ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ (ТЕХНИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)»

На правах рукописи

САГАЙДАК
Александра

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ ПРЕОДОЛЕНИЯ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК, ОБУСЛОВЛЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ ABC-ТРАНСПОРТЕРОВ

1.5.4. Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук,
старший научный сотрудник
НИЛ «Клеточная биотехнология» СПбГТИ(ТУ)
Новикова Дарья Сергеевна

Санкт-Петербург
2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность

По данным ВОЗ, в настоящее время наблюдается тенденция увеличения числа раковых заболеваний. Только в 2022 году было зафиксировано более 600 тысяч новых случаев заболеваний, среди которых рак легких, молочной железы и колоректальный рак оказались наиболее распространенными [1]. При этом химиотерапия является основным, а при некоторых формах и стадиях рака единственным методом лечения. В то же время использование химиотерапии становится причиной развития резистентности опухолей, приводящей к неэффективности используемого метода лечения. Зачастую смена препарата в таком случае не приводит к положительным результатам ввиду того, что опухоль оказывается невосприимчивой также и к другим химиотерапевтическим агентам иного механизма действия. Это явление называется множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) [2]. Для пациентов с резистентными опухолями остается только паллиативная терапия, поэтому возможность преодоления резистентности становится жизненно важной при лечении онкологических больных [3].

В основе резистентности опухолевых клеток могут лежать различные механизмы адаптации к химиотерапевтическим препаратам [4]. Наиболее распространенным и универсальным механизмом резистентности является повышенный эффлюкс, обусловленный действием белков-транспортеров семейства ABC [5]. В здоровых клетках функционирование ABC-транспортеров обеспечивает выброс нежелательных низкомолекулярных соединений, таких как метаболиты и ксенобиотики [6]. В опухолевых клетках экспрессия белков-транспортеров не только изначально высока, но и продолжает повышаться в ответ на действие химиотерапии, обеспечивая развитие резистентности [7].

Один из способов преодоления ABC-транспортер-обусловленной химиорезистентности заключается в снижении функциональной активности транспортных белков, что позволяет дольше удерживать противоопухолевые препараты в клетках, тем самым повышая их эффективность. Существующие подходы к блокированию транспорта за счет ABC-транспортеров, в основе которых лежит как прямое ингибирование этих белков, так и опосредованное воздействие на них через сигнальные пути, регулирующие их экспрессию, обладают серьезными недостатками и оказываются малоэффективными в клинических испытаниях [8]. В связи с этим поиск новых подходов к преодолению ABC-транспортер-опосредованной устойчивости опухолевых клеток остается актуальным.

Степень разработанности темы

Поиск подходов к преодолению ABC-транспортер-опосредованной лекарственной устойчивости опухолевых клеток предполагает использование клеточных моделей, которые релевантно воспроизводят механизмы резистентности нативных опухолей. Клеточные модели находят широкое применение для изучения механизмов формирования химиорезистентности клеток. На данный момент выведено достаточно большое количество клеточных линий с ABC-транспортер-опосредованной резистентностью к противоопухолевым препаратам различного механизма действия, в том числе на основе одного из самых распространенных видов рака – аденокарциномы толстой кишки человека [9, 10]. Однако о создании моделей, отражающих процесс развития резистентности к таксолу, одному из наиболее используемых противораковых препаратов, входящему в список ЖНВЛП, до сих пор не сообщалось.

В подавляющем большинстве исследований ABC-транспортер-опосредованная химиорезистентность связывается с гиперэкспрессией лишь

одного из транспортных белков. В связи с этим демонстрируется увеличение чувствительности клеток к лекарственному препарату при ингибировании конкретного ABC-транспортера [11]. В то же время ABC-транспортеры характеризуются широкой перекрывающейся субстратной специфичностью и, обладая высокой структурной гомологией, могут функционировать сообща при развитии резистентности [12].

На данный момент не существует единого подхода к преодолению ABC-транспортер-опосредованной резистентности опухолевых клеток, как и общепризнанного определения низкомолекулярных ингибиторов белков-транспортеров. Единственное условие, позволяющее приписать соединению ABC-транспортер ингибирующую активность, это способность снижать выброс ксенобиотиков из клетки [13]. Множество природных и синтезированных соединений, а также уже известных препаратов было исследовано на предмет проявления ими свойств по снижению выброса противоопухолевых агентов [14–17]. В настоящее время создано три поколения ингибиторов транспортеров прямого действия, применение которых заметно снижало эффлюкс химиотерапевтических препаратов на стадии доклинических и клинических исследований, однако ни одно из рассматриваемых соединений не смогло проявить достаточной эффективности и успешно пройти клинические испытания°[8].

Цель и задачи

Целью работы являлась разработка перспективных подходов к таргетированию опухолей с ABC-транспортер-опосредованной резистентностью. Для достижения поставленной цели был сформулирован ряд задач:

- создать клеточные модели с разной степенью устойчивости к противоопухолевому препарату таксолу, используемому в клинической практике;

- оценить вклад белков семейства ABC в формирование резистентных характеристик полученных клеточных моделей;

- определить профиль лекарственной устойчивости резистентных моделей с использованием препаратов, отличающихся по механизму противоопухолевого действия;

- обосновать возможность использования таргетных противоопухолевых агентов для преодоления ABC-транспортер-опосредованной резистентности;

- подтвердить возможность применения АТФ-подобных соединений для сенсибилизации резистентных моделей.

Положения, выносимые на защиту

1. Стабильная резистентность клеточных моделей аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 к таксолу обусловлена повышенной экспрессией двух транспортеров семейства ABC – P-gp и BCRP.

2. Развитие резистентности клеток HCT116 к таксолу приводит к формированию клеточного фенотипа множественной лекарственной устойчивости.

3. Ингибиторы MDM2 не стимулируют развитие ABC-транспортер-опосредованной устойчивости, способствуют подавлению активности транспортеров и восстановлению чувствительности клеток HCT116 к противоопухолевым препаратам.

4. Комбинированное применение препаратов с АТФ-подобными соединениями представляет собой стратегию по преодолению лекарственной устойчивости клеток, обусловленной активностью ABC-транспортеров.

Методология и методы исследования

Методологической базой исследования являлись отечественные и зарубежные работы, посвященные изучению АВС-транспортер-опосредованной устойчивости опухолевых клеток к лекарственным препаратам и способам ее преодоления. В работе использовали современные методы клеточной и молекулярной биологии и молекулярной фармакологии, адекватные поставленным задачам.

Выведение клеточных моделей, устойчивых к цитостатику таксолу, осуществляли посредством рутинного культивирования клеток HCT116 дикого типа в присутствии таксола. Уровни экспрессии генов белков-транспортеров семейства АВС в клетках, устойчивых к противоопухолевому соединению, оценивали методом ОТ-ПЦР РВ, уровни экспрессии АВС-транспортеров изучали методом иммуноцитохимии и вестерн-блот анализа, транспортную активность АВС-белков в клетках оценивали по накоплению клетками красителей родамина 123 (R123) и hoechst 33342. Развитие лекарственной устойчивости выведенных клеточных моделей оценивали по их выживаемости в присутствии противоопухолевых препаратов методом МТТ-теста.

Влияние потенциальных ингибиторов на активность АВС-транспортеров определяли по накоплению химиорезистентными клетками красителя R123 и hoechst 33342. Влияние потенциальных ингибиторов на АТФазную активность АВС-транспортеров исследовали методом люминесцентного анализа с использованием рекомбинантного P-gp. Способность соединений восстанавливать чувствительность химиорезистентных моделей к противоопухолевому препарату оценивали методом МТТ-теста. Оценка воздействия ингибиторов MDM2 на экспрессию генов АВС-транспортеров в клетках проведена по результатам долгосрочной обработки клеток нутлином-3а с последующим проведением ОТ-ПЦР РВ и иммуноцитохимического анализа.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных методов исследования, проведением экспериментов в трех повторностях, а также корректным статистическим анализом полученных результатов.

Научная новизна

В ходе работы впервые получены и охарактеризованы химиорезистентные клеточные линии аденокарциномы толстой кишки человека HCT116, устойчивые к различным концентрациям цитостатика таксола в диапазоне от 10 нМ до 2,3 мкМ. Показано, что резистентность полученных клеточных моделей обусловлена гиперэкспрессией двух транспортеров семейства ABC – P-gp и BCRP. Отмечено, что использование таксола приводит к развитию множественной лекарственной устойчивости к химиотерапевтическим агентам другого механизма действия, в том числе ингибиторам MDM2, ингибиторам протеасом, а также топоизомеразы II. Полученные результаты согласуются с литературными данными о развитии ABC-транспортер-опосредованной устойчивости опухолевых клеток предстательной железы в ответ на терапию таксолом, которая сопровождается формированием множественной лекарственной устойчивости [7].

Проведено комплексное исследование способности таргетных противоопухолевых препаратов (ингибиторов MDM2) подавлять ABC-опосредованный эффлюкс химиотерапевтических агентов. Показано, что ингибиторы MDM2 являются безопасными с точки зрения развития ABC-транспортер-опосредованной резистентности опухолевых клеток. Использование ингибиторов MDM2 является перспективным подходом для снижения активности ABC-белков и преодоления резистентности опухолевых клеток.

На основании полученных результатов предложен новый подход к преодолению ABC-транспортер-опосредованной резистентности и подавлению выброса противоопухолевых препаратов из клеток за счет применения препарата совместно с АТФ-подобными соединениями. Подтвержден механизм подавления АТФазной активности транспортеров за счет взаимодействия АТФ-подобных соединений с нуклеотид-связывающим доменом транспортных белков. Применение АТФ-подобных соединений предотвращает связывание АТФ и его гидролиз, что снижает активность ABC-транспортеров, требующую затрат энергии, и, соответственно, предотвращает эффлюкс противоопухолевых препаратов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Получение химиорезистентных клеточных моделей аденокарциномы толстой кишки человека является важным шагом для понимания механизмов формирования устойчивости опухолевых клеток к широко используемым противоопухолевым препаратам. Разработанные резистентные модели могут быть использованы как для оценки ABC-транспортер ингибирующей активности уже известных лекарств и новых соединений, так и для исследования процессов, протекающих при длительном применении цитостатических препаратов.

Продемонстрированная в работе способность таргетных противоопухолевых агентов снижать активность ABC-транспортеров позволяет рассматривать ингибиторы MDM2 в качестве соединений, позволяющих преодолеть ABC-транспортер-опосредованную множественную лекарственную устойчивость клеток аденокарциномы толстой кишки человека. Структурные особенности рассмотренных ингибиторов MDM2 могут быть положены в основу создания новых ингибиторов ABC-транспортеров.

Предложенная стратегия по преодолению лекарственной устойчивости, обусловленной активностью ABC-транспортеров, на основе совместного приема

препарата и АТФ-подобного соединения может быть использована не только для преодоления химиорезистентности опухолей к таксолу, но и к препаратам иного механизма действия. При этом рибавирин, уже используемый в клинической практике как противовирусный препарат, может быть в кратчайшие сроки перепрофилирован для применения в контексте терапии раковых заболеваний.

Использованные в работе методы могут быть применены для изучения формирования ABC-транспортер-опосредованной резистентности опухолевых клеток в результате использования других противоопухолевых препаратов, а также для определения способности соединений ингибировать ABC-транспортеры и восстанавливать чувствительность опухолевых клеток к химиотерапевтическим соединениям. Полученные при этом сведения обеспечат успешную терапию злокачественных новообразований.

Апробация результатов

Основные результаты диссертационной работы представлены на XXVII Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2020), VI Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии. МОБИ-ХИМФАРМА 2020» (Нижний Новгород, 2020), XI Научной конференции «Традиции и Инновации» (Санкт-Петербург, 2020), XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021» (Санкт-Петербург, 2021), XII International conference on chemistry for young scientists “Mendeleev 2021” (Санкт-Петербург, 2021), Научной конференции для молодых ученых «LifeSciencePolytech» (Санкт-Петербург, 2021), VI Всероссийской конференции по молекулярной онкологии (Москва, 2021), XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2022), Всероссийской научно-практической конференции им. Жореса Алферова (Санкт-

Петербург, 2022), VIII Молодёжной школе-конференции по молекулярной биологии и генетическим технологиям Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2022), VIII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии. МОБИ-ХИМФАРМА 2023» (Санкт-Петербург, 2023), XIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2023).

Четыре доклада отмечены дипломами I–III степени.

Публикации по результатам исследования

По теме диссертации опубликовано 49 работ, 12 из которых представлены в рецензируемых научных журналах (8 статей входят в международные базы данных Web of Science и Scopus, 4 статьи – в перечень рецензируемых научных изданий ВАК), а 37 публикаций – в трудах всероссийских и международных научных конференций.

Личный вклад автора

Работа выполнена на базе НИЛ «Молекулярная фармакология» СПбГТИ(ТУ) в период с 2019 по 2024 год. Лично автором или при его непосредственном участии были выполнены все ключевые теоретические и экспериментальные исследования – изучение современного состояния темы исследования, постановка цели и задач исследования, планирование и проведение экспериментов, анализ полученных результатов, написание статей, апробация результатов исследования.

Объем и структура работы

Научно-исследовательская работа изложена на 144 страницах, содержит 13 таблиц и 31 рисунок. Диссертация включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты и обсуждение, заключение, список сокращений и условных обозначений, список литературы. Список литературы включает 180 источников.

Финансирование

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-33-70250) и Российского научного фонда (гранты №°19-73-10150 и № 23-13-00344).

Благодарности

Автор безмерно благодарит своего научного руководителя, к.х.н. Новикову Дарью Сергеевну, за всестороннюю помощь, терпение, внимание и интерес к работе, ценные рекомендации и замечания.

Автор выражает глубокую благодарность с.н.с. лаборатории НИЛ «Молекулярная фармакология», к.х.н. Григорьевой Татьяне Алексеевне, за помощь с выбором темы исследования, участие в постановке задач и планировании экспериментов, а также в интерпретации результатов.

Автор выражает особую благодарность руководителю научно-исследовательской лаборатории «Молекулярная фармакология» СПбГТИ (ТУ) – к.х.н. Трибуловичу Вячеславу Генриховичу – за предоставленную возможность выполнения работы в стенах лаборатории, внимательное руководство, ценные дискуссии и полезные замечания.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Проблемы химиотерапии раковых заболеваний

Статистика и методы лечения раковых заболеваний

Будучи причиной каждой шестой смерти по всему миру рак является серьезной социальной проблемой, проблемой общественного здравоохранения и экономической проблемой XXI века. Согласно оценкам Международного агентства по изучению рака (МАИР), в 2022 году было зарегистрировано около 20 миллионов новых случаев рака, а также 9,7 миллиона смертей от него. Почти половина всех случаев была зарегистрирована в Азии, где проживает 59,2% мирового населения. Уровень смертности от рака в африканском и азиатском регионах существенно выше, чем в других регионах. Основными причинами столь неблагоприятного соотношения являются поздняя диагностика злокачественных новообразований и недоступность качественной противоопухолевой терапии [18, 19].

Наиболее часто диагностируемым видом злокачественного новообразования во всем мире является рак легких (12,4% от общего числа новых случаев рака), за ним следуют: рак молочной железы (11,6%), толстой кишки (9,6%), предстательной железы (7,3%) и желудка (4,9%). Рак легких одновременно является основной причиной смертности населения от опухолевых заболеваний (18,7% от общего числа случаев смерти от рака), затем идут: рак толстой кишки (9,3%), печени (7,8%), молочной железы (6,9%) и желудка (6,8%) [18]. В то же время, наиболее часто диагностируемым раком у женщин, одновременно представляющим собой основную причину смерти, является рак молочной железы, в случае мужчин – рак легких. Считается, что рак легких занимает лидирующие позиции в распространенности и причинах смертности из-за укоренившейся привычки употребления табака [19].

Предполагается, что в 2050 году число новых случаев рака достигнет 35 миллионов, что на 75% больше показателя, зафиксированного в 2020 году. Ключевым фактором, определяющим масштабы заболеваемости раком, является демографический переход, характеризующийся низкой рождаемостью и низкой смертностью. Поэтому ожидается, что наиболее высокие показатели заболеваемости раком будут наблюдаться в странах с высоким уровнем и качеством жизни [18]. При этом наличие ресурсов для диагностики раковых заболеваний и борьбы с ними будет предопределять уровень смертности населения [19].

Терапия злокачественных заболеваний не ограничивается одним определенным методом лечения. В зависимости от типа и стадии рака могут использоваться химиотерапия, хирургическое вмешательство, лучевая терапия, гормональная терапия и иммунотерапия. Для достижения максимальной эффективности терапии раковых заболеваний может использоваться комбинация обозначенных методов лечения. При этом основополагающая цель терапии опухолей – полная ликвидация раковых тканей без причинения вреда здоровым тканям. В случаях, когда полное уничтожение опухоли невозможно, преследуется цель подавления рака до субклинического состояния с последующим поддержанием состояния пациента, позволяющего вести нормальный образ жизни°[20].

При локализованных раковых заболеваниях и небольших размерах опухолей применяют метод хирургического лечения. Хирургическим вмешательством удаляются опухолевые ткани, которым не свойственно метастазирование. Удаление метастазирущих тканей приводит к разрастанию опухоли и ее проникновению в здоровые органы и ткани [21]. Полное удаление опухолевых клеток хирургическим методом практически невозможно, поэтому, как правило, хирургическое удаление опухолевых тканей комбинируют с другими методами терапии опухолей. Даже наличие одной раковой клетки в оперируемой ткани может привести к формированию нового очага ракового заболевания.

Проведение биопсии раковой ткани обязательно для понимания стадии рака и дальнейшей схемы лечения [22].

Применение химиотерапевтических средств позволяет остановить рост опухолевых клеток или обеспечить их уничтожение. Неизбежным побочным эффектом химиотерапии является одновременное токсическое воздействие на здоровые клетки организма. Несмотря на высокую эффективность химиотерапии, применение данного метода лечения раковых заболеваний в большинстве случаев влечет за собой развитие лекарственной устойчивости опухолей. В рамках курса химиотерапии могут применяться до нескольких препаратов одновременно, что позволяет увеличить эффективность терапии и снизить ее токсичность [20].

При терапии раковых заболеваний также применяется лучевая терапия опухолей. Лучевая терапия подразумевает повреждение ДНК клеток непосредственным ионизирующим излучением или свободными радикалами, образующихся в клетках в результате лучевой обработки. Лучевая терапия позволяет уменьшить размеры опухоли или полностью ее ликвидировать. Как и в случае химиотерапии, лучевая терапия может повреждать здоровые клетки и приводить к негативным последствиям, связанным с воздействием ионизирующим облучением [23]. Метод лучевой терапии, как правило, не применяется для лечения раковых заболеваний у детей из-за более высокой чувствительности организма [20].

Эффективным решением для терапии опухолей, рост и развитие которых зависит от гормонов, является гормонотерапия. Гормонотерапия активным образом используется для лечения опухолей молочной железы, предстательной железы, репродуктивной системы. Используемые при гормонотерапии препараты обеспечивают нарушение связывания гормонов с их клеточными рецепторами, ингибирование выработки гормонов, а также деградацию рецепторов гормонов. Несмотря на вероятные побочные эффекты от терапии в виде нарушения функциональности органов, гормонотерапия позволяет снизить рецидивы заболеваний и смертность пациентов [24].

Терапия раковых заболеваний также возможна посредством активации естественных механизмов защиты организма, способных идентифицировать раковые клетки и убить их. В рамках иммунотерапии опухолей используются антитела, способные блокировать иммуносупрессивные молекулы, активирующиеся при раковых заболеваниях и ограничивающие активацию Т-клеток. Кроме того, рассматривается введение предварительно активированных эффекторных клеток или специальных клеточных конструкций, способных активировать эффекторные клетки организма. Иммунотерапия отмечается как перспективный метод надежного уничтожения раковых клеток, однако ее использование часто сопряжено с возникновением аутоиммунных расстройств°[25].

Химиотерапевтические препараты и развитие резистентности

Несмотря на существование различных методов борьбы с раковыми заболеваниями, чаще всего применяется химиотерапевтическая стратегия. Широко используемые химиотерапевтические препараты можно разделить на два класса в зависимости от их происхождения. Они могут быть либо природного происхождения (экстрагироваться из растений), либо синтетического. В зависимости от механизма действия препараты подразделяют на алкилирующие агенты, антиметаболиты, ингибиторы топоизомеразы, ингибиторы митотического веретена и другие (Таблица 1).

Химиотерапевтические препараты алкилирующего ряда переносят алкильные группы на остатки гуанина ДНК, что приводит к образованию аддуктов ДНК, поперечных связей, разрывов цепей ДНК. Это становится причиной нарушения репликации ДНК и, в конечном итоге, клеточной гибели. Противоопухолевые препараты, относящиеся к антиметаболитам, обеспечивают гибель опухолевых клеток посредством нарушения синтеза ДНК и РНК,

обеспечения формирования разрывов цепей ДНК или включения в нее ложных структурных аналогов пиримидинов и пуринов.

Таблица 1 – Классификация химиотерапевтических препаратов в зависимости от их механизма действия

Группа	**Химиотерапевтические препараты**
Алкилирующие агенты	
Гидразин	Темозоломид
Оксазафосфорины	Циклофосфамид, ифосфамид
Азотистые иприты	Бусульфан, хлорамбуцил, мелфалан
Агенты на основе платины	Цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин
Антиметаболиты	
Аналоги пурина	6-меркаптопурин, азатиоприн, кладрибин
Антагонисты пурина	Флударабин
Антагонисты пиримидина	Цитарабин, 5-фторурацил, гемцитабин, капецитабин
Антифолаты	Метотрексат, пеметрексед, пралатрексат
Ингибиторы рибонуклеотид редуктазы	Гидроксимочевина
Ингибиторы топоизомеразы	
Ингибиторы топоизомеразы I	Иринотекан, топотекан
Ингибиторы топоизомеразы II	Этопозид, тенипозид, идарубицин, даунорубицин, доксорубицин
Ингибиторы митотического кинеза	
Таксаны	Доцетаксел, паклитаксел
Алкалоиды барвинка	Винкристин, винбластин
Другие	
Ферменты	L-аспарагиназа
Антибиотики	Блеомицин, актиномицин Д
Ингибиторы протеасом	Бортезомиб
Ингибиторы тирозинкиназы	Иматиниб и эрлотиниб

Ингибиторы топоизомераз, в свою очередь, подавляют активность топоизомераз, которые участвуют в процессах репликации ДНК, а также вызывают разрывы цепей ДНК. Нарушение структуры ДНК обеспечивает активацию апоптоза опухолевых клеток. Ингибиторы митотического кинеза обеспечивают остановку митоза опухолевых клеток посредством взаимодействия с тубулином. Связывание алкалоидов барвинка и таксанов с тубулином нарушает процесс формирования веретена деления и его дальнейшее функционирование, что делает невозможным процесс деления опухолевых клеток и приводит к их гибели.

Другие химиотерапевтические препараты характеризуются неоднородными механизмами действия. В то время как L-аспарагиназа расщепляет аминокислоту L-аспарагин, необходимую для нормального клеточного метаболизма, бортезомиб приводит клетку к апоптотической гибели путем ингибирования деградации проапоптотических белков. Иматиниб и эрлотиниб ингибируют активность тирозинкиназы, участвующей во множестве внутриклеточных путей, связанных с рецепторно-опосредованной сигнализацией роста, что приводит к клеточной дисфункции и последующей гибели клеток. Действие антибиотика блеомицина становится причиной образования свободных радикалов, вызывающих повреждение ДНК и приводящих к остановке клеточного цикла в фазе G2 с последующей гибелью опухолевых клеток. Актиномицин D, в свою очередь, непосредственно интеркалирует в ДНК и нарушает транскрипцию ДНК [4].

Применение противоопухолевых препаратов является основным, а при некоторых формах и стадиях онкологии единственным методом лечения гиперпролиферативных заболеваний. Частым следствием взаимодействия химиотерапевтического препарата с опухолевыми клетками является гибель высокочувствительных клеток и выживание клеток с определенным набором свойств, обеспечивающих защиту от действия противоопухолевого препарата. Совокупность генотипических и фенотипических особенностей выживших опухолевых клеток влияет на дальнейшее развитие клеточной устойчивости, в

лучшем случае, к используемому терапевтическому агенту, в худшем – к широкому ряду противоопухолевых препаратов [26, 27].

Резистентность опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам может быть перекрестной или множественной. Перекрестная резистентность отмечается в том случае, если приобретенная резистентность опухолевых клеток, вызванная медикаментозным лечением, приводит к резистентности к другим лекарственным средствам со схожей структурой или действием [28]. Это может произойти при последовательном введении препаратов с перекрывающимися механизмами действия, например, ингибиторов тирозинкиназы HER2 трастузумаба и эмтанзина при лечении опухоли молочной железы. При этом использование трастузумаба на первом этапе лечения обеспечивает устойчивость опухоли к эмтанзину, препарату второй линии [29]. В случае длительного воздействия цисплатина на мышиные модели немелкоклеточного рака легких вырабатывается перекрестная устойчивость клеток к иным представителям класса препаратов на основе платины [30].

Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток, в свою очередь, означает устойчивость клеток к химиотерапевтическим препаратам, обладающих различной структурой и механизмами противоопухолевого действия [28]. Развитие множественной лекарственной устойчивости можно продемонстрировать на примере клеточных моделей аденокарциномы толстой кишки человека, устойчивых к классическому представителю химиотерапии – цитостатику таксолу. Выработанная устойчивость к препарату первоначальной обработки клеток привела к формированию устойчивости клеток к ингибитору MDM2 нутлину-3а и ингибитору протеасом Mg132, которые обладают различными механизмами действия [2].

Химиорезистентность, в том числе множественная лекарственная устойчивость, опухолевых клеток является основной причиной снижения эффективности терапии онкологических заболеваний и развития рецидивов и метастазов опухоли на различных стадиях лечения. Для пациента это означает,

что для него возможна лишь паллиативная терапия при смертельном исходе в более чем 90% случаев зрелых опухолей [3, 31, 32].

Механизмы формирования резистентности

В результате воздействия противоопухолевого препарата на раковые клетки может вырабатываться как один защитный механизм, так и сразу несколько, способствуя формированию комплексной защиты клеток. Резистентность опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам может быть обусловлена различными клеточными механизмами, связанными с повышенной репарацией ДНК, генетическим регулированием различных молекулярных путей, повышенными метаболизмом противоопухолевых препаратов и их эффлюксом [4].

Обработка клеток меланомы человека алкилирующим химиотерапевтическим препаратом цисплатином приводит к повышенной экспрессией эндонуклеазы репарации ДНК XPF и белка репарации ДНК ERCC-1, необходимых для процесса репарации. Репарация ДНК опухолевых клеток, поврежденной в результате химиотерапевтической обработки, позволяет миновать клеточную гибель и обеспечить их выживание [33].

Дополнительным механизмом устранения повреждений ДНК является ее гомологичная рекомбинация. Важным участником гомологичной рекомбинации ДНК является репликационный белок А, связывание которого с поврежденной ДНК обеспечивает остановку репликации в контрольных точках с последующей починкой ДНК. Воздействие цисплатина на клетки эпителиального рака яичников и немелкоклеточного рака легких приводит к формированию устойчивости к препарату, которая связана с повышенной экспрессией репликационного белка А. Это обеспечивает восстановление структуры ДНК клеток, их деление и дальнейшее развитие [34]. В клетках рака молочной железы, устойчивой к цисплатину, отмечалась повышенная экспрессия ДНК-зависимой протеинкиназы,

принимающей участие в восстановлении двухцепочечных разрывов ДНК [35]. Таким образом, в результате обработки опухолевых клеток химиотерапевтическими препаратами, действующими по принципу повреждения ДНК клеток, активируется большое множество механизмов, направленных на восстановление структуры ДНК с целью обеспечения дальнейшей жизни клеток.

В качестве генетического ответа на воздействие противоопухолевого препарата рассматриваются мутации генов, нарушения в их амплификации, эпигенетические изменения для регуляции генов, являющихся мишенями противоопухолевых препаратов или играющих важную роль в развитии или гибели опухолевых клеток. В химиорезистентных опухолевых клетках часто наблюдаются мутации гена белка p53. Белок p53 отвечает за стабильность генома и клеточный гомеостаз, регулирует клеточный цикл, вызывая остановку в фазе G1 для устранения генотоксического стресса, в противном же случае наступает апоптоз. Миссенс-мутации в гене *TP53* сводят на нет защитную роль белка p53 в опухолевых клетках, обеспечивая нечувствительность клеток к действию p53-направленных препаратов, а также рост и развитие клеток с нарушениями в структуре ДНК [4]. В опухолевых клетках миелоидного лейкоза отмечается повышенная экспрессия химерной тирозинкиназы BCR-ABL, которая отвечает за развитие онкогенных свойств клеток. Клиническое применение ингибитора тирозинкиназы иматиниба оборачивается мутацией участка связывания препарата с белком и формированию устойчивости к действию препарата [36].

Кроме регулирования действия противоопухолевого препарата на раковые клетки посредством различного рода мутаций генов, имеет место контроль амплификации генов, кодирующих белки-мишени при химиотерапии. Повышенная экспрессия гена фермента дигидрофолатредуктазы, участвующего в пролиферации клеток, позволяет нивелировать воздействие антиметаболита метотрексата на лейкозные клетки [4].

Отмечается важная роль эпигенетических изменений в раковых клетках, обеспечивающих формирование устойчивости к противоопухолевым препаратам. В процессе онкогенеза эпигеном претерпевает многочисленные изменения,

включая потерю метилирования ДНК по всему геному, региональное гиперметилирование, глобальные изменения в маркерах модификации гистонов, а также изменения экспрессии микроРНК. Гиперметилирование генов супрессоров опухолей или гипометилирование онкогенов позволяет сформировать определенную устойчивость опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам. Несмотря на то, что микроРНК не способны кодировать какие-либо белки, они влияют на регуляцию экспрессии генов путем посттранскрипционных модификаций [4].

Действие противоопухолевого препарата на клетку становится причиной активации метаболизма лекарственного препарата. Таким образом, клетка стремится нейтрализовать негативное воздействие препарата. В метаболизме соединений участвуют различные изоформы цитохрома, а также глутатион-S-трансферазы, гамма-глутамилтрансфераза, уридинфосфат-глюкуронозилтрансферазы, тиопурин метилтрансферазы и дигидропиримидиндегидрогеназы. Интенсивная экспрессия изоформы цитохрома CYP1B1 наблюдалась в различных типах раковых клеток в ответ на обработку митоксантроном, доцетакселом и паклитакселом, обеспечивая устойчивость клеток при действии препаратов [37]. При этом устойчивость тканей молочной железы к препаратам различного механизма действия – ифосфамиду и фторурацилу – была сформирована на фоне повышенной экспрессии иного фермента – CYP2A6 [38].

Снижение лекарственной нагрузки на опухолевые клетки также происходит за счет усиленного оттока препаратов из клеток в ответ на химиотерапию. Основными белками, задействованными в выбросе противоопухолевых соединений из клеток, являются белки семейства ABC – P-гликопротеин (P-gp), белок устойчивости рака молочной железы (BCRP), а также белок множественной лекарственной устойчивости (MRP1) [4]. ABC-транспортеры обладают широкой субстратной специфичностью, что приводит к интенсивному неселективному выбросу противоопухолевых препаратов из клеток. Поэтому функционирование

ABC-белков связывают с резистентностью опухолевых клеток сразу к нескольким лекарственным препаратам, в том числе различного механизма действия [27, 39].

Отмечается, что на устойчивость опухолей к химиотерапии заметно влияет повышенная продукция интерлейкинов IL-1, IL-4, IL-6 и IL-8, а также факторов роста опухолей. Острое воспаление способствует уничтожению опухоли, однако хронический иммунный ответ приводит к росту опухоли и устойчивости к терапии [4]. В крови пациентов с раком молочной железы, характеризующимся множественной лекарственной устойчивостью, обнаружена повышенная экспрессия IL-6, чего нет в крови пациентов с раком, чувствительным к терапии. Экспрессия гена IL-6 в клетках рака молочной железы повышает их устойчивость к медикаментозному лечению за счет активации семейства транскрипционных факторов, обеспечивающих индукцию экспрессии гена P-gp [40]. Важным фактором развития химиорезистентности клеток рака яичников является повышенная экспрессия IL-6, приводящая к резистентности к цисплатину и паклитакселу. Химиорезистентность раковых клеток обусловлена участием IL-6 в индукции экспрессии P-gp, а также белков, ингибирующих апоптоз (Bcl-2, Bcl-xL и XIAP) [41]. При раке легких имеет место влияние различных факторов роста фибробластов опухоли на пролиферацию опухоли и формирование устойчивости клеток к химиотерапии. Факторы роста опухоли легких активируют путь MAPK, способствуя тем самым пролиферации клеток и снижению чувствительности клеток к эрлотинибу посредством ингибирования апоптоза [42].

Транспортные белки семейства ABC

Строение и функции ABC-транспортеров

Транспортеры семейства ABC широко представлены во всех организмах, начиная с бактерий и заканчивая приматами. Геном человека содержит 49 генов, кодирующих ABC-белки, организованных в 7 подсемейств, обозначаемых ABCA-

ABCG в соответствии со сходством их аминокислотных последовательностей и доменной организацией. ABC-переносчики играют важную роль в регулировании импорта и экспорта веществ через плазматические мембраны. У человека функционирование данных белков обычно предполагает отток молекул из клетки во внеклеточную жидкость.

Представители семейства ABC формируют АТФ-зависимые трехмерные структуры в мембранах клеток и органелл. Структура ABC-транспортеров отличается высокой консервативностью как между видами, так и в пределах одного вида. Типичная структура ABC-транспортеров предполагает два связанных с мембраной трансмембранных домена (ТМД) и два внутриклеточных нуклеотид-связывающих домена (НСД) (Рисунок 1).

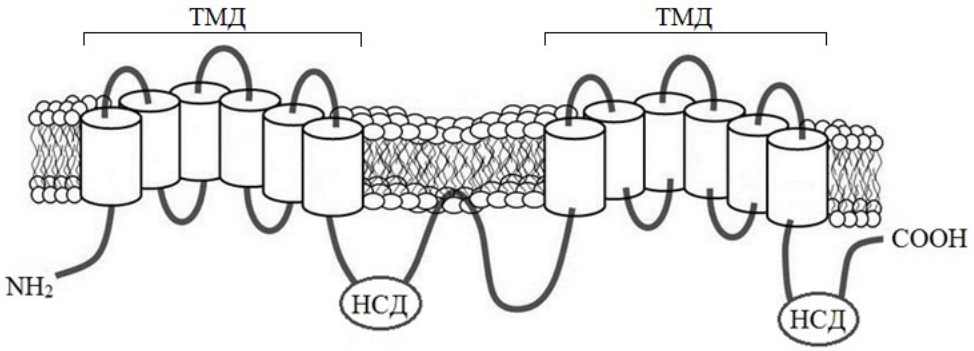


Рисунок 1 – Общая структура ABC-транспортеров на примере структуры белка ABCB1 (P-gp).

Трансмембранный домен чаще всего состоит из 6 α-спиралей, соединенных внутри- и внеклеточными петлями. ТМД формируют транслокационный канал для связывания широкого спектра соединений и последующего их транспорта. После связывания с субстратом ТМД претерпевают конформационные изменения, позволяющие связанной молекуле проходить через мембрану. Конформационные изменения ТМД требуют затрата энергии, которая обеспечивается функционированием нуклеотид-связывающих доменов [6].

Каждый НСД содержит мотив Walker-A (P-петля), который связывается с фосфатными группами АТФ. Кроме того, каждый НСД также содержит мотив,

специфичный для семейства ABC-транспортеров, высококонсервативную аминокислотную последовательность LSGGQ. С белком одновременно связываются две молекулы АТФ, каждая из которых располагается между АТФ-связывающим мотивом одного НСД и ABC-транспортер-специфическим мотивом другого НСД. Связывание субстрата с ТМД провоцирует гидролиз АТФ, в результате чего высвободившаяся энергия расходуется на обеспечение конформационной подвижности ТМД, обеспечивая смену состояния белка с «открыто внутрь» на «открыто наружу». При этом сродство субстрата с ТМД снижается и осуществляется транслокация субстрата во внеклеточное пространство (Рисунок 2) [43, 44].

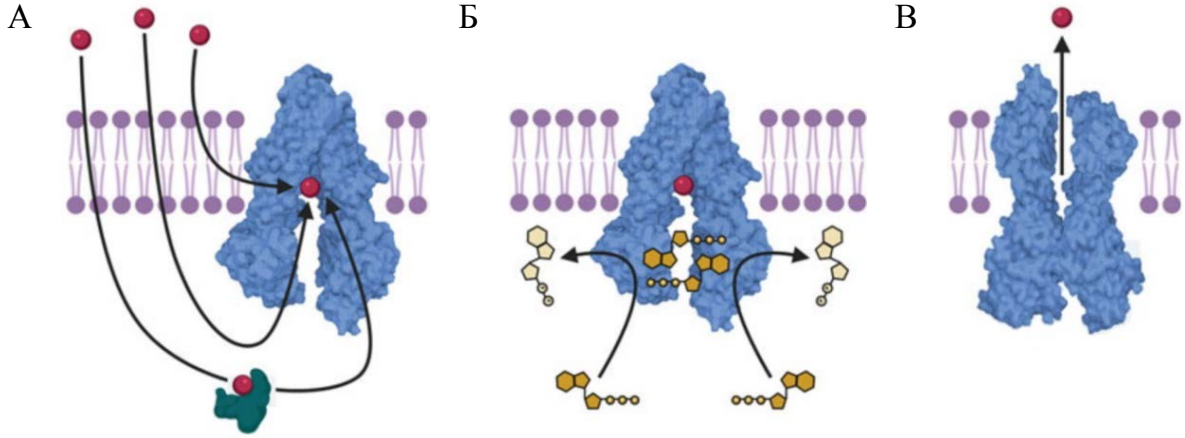


Рисунок 2 – АТФ-зависимый транспорт молекулы субстрата ABC-транспортерами: А – связывание молекулы с ТМД белка непосредственно после попадания в клетку или после метаболизма; Б – гидролиз связанных с НСД молекул АТФ; В – использование высвободившейся энергии для конформационных перестроек ТМД и выброса молекулы из клетки.

Несмотря на большое сходство в строении ABC-транспортеров, существуют определенные различия, которые отличают одних представителей семейства ABC от других. На примере транспортера ABCC1 (MRP1) можно выделить структурную специфику некоторых транспортеров подсемейства ABCC. Данные белки состоят из трех ТМД, при этом третий ТМД имеет всего пять α-спиралей. Этот дополнительный домен с нечетным числом спиралей определяет

внеклеточное расположение N-конца домена, в то время как остальным белкам свойственно внутриклеточное расположение обоих N- и С-концов ТМД. Внеклеточные петли между ТМД белков часто гликозилируются в положениях, специфичных для данного типа транспортера. Для некоторых транспортеров, таких как ABCA1, внеклеточные петли между спиралями ТМД удлиняются, образуя большие внеклеточные белковые домены.

Кроме того, существуют транспортеры, которые не содержат всех структурных компонентов, необходимых для осуществления транспорта молекул, в рамках одной непрерывной аминокислотной цепи. Примером такого транспортера может быть белок ABCG2 (BCRP). НСД ABCG2 располагается между N-концом и ТМД, когда в случае других переносчиков НСД находится между двумя ТМД или ТМД и С-концом белков. Данный белок характеризуется как полутранспортер, содержащий только один ТМД и один НСД. Для функциональной активности белка необходима его димеризация с участием двух ABCG2 белков. Описанные структурные особенности АВС-белков представлены на Рисунке 3.

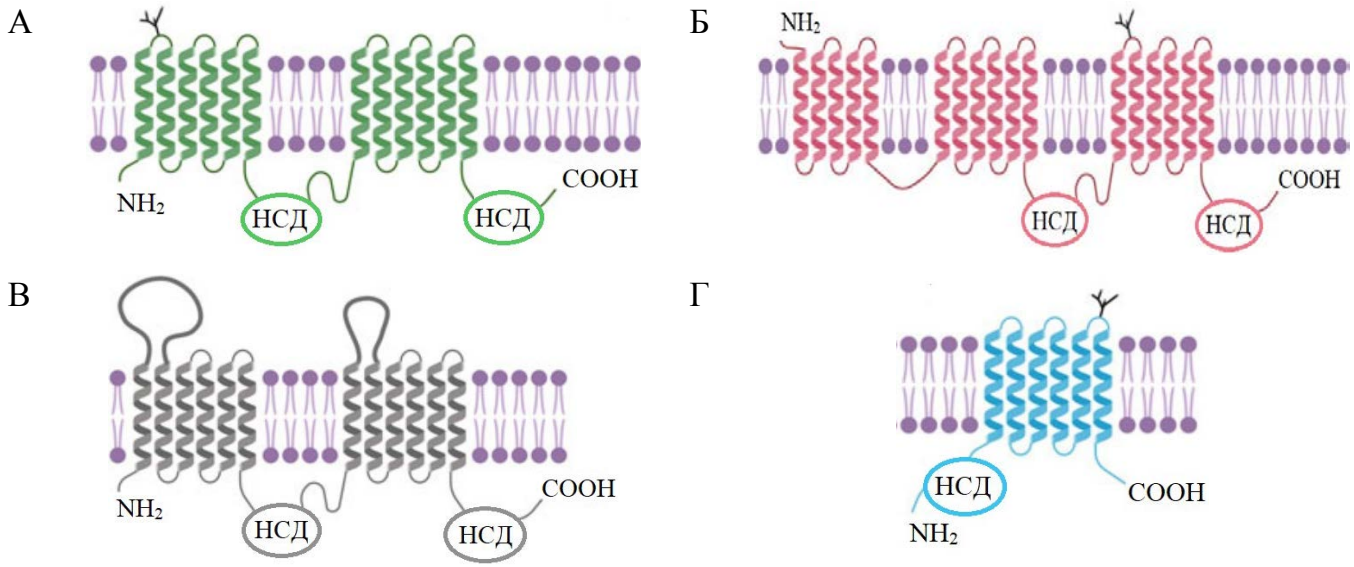


Рисунок 3 – Структурные особенности АВС-транспортеров: А – ABCB1 (P-gp) транспортер; Б – ABCC1 (MRP1) транспортер; В – ABCA1 транспортер; Г – ABCG2 (BCRP) транспортер.

Трансмембранные домены характеризуются множеством сайтов связывания транспортируемых молекул, которым свойственны различия в расположении и аминокислотной последовательности. При этом каждому переносчику свойственен достаточно широкий спектр связываемых и транспортируемых соединений, который может перекрываться для АВС-белков [43]. АВС-транспортеры способны переносить через мембраны различные вещества, такие как небольшие неорганические или органические молекулы, стеролы, ионы металлов, полипептиды и белки, а также обеспечивать выброс метаболитов и ксенобиотиков из клетки [6].

АВС-транспортеры – трансмембранные белки, которые локализуются в липидном бислое мембраны клетки или мембран таких органелл как лизосомы, митохондрии или эндоплазматический ретикулум. Благодаря роли в общей клеточной функции, АВС-транспортеры можно обнаружить во многих различных тканях организма. АВС-транспортеры располагаются в клетках систем и органов, обеспечивающих всасывание, распределение, метаболизм и выведение из организма нежелательных соединений, а также в защитных барьерах организма. Основными подобными системами и органами являются желудочно-кишечный тракт, печень и почки, а также гематоэнцефалический барьер и плацента, соответственно [43, 45].

Основные представители

Строение, локализация и функционирование некоторых АВС-транспортеров были достаточно детально изучены. Однако до сих пор точные функции некоторых представителей семейства АВС полностью не выяснены. Для многих АВС-транспортеров не было установлено, обладают ли они способностью связывать ксенобиотики и выбрасывать их из клеток. При этом наиболее изученными подсемействами являются ABCA, ABCB и ABCC [43].

Функция представителей подсемейства ABCA обычно связана с обеспечением липидного гомеостаза. Белок ABCA1 широко распространен по всему организму и отвечает за транспортировку фосфолипидных и холестериновых компонентов к внеклеточному аполипопротеину A-1 для выработки липопротеинов высокой плотности [46]. При этом белки ABCA2, ABCA3 и ABCA4 обеспечивают перенос липидов в клетках головного мозга, легких и глаз, соответственно. Предполагается, что представители подсемейства ABCA могут оказывать влияние на фармакокинетику ксенобиотиков, что было подтверждено исследованиями, связывающими ABCA2 с транспортировкой химиотерапевтического средства эстрамустина [47]. Участие иных представителей подсемейства ABCA, в частности ABCA3, ABCA5 и ABCA13, в непосредственном выбросе ксенобиотиков из клеток не подтвердилось – их роль в снижении внутриклеточных концентраций соединений может быть проявлена разве что на уровне их удержания в лизосомах [48].

Подсемейство ABCB представляет собой одну из наиболее разнородных групп транспортеров, основным представителем которой является белок ABCB1 (P-gp). Белок P-gp – наиболее хорошо изученный переносчик подсемейства ABCB, который задействован в транспортировке различных субстратов из клеток, а также в выбросе из клеток ксенобиотиков [49]. Впервые P-gp был охарактеризован в 1976 г. Р. Л. Джулиано и В. Лингом при исследовании опухолевых клеток грызунов с пониженной чувствительностью к противоопухолевым препаратам, которые клетки считают ксенобиотиками [50].

P-gp характеризуется чрезвычайно низкой субстратной специфичностью, что выражается в транспорте самых разнообразных соединений – широкое множество нейтральных молекул, некоторые органические катионы и анионы, а также полипептиды, производные последних с молекулярной массой от 250 до 4000 кДа, красители и лекарства. Присутствие P-gp в эпителии кишечника и гематоэнцефалического барьера предотвращает абсорбцию ксенобиотиков, обеспечивая общую защиту организма и, в частности, головного мозга. Кроме этого, экспрессия P-gp в клетках почечных канальцев и печени способствует

выведению соединений из организма путем их экскреции в фильтрат мочи и в желчь, соответственно [49, 51, 52].

Иные представители семейства ABCB, такие как ABCB2, ABCB3, ABCB8-10, в свою очередь, участвуют в транспорте пептидов во внутриклеточных компартментах, таких как лизосомы, митохондрии и эндоплазматический ретикулум [53]. Отмечается, что ABCB2 и ABCB3 участвуют во внутриклеточном переносе антигенов [54]. Функционирование белка ABCB11 связывают с транспортом желчных кислот в печени [55], а также с выбросом некоторых лекарственных препаратов, таких как правастатин [56].

Подсемейство ABCC включает белки, обозначаемые как ABCC1-ABCC12. Представители подсемейства ABCC1-5, в первую очередь, были исследованы на предмет их роли в устойчивости к противоопухолевым препаратам, но они также обладают способностью связывать ряд других лекарственных препаратов, часто в форме метаболитов [51]. Наиболее изученный представитель подсемейства – ABCC1 (MRP1) – был впервые охарактеризован в 90-е годы [57].

В качестве субстратов MRP1 выступают органические нейтральные соединения, а также органические анионы. Таким образом, транспортируемыми MRP1 молекулами также являются различные лекарственные препараты, в том числе противоопухолевые и анти-ВИЧ и флуоресцентные красители [49]. Кроме того, активность MRP1 в клетках связана с выполнением про- и противовоспалительных функций. Провоспалительная функция транспортера проявляется в том, что белок переносит цистеинил-лейкотриен С4 – липидный медиатор воспаления [58]. При этом MRP1 также транспортирует эндогенные антиоксиданты глутатион и дисульфид глутатиона [59].

Транспортная активность MRP1 обеспечивает такие важные функции как регуляция клеточного цикла, поддержание окислительно-восстановительного потенциала, модуляция иммунной функции и фиброгенеза [60]. Белок MRP1 экспрессируется практически во всех тканях человека. Высокие уровни белка наблюдаются в легких, селезенке, семенниках, почках, плаценте, щитовидной

железе, мочевом пузыре и надпочечниках, низкий – в некоторых клетках системы кровообращения, таких как эозинофилы, Т-хелперные клетки и эритроциты [19].

Подсемейство ABCC также содержит несколько уникальных представителей, которые не являются типичными транспортерами. Среди них можно выделить регулятор трансмембранной проводимости при муковисцидозе – хлоридный канал ABCC7 и рецепторы сульфонилмочевины ABCC8 и ABCC9.

Подсемейство ABCD является достаточно малочисленным и включает четыре полупереносчика (ABCD1-4), которые образуют функциональные гомо- или гетеродимеры. Представители данного подсемейства, в первую очередь, ответственны за транспорт жирных кислот и витамина B12 в пероксисомах, а также лизосомах и эндоплазматическом ретикулуме, соответственно [43]. Белки ABCD1-3 участвуют в транспорте длинноцепочечных жирных кислот из цитозоля в пероксисомы, различаясь по сродству к субстрату для цепей различной структуры и длины. В свою очередь, белок ABCD4 находясь в лизосомах и эндоплазматическом ретикулуме, обеспечивает транспорт субстратов, таких как витамин B12, в цитозоль [61].

Единственным представителем подсемейства ABCE является белок ABCE1. Структура белка ABCE1 предполагает полное отсутствие ТМД, что определяет его функцию, не связанную с транспортом субстратов. Образуя гетеродимер с РНКазой L, белок ABCE1 обеспечивает ее ингибирование и тем самым регулирует широкий спектр биологических реакций, включая ответ на вирусную инфекцию, пролиферацию опухолевых клеток и антиапоптоз [62].

Аналогичное отсутствие ТМД свойственно и представителям подсемейства ABCF – ABCF1-3. Белки подсемейства ABCF, в частности ABCF2 могут влиять на устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическому препарату цисплатину нетранспортным образом, однако конкретные механизмы данной устойчивости пока остаются неизвестными [63].

Последнее выделенное подсемейство ABC-транспортеров состоит из пяти представителей – ABCG1-2; ABCG4-5 и ABCG8. Функционирование белков подсемейства ABCG связано как с транспортом липидов, так и с детоксикацией

организма. Белки ABCG5 и ABCG8 играют важную роль в выведении из клеток ксенобиотиков, предотвращая накопление токсичных ксеностеролов в организме [64]. Белок ABCG2 (BCRP) является наиболее изученным транспортером подсемейства ABCG и впервые был охарактеризован в 1998 году при изучении устойчивости рака молочной железы к терапии митоксантроном [65].

В качестве транспортируемых BCRP соединений выступают важные физиологические субстраты, включая ураты, фолиевую кислоту, рибофлавин и метаболиты, а также различные фотосенсибилизаторы, флуоресцентные агенты, терапевтические препараты – противовирусные, антибактериальные и противоопухолевые. Активность BCRP обеспечивает создание защитных лактационного и плацентарного барьеров [19]. Белок BCRP экспрессируется в широком множестве тканей и органов. BCRP распространен в апикальных клеточных мембранах плаценты, головного мозга, предстательной железы, желудочно-кишечного тракта, яичек, яичников, гепатоцитов, почечных канальцев, стволовых клеток, надпочечников, матки, желчных протоков, желчного пузыря, центральной нервной системы, а также в эндотелии вен и капилляров [66].

Роль в опухолевых заболеваниях

Функционирование белков семейства ABC в клетках связано с развитием устойчивости опухолей к противоопухолевым препаратам с последующим прогрессированием опухолей. Наибольший вклад в развитие опухолевых заболеваний вносят белки P-гликопротеин, BCRP и MRP1 [67]. История их изучения началась одновременно с исследованием резистентности опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам [50, 57, 65].

В 1973 году Дано отметил выброс дауномицина из клеток асцитной опухоли Эрлиха с лекарственной устойчивостью [68]. Последующая работа показала, что ограниченная проницаемость противоопухолевых средств через мембрану клеток с лекарственной устойчивостью связана с присутствием гликопротеина на

поверхности клетки, названного Р-гликопротеином (P-gp) [50]. На основании наличия специфических консервативных аминокислотных последовательностей было установлено, что P-gp является АТФ-зависимым белком-переносчиком из семейства ABC, а также было отмечено его функционирование как насоса для оттока противоопухолевых препаратов из клеток [69, 70].

Десятилетием позже была идентифицирована клеточная линия мелкоклеточного рака легких человека (H69), проявляющая устойчивость к доксорубицину, а также широкому кругу противоопухолевых средств различного механизма действия, не связанную с P-gp [71]. Анализ показал экспрессию нового ABC-транспортера, названного MRP1 (белок, ассоциированный с множественной лекарственной устойчивостью 1) [57]. Исследование устойчивости клеток рака молочной железы человека, в которой не проявлялась активность P-gp и MRP1 белков, к ряду противоопухолевых препаратов позволило обнаружить третий ABC-переносчик – BCRP (белок устойчивости к раку молочной железы) [65].

В опухолевых клетках роль ABC-транспортеров в значительной степени связана с удалением нежелательных для клеток химиотерапевтических препаратов и развитием лекарственной устойчивости. Функционирование P-gp, BCRP и MRP1 белков приводит к выбросу широкого спектра химиотерапевтических препаратов первой и второй линии. При этом именно активность ABC-транспортеров в клетках становится причиной развития множественной лекарственной устойчивости опухолей. Значительно пересекающаяся субстратная специфичность транспортеров (Таблица 2) приводит к тому, что выработанная транспортер-опосредованная устойчивость к одному лекарственному препарату обеспечивает нечувствительность клеток к другим используемым химиотерапевтическим соединениям, как со схожим, так и с различным механизмом действия [12].

Попытки повышения чувствительности резистентных опухолевых клеток к химиотерапии путем увеличения концентрации препаратов чреваты повышением экспрессии генов P-gp, BCRP, MRP1 транспортеров – *ABCB1*, *ABCG2*, *ABCC1*, соответственно, а также самих белков. Повышение экспрессии белков приводит к

интенсивному выбросу противоопухолевых препаратов из клеток и сохранению устойчивости клеток к действию препаратов [7].

Таблица 2 – Противоопухолевые препараты, являющиеся субстратами ABC-транспортеров

ABC-транспортеры/противоопухолевые препараты		**P-gp**	**BCRP**	**MRP1**
Ингибиторы топоизомеразы I	Иринотекан	+ [72]	+ [73]	+[72]
	Топотекан	–	+ [74]	+[72]
Ингибиторы топоизомеразы II	Даунорубицин	+ [75]	+ [76]	+[77]
	Доксорубицин	+ [78]	+ [79]	+[80]
	Эпирубицин	+ [81]	+ [82]	+[77]
	Этопозид	+ [83]	+ [84]	+[77]
	Тенипозид	+ [84]	+ [84]	+[77]
	Митоксантрон	+ [85]	+ [86]	+[77]
Алкалоиды барвинка	Винбластин	+ [87]	–	+[77]
	Винкристин	+ [88]	–	+[77]
Таксаны	Доцетаксел	+ [89]	–	–
	Паклитаксел	+ [90]	+ [91]	+[77]
Антифолаты	Метотрексат	+ [92]	+ [93]	+[77]
Антибиотики	Актиномицин D	+ [94]	–	+[77]

Помимо участия ABC-транспортеров в снижении чувствительности опухолевых клеток к химиотерапевтическим агентам, белки семейства ABC непосредственно участвуют в прогрессировании опухолей [67]. Установлено, что в результате межклеточного контакта опухолевых клеток образуются микрочастицы мембраны, которые переносят P-gp от химиорезистентных клеток к чувствительным. Это явление позволяет делиться устойчивостью с

чувствительными к терапии клетками, что обеспечивает рост, опухоли и распространение метастазов [95].

Белок P-gp также участвует в формировании устойчивости опухолевых клеток к апоптозу. Активность P-gp обеспечивает сниженную чувствительность опухолевых клеток к апоптотическим стимулам [96]. P-gp выступает в качестве переносчика фактора активации тромбоцитов, приводящего к усилению антиапоптотических сигналов посредством активации таких белков как BCL-2 и BCL-XL [97]. Ингибирование P-gp транспортера, в свою очередь, приводит к остановке клеточного цикла и индукции апоптоза [98].

Белок MRP1 характеризуется способностью экспортировать лейкотриен C4 за пределы опухолевых клеток. В результате лейкотриен C4 активирует связанный с G-белком рецептор, что запускает сигнальные пути, способствующие пролиферации и выживанию опухолевых клеток. В частности, вклад ABC-транспортера в перенос лейкотриена C4 приводит к прогрессированию протоковой аденокарциномы поджелудочной железы [99]. Лейкотриены играют важную роль в создании воспалительной среды, способствующей прогрессированию рака. Таким образом, MRP1, переносящий лейкотриен C4, обеспечивает воспалительные опухолевые процессы, тем самым способствуя ангиогенезу, инвазии опухолевых тканей в окружающие их здоровые ткани, а также устойчивости опухолей к апоптозу [67]. Кроме того, MRP1 является транспортером основного фактора роста фибробластов, выступающий как фактор выживания клеток Капоши и остеогенной саркомы [100].

Влияние BCRP на развитие опухолей проявляется при анализе субпопуляций опухолевых клеток с признаками стволовости. Транспортная активность BCRP обеспечивает пролиферацию, формирование сфероидов и поддержание стволовости опухолевых клеток [101].

Задействование ABC-транспортеров в формировании множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток, а также в прогрессировании опухолей представляет собой серьезную проблему при лечении злокачественных новообразований. Нечувствительность опухоли к терапии жизненно важными

препаратами на фоне ее агрессивного развития коррелирует с плохими прогнозами и низкими показателями выживаемости [67].

Преодоление ABC-опосредованной резистентности

Подходы к блокированию ABC-транспортеров

Проблема множественной лекарственной устойчивости и снижения эффективности химиотерапии опухолей диктует необходимость блокирования транспортной активности P-gp, BCRP и MRP1. На данный момент имеется ряд подходов для преодоления ABC-транспортер-опосредованной множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток.

В качестве одного из подходов преодоления множественной лекарственной устойчивости является применение липофильных пептидов, которые характеризуются как высокоаффинные субстраты ABC-транспортеров. Пептиды, являющиеся аналогами трансмембранных доменов белков, могут нарушать правильную сборку или функционирование белка-мишени. Примером подобного взаимодействия может быть направленное ингибирование рецепторов, связанных с G-белком [102]. Кроме того, в качестве специфично связывающегося с белками субстрата также может выступать антитело. Показано, что мышиное моноклональное антитело, связывающееся с внеклеточными эпитопами P-gp, снижает активность транспортера и, соответственно, выделение лекарственных субстратов из опухолевых клеток [103]. Основные ограничения, связанные с применимостью данного подхода, относятся к иммуногенности используемых чужеродных белковых структур.

Транспортная активность ABC-транспортеров в опухолевых клетках может быть блокирована посредством вмешательства в пути передачи сигналов, которые регулируют их экспрессию. Экспрессия P-gp, BCRP и MRP1 контролируется на транскрипционном уровне множеством сигнальных механизмов, включая пути

sonic hedgehog, AKT, JNK–SAPK, циклооксигеназа 2–простагландин E2, а также теми, которые активируются 1α – фактором, индуцируемым гипоксией, и p53 [8]. Показано, что ингибиторы циклооксигеназы нейтрализуют МЛУ и усиливают цитотоксичность противоопухолевых препаратов путем снижения уровня транскриптов трех ключевых ABC-транспортеров [104]. Блокирование пути sonic hedgehog путем воздействия на его фактор транскрипции – Gli1 – повышает чувствительность клеток глиомы к винкристину и этопозиду за счет ингибирования экспрессии P-gp и MRP1 [105].

Регуляция экспрессии ABC-транспортеров также предполагает участие ядерных рецепторов, которые обычно активируются липофильными веществами, такими как эндогенные гормоны и витамины, и транскрипционно регулируют экспрессию белков. Блокирование обозначенных ядерных факторов может обеспечить снижение экспрессии ABC-транспортеров. Целенаправленный нокдаун ядерного рецептора PXR с помощью короткой шпильки РНК (кшРНК) повысил чувствительность клеток рака предстательной железы человека к паклитакселу и винбластину в результате снижения экспрессии белков-транспортеров [106]. Аналогичным образом, подавление активности PXR с помощью малых интерферирующих РНК (микроРНК) в клетках рака эндометрия привело к снижению экспрессии P-gp и сенсибилизации клеток к паклитакселу и цисплатину [107]. В настоящее время подход регулирования сигнальных путей, ответственных за экспрессию ABC-транспортеров, все еще находится на стадии апробации.

Снижение активности ABC-транспортеров может быть осуществлено в результате непосредственной деградации генов белков. Для этого целесообразно применение антисмысловых олигодезоксирибонуклеотидов, рибозимов, микроРНК и кшРНК. Было показано, что данный способ воздействия на белки-транспортеры приводит к преодолению МЛУ опухолевых клеток, характеризующихся повышенной экспрессией транспортеров [8]. При этом возможно единовременное воздействие на гены всех трех ABC-транспортеров при использовании многоцелевых мультирибозимов. Результатом является снижение

экспрессии ABC-транспортеров и преодоление МЛУ в клетках карциномы желудка и яичников [108]. Несмотря на полученные *in vitro* результаты успешного преодоления МЛУ опухолевых клеток посредством воздействия на гены транспортеров, применимость данного подхода *in vivo* находится под сомнением. В качестве основных недостатков подхода отмечается подверженность влиянию нуклеаз и иммуногенность [8, 109].

Перспективным подходом к преодолению МЛУ опухолевых клеток является инкапсуляция химиотерапевтических средств в липосомах, полимерных мицеллах или наноносителях. Основными причинами действенности данного подхода является сохранение стабильности противоопухолевого препарата вплоть до момента его высвобождения, нацеливание действия препарата и обеспечение высокой лекарственной нагрузки препарата на опухолевые клетки. Эффективность использования наночастиц с противоопухолевыми препаратами была определена на стадии доклинических исследований [8]. В наночастицы из полимерной смеси инкапсулировали противоопухолевый препарат паклитаксел и C6-церамид, непосредственно участвующий в активации механизмов апоптоза клеток. Паклитаксел был включен в полимерные частицы, характеризующиеся быстрым высвобождением, которое зависит от pH, в то время как C6-церамид был помещен в частицы с медленным высвобождением. Противоопухолевые соединения в виде полимерной смеси были внутривенно введены самкам мыши с раком молочной железы, характеризующейся P-gp-опосредованной МЛУ. Это обеспечило максимально эффективную лекарственную нагрузку на опухолевые клетки, по сравнению с введением свободных препаратов, и привело к преодолению транспортной активности ABC-белка и уменьшению размера опухоли [110]. Разработка эффективных наномедицинских платформ, рекомендуемых к использованию в клинике, требует более детального изучения токсичности и дальнейшего метаболизма полимерных материалов системы доставки [8].

Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток является актуальной проблемой, поиски эффективного решения которой начались менее

чем через 10 лет после открытия P-gp-опосредованной МЛУ. В связи с этим не удивительно, что одним из подходов к блокированию АВС-транспортеров стал поиск низкомолекулярных соединений, которые в результате непосредственного взаимодействия с транспортером могли бы привести к ингибированию его активности. Результатом поиска стал ряд соединений, исследованных на предмет ингибирования активности АВС-транспортеров и в дальнейшем показавших потенциальную действенность подхода в клинических испытаниях. Ингибиторы АВС-транспортеров действуют по принципу связывания с трансмембранной полостью белков. При этом имеет место как конкурентное взаимодействие с сайтами связывания и переноса противоопухолевых препаратов, так и неконкурентное связывание со свободной областью трансмембранного домена белков, которая модулирует сродство субстрата к сайту переноса. Взаимодействие ингибиторов АВС-транспортеров с белками купирует возникновение конформационных изменений в транспортерах и, соответственно, выброс препаратов из клеток [111, 112].

Низкомолекулярные ингибиторы АВС-транспортеров

В период последнего десятилетия XX века поиск низкомолекулярных соединений, способных снижать активность АВС-транспортеров, привел к обнаружению ингибирующих свойств у целого ряда уже известных веществ. Среди них иммунодепрессант циклоспорин [14] или блокатор кальциевых каналов верапамил [15], которые на тот момент уже использовались в медикаментозной медицине. Соединения с обнаруженными ингибирующими свойствами относительно АВС-транспортеров были обозначены как первое поколение ингибиторов (Таблица 3). Хотя ингибиторы первого поколения способны проявлять ингибирующую способность по отношению к АВС-транспортерам, им свойственна токсичность в эффективных концентрациях [12, 113, 114].

Таблица 3 – Поколения ингибиторов ABC-транспортеров

Поколение	**Представители**
Первое	Амиодарон, циклоспорин А, хинидин, хинин, верапамил, нифедипин, дексникульдипин, итраконазол, кетоконазол, фелодипин, нитрендипин, хлорпромазин, лидокаин, мибефрадил, мифепристон, терфенадин
Второе	Валсподар (PSC-883), бирикодар (VX-710), KR30031, MS-209, MS-073
Третье	Зосуквидар (LY335979), тариквидар (XR-9576), ланиквидар (R101933), элакридар (GF120918), OC144-093 (ONT-093), LY475776, V-104

Для улучшения функциональных свойств ингибиторов белков-транспортеров и уменьшения их токсичности был предложен ряд химических модификаций, позволивший сформировать второе поколение ингибиторов. Например, KR30031 – аналог верапамила – проявляет меньшее воздействие на сердечно-сосудистую систему [16]. PSC833 (валсподар), созданный на основе циклоспорина Д, обладает высокой ингибирующей активностью по отношению к P-gp и BCRP при значительно меньшем иммуносупрессивном влиянии [17]. Утверждается, что основной чертой ингибиторов второго поколения является их побочное действие, приводящее к снижению клиренса и метаболизма химиотерапевтических агентов, что способствует повышению концентрации препаратов в плазме крови до недопустимого уровня токсичности. Результатом подобного действия стала высокая смертность пациентов при проведении клинических испытаний [12, 115].

Ингибиторы третьего поколения были разработаны специально для обеспечения высокого сродства к ABC-переносчикам, а также снижения влияния ингибиторов транспортеров на клиренс и метаболизм противоопухолевых препаратов. Ингибирование цитохрома P450 3A, являющееся причиной многих побочных фармакокинетических эффектов ингибиторов предыдущего поколения, как правило, удается избежать при применении ингибиторов третьего поколения

[12, 13]. Наиболее эффективный представитель третьего поколения ингибиторов – тариквидар. Тариквидар обладает способностью длительного ингибирования P-gp, поскольку однократное внутривенное введение тариквидара ингибировало отток R123 из лимфоидных клеток с экспрессией P-gp по меньшей мере на 48 часов [116]. Дальнейшее изучение тариквидара, использованного в сочетании с химиотерапией первой линии для пациентов с немелкоклеточным раком легких, выявило дополнительные токсические эффекты от применения препарата [12, 117].

На фоне проведенных исследований сформировалось понятие идеального препарата-ингибитора ABC-транспортеров. Таковой не должен иметь побочных фармакологических эффектов, не должен влиять на фармакокинетику противоопухолевых препаратов, а также оказывать влияние исключительно на ABC-транспортеры [12, 13]. Ингибиторы транспортеров всех трех поколений не смогли проявить необходимой эффективности и отсутствия нежелательных влияний на организм, и, соответственно, не прошли дальше второй стадии клинических испытаний [12, 117–121]. На данный момент нет официально зарегистрированных и клинически применимых ингибиторов ABC-транспортеров для преодоления множественной лекарственной устойчивости. В связи с этим, вопрос поиска высокоэффективных ингибиторов ABC-транспортеров остается открытым.

Поиск новых ингибиторов ABC-транспортеров проводится с использованием новых подходов, предполагающих виртуальную оценку молекулярного взаимодействия исследуемых соединений с ABC-транспортерами с последующим синтезом соединений, а также проведение высокопроизводительного клеточного скрининга [117, 122]. В рамках нового подхода к поиску ингибиторов ABC-транспортеров был выполнен компьютерный скрининг библиотеки соединений Национального онкологического центра США с выявлением соединений, способных взаимодействовать с P-gp и ингибировать его активность. По результатам компьютерного скрининга было отобрано 2 000 соединений, которые использовали для проведения высокопроизводительного

клеточного скрининга на основе химиорезистентной клеточной линии рака яичников. По результатам анализа было идентифицировано новое соединение NSC23925, которое является наиболее эффективным ингибитором P-gp. Кроме того, обнаруженное соединение способно преодолевать устойчивость клеток рака яичников, молочной железы и толстой кишки к паклитакселу, доксорубицину и винкристину [123].

Используя схожие подходы, удалось идентифицировать синтетические и природные соединения, проявляющие способность ингибировать ABC-транспортеры. Оценка эффективности нового химического семейства сильнодействующих селеносодержащих соединений, представляющих собой гибриды фенилселеноэфиров, позволила выявить производные гидантоина, которые характеризуются значительно более сильным действием, чем ингибитор первого поколения – верапамил. При десятикратно меньшей концентрации производные гидантоина проявляют почти в три раза больший ингибирующий эффект. Кроме того, производные гидантоина обладают цитотоксическим и антипролиферативным действием относительно чувствительных и резистентных клеточных линий мышиной Т-лимфомы, а также клеток нейробластомы человека, что указывает на определенные терапевтические перспективы. Механизм действия производных гидантоина связывали с остановкой клеточного цикла и пролиферации клеток за счет снижения экспрессии циклина D1 и индукции экспрессии p53, соответственно [124].

Потенциальную терапевтическую ценность, выражающуюся в ингибировании ABC-транспортеров, проявили производные имидазолона. Большинство соединений из исследованной группы 5-арилиденимидазолонов обладают ингибирующей активностью по отношению к P-gp и снижают отток R123 в чувствительных и химиорезистентных клетках Т-лимфомы. При этом у некоторых соединений ингибирующий эффект в два раза превышает эффект верапамила и сопоставим со способностью тариквидара снижать активность P-gp. Соединения дополнительно приводят к гибели клеток Т-лимфомы, превосходя эффект от применения доксорубицина [125]. Аналогичные свойства также

проявляет иная группа производных имидазола – имидазо[4,5-b]пиридины [126]. Значительно лучшие показатели ингибирующей активности, в свою очередь, проявляют арилпиперазиновые производные 5-спироимидазолидин-2,4-дионов, показывая 23-кратную эффективность ингибирования P-gp относительно верапамила и 6-кратную – относительно тариквидара [127].

Определено, что многие природные алкалоиды и флаваноиды обладают мощным ингибированием ABC-транспортеров. Проведенные поиск и исследования показали, что нуциферин – алкалоид, выделенный из растений *Nelumbo nucifera* и *Nymphaea caerulea*, позволяет увеличить накопление широкого ряда субстратов P-gp (паклитаксел, доцетаксел, доксорубицин, даунорубицин, R123) опухолевыми клетками с P-gp-опосредованной устойчивостью. При этом совместное применение нуциферина и паклитаксела обеспечивает более значительное ингибирование транспортера и подавление роста опухолевых клеток, чем при использовании верапамила. Влияние нуциферина на клетки не ограничивается только ингибированием активности P-gp, соединение дополнительно приводит к снижению экспрессии белков P-gp и BCRP посредством инактивации пути PI3K/AKT/ERK [128].

Рассмотрение природных флавоноидов позволило выделить таксифолин, содержащийся в *Silybum marianum,* как потенциальное соединение, способное ингибировать активность P-gp. Применение таксифолина позволяет снизить отток красителя, субстрата P-gp, в опухолевых клетках со стабильной экспрессией P-gp, при этом в клетках также наблюдается снижение экспрессии транспортера. Таксифолин, снижая P-gp-опосредованный транспорт химиотерапевтических препаратов, обеспечивает улучшение их накопления чувствительными и резистентными клетками рака шейки матки, что приводит к гибели клеток [11].

Подтверждение способности найденных соединений эффективно снижать ABC-опосредованный выброс противоопухолевых препаратов из клеток, тем самым восстанавливая чувствительность химиорезистентных клеток к терапии, в условиях доклинических и клинических испытаний сможет поставить точку в вопросе поиска новых ингибиторов ABC-транспортеров.

Репозиционирование препаратов

В поисках эффективных ингибиторов ABC-транспортеров четвертого поколения все чаще рассматривают соединения, уже используемые в клинике для терапии различных заболеваний. Способность ингибировать активность транспортеров проявляют представители таких классов препаратов как противоинфекционные, противоаллергические и противовоспалительные, а также противоопухолевые препараты [129–131]. В частности, применение нейролептиков различного механизма действия позволяет снизить активность P-gp в эпителиальных клетках почек свиньи с повышенной экспрессией P-gp, что приводит к увеличению накопления клетками R123 [132].

Отмечается, что способность ингибировать ABC-транспортеры может быть присуща определенным классам препаратов. Так макролидные антибиотики эритромицин, азитромицин, кларитромицин и рокситромицин, применяемые для лечения острых и хронических инфекций, проявляют ингибирующее воздействие на активность P-gp в клетках саркомы матки человека с P-gp-опосредованной множественной лекарственной устойчивостью [133]. Противоязвенные препараты пантопразол, омепразол и лансопразол, подавляющих секрецию соляной кислоты клетками желудка, также способны ингибировать P-gp в клетках карциномы толстой кишки человека и эпителиальных клетках почек свиньи со стабильной экспрессией P-gp [134]. При этом омепразол также снижает активность BCRP и предотвращает эффлюкс красителя в рамках тест-системы везикулярного транспорта.

Среди противоопухолевых препаратов значительной группой, обладающей ярко выраженной способностью снижать активность ABC-транспортеров, выделяются ингибиторы тирозинкиназ. С помощью анализа везикулярного транспорта, являющегося одной из рекомендованных тестовых систем *in vitro* для оценки способности соединений ингибировать ABC-транспортеры, ингибиторы тирозинкиназ были обозначены как сильные ингибиторы BCRP. Использование

ингибиторов тирозинкиназ приводит к снижению транспортной активности BCRP и увеличению накопления красителя люцифера желтого более чем в 2 раза относительно контроля. При этом в качестве ингибитора BCRP сорафениб проявляет себя наилучшим образом среди изученных противоопухолевых препаратов [131].

Кроме этого, способность ингибировать ABC-транспортеры проявляют противоопухолевые препараты из группы ингибиторов PARP – олапариб и рукапариб. Соединения снижают активность как P-gp, так и BCRP в клетках почек собак, экспрессирующих транспортеры [135, 136]. Применение противоопухолевого препарата, представителя группы ингибиторов CDK4/6, рибоциклиба снижает эффлюксную активность P-gp и преодолевает как P-gp-опосредованную устойчивость клеток острого миелоидного лейкоза к даунорубицину [137], так и клеток эпидермоидной карциномы человека к колхицину и доксорубицину. В последнем случае дополнительно отмечается, что воздействие на клетки рибоциклибом обеспечивает снижение экспрессии P-gp как на белковом, так и на генном уровне [138].

Использование препаратов, применяемых в терапии или находящихся на последних стадиях клинической апробации, обладает значимым преимуществом. Профиль безопасности подобных препаратов уже определен или в большей степени изучен, что позволит осуществить их введение в клинику для преодоления химиорезистентности опухолевых клеток в значительно меньшие сроки относительно препаратов, прошедших исключительно доклинические испытания [129].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Создание химиорезистентных моделей опухолевых клеток

Создание химиорезистентных клеточных моделей с использованием подхода, основанного на рутинном культивировании опухолевых клеток в присутствии противоопухолевых препаратов, позволяет в наибольшей степени воспроизвести естественные условия формирования лекарственной устойчивости. К настоящему времени путем рутинного культивирования получены человеческие клеточные модели аденокарциномы толстой кишки HCT15 и карциномы легких H460, характеризующихся резистентностью к ряду тубулин-связывающих препаратов. Изучение полученных химиорезистентных линий позволило выявить участие белков аннексина II и IV в развитии клинически значимой устойчивости клеток к антимитотическим агентам [139]. Такой же метод был использован для получения клеточных моделей аденокарциномы молочной железы человека SK-BR-3 и MCF-7, устойчивых к препаратам таксанового ряда, с целью изучения молекулярных механизмов резистентности [9]. В настоящей работе рутинное культивирование было использовано для получения моделей аденокарциномы толстой кишки человека HCT116, обладающих устойчивостью к широко применяемому в клинике цитостатику таксолу, относящемуся к первому поколению препаратов таксанового ряда и обладающего антимитотическим действием.

Способы создания химиорезистентных клеточных моделей

На данный момент не существует общепринятого протокола выведения химиорезистентных клеточных моделей. Общий принцип создания опухолевых клеточных линий, устойчивых к клинически значимым химиотерапевтическим агентам, заключается в рутинной обработке клеток препаратами в течение

определенного периода времени. При этом концентрация препарата для первичной обработки клеток, схема и продолжительность культивирования могут существенно различаться как в зависимости от используемой клеточной линии, так и от планируемого результата.

Схема обработки клеток

Выбор схемы обработки клеток противоопухолевым препаратом заслуживает особого внимания, так как от этого прямым образом зависит формирование клеточных механизмов химиорезистентности. В настоящее время для создания химиорезистентных моделей используются две принципиальные схемы, отличающиеся условиями культивирования клеток до момента восстановления их роста и пролиферации в присутствии противоопухолевого препарата.

Эпизодическая обработка. Схема эпизодического культивирования клеток в присутствии противоопухолевого препарата предполагает обработку клеток препаратом в течение установленного времени (до нескольких суток), после чего он удаляется из среды. Культивирование клеток в среде без препарата осуществляется до восстановления жизнеспособности и пролиферации клеток. Повторение циклов удаления-внесения противоопухолевого препарата в среду производится до момента восстановления пролиферации клеток в присутствии препарата [140]. Удаление противоопухолевого препарата из среды позволяет клеткам, в том числе наиболее чувствительным, предварительно выработать механизмы устойчивости, необходимые для выживания при возобновлении обработки препаратом, тем самым сократив общее время обработки клеток и получения устойчивой клеточной популяции.

В случае эпизодической обработки клеток противоопухолевым препаратом следует отметить тот факт, что каждое изменение состава питательной среды клетки воспринимают как стресс, что приводит к активации клеточных механизмов, призванных поддерживать жизнеспособность клеток в условиях резкого изменения состояния окружающей среды. Поэтому резистентность

получаемых таким образом химиорезистентных клеток отражает не только специфику воздействия противоопухолевого препарата, но и клеточный ответ на изменения условий культивирования. Профиль устойчивости таких клеток не идентичен профилю резистентности клеток, сформированной в результате химиотерапевтического воздействия. Применение полученных таким способом моделей для изучения путей преодоления химиорезистентности опухолевых клеток часто приводит к искажению результатов, что на практике может стать причиной неэффективной терапии и дальнейшего расширения профиля устойчивости опухоли. В связи с означенными недостатками схемы эпизодического культивирования в присутствии противоопухолевого препарата, в практике создания химиорезистентных клеточных моделей более распространена схема постоянной обработки клеток.

Постоянная обработка. Схема постоянной обработки клеток предполагает культивирование клеток в присутствии противоопухолевого препарата вплоть до момента восстановления пролиферации клеток [9, 139]. Такая схема широко применяется благодаря тому, что при ее реализации воспроизводятся клинические условия воздействия химиотерапевтического агента на опухолевые клетки. Постоянное воздействие противоопухолевого препарата на клетки приводит к гибели клеток, не способных оперативно активировать механизмы клеточной защиты от нежелательного химического агента. При этом в живых остаются клетки, рост и пролиферация которых останавливаются при воздействии препарата, однако благодаря нативной защите, а также своевременной выработке дополнительных механизмов защиты, жизненный цикл клеток не заканчивается гибелью, они адаптируются и продолжают свое существование.

В результате применения схемы постоянной обработки препаратом появляются клетки, приспособившиеся к жизни в присутствии противоопухолевого препарата и обладающие определенным профилем устойчивости, который сопоставим с профилем резистентности опухолевых клеток, формируемым при химиотерапии. В связи с изложенным, для получения химиорезистентных клеточных моделей HCT116, в наибольшей степени

воспроизводящих естественные условия формирования устойчивости к цитостатику таксолу, была выбрана именно схема постоянной обработки клеток противоопухолевым препаратом.

Продолжительность культивирования

При выборе продолжительности культивирования клеток в присутствии химиотерапевтического агента важно учитывать, что этот параметр прямо влияет на степень адаптации клеток к препарату и, соответственно, степень выработанной химиорезистентности. В практике выведения резистентных моделей культивирование клеток в присутствии химиотерапевтического агента в равной степени осуществляется как на протяжении короткого, так и длительного промежутка времени. Окончание культивирования клеток в присутствии противоопухолевого препарата отмечается повышением концентрации соединения в 2-3 раза с дальнейшей адаптацией клеток к новой концентрации.

Кратковременное культивирование клеток противоопухолевым препаратом осуществляется до момента восстановления пролиферирующей способности клеток в присутствии препарата, что в среднем может занимать 2-3 недели с момента первой обработки [139, 140]. Однако непродолжительное культивирование клеток является причиной неполной адаптации к препарату и низкой интенсивности активации механизмов клеточной защиты от действия ксенобиотика. Результатом краткосрочного получения химиорезистентных клеточных моделей является повышенная вероятность гибели клеток при увеличении концентрации препарата. Сформированной устойчивости может оказаться недостаточно для выживания, особенно в случае обработки клеток высокими концентрациями препарата.

В связи с обозначенными недостатками кратковременного культивирования клеток в присутствии препарата, более предпочтительным является получение клеточных моделей химиорезистентности опухолевых клеток посредством их культивирования в присутствии противоопухолевого препарата на протяжении длительного периода времени. В таком случае обработка проводится до

стабильной пролиферации клеток в присутствии противоопухолевого препарата [9]. В зависимости от типа клеток, механизма лекарственного препарата и его концентрации, процесс полной адаптации опухолевых клеток к препарату существенно различается по длительности, при этом чаще всего адаптация занимает от месяца до полутора лет [141, 142].

Продолжительное культивирование клеток в присутствии противоопухолевого препарата позволяет достичь полной адаптации клеток к препарату и максимальной активации механизмов клеточной защиты. Формирование развитой устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическому агенту определяет стабильную защиту клеток от действия препарата и их способность выживать при повышении концентрации препарата с последующим развитием механизмов клеточной защиты, необходимых для роста и пролиферации в новых условиях культивирования. Продолжительное культивирование клеток в присутствии противоопухолевого препарата гарантирует получение химиорезистентных клеточных моделей к различным концентрациям препарата, в том числе, используемым в клинике. Длительность культивирования клеток в присутствии противоопухолевого препарата и, соответственно, степень развития устойчивости клеток к препарату сопоставимы с клиническими условиями химиотерапевтического воздействия. В связи с этим, выведение клеточных моделей аденокарциномы толстой кишки человека, устойчивых к таксолу осуществлялось именно при длительном культивировании клеток в присутствии противоопухолевого препарата.

Выбор исходной концентрации химиотерапевтического препарата

Одним из наиболее значимых параметров при создании химиорезистентных клеточных моделей является концентрация химиотерапевтического агента, используемая при первичной обработке клеточных культур. Выбор исходной

концентрации препарата фактически определяет дальнейшую схему выведения химиорезистентных моделей.

При получении химиорезистентных линий в результате кратковременного культивирования клеток в присутствии препарата в качестве исходной концентрации соединения, как правило, используют концентрацию, приводящую к гибели 50% клеток (IC_{50}) [139, 140]. Однако при кратковременном культивировании могут быть использованы также концентрации значительно меньше [140, 143] или больше значения IC_{50} [144] для соответствующего препарата. В случае продолжительного культивирования опухолевых клеток в присутствии противоопухолевого препарата применяют концентрации, соответствующие или близкие к значению IC_{50} [9, 145]. При этом конечные концентрации при выведении химиорезистентных клеток в условиях непродолжительного культивирования с препаратом превышают значения IC_{50} от нескольких раз до полутора сотен раз [139, 140], тогда как при длительной обработке используются конечные концентрации лишь в десятки раз превышающие значения IC_{50} [9, 145].

В общем случае, для первичной обработки опухолевых клеток следует использовать концентрации, оказывающие цитотоксический эффект, который клетки способны будут перенести, активировав необходимые механизмы устойчивости. Выбор начальной концентрации должен соотноситься с предполагаемой продолжительностью культивирования. Общее непродолжительное время культивирования опухолевых клеток в присутствии противоопухолевого препарата допускает использование как низких, так и высоких начальных концентраций. При этом при длительном культивировании клеток в присутствии химиотерапевтического агента предпочтительнее использовать незначительную лекарственную нагрузку.

Еще одна трудность при выборе исходной концентрации препарата связана с тем фактом, что при определении значения IC_{50} используются различные экспериментальные протоколы. При этом различаться могут как методы оценки активности, так и длительность обработки исследуемым препаратом. Чаще всего

различные протоколы дают близкие значения, однако в случае специфического механизма действия или отложенного эффекта препарата, значения IC_{50} могут отличаться на порядки. Например, при использовании антибиотика G418 значительная целевая гибель клеток во время селекции трансфицированных клеток наблюдается лишь спустя 3-5 суток после начала обработки. Это связано с механизмом действия препарата, заключающегося в нарушении синтеза белка. Исходя из этого, эффективную концентрацию антибиотика для каждой клеточной линии подбирают так, чтобы обеспечить целевую активность при минимальном сопутствующем цитотоксическом эффекте препарата.

Для оценки цитотоксического действия противоопухолевого препарата на клетки часто используют МТТ-тест. Изначально, метод с использованием МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромида) был разработан как способ оценки клеточной метаболической активности, в основе которого лежит восстановление желтой соли МТТ до фиолетовых кристаллов формазана $НАД^+$ и $НАДФ^+$-зависимыми клеточными оксидоредуктазами [146]. Тем не менее, в случае таксола этот метод может быть использован и для оценки жизнеспособности клеток, что связано с особенностью механизма действия препарата. Было показано, что значения IC_{50} таксола, полученные параллельно с использованием МТТ-теста и сульфородаминового теста, сопоставимы [140]. Это подтверждает тот факт, что действие таксола приводит к снижению метаболической активности клеток с их последующей гибелью, и в этом случае МТТ-тест отражает не только ингибирование метаболических процессов, но и клеточную гибель.

В литературе можно найти данные по оценке цитотоксического действия таксола в течение различных периодов времени от 48 до 96 часов [9, 139]. В нашем исследовании мы применили протокол, включающий 48-часовую экспозицию клеток, так как именно на вторые сутки исследуемая клеточная культура вступает в фазу активного роста и деления большинства клеток. В этот момент клетки уже становятся уязвимыми для действия противоопухолевого препарата [147].

Таким образом, все проделанные в работе эксперименты с использованием МТТ-теста включали в себя обработку клеток таксолом или препаратом сравнения в течение двух суток.

Значения IC_{50} для одного и того же препарата, в частности таксола, могут существенно различаться в зависимости от типа клеток. На это могут оказывать влияние как различная экспрессия ферментов, отвечающих за метаболизм препарата, профиль экспрессии белков-транспортеров, выбрасывающих препарат из клеток, активация определенных механизмов обхода апоптоза, так и различия в структуре микротрубочек опухолевых клеток, являющихся мишенью таксола. Микротрубочки могут включать изоформы тубулина, характеризующиеся разной степенью динамичности. Например, связывание таксола с β3-тубулином, который отличается высокой динамичностью, снижает влияние таксола, действующего по принципу стабилизации микротрубочек и нарушения процесса деления клеток. Определенный изоформный профиль тубулина в линиях опухолевых клеток приводит к тому, что для достижения полулетального эффекта потребуются различные концентрации таксола [44, 148, 149].

Согласно литературным данным, значения IC_{50} для таксола могут различаться в 20 раз в зависимости от линии опухолевых клеток (Таблица 4). Однако мы не нашли данных по обработке рассматриваемой нами культуры клеток HCT116 таксолом в течение 48 ч. Поэтому мы провели серию экспериментов, чтобы установить значение IC_{50} для используемой нами клеточной линии HCT116 дикого типа.

Таблица 4 – Значения IC_{50} таксола при обработке различных клеточных линий в течение 48 ч

Клеточная линия		**IC_{50}, мкМ**	**Источник**
A375	меланома кожи человека	0,100	[150]
SF-268	глиобластома человека	0,022	[151]

Клеточная линия		**IC_{50}, мкМ**	**Источник**
MDA-MB-231	аденокарцинома молочной железы человека	0,005	[152]
MCF-7	аденокарцинома молочной железы человека	0,011	[151]
NCI-H460	аденокарцинома легких человека	0,010	
A549	аденокарцинома легких человека	0,100	[153]
PANC-1	аденокарцинома поджелудочной железы человека	0,060	[150]
HepG2	гепатокарцинома человека	0,045	[154]
A2780	аденокарцинома яичников человека	0,025	[152]
SKOV3	аденокарцинома яичников человека	0,010	[155]
HeLa	аденокарцинома шейки матки человека	0,030	[156]
PC-3	аденокарцинома предстательной железы человека	0,077	[152]
SW620	аденокарцинома толстой кишки человека	0,030	[157]
HT-29	аденокарцинома толстой кишки человека	0,008	[158]
HCT8	аденокарцинома толстой кишки человека	0,019	[159]
AsPC-1	аденокарцинома поджелудочной железы человека	0,089*	[160]
PANC-1	аденокарцинома поджелудочной железы человека	0,010*	
VCaP	аденокарцинома предстательной железы человека	0,017*	[140]
PC-3	аденокарцинома предстательной железы человека	0,009*	
DU145	аденокарцинома предстательной железы человека	0,006*	
DLD-1	аденокарцинома толстой кишки человека	0,022*	[160]
HCT116	аденокарцинома толстой кишки человека	0,061*	[161]
		0,006**	[162]

* обработка клеток в течение 72 ч

** обработка клеток в течение 96 ч

Еще одним параметром, от которого зависит значение IC50, является время воздействия препарата. Обычно для достижения 50% гибели при длительной обработке клеток препаратом хватает меньших концентраций, чем при более короткой обработке. Та же самая тенденция наблюдается и в случае таксола. Мы определили, что концентрация, приводящая к гибели 50% клеток HCT116 дикого типа в течение 48 ч, составляет 0,12 мкМ (Рисунок 4). Полученное нами значение IC_{50} в 2 раза превышает значение концентрации, полученное при обработке в течение 72 ч, и в 20 раз больше, чем при 96-часовой обработке [161, 162].

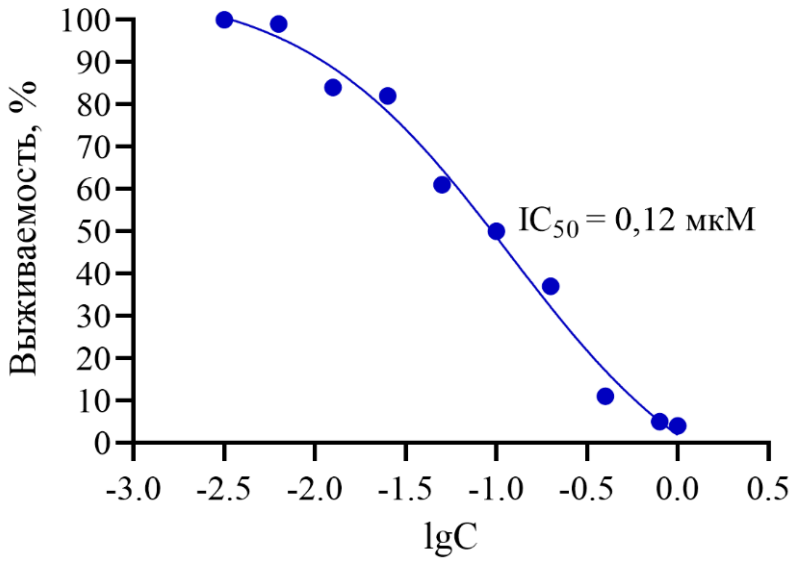


Рисунок 4 – Выживаемость клеток HCT116 дикого типа в присутствии различных концентраций таксола (48 ч).

Таким образом, в рамках продолжительного культивирования опухолевых клеток с постоянным присутствием таксола в среде, было решено использовать 0,01 мкМ таксола в качестве исходной концентрации препарата, что в 10 раз меньше полученного нами значения IC_{50}. Обработка клеток препаратом в концентрации, оказывающей незначительный цитотоксический эффект, позволит положить начало формированию полной устойчивости обрабатываемых клеток к широкому диапазону концентраций.

Выведение панели химиорезистентных моделей

Для получения химиорезистентных моделей использовали непрерывную схему обработки клеток аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 цитостатиком таксолом. Поддержание выбранной концентрации осуществляли с помощью использования раствора таксола в питательной среде, который готовили из стоковых растворов таксола в ДМСО таким образом, чтобы конечная концентрация ДМСО составляла 0,5%.

Обработка клеток HCT116 дикого типа первичной концентрацией таксола (0,01 мкМ) на третьи сутки привела к заметному цитотоксическому эффекту препарата, что выражалось в уменьшении роста клеток и их гибели (Рисунок 5). Дальнейшее культивирование клеток в присутствии таксола обеспечило адаптацию клеток к действию противоопухолевого препарата и их восстановление, что привело к ускорению роста клеток. При этом замену питательной среды проводили каждые 2 дня, при достижении 80% конфлюентности клеток осуществляли их пересев. Когда скорость роста обрабатываемых клеток достигла значений контрольной линии, концентрацию препарата повысили до 0,03 мкМ.

А Б

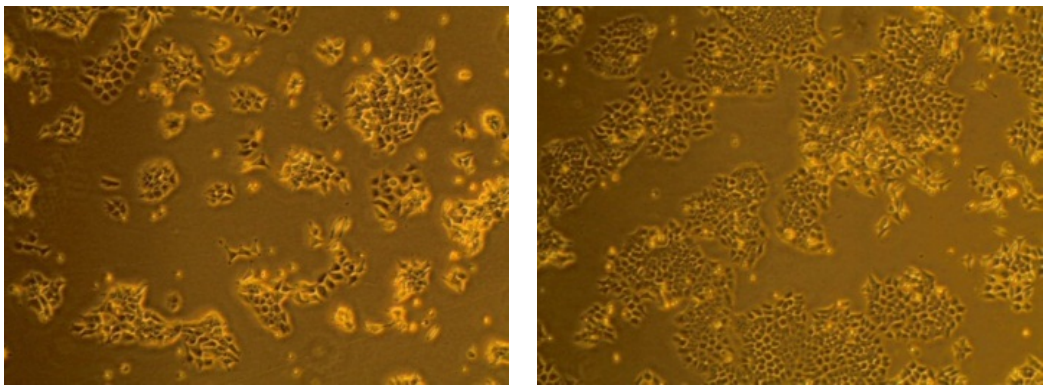


Рисунок 5 – Сравнение клеток HCT116, культивируемых в среде с исходной концентрацией таксола (А), и контрольных клеток HCT116 (Б) на 3 сутки.

При обработке клеток повышенными концентрациями таксола применяли схему непрерывного культивирования клеток до момента полной адаптации к используемой концентрации препарата. После этого начинали новый этап культивирования, при котором концентрацию таксола увеличивали в 2 раза. Таким образом была получена панель химиорезистентных линий, начиная от моделей с низкой степенью резистентности и кончая высокорезистентными клеточными моделями (Таблица 5).

Таблица 5 – Панель выведенных химиорезистентных моделей HCT116

Степень резистентности	**Обозначение модели**	**Концентрация таксола, мкМ**	**Превышение значения IC_{50}**
Низкая	S1	0,01	0,08
	S2	0,03	0,25
Умеренная	M1	0,06	0,5
	M2	0,12	1
	M3	0,24	2
	M4	0,48	4
Высокая	H1	0,96	8
	H2	1,92	16
	H3	*2,30*	*19,2*

Следует отметить, что после получения стабильной клеточной линии, устойчивой к концентрации таксола 1,92 мкМ, дальнейшее двукратное увеличение оказалось невозможным. Это может быть связано с истощением потенциала устойчивости клеток к таксолу на всех возможных уровнях, включая генетические механизмы, при котором дальнейшее повышение концентрации таксола в 2 раза становится лимитирующим фактором, запускающим клеточную гибель. Мы сделали несколько попыток продолжить выведение резистентных клеток на концентрациях, промежуточных между 3,84 и 1,92 мкМ, и

положительного результата достигли лишь при повышении концентрации таксола до 2,3 мкМ. Данная модель стала последней в панели выведенных резистентных линий, а последнее увеличение концентрации таксола составило 1,2 раза.

Таким образом, при использовании исходной концентрации таксола, в 10 раз меньше значения IC_{50}, была достигнута устойчивость клеток к таксолу в концентрациях, превышающих это значение более чем в 16 раз (Таблица 6). Выведение каждой химиорезистентной клеточной модели сопровождалось различающейся продолжительностью культивирования, которая определялась степенью активации адаптационных механизмов клеток. Временем выведения клеточной модели считался период времени, требующийся для достижения клетками скорости роста, близкой или сопоставимой со скоростью роста клеток HCT116 дикого типа. На основании использованной концентрации таксола, а также продолжительности выведения, полученные химиорезистентные модели были разделены на 3 группы (Таблица 5, Рисунок 6).

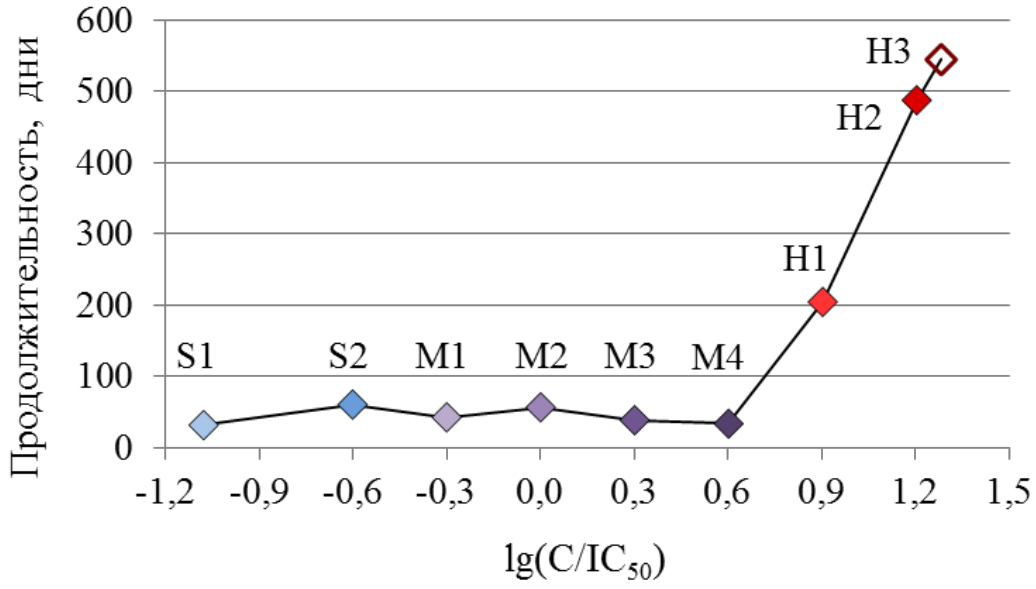


Рисунок 6 – Зависимость продолжительности выведения химиорезистентных моделей HCT116 от используемой концентрации таксола.

Таблица 6 – Значения IC_{50} таксола и индекс резистентности для химиорезистентных моделей

Обозначение клеточной модели	**IC_{50}, мМ**	**Индекс резистентности**
S1	$0{,}83 \cdot 10^{-3}$	7
S2	$2{,}5 \cdot 10^{-3}$	21
M1	$5 \cdot 10^{-3}$	42
M2	$9{,}9 \cdot 10^{-3}$	83
M3	0,04	$0{,}3 \cdot 10^{3}$
M4	0,24	$2 \cdot 10^{3}$
H1	0,43	$3{,}6 \cdot 10^{3}$
H2	0,76	$6{,}3 \cdot 10^{3}$
H3	*0,86*	$7{,}1 \cdot 10^{3}$

Выживание клеток при повышении концентрации таксола требует развития различающихся механизмов устойчивости, и в каждом конкретном случае обработки затрачивается определенное количество времени. Обработка клеток исходной концентрацией таксола обеспечила незначительную выработку механизмов для защиты клеток от действия таксола в повышенной концентрации, что выразилось в частичной гибели клеток на 3 сутки обработки. Необходимость формирования глубинных механизмов устойчивости проявилась в том, что для получения модели S2 продолжительность выведения химиорезистентных клеток значительно увеличилась относительно периода создания модели S1 (Рисунок 6).

Сформированный на данном этапе уровень резистентности клеток обеспечил первичную защиту клеток от действия таксола на этапе следующего повышения концентрации, при котором наблюдалось лишь снижение скорости пролиферации клеток. Это привело к сокращению периода времени, необходимого для выработки устойчивости модели M1. Подобная тенденция

также наблюдалась при получении всех групп моделей с умеренной резистентностью (М2–М4, Рисунок 6).

Дальнейшее повышение концентрации таксола сопровождалось значительной гибелью клеток на 2 сутки присутствия препарата в среде. Это говорит о том, что в основной популяции клеток механизмов, сформированных для защиты клеток от таксола, оказывается недостаточно. Формирование устойчивости к концентрациям таксола, более чем в 8 раз превышающим значение IC_{50}, требует значительных изменений на генном уровне. В связи с этим общая продолжительность выведения модели Н1 увеличилась в 6 раз относительно времени создания модели М4. Сформированная устойчивость клеток позволил снизить цитотоксическое воздействие таксола на клетки на следующем этапе повышения концентрации, при дальнейшем увеличении продолжительности выведения.

Несмотря на то, что химиорезистентная модель Н3 была получена, она обладала крайне высокой чувствительностью к внешним факторам. Хотя нам удалось достичь устойчивого роста клеток, скорость роста оказалась заметно сниженной относительно клеток дикого типа. Это может свидетельствовать о том, все доступные адаптационные механизмы задействованы в обеспечении устойчивости к таксолу и данная концентрация таксола является предельной.

Для каждой опухолевой клеточной линии существует своя предельная концентрация препарата, к которой клетки способны выработать устойчивость. Это характеризует потенциал развития устойчивости клеток к препарату. Например, для клеток рака молочной железы человека MCF-7 и SK-BR-3 такими концентрациями являлись концентрации таксола, превышающие IC_{50} для клеток дикого типа в 30 и 7 раз, соответственно [9]. В нашем случае предельно допустимой концентрацией для получения клеток HCT116, устойчивых к таксолу, являлась концентрация, которая более чем в 19 раз превышает значение IC_{50} для клеток дикого типа.

Все выведенные химиорезистентные клеточные модели характеризуются значительной устойчивостью к таксолу относительно клеток дикого типа, что

проявляется в существенном увеличении значений IC_{50} таксола (Таблица 6). Отношение IC_{50} таксола для выведенных моделей к соответствующему значению для клеток дикого типа называют индексом резистентности. Для полученных моделей индекс резистентности составил от 7 до 7128.

Согласно полученным данным, наиболее прогрессирующим развитием устойчивости к таксолу характеризуются модели S1 и M4. В свою очередь у моделей H1 и H2 отмечается наименьший темп развития устойчивости. Наблюдаемую тенденцию можно объяснить специфическим потенциалом моделей с низкой и умеренной резистентностью к развитию устойчивости к таксолу с последующим приближением к исчерпанию резерва клеточных механизмов защиты при продолжительном выведении моделей в условиях высоких концентраций препаратов.

Оценка стабильности химиорезистентности моделей

Стабильность химиорезистентности клеточных моделей – важная характеристика клеток, которая отражает уровень механизмов, вовлеченных в обеспечение резистентности. Кроме того, данная характеристика определяет достоверность результатов при исследовании способности препаратов к преодолению резистентности опухолевых клеток. В настоящем исследовании стабильность химиорезистентности полученных клеточных моделей определяли по скорости потери химиорезистентных свойств, которую оценивали с помощью того же препарата, который использовали для формирования резистентных свойств.

Скорость потери химиорезистентных свойств определяли путем культивирования полученных клеточных моделей в стандартных условиях и дальнейшей оценки жизнеспособности клеток по используемому протоколу. После «снятия» моделей с препарата, проводили обработку клеток таксолом в различных концентрациях и через различные промежутки времени, начиная с 1

недели. Так, модели группы S (низкая резистентность) быстро теряют свои химиорезистентные характеристики при культивировании без таксола в среде. Уже через неделю обработка клеток таксолом в концентрации, близкой к значению IC_{50} для дикого типа, вызывает существенную клеточную гибель (Рисунок 7), сопоставимую с показателями выживаемости клеток дикого типа. Это говорит о невозможности использования клеточных моделей группы S для изучения химиорезистентности клеток. В противном случае, полученные результаты будут идти вразрез с клинической картиной химиорезистентности и попытки преодоления устойчивости опухолевых клеток будут неэффективными. При этом модели с низкой степенью резистентности могут быть интересны с точки зрения изучения динамики формирования устойчивости клеток к препарату.

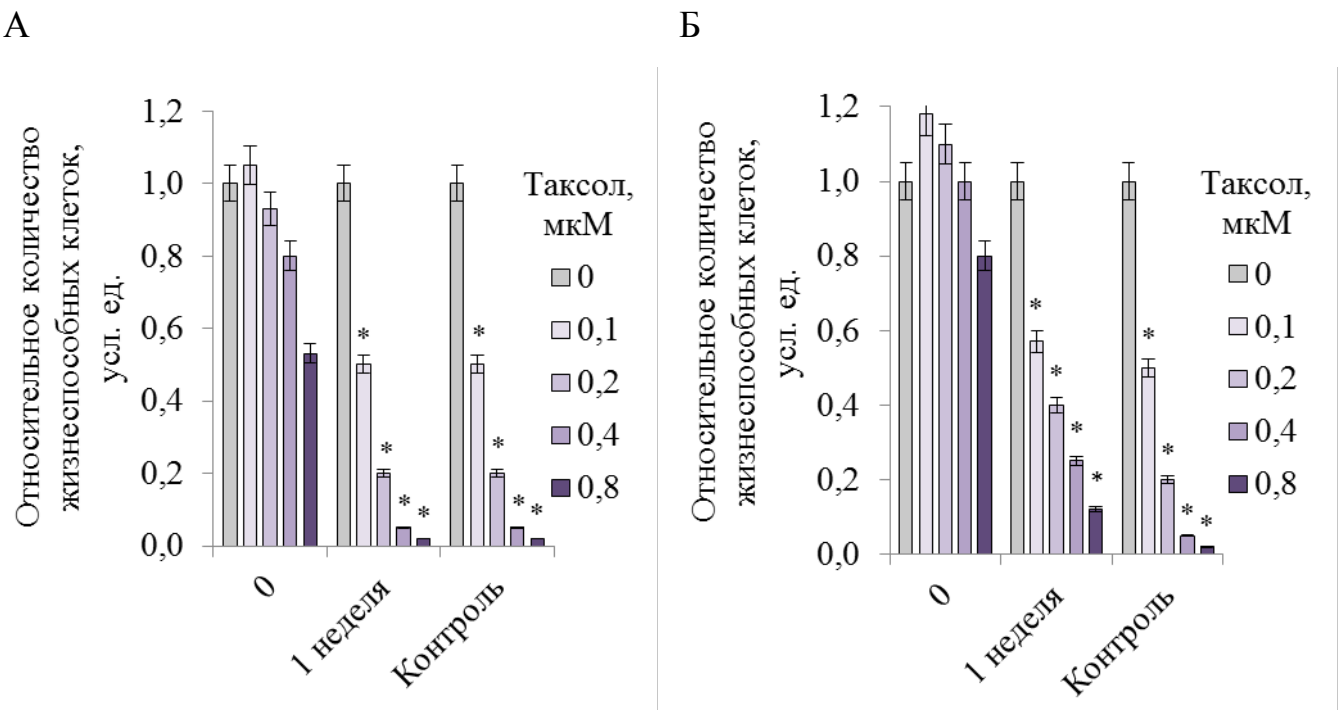


Рисунок 7 – Жизнеспособность клеток моделей S1 (А) и S2 (Б) при действии таксола после культивирования в стандартных условиях. Статистическую значимость относительно аналогичных значений моделей, культивируемых в присутствии таксола, оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

Химиорезистентные модели группы М (умеренная резистентность) сохраняют стабильную устойчивость к таксолу в течение двух недель (Рисунок 8). Однако уже через месяц после удаления препарата из среды отмечается существенное снижение резистентности клеток, что видно по существенному цитотоксическому действию таксола в исследованном диапазоне концентраций. Интересно отметить, что таксол в исследованном диапазоне концентраций вызывал также эффект стимулирования жизнеспособности клеток. Это может свидетельствовать в пользу того, что для химиорезистентных клеток таксол становится необходимым компонентом питательной среды. Таким образом, проведение экспериментов, основной целью которых является поиск способов преодоления устойчивости клеток, в течение 2 недель с момента отмены препарата позволяет получить данные с высокой степенью достоверности.

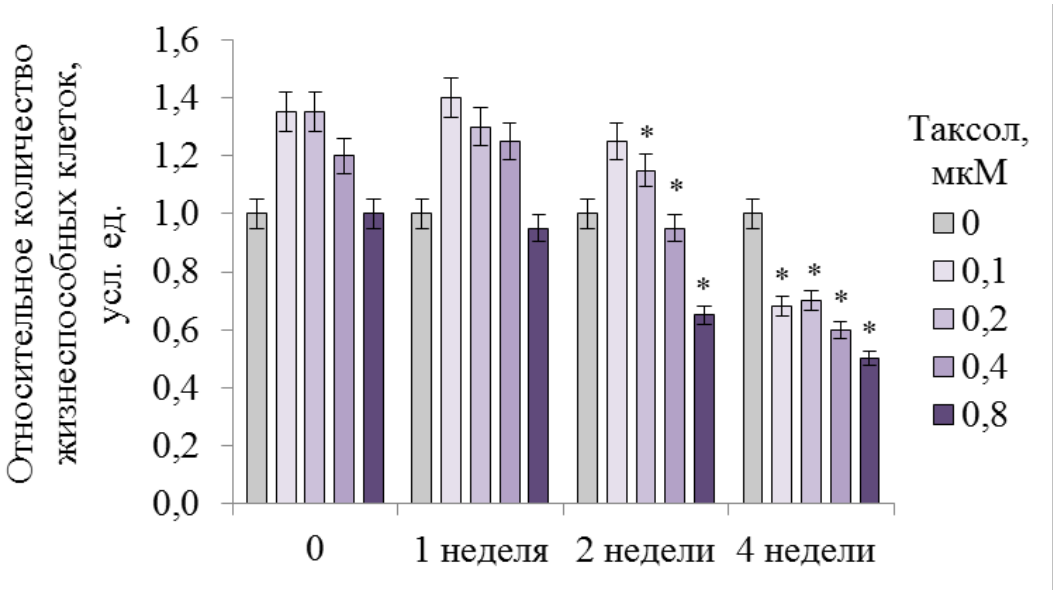


Рисунок 8 – Жизнеспособность клеток моделей группы М при действии таксола после культивирования в стандартных условиях на примере модели М1. Статистическую значимость относительно аналогичных значений модели, культивируемой в присутствии таксола, оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

В случае моделей группы Н, характеризующихся высокой степенью резистентности, высокая устойчивость клеток к таксолу сохраняется вплоть до месяца культивирования в стандартных условиях (Рисунок 9). При этом наблюдаемый эффект стимулирования жизнеспособности клеток в присутствии таксола в исследованном диапазоне концентраций более выражен, чем при рассмотрении моделей группы М. Это может говорить о крайне развитой резистентности моделей группы Н к таксолу, обусловленной изменениями на генетическом уровне. Использование данных моделей в рамках *in vitro* исследований возможно на протяжении длительного времени.

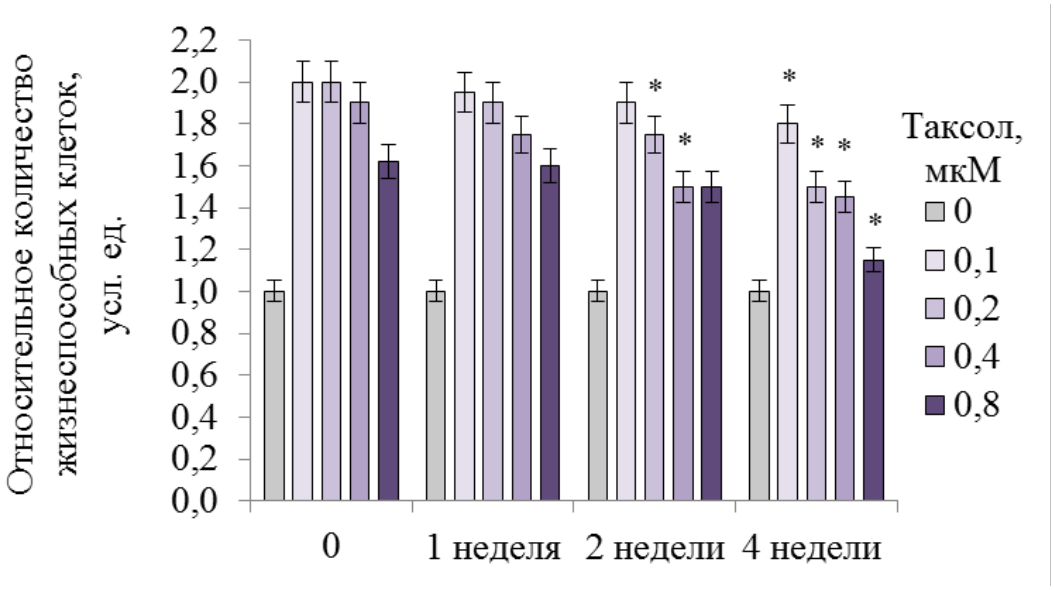


Рисунок 9 – Жизнеспособность клеток моделей группы Н при действии таксола после культивирования в стандартных условиях на примере модели Н1. Статистическую значимость относительно аналогичных значений модели, культивируемой в присутствии таксола, оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

Следует отметить, что при снятии химиорезистентных клеток с препарата у моделей с развитой резистентностью наблюдаются признаки стресса, степень которого находится в прямой зависимости от использованной для выведения концентрации таксола. Наблюдаемый «эффект отмены», вероятно, связан с

зависимостью клеток от таксола, которая возникает на фоне задействования механизмов, участвующих в формировании устойчивости клеток в процессе канцерогенеза [44].

Таким образом, результаты, полученные при оценке стабильности химиорезистентности созданных моделей, подтверждают участие различных механизмов формирования резистентности.

Оценка морфологических параметров моделей

Морфологические особенности клеток являются прямым проявлением многих клеточных процессов. Развитие устойчивости опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам сопровождается морфологическими изменениями, что является следствием перестройки клеточных процессов в целях адаптации. При этом изменения в морфологии клеток определяются природой химиорезистентности опухолевых клеток.

Таблица 7 – Содержание округлых клеток в популяциях моделей

Клеточные модели	**Содержание округлых клеток, %**
S1	14
M1	54
M3	58
H1	72
H3	75

При выведении химиорезистентных клеточных моделей было отмечено изменение некоторых морфологических параметров относительно клеток дикого типа, рассматриваемых в качестве контроля. Начиная с резистентной клеточной модели S1, в популяции появлялось значительное количество округлых клеток,

что сохранялось на протяжении выведения всех последующих химиорезистентных клеточных моделей. Количественные показатели содержания округлых клеток в популяциях моделей с различной степенью резистентности к таксолу получены с использованием имиджинговой системы и представлены в Таблице 7. На фоне развития общей устойчивости опухолевых клеток к увеличивающимся концентрациям таксола отмечается увеличение доли клеток, подверженных цитотоксическому действию препарата (Рисунок 10).

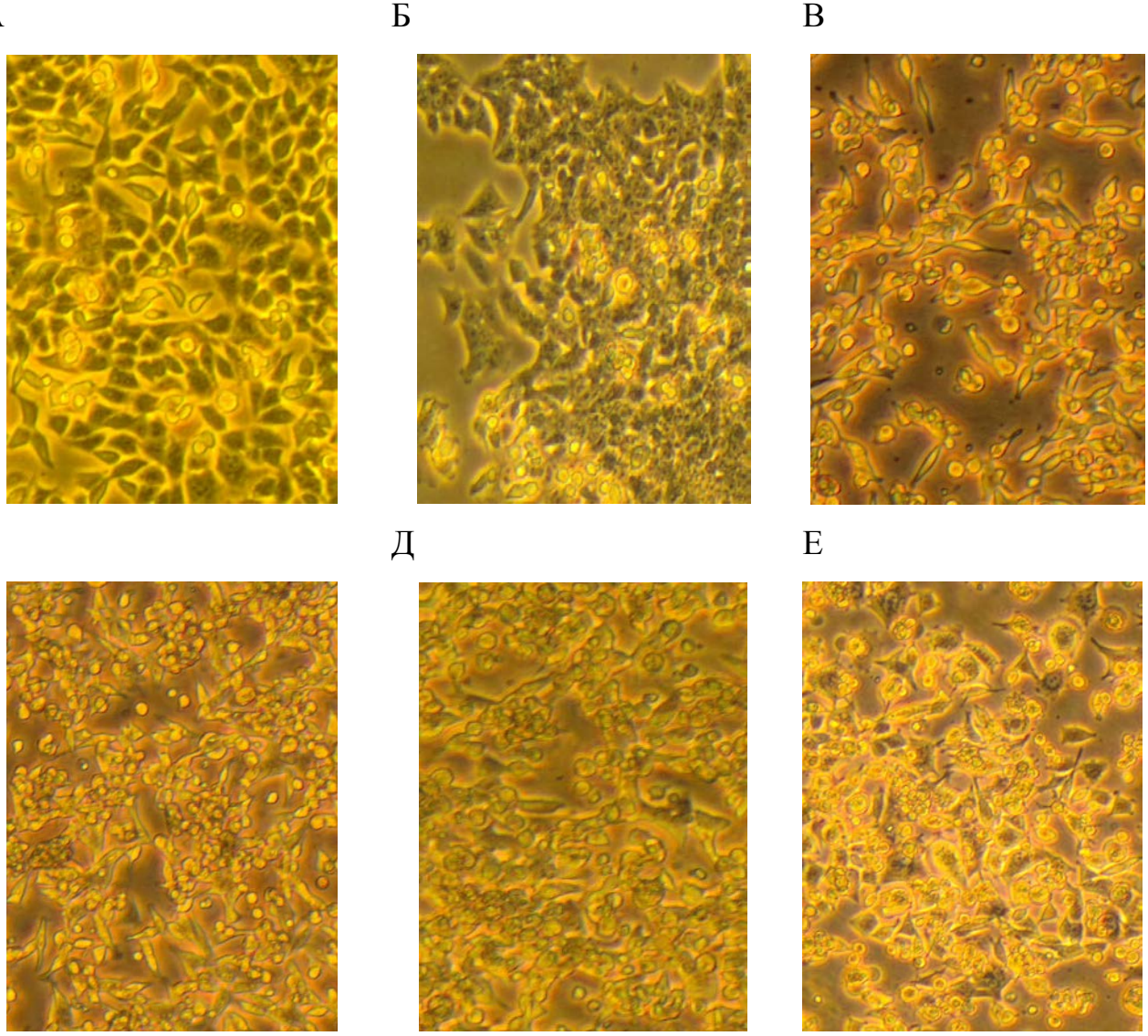


Рисунок 10 – Увеличение количества округлых клеток при выведении химиорезистентных к таксолу моделей. А – контроль, Б – модель S1, В – модель M1, Г – модель M3, Д – модель H1, Е – модель H3.

Для выведенных моделей было также отмечено увеличение размера клеток относительно контроля. Количественные показатели размеров клеток и площади поверхности клеток получали с использованием имиджинговой системы (Рисунок 11). В качестве оценочного параметра использовали среднее значение площади поверхности клеток. Согласно полученным данным, наблюдается тенденция увеличения размера клеток полученных моделей с повышением уровня химиорезистентности клеток (Таблица 8).

А Б

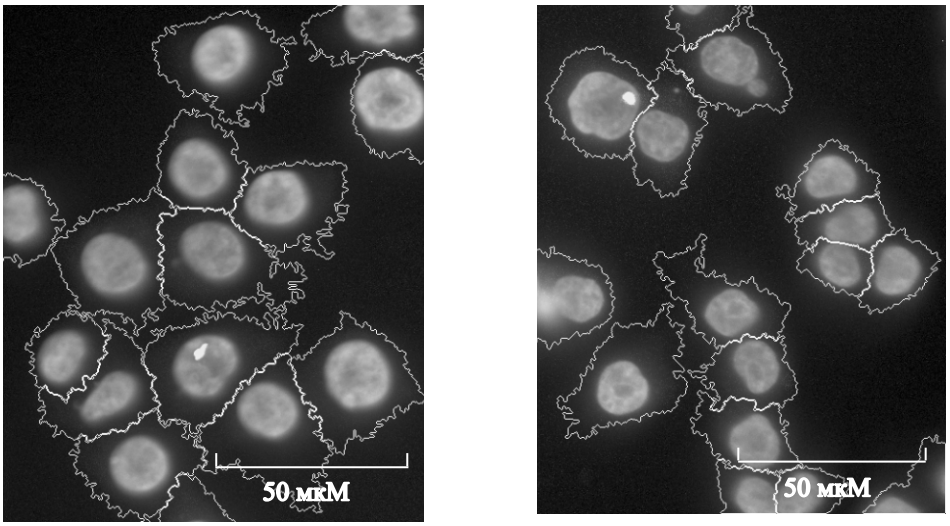


Рисунок 11 – Пример оценки площади поверхности клеток химиорезистентной модели H1 (А) и контроля (Б) с использованием имиджинговой системы.

Согласно литературным сведениям, обработка клеток противоопухолевыми препаратами, в частности таксолом, может приводить к увеличению размеров клеток. Увеличенные в размерах клетки носят название гигантских опухолевых клеток, при этом они характеризуются потенциалом к метастазированию и развитию химиорезистентности [163]. Формирование потенциала к метастазированию и прогрессированию у опухолевых клеток также является следствием эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП), который, в свою

очередь, может быть вызван развитием резистентности опухолевых клеток к химиотерапевтическому агенту.

Таблица 8 – Площадь поверхности контрольных клеток и клеток химиорезистентных моделей

Клеточные модели	**Площадь поверхности, мкм^2**
Контроль	424±21
S1	435±22
M1	482±24
M3	505±25
H1	572±29
H3	644±32

ЭМП предполагает улучшение миграционных и инвазивных свойств клеток, что сопровождается нарушением клеточной полярности, перестройкой цитоскелета, нарушением межклеточной адгезии и изменением адгезии клеток к матриксу. Морфологическими особенностями опухолевых клеток при ЭМП являются их веретенообразная форма и образование псевдоподий [164]. Подобные морфологические особенности, наряду со сниженной адгезией, были также обнаружены у выведенных химиорезистентных моделей (Рисунок 12). Это подтверждает подверженность клеток эпителиально-мезенхимальному переходу и формированию потенциала к метастазированию.

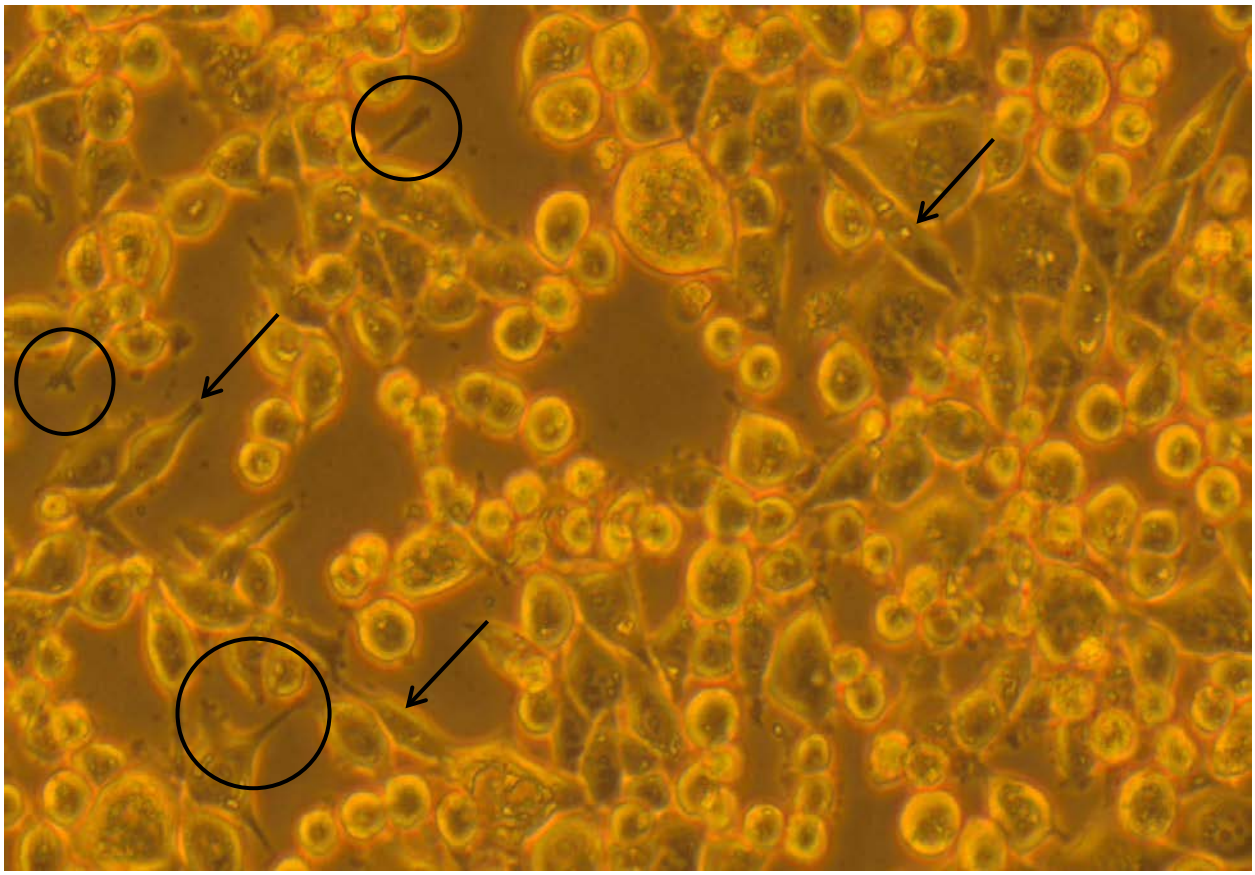


Рисунок 12 – Веретенообразная форма (отмечено стрелкой) химиорезистентных клеток и образование псевдоподий (отмечено окружностью) на примере модели М1.

Для количественной оценки адгезивной способности выведенных моделей определяли уровни экспрессии гена Е-кадгерина (*CDH1*) в химиорезистентных моделях и контрольной линии. Е-кадгерин участвует в образовании межклеточных контактов, а также является маркером снижения адгезии опухолевых клеток и развития ЭМП [165]. Результаты исследования, проведенного методом ПЦР-анализа, приведены в Таблице 9.

Таблица 9 – Относительные уровни экспрессии гена Е-кадгерина

Клеточные модели	**Ген *CDH1*, $\times 10^{-5}$**
Контроль	50±2,50
S1	18±0,90
M1	6,00±0,30
M3	4,30±0,22
H1	3,50±0,17
H3	3,30±0,17

Согласно полученным результатам, устойчивые к таксолу модели характеризуются пониженной экспрессией гена Е-кадгерина относительно контроля. При этом экспрессия *CDH1* снижается по мере развития химиорезистентности моделей. Это согласуется с экспериментальными наблюдениями адгезивной способности выведенных моделей.

Таким образом, увеличение размеров опухолевых клеток моделей, резистентных к повышающимся концентрациям таксола, наравне с их морфологическими изменениями и ослабленной адгезией, свидетельствуют об усилении потенциала резистентных клеток к метастазированию по мере увеличения степени резистентности.

Характеристика химиорезистентных моделей

Воздействие химиотерапевтических препаратов на опухолевые клетки приводит к выработке клетками различных защитных механизмов, позволяющих снизить терапевтическое действие препарата и обеспечить выживаемость клеток. Лечение препаратами группы таксанов, в частности, таксолом, неизбежно приводит к развитию перекрестной устойчивости к остальным представителям группы. Механизм устойчивости обусловлен мутациями в генах изотипов β-

тубулина, отличающихся меньшей динамичностью, а также повышенной экспрессией высокодинамичных изотипов β-тубулина. Это обеспечивает снижение стабилизации таксанами β-тубулина микротрубочек, что позволяет опухолевым клеткам пройти митоз без его остановки и клеточной гибели [44].

В то же время отмечается, что наряду с перекрестной устойчивостью, когда пациент перестает отвечать на терапию таксолом, формируется устойчивость опухолевых клеток к другим противоопухолевым препаратам с иным механизмом действия, что проявляется в неэффективности различных терапевтических стратегий, имеющихся в арсенале у клиницистов. Таким образом, эффективность применения препаратов таксановой группы ограничивается возникновением множественной лекарственной устойчивости опухоли. При этом ключевым белком-транспортером, определяющим развитие множественной лекарственной устойчивости при терапии таксолом и другими представителями группы, является Р-гликопротеин. Особенно ярко это проявляется в контексте рака гортани и молочной железы человека [9, 166, 167].

Сам феномен множественной лекарственной устойчивости к противоопухолевым препаратам различного механизма действия может определяться различными механизмами, однако наиболее универсальным является повышенный эффлюкс препаратов, который осуществляется белками-транспортерами семейства ABC. Среди известных транспортеров, на сегодняшний день терапевтически значимыми являются три: Р-гликопротеин (P-gp), белок устойчивости рака молочной железы человека (BCRP), а также белок множественной лекарственной устойчивости (MRP1) [4]. Повышенная активность этих транспортеров была выявлена при изучении природы множественной резистентности конкретных типов опухолевых клеток.

Тем не менее, раковые клетки обладают высоким адаптационным потенциалом и способны запускать компенсаторные механизмы. Учитывая достаточно сильно перекрывающуюся субстратную специфичность ABC-транспортеров [4], дублирование функций, вероятно, должно обеспечивать требуемый интегральный эффект. Мы предположили, что в случае формирования

множественной резистентности при обработке таксолом нельзя ограничиваться рассмотрением лишь ключевого белка, Р-гликопротеина. Поэтому при исследовании полученных резистентных моделей мы провели оценку вклада всех трех терапевтически значимых транспортеров семейства ABC.

Оценка уровня экспрессии генов ABC-транспортеров

Вклад основных клинически значимых транспортеров семейства ABC в формировании множественной резистентности у клеток аденокарциномы толстой кишки человека при обработке таксолом оценивался, в первую очередь, по уровню экспрессии генов транспортеров. Исследование проводили на полученных моделях с умеренной и высокой резистентностью. Модели с низкой резистентностью не были рассмотрены в связи с нестабильностью устойчивости.

Для оценки уровней экспрессии генов ABC-транспортеров методом ПЦР-анализа были подобраны соответствующие праймеры, позволяющие получать продукты в пределах 135-168 п.о. и обладающих высокой селективностью к генам рассматриваемых транспортеров. В качестве контроля рассматривали клетки дикого типа, нормализацию результатов проводили относительно экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH. Полученные результаты ПЦР-анализа представлены в Таблице 10.

Согласно полученным данным в клетках дикого типа наблюдается достаточно равномерное распределение по экспрессии генов рассматриваемых транспортеров. Экспрессия гена P-gp и BCRP практически одинакова, в то время как экспрессия гена MRP1 в два раза меньше. При этом в клетках резистентных моделей наблюдается резкое увеличение экспрессии генов как P-gp, так и BCRP. Наблюдаемое увеличение экспрессии генов транспортеров говорит об их участии в формировании фенотипа множественной резистентности. Интересно отметить, что при увеличении экспрессии генов P-gp и BCRP уровень экспрессии гена MRP1 снижается на порядок и остается на этом уровне вне зависимости от

степени сформированной резистентности. Можно предположить, что этот уровень является минимально необходимым для обеспечения выброса субстратов, специфичных исключительно для MRP1.

Таблица 10 – Относительные уровни экспрессии генов ABC-транспортеров

Клеточная линия	**Ген ABC-транспортера**		
	ABCB1 (P-gp), $\times 10^{-2}$	*ABCG2* (BCRP), $\times 10^{-2}$	*ABCC1* (MRP1), $\times 10^{-2}$
Контроль	0,048±0,002	0,047±0,002	0,020±0,001
M1	3,00±0,15	9,10±0,45	0,00150±0,00007
M2	4,40±0,22	7,90±0,40	0,00140±0,00007
M3	6,00±0,30	11,00±0,50	0,00190±0,00010
M4	5,50±0,27	18,00±0,90	0,00260±0,00013
H1	14,00±0,70	41,00±2,00	0,00076±0,00004
H2	21,00±1,10	53,00±2,60	0,00180±0,00009

Результаты оценки уровней экспрессии генов ABC-транспортеров в выведенных клеточных моделях выявили более интенсивное нарастание экспрессии гена BCRP по сравнению с P-gp. Так, клеточная модель M1 характеризуется превышением экспрессии генов белков P-gp и BCRP более чем в 60 и 190 раз, соответственно, относительно чувствительных клеток. Максимальное увеличение экспрессии рассматриваемых генов наблюдается в клеточной модели H2 с высокой степенью резистентности к таксолу, при которой экспрессия P-gp превышает уровень экспрессии гена в контрольных клетках почти в 450 раз, а BCRP – в 1150 раз. Полученные результаты соответствуют разделению моделей по степени резистентности на умеренную и высокую (Рисунок 13). Тем не менее, на уровне экспрессии генов, больший вклад вносит BCRP.

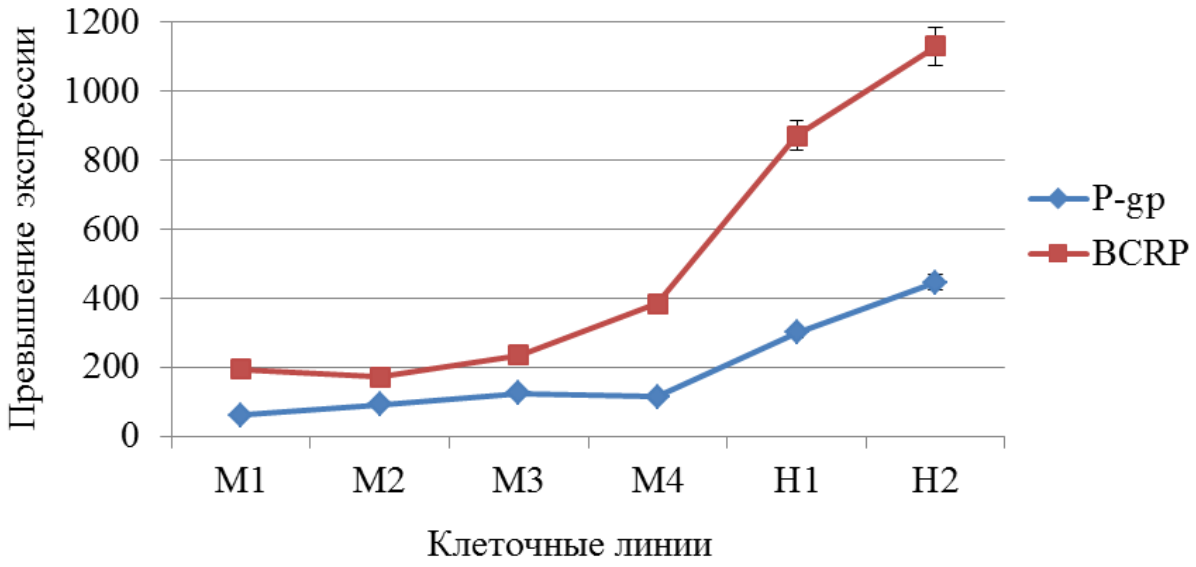


Рисунок 13 – Превышение уровня экспрессии генов ABC-транспортеров в химиорезистентных моделях относительно контрольного уровня.

Таким образом, оценка уровней экспрессии генов ABC-транспортеров в химиорезистентных клеточных моделях позволяет сделать вывод о потенциальном участии не только P-gp, который считается основным движущим фактором при формировании множественной резистентности при действии препаратов таксановой группы, но и BCRP, повышенная экспрессия которого определяет множественную резистентность преимущественно в раке молочной железы человека.

Оценка экспрессии белковых продуктов

Экспрессия генов является достаточно ярким показателем, однако транспортные функции белков семейства ABC определяются именно на белковом уровне. Поэтому данные по экспрессии генов были дополнены данными по экспрессии белков. Определение уровней экспрессии белков P-gp и BCRP осуществляли двумя различными методами: иммуноцитохимического анализа и вестерн-блот анализа, что позволяет получить достоверные данные по содержанию белков в клетках резистентных моделей. В связи с тем, что уровень

экспрессии гена MRP1 в полученных химиорезистентных моделях снижен до минимального уровня, оценку экспрессии MRP1 на белковом уровне не проводили.

Иммуноцитохимический анализ экспрессии белков P-gp и BCRP проводили с помощью селективных к соответствующему белку антител, содержащих флуоресцентную метку. В случае анализа экспрессии белка P-gp, использовались антитела, конъюгированные с производным флуоресцеина (изотиоцианат флуоресцеина, FITC), обладающим зеленой флуоресценцией. Анализ экспрессии белка BCRP проводили с применением антител, конъюгированных с аллофикоцианином, белком семейства фикобилипротеинов с флуоресценцией в дальней красной области спектра. Использование меченых антител позволяет не только провести количественную оценку содержания интересующих белков, но также визуализировать полученные результаты с использованием имиджинговой системы.

Для оценки экспрессии P-gp и BCRP на белковом уровне использовали показатель интенсивности свечения клеток, обработанных конъюгированными антителами. Определяемым параметром выступало среднее значение флуоресценции клеток. В качестве контроля выступали клетки дикого типа. Количественные данные по экспрессии рассматриваемых белков-транспортеров в разработанных химиорезистентных моделях представлены в Таблице 11.

Согласно полученным результатам, экспрессия как P-gp, так и BCRP повышается значительно во всех рассмотренных резистентных моделях. При этом экспрессия транспортных белков планомерно увеличивается с повышением степени химиорезистентности моделей. Наблюдаемые тенденции согласуются с данными, полученными на уровне экспрессии генов. Тем не менее, максимальное превышение экспрессии белка P-gp по сравнению с контрольной линией составляет 1,4 раза, тогда как экспрессия белка BCRP увеличивается в 4,2 раза, что подтверждает ABC-транспортер-опосредованный характер устойчивости моделей с превалированием BCRP над P-gp.

Таблица 11 – Флуоресценция клеток контроля и химиорезистентных моделей

Клеточная линия	**ABC-транспортер**	
	FITC (P-gp)	APC (BCRP)
Контроль	426±21	94±5
M1	480±24	179±9
M2	508±25	222±11
M3	535±27	264±13
M4	562±28	307±15
H1	590±29	349±17
H2	617±31	392±20

К сожалению, данные по экспрессии белков P-gp и BCRP, полученные иммуноцитохимическим методом, нельзя сравнить между собой. Это связано как с различной аффинностью используемых антител к соответствующим белкам, а также различной интенсивностью флуоресценции конъюгированных меток. Визуализация результатов иммуноцитохимического на примере модели H1 с высокой степенью резистентности, полученные на имиджинговой системе Operetta, представлена на Рисунках 14–15.

А Б

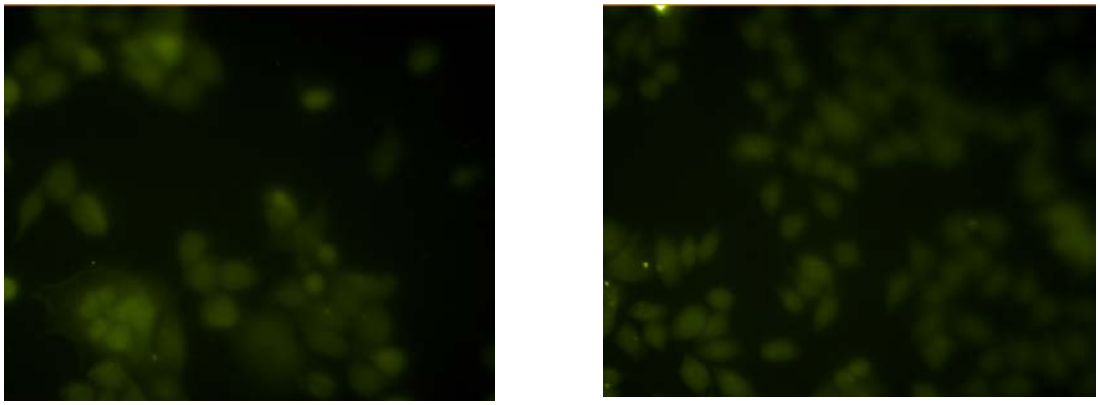


Рисунок 14 – Пример окрашивания клеток химиорезистентной модели H1 (А) и контроля (Б) антителами к P-gp, конъюгированными с FITC.

А Б

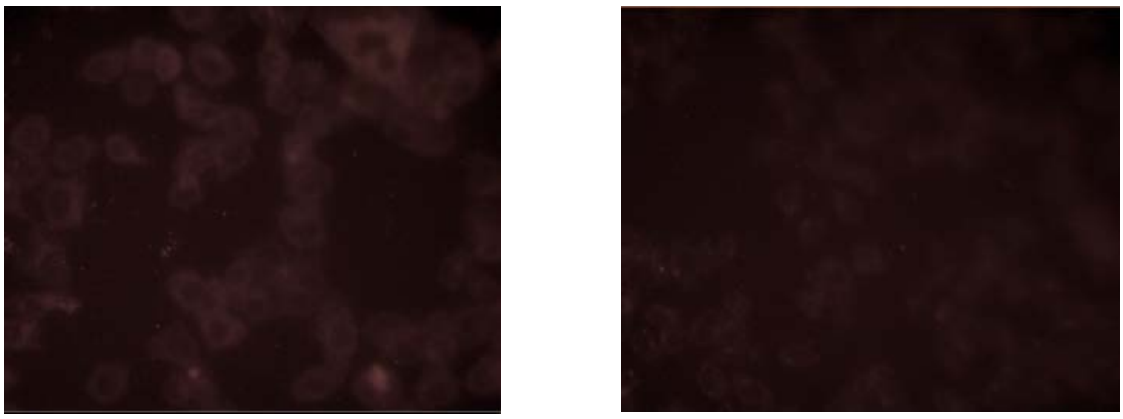


Рисунок 15 – Пример окрашивания клеток химиорезистентной модели H1 (А) и контроля (Б) антителами к BCRP, конъюгированными с APC.

Дополнительно уровни экспрессии P-gp и BCRP в клетках оценивали методом вестерн-блот анализа. Детектирование P-gp и BCRP белков осуществляли с использованием специфических к белкам антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP), необходимой для хемилюминесцентного обнаружения целевых белков. Для сравнения в обоих случаях использовали клетки дикого типа. На основе результатов гель-документирования проводили полуколичественную оценку уровней экспрессии

белков-транспортеров в клетках, при которой интенсивность полученных белковых линий P-gp и BCRP соотносили с соответствующим сигналом GAPDH.

В целом, полученные данные согласуются с данными ПЦР-анализа и иммуноцитохимического окрашивания клеток. Нам удалось зафиксировать повышенную экспрессию P-gp и BCRP в клетках химиорезистентных моделей, увеличивающуюся по мере развития устойчивости к таксолу. При этом экспрессия P-gp в контрольных клетках практически не фиксировалась (Рисунок 16). Подобное расхождение можно объяснить использованием методов анализа экспрессии белков, различающихся процедурами пробоподготовки, окрашивания антителами, а также проявки антител.

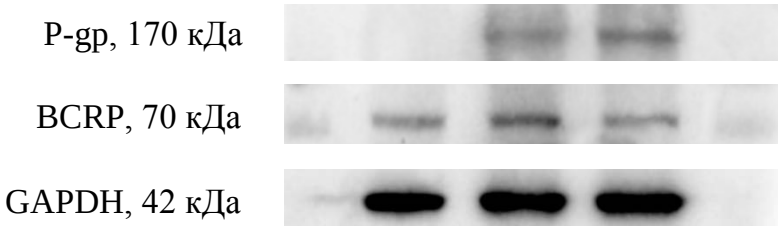


Рисунок 16 – Пример анализа уровней экспрессии P-gp и BCRP в клетках контроля и моделях H1 и H2 относительно GAPDH.

Таким образом, на белковом уровне было также подтверждено задействование как P-gp, так и BCRP в обеспечении резистентности клеток полученных моделей. При этом BCRP, по всей видимости, играет в данном случае ведущую роль. Данный результат еще раз подтверждает наше предположение о том, что устойчивость опухолевых клеток к таксолу может формироваться индивидуальным образом в зависимости от типа клеток.

Оценка транспортной активности ABC-белков

Множественная лекарственная устойчивость, обусловленная повышенной экспрессией ABC-транспортеров, проявляется в виде выброса противоопухолевого препарата из клеток при непосредственном участии этих транспортеров [168]. При этом интенсивность выброса определяется как транспортная активность белков семейства ABC.

Для того, чтобы оценить транспортную активность чаще всего используют специфические флуюресцентные вещества (красители), являющиеся субстратами транспортных белков. Эффлюкс таких веществ легко визуально контролировать и количественно оценивать по изменению интенсивности флуоресценции внутри клетки. Для белка P-gp таким классическим субстратом является R123, который часто используют в качестве прижизненного митохондриального красителя.

Оценку транспортной активности P-gp в полученных резистентных моделях проводили в присутствии тариквидара (ТКД), ингибитора третьего поколения, обладающего высоким сродством к P-gp. Было показано снижение накопления R123 клетками химиорезистентных моделей по сравнению с контролем, клетками дикого типа, с увеличением степени резистентности клеток, что согласуется с полученными ранее данными и подтверждает факт P-gp-опосредованной резистентности (Рисунок 17).

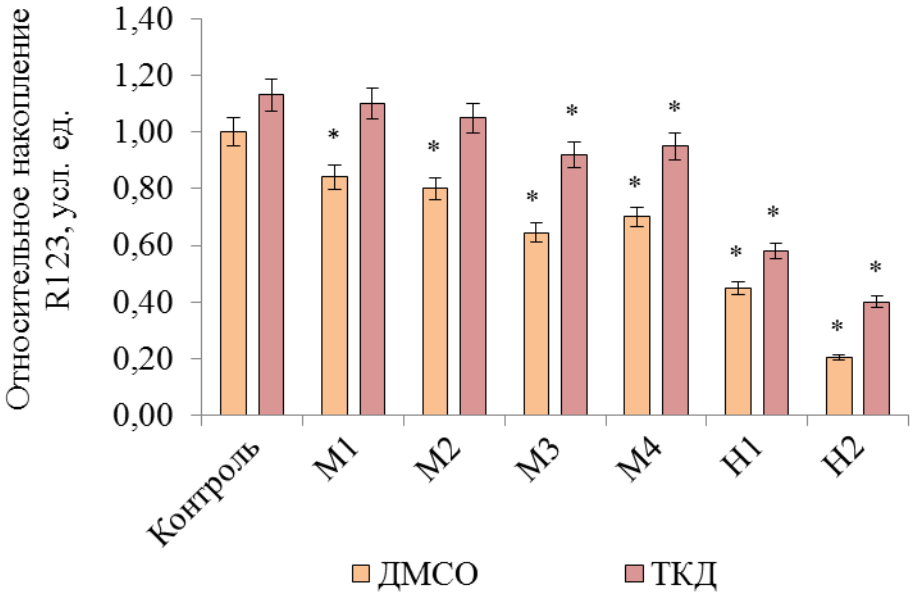
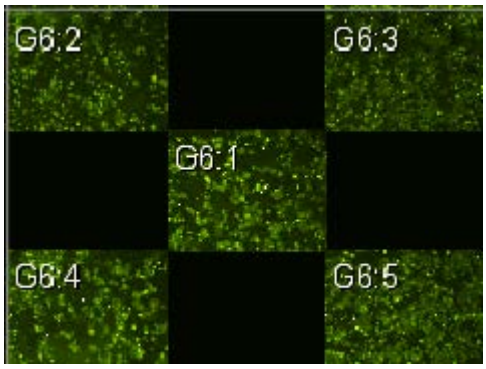
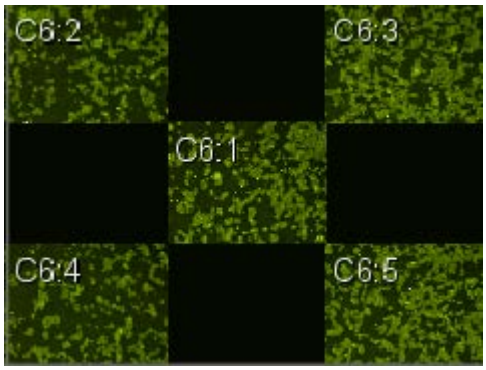


Рисунок 17 – Оценка транспортной активности P-gp по накоплению R123 в резистентных моделях. ТКД – тариквидар. Статистическую значимость различий относительно контроля оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

В то же время применение ингибитора P-gp на резистентных моделях позволяет снизить активность транспортера и тем самым увеличить накопление красителя. В случае химиорезистентных моделей группы M накопление R123 восстанавливается до уровней, сопоставимых с контролем. В случае моделей с высокой степенью резистентности восстановления до уровня контроля не было достигнуто при используемой концентрации тариквидара. Интересно отметить, что обработка тариквидаром контрольной линии HCT116 также приводит к значимому увеличению накопления красителя, что подтверждает наличия некоторого базального уровня транспортной активности P-gp, необходимого для поддержания нормального функционирования клеток. Визуализация результатов оценки транспортной активности P-gp показана на Рисунке 18.





M1, ДМСО M1, ТКД

Рисунок 18 – Накопление R123 клетками химиорезистентной модели M1 в присутствии тариквидара (ТКД).

К сожалению, для BCRP к настоящему времени не было выявлено достаточно селективного субстрата, поэтому оценку его транспортной активности осуществляли на основе интегральных данных с использованием ядерного красителя hoechst 33342, являющегося в равной степени субстратом P-gp и BCRP. Для подавления транспортной активности использовали ортованадат натрия (ОВН), который является неселективный ингибитором ABC-транспортеров и оказывает ингибирующее действие как на P-gp, так и BCRP.

Согласно полученным данным, относительное накопление hoechst 33342 снижается существенно по мере усиления резистентности разработанных моделей (Рисунок 19). При этом эффект от ингибирования активности P-gp оказывается чуть меньше, чем половинный интегральный эффект ингибирования двух транспортеров одновременно, что хорошо видно при исследовании моделей M1 и M2. Данные результаты не только подтверждают существенную активацию как P-gp, так и BCRP в клетках химиорезистентных моделей, но и преобладание вклада BCRP в развитие фенотипа множественной резистентности клеток.

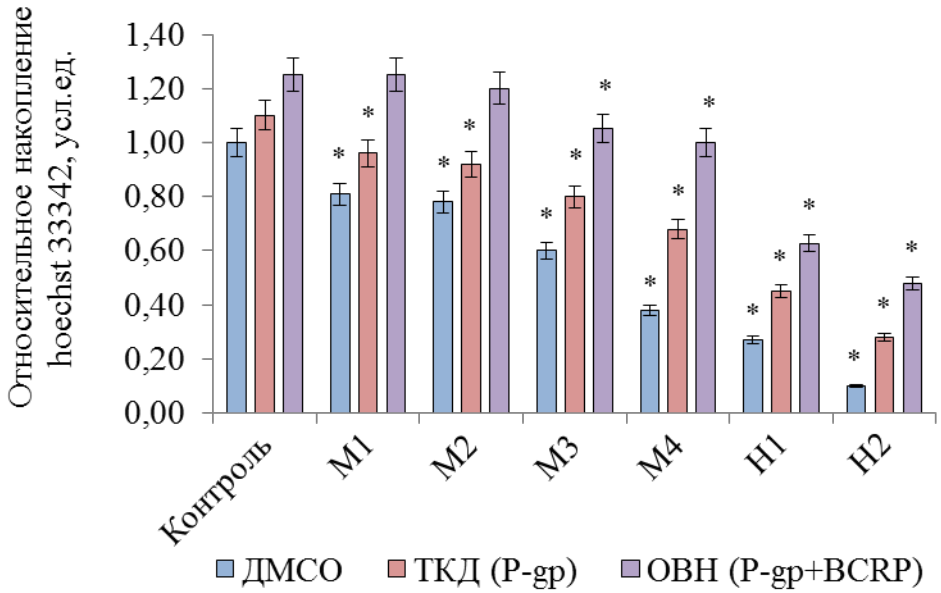
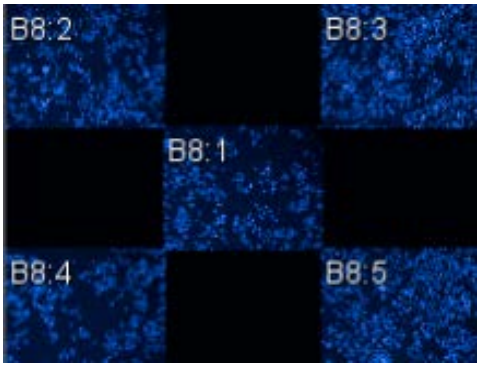


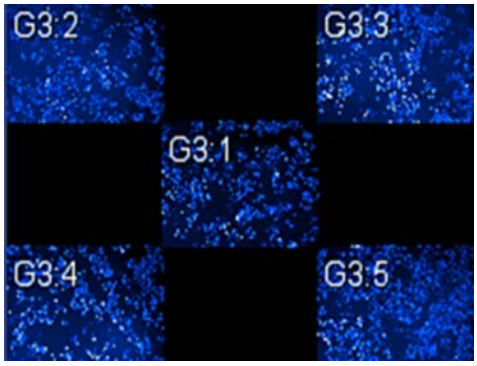
Рисунок 19 – Оценка интегральной транспортной активности P-gp и BCRP по накоплению hoechst 33342 в резистентных моделях. ТКД – тариквидар, ОВН – ортованадат натрия. Статистическую значимость различий относительно контроля оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

При исследовании накопления hoechst 33342 под действием ингибиторов тариквидара и ортованадата натрия наблюдались аналогичные тенденции по увеличению содержания красителя в клетках, как при исследовании накопления R123. В случае моделей с высокой степенью резистентности отмечалось лишь небольшое восстановление накопления. Визуализация результатов оценки интегральной транспортной активности P-gp и BCRP показана на Рисунке 20.

А

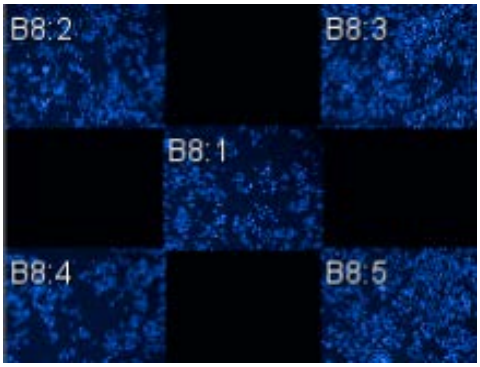


M1, ДМСО

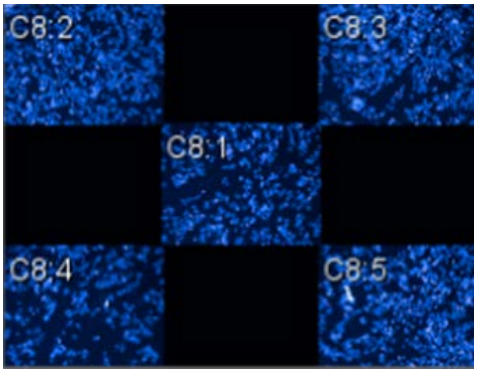


M1, ТКД

Б



M1, ДМСО



M1, ОВН

Рисунок 20 – Накопление hoechst 33342 клетками химиорезистентной модели M1 в присутствии тариквидара (ТКД) (А) и ортованадата натрия (ОВН) (Б).

Таким образом, полученные результаты говорят о выраженной транспортной активности P-gp и BCRP в клетках химиорезистентных моделей, определяющей ABC-транспортер-опосредованный механизм множественной резистентности выведенных клеточных моделей. Функционирование одновременно P-gp и BCRP может обеспечивать устойчивость к еще более широкому ряду химиотерапевтических агентов.

Устойчивость клеток к препаратам различных классов

Повышенная экспрессия, и как следствие, повышенная активность ABC-транспортеров, инициированная действием химиотерапевтического агента, способствует выработке резистентности к этому препарату. Принимая во внимание широкую субстратную специфичность ABC-транспортеров, этот механизм резистентности может распространяться и на другие химиотерапевтические агенты, действующие по другим механизмам. В случае, когда опухолевые клетки резистентны к двум и более препаратам различного механизма действия на фоне повышенной экспрессии транспортных белков семейства ABC, то говорят о формировании фенотипа множественной лекарственной устойчивости.

Для определения профиля лекарственной устойчивости полученных резистентных моделей, была исследована чувствительность клеток к таксолу, а также другим противоопухолевым препаратам, оказывающим противоопухолевый эффект по пути, отличному от стабилизации микротрубочек. В качестве препаратов рассматривали три группы химиотерапевтических агентов: ингибиторы топоизомеразы II, ингибиторы протеасом и таргетные препараты на примере ингибиторов MDM2. Исследование действия препаратов проводили в нескольких концентрациях, во избежание комбинированного эффекта исследуемых соединений с таксолом, высев клеток на анализ осуществляли в питательной среде без таксола.

Согласно полученным данным, выведенные модели продемонстрировали сниженную чувствительность ко всем исследованным препаратам в исследованных концентрациях, что хорошо видно уже на клеточной модели M1 (Рисунок 21). При этом к таксолу, препарату формирования резистентности, и доксорубицину, ингибитору топоизомеразы II, все модели проявили абсолютную нечувствительность. В то же время чувствительность к двум другим препаратам, ингибитору протеасом Mg132 и ингибитору MDM2 нутлину-3a, снижалась

существенно по мере усугубления резистентности моделей. Интересно, что в случае обработки клеток химиорезистентных моделей доксорубицином отмечается некоторое увеличение жизнеспособности клеток, как и при обработке таксолом. Вероятно, доксорубицин способен в какой-то мере компенсировать зависимость резистентных клеток от таксола.

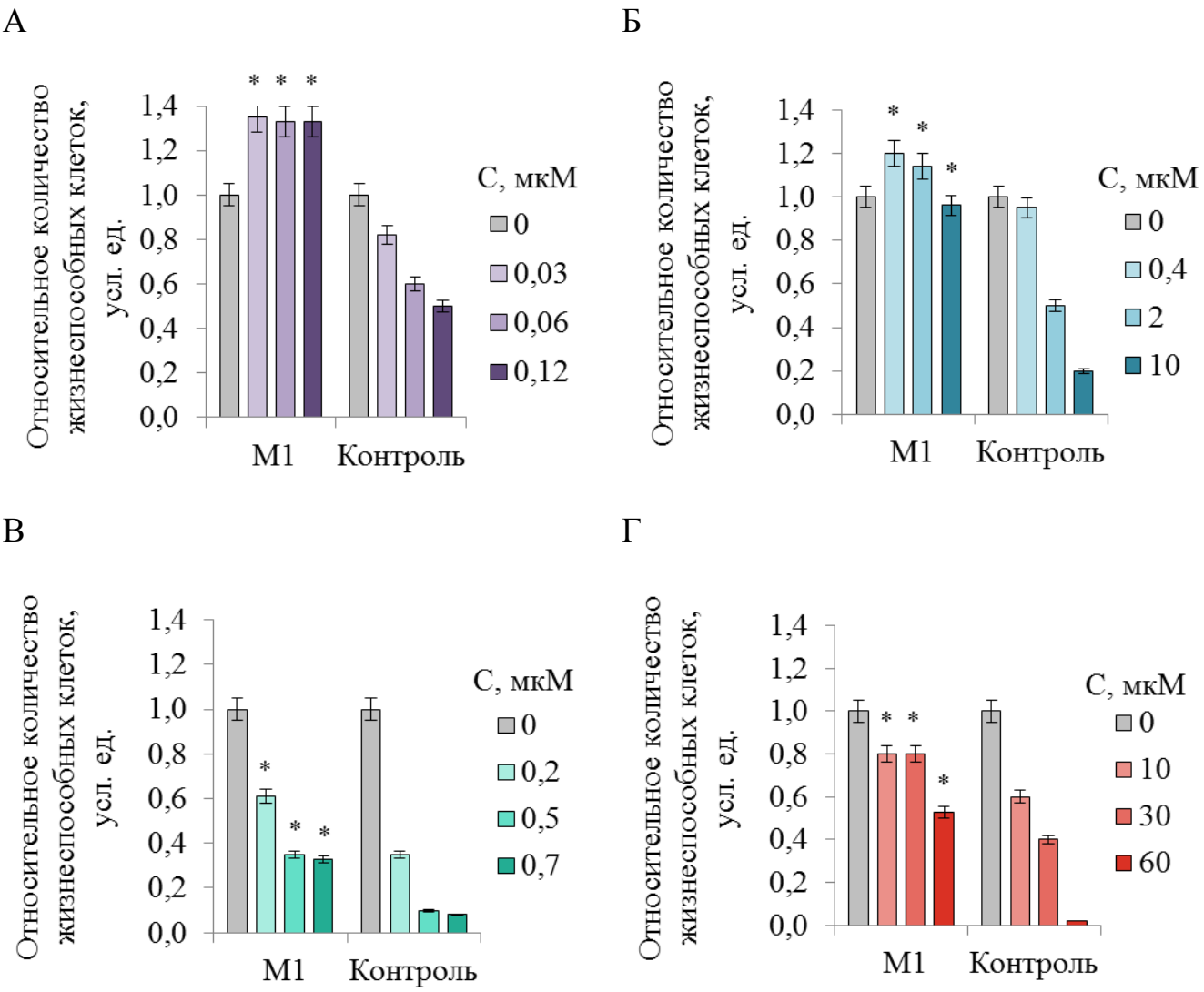


Рисунок 21 – Жизнеспособность клеток химиорезистентной модели М1 и контрольных клеток в присутствии противоопухолевых соединений. А – таксола; Б – доксорубицина; В – Mg132; Г – нутлина-3а. Статистическую значимость различий относительно соответствующего значения контрольной линии оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

Установленная в ходе исследования резистентность выведенных моделей к препаратам четырех различных групп указывает на развитие множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Уровни чувствительности к рассмотренным препаратам, продемонстрированные в ходе исследования, позволяют говорить о сформированном фенотипе множественной лекарственной устойчивости. Стабильная резистентность и подтвержденный фенотип МЛУ полученных моделей позволяет использовать их в качестве инструмента для изучения подходов к преодолению ABC-транспортер-опосредованной множественной лекарственной устойчивости, ставшей одной из основных проблем при лечении пациентов с различными видами рака [169].

Способы преодоления химиорезистентности

На сегодняшний день преодоление резистентности опухолей остается сложной задачей, требующей индивидуального подхода в каждом конкретном случае. Если говорить о множественной лекарственной устойчивости, обусловленной повышенной активностью транспортных белков семейства ABC, то вопрос преодоления остается открытым.

Предполагается, что для преодоления химиорезистентности опухолевых клеток можно использовать низкомолекулярные ингибиторы ABC-транспортеров. При этом основная сложность разработки ингибиторов транспортных белков заключается в том, что они сами по себе не обладают терапевтическим потенциалом, а используются в комбинации с химиотерапевтическими агентами. Предлагаемые ингибиторы снижают активность белков и выброс противоопухолевых препаратов из клеток за счет связывания с трансмембранной полостью транспортеров. К сожалению, на стадии клинических испытаний такой подход не показал необходимой для клинического применения эффективности, в связи с чем поиск низкомолекулярных ингибиторов продолжается [8].

Наиболее актуальным подходом к преодолению ABC-транспортер-обусловленной резистентности опухолей является поиск соединений, уже используемых в терапии или находящихся на стадии клинической апробации, способных оказывать сенсибилизирующее действие за счет побочной активности, заключающейся в ингибировании транспортных белков. В случае выявления требуемых сенсибилизирующих свойств, процесс введения таких соединений в клиническое использование будет занимать намного меньше времени [129–132].

Применение ингибиторов MDM2 для преодоления множественной лекарственной устойчивости

Белок MDM2 является основной E3-убиквитин лигазой онкосупрессора опухолей p53, отвечающего за поддержание стабильности генома и генетической однородности клеток организма. Гиперэкспрессия MDM2 в определенных типах опухолей приводит к подавлению антионкогенных свойств p53 за счет убиквитин-зависимой деградации p53 в протеасомах, инициируемой непосредственным взаимодействием MDM2 с p53. Поэтому разработка соединений, способных нарушить это взаимодействие, так называемых ингибиторов MDM2 представляет собой одну из противораковых стратегий.

Ингибиторы MDM2 представляют собой группу проапоптотических агентов, находящихся на стадии клинических испытаний [170]. Эти соединения актуальны для широкого спектра солидных опухолей, так как изменения сигнального пути p53-MDM2 фиксируются в более чем в 50% случаев окологических заболеваний. Помимо этого, для некоторых представителей класса ингибиторов MDM2 отмечается способность взаимодействовать с одним из транспортных белков семейства ABC – P-gp [168]. При совместном применении селективных ингибиторов MDM2 с такими цитостатическими препаратами, как винкристин, отмечается существенная гибель клеток резистентных нейробластомы и рабдомиосаркомы, демонстрирующих повышенную экспрессию

P-gp [171]. Положительный эффект от сочетанного применения ряда ингибиторов MDM2 с винкристином был также получен на клетках нейробластомы с отрицательным статусом p53 [172]. Имеющиеся в литературе данные говорят о том, что ингибиторы MDM2, обладая собственной таргетной противоопухолевой активностью, могут быть эффективны в борьбе с резистентностью опухолей, обусловленной активностью ABC-транспортеров.

Ингибиторы MDM2 в качестве платформы для разработки ингибиторов транспортных белков обладают рядом преимуществ:

- для ингибиторов MDM2 тщательно разработана фармакофорная гипотеза позволяющая применять методы рационального дизайна;

- структура ингибиторов может варьироваться в широких пределах и не является антагонистичной структуре известных ингибиторов транспортных белков.

Таким образом, учитывая потребность в препаратах, позволяющих осуществлять терапию резистентных опухолей, мы оценили эффективность известных и разработанных нами ранее ингибиторов MDM2 в преодолении множественной лекарственной устойчивости выведенной панели резистентных моделей.

Ингибирование активности ABC-транспортеров

Для того, чтобы ингибиторы MDM2 можно было эффективно использовать на резистентных опухолях, они должны обладать выраженной ингибирующей активностью по отношению к транспортным белкам, в первую очередь P-gp и BCRP. Способность ингибиторов MDM2 снижать транспортную активность белков семейства ABC исследовали на выведенной панели резистентных моделей. В качестве ингибиторов MDM2 использовали структуры различных химических классов:

- нутлин-3a (цис-имидазолин, наиболее активный и изученный ингибитор, один из первых ингибиторов MDM2 – нутлинов);

- AMG232 (пиперидинон, селективный ингибитор MDM2);

- TR16 (производное изоиндолинона, собственная разработка НИЛ «Молекулярная фармакология»).

В первую очередь исследовали влияние указанных ингибиторов MDM2 в различных концентрациях на транспортную активность белка P-gp. Оценку влияния проводили по увеличению накопления клетками моделей митохондриального красителя R123, который считается селективным субстратом транспортера. При этом эффект от использования ингибиторов MDM2 сопоставляли с эффектом от применения тариквидара, ингибитора, проявляющего высокое сродство к P-gp.

Согласно полученным результатам, все исследованные ингибиторы MDM2 способствуют накоплению R123 в клетках химиорезистентных моделей, при этом значительный эффект накопления отмечается также в клетках высокорезистентных моделей (Рисунок 22). Для всех исследованных соединений был выявлен дозозависимый характер увеличения накопления красителя.

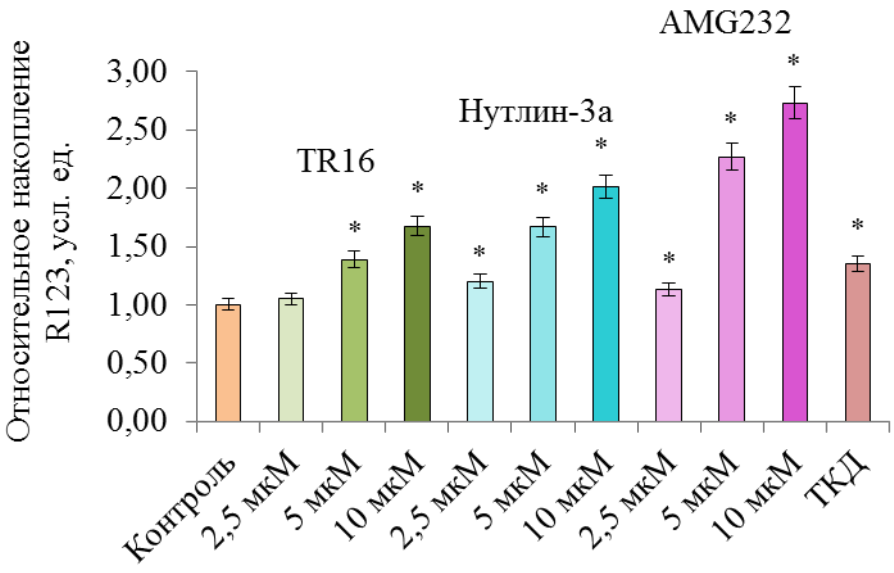


Рисунок 22 – Оценка транспортной активности P-gp по накоплению R123 клетками модели H1 в присутствии ингибиторов MDM2. ТКД – тариквидар. Статистическую значимость различий относительно контроля оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

Эффект от использования ингибиторов MDM2 в наименьшей концентрации (2,5 мкМ) был сопоставим с эффектом от использования тариквидара. Наилучший результат по ингибированию транспортной активности P-gp продемонстрировал ингибитор AMG232. Проведенные эксперименты подтвердили потенциал ингибиторов MDM2 для использования в качестве ингибиторов P-gp.

Комплексная оценка влияния ингибиторов MDM2 на активность двух транспортных белков, P-gp и BCRP, активно экспрессируемых в выведенных клеточных моделях, также позволила выявить четкие зависимости накопления клетками красителя hoechst 33342 от исследованных концентраций ингибиторов MDM2 (Рисунок 23), как и в случае накопления R123.

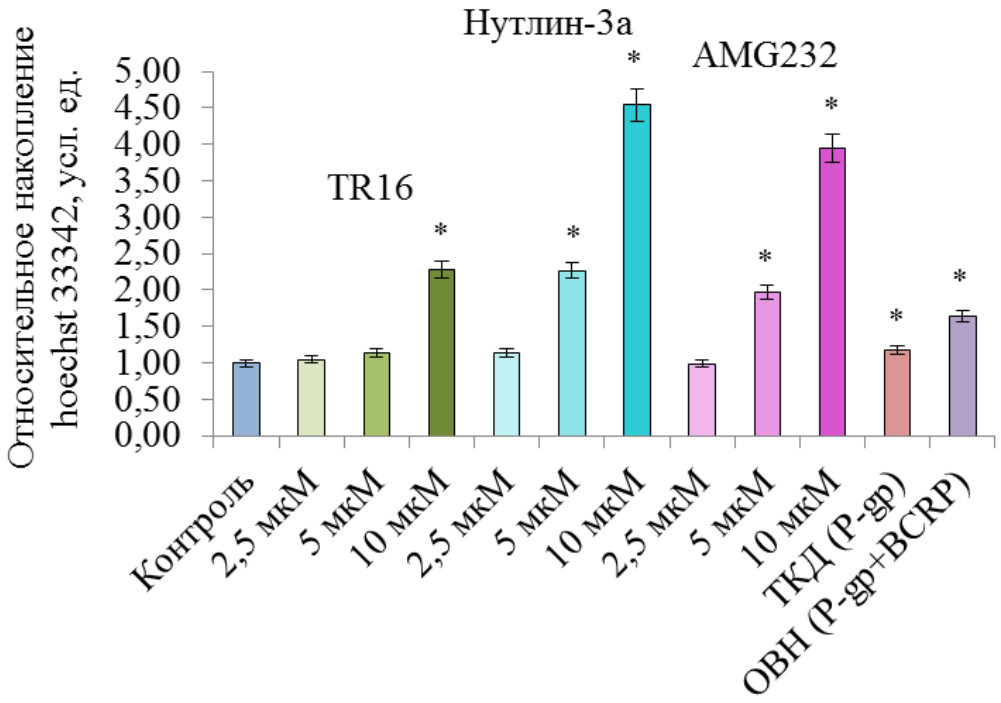


Рисунок 23 – Оценка транспортной активности BCRP по накоплению hoechst 33342 клетками модели H1 в присутствии ингибиторов MDM2. ТКД – тариквидар, ОВН – ортованадат натрия. Статистическую значимость различий относительно контроля оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

Эффект от использования ингибиторов MDM2 в низких концентрациях сопоставим с эффектом от применения тариквидара, считающимся селективным ингибитором P-gp. При этом повышение концентрации исследованных соединений приводит к увеличению накопления клетками красителя hoechst 33342, превышая показатели использования ингибитора P-gp и BCRP ортованадата натрия. В отличие от предыдущего эксперимента, наблюдалась инверсия в эффективности ингибиторов MDM2 подавлять эффлюкс обоих транспортеров, при которой наиболее активным оказался нутлин-3a. При этом оценку влияния ингибиторов MDM2 на активность непосредственно BCRP проводили косвенным путем, сопоставляя данные по накоплению обоих красителей.

Анализ полученных данных позволил сделать вывод об ингибирующем потенциале исследованных соединений. Учитывая результаты влияния ингибиторов MDM2 на накопление клетками R123 (селективного субстрата P-gp), можно предположить, что AMG232 и TR16 обладают большим сродством к P-gp, оказывая ингибирующее действие преимущественно на этот транспортер. В то же время, нутлин-3a проявляет универсальное сродство и ингибирующие способности сразу к двум транспортерам (P-gp и BCRP). Эффективность нутлин-3a на высокорезистентных моделях также косвенно подтверждает больший вклад BCRP в резистентные характеристики клеток.

Таким образом, оценка влияния ингибиторов MDM2 на активность ABC-транспортеров клеток химиорезистентных моделей продемонстрировала способность соединений подавлять активность P-gp и BCRP. При этом использование красителей различной селективности выявило различия в специфичности ингибиторов по отношению к транспортерам.

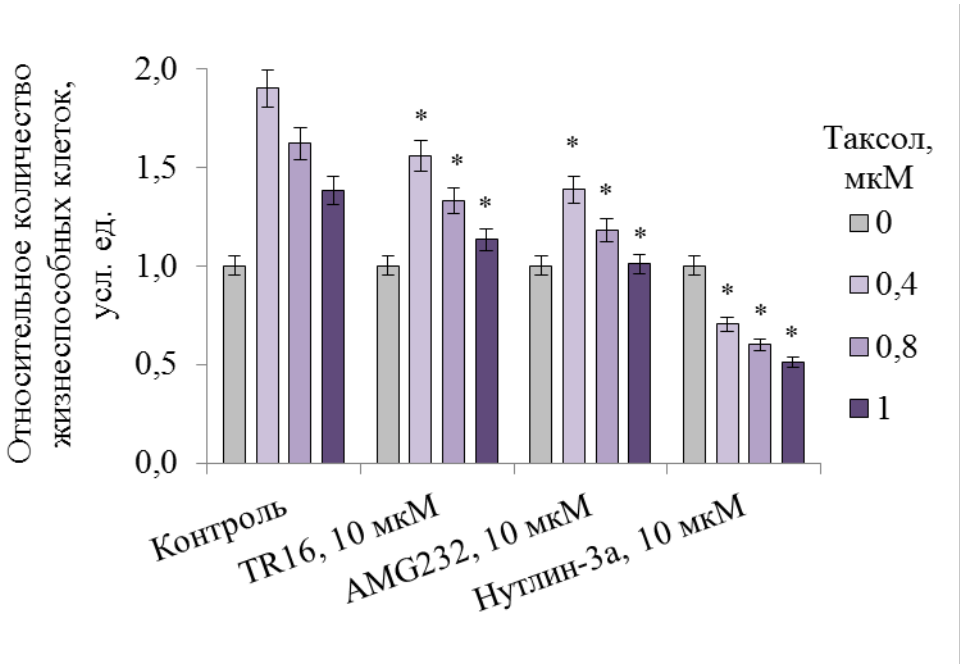
Сенсибилизация резистентных моделей

Способность ингибиторов MDM2 снижать активность ABC-транспортеров позволяет рассматривать данный класс препаратов в качестве потенциальных соединений для преодоления устойчивости опухолевых клеток. Для того, чтобы оценить применимость ингибиторов MDM2 для сенсибилизации клеток с фенотипом множественной лекарственной устойчивости к действию различных химиотерапевтических агентов, проводили изучение жизнеспособности клеток выведенных резистентных моделей при их совместном применении с препаратами трех рассмотренных ранее групп.

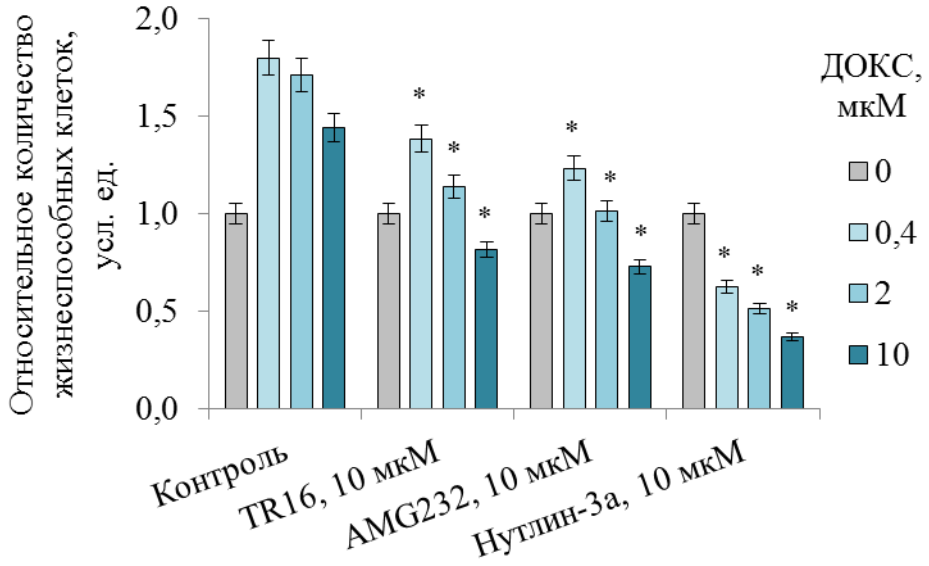
Исследование совместного применения ингибиторов MDM2 проводили при концентрации соединений, на которой наблюдался максимальный эффект снижения транспортной активности белков P-gp и BCRP. При этом использовали различные концентрации противоопухолевых препаратов, в качестве которых использовали таксол, доксорубицин и ингибитор протеасом Mg132.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что ингибиторы MDM2 проявляют способность восстанавливать чувствительность клеток выведенных моделей, в том числе характеризующихся высокой степенью резистентности (Рисунок 24), ко всем рассматриваемым противоопухолевым препаратам. При этом данные по оценке жизнеспособности резистентных моделей полностью соотносятся с результатами оценки влияния ингибиторов MDM2 на активность транспортных белков. Нутлин-3а наилучшим образом проявил себя как в снижении активности транспортеров, так и в восстановлении чувствительности клеток резистентных моделей к противоопухолевым препаратам.

А


Относительное количество жизнеспособных клеток, усл. ед.
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
Таксол, мкМ
0
0,4
0,8
1
Контроль
TR16, 10 мкМ
AMG232, 10 мкМ
Нутлин-3а, 10 мкМ

Б


Относительное количество жизнеспособных клеток, усл. ед.
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
ДОКС, мкМ
0
0,4
2
10
Контроль
TR16, 10 мкМ
AMG232, 10 мкМ
Нутлин-3а, 10 мкМ

В

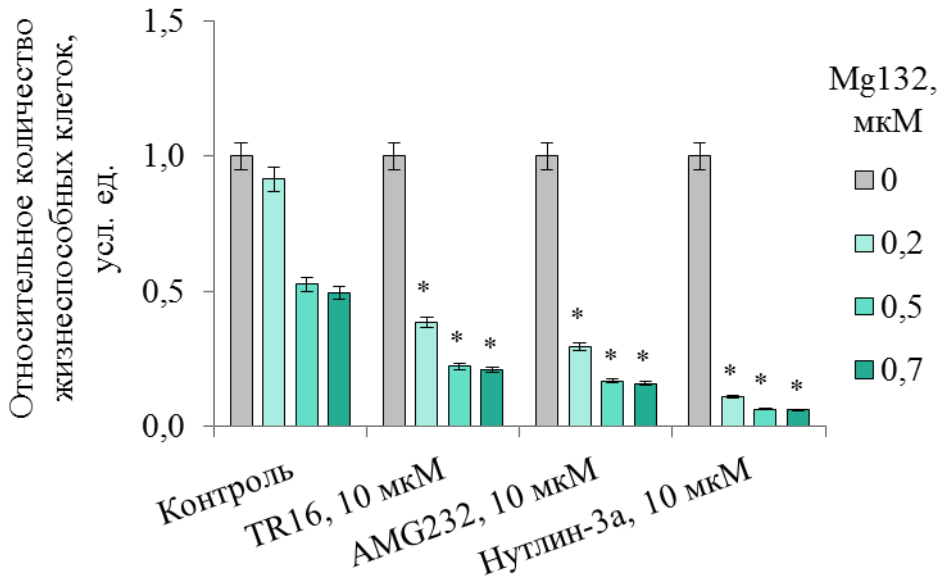


Рисунок 24 – Жизнеспособность клеток химиорезистентной модели H1 при действии таксола (А), доксорубицина (Б), Mg132 (В) в присутствии ингибиторов MDM2. Статистическую значимость различий относительно аналогичных значений контроля оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

Следует отметить, что в случае высокорезистентных клеточных моделей ингибиторы TR16 и AMG232 практически не оказывали сенсибилизирующего эффекта при действии таксола и доксорубицина. В то же время применение нутлина-3а обеспечило увеличение гибели клеток практически в два раза. Наблюдаемый эффект может быть косвенным подтверждением того, что в выведенных моделях устойчивость клеток обусловлена в большей степени активностью BCRP, к которому нутлин-3а проявляет большее сродство.

Таким образом, была подтверждена способность ингибиторов MDM2 восстанавливать чувствительность химиорезистентных опухолевых клеток, в том числе клеток высокорезистентных моделей, не только к таксолу, на котором выводились модели, но и к препаратам другого механизма действия. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности ингибиторов MDM2 для

преодоления множественной лекарственной устойчивости опухолей на различных стадиях лечения.

Взаимодействие ингибиторов MDM2 с ABC-транспортерами

Для изучения непосредственного связывания ингибиторов MDM2 с транспортными белками семейства ABC, наряду с методами компьютерного моделирования, подробно описанными в работе [26, 175], использовали метод *in vitro*, основанный на оценке АТФазной активности.

Оценку влияния ингибиторов MDM2 на АТФазную активность P-gp проводили с использованием коммерческого набора P-gp-Glo (Promega). Метод, лежащий в основе протокола, предполагает обработку рекомбинантного белка P-gp исследуемыми соединениями с добавлением раствора MgATP, после чего с помощью люминесцентного анализа фиксируется количество непрореагировавшего с P-gp АТФ. На основе полученных результатов делается вывод о влиянии исследуемых соединений на потребление белком АТФ, то есть АТФазную активность транспортера. Изменение АТФазной активности P-gp говорит о его непосредственном взаимодействии с соединениями, стимулирующими или ингибирующими его транспортную функцию. В связи с этим, оценка изменения АТФазной активности P-gp в результате его обработки соединениями часто используется для подтверждения связывания соединений с этим транспортером.

Согласно полученным данным, все исследованные ингибиторы MDM2 изменяют АТФазную активность рекомбинантного P-gp относительно базального уровня (Рисунок 25). Наблюдаемый эффект схож с эффектом применения тариквидара, селективного ингибитора P-gp, непосредственно связывающегося с субстрат-связывающей полостью и ингибирующего активность транспортера. Это является свидетельством прямого взаимодействия нутлина-3a, AMG232 и TR16 с P-gp.

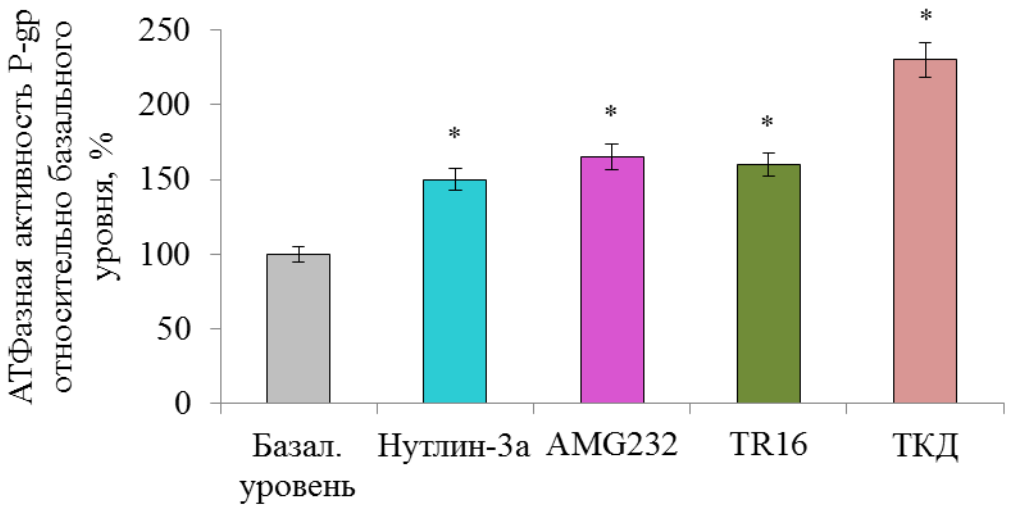


Рисунок 25 – АТФазная активность рекомбинантного P-gp в присутствии ингибиторов MDM2. ТКД – тариквидар. Статистическую значимость различий относительно базального уровня оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

К сожалению, на сегодняшний день подобного *in vitro* теста, позволяющего детектировать каким-либо образом непосредственное взаимодействие субстратов и белка BCRP, пока не разработано. Тем не менее, учитывая высокую гомологию транспортеров, сильно перекрывающуюся субстратную специфичность, а также опираясь на ряд расчетных экспериментов, можно высказать предположения, что все исследованные ингибиторы MDM2 будут напрямую взаимодействовать также с BCRP.

Оценка безопасности применения ингибиторов MDM2

Основной проблемой применения химиотерапевтических агентов является риск развития химиорезистентности раковых клеток. Такие широко используемые противораковые препараты, как цисплатин, таксол, ингибиторы тирозинкиназ гефитиниб и эрлотиниб, гемцитабин, доксорубицин, этопозид, не только могут стимулировать развитие перекрестной резистентности, но и приводить к формированию фенотипа множественной лекарственной устойчивости [173].

Ингибиторы MDM2 относятся к группе таргетных противораковых препаратов, направленных на предотвращение белок-белкового взаимодействия p53-MDM2. Известно, что после кратковременной обработки ингибитором MDM2, в частности нутлином-3a, в высокой концентрации значимых изменений в уровне экспрессии P-gp и BCRP в клетках не происходит [174]. При этом влияние ингибиторов MDM2 на экспрессию ABC-транспортеров в результате длительной обработки не исследовалось.

В рамках оценки безопасности применения ингибиторов MDM2 в контексте развития резистентности была проведена работа по созданию клеточных линий, устойчивых к различным концентрациям высокоактивного и наиболее изученного ингибитора MDM2 нутлина-3a. Модели резистентности получали также посредством непрерывного культивирования клеток HCT116 в присутствии противоопухолевого агента до момента адаптации клеток. В качестве начальной использовали концентрацию нутлину-3a равную 10 мкМ, оказывающую выраженную p53-зависимую гибель клеток HCT116 дикого типа на 2 сутки обработки [26].

В ходе выведения клеток, устойчивых к нутлину-3a, была выявлена крайне низкая переносимость препарата опухолевыми клетками. После двух этапов культивирования, все дальнейшие попытки повышения концентрации оказались неудачными. Увеличение концентрации нутлина-3a в среде в 6 раз относительно первоначальной концентрации неизбежно приводило к тотальной гибели клеток. Такой же результат, хоть и отложенный по времени, был получен при увеличении концентрации нутлина-3a в 4,5 раза. Схема обработки клеток нутлином-3a приведена на Рисунке 26.

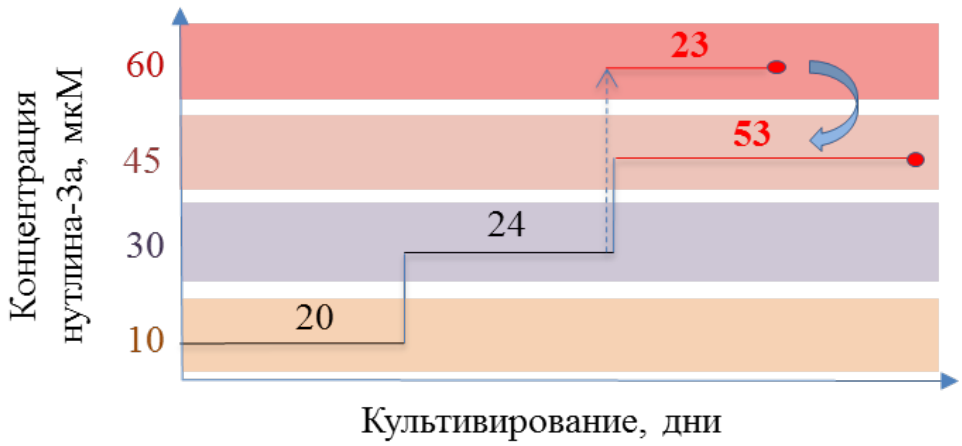


Рисунок 26 – Схема обработки клеток HCT116 нутлином-3а.

Тем не менее, в ходе экспериментов была получена клеточная линия, устойчивая к максимально возможной концентрации препарата (30 мкМ). Она была использована для оценки уровней экспрессии генов белков P-gp, BCRP и MRP1. Уровни экспрессии генов ABC-транспортеров оценивали методом ПЦР-анализа с использованием подобранных ранее праймеров, в качестве контроля рассматривали клетки дикого типа, нормализацию результатов проводили относительно экспрессии GAPDH. Полученные результаты представлены в Таблице 12.

Таблица 12 – Относительные уровни экспрессии генов ABC-транспортеров

Клеточная линия	**Ген ABC-транспортера**		
	ABCB1 (P-gp), $\times 10^{-2}$	*ABCG2* (BCRP), $\times 10^{-2}$	*ABCC1* (MRP1), $\times 10^{-2}$
Контроль	0,048±0,002	0,047±0,002	0,020±0,001
HCT116нутлин-3а	0,037±0,002	0,120±0,006	0,01389±0,00069

Согласно полученным данным, длительная обработка клеток ингибитором MDM2 не приводит к существенному изменению уровней экспрессии генов клинически значимых ABC-транспортеров. Несмотря на повышение уровня экспрессии гена BCRP в обрабатываемых клетках в 2,6 раза, наблюдается

снижение уровней экспрессии генов P-gp и MRP1 относительно контроля. Методом иммуноцитохимического окрашивания было подтверждено соответствие уровней экспрессии генов транспортеров P-gp и BCRP с их экспрессией на белковом уровне.

Таким образом, сохранение уровней экспрессии транспортеров P-gp и BCRP, обуславливающих резистентные характеристики клеток HCT116 при обработке таксолом, говорит о безопасности применения ингибиторов MDM2, в частности нутлина-3a, с точки зрения развития ABC-транспортер-опосредованной лекарственной устойчивости. Учитывая способность ингибиторов MDM2 снижать транспортную активность ABC-транспортеров, они являются перспективными агентами для разработки препаратов, позволяющих преодолеть множественную лекарственную устойчивость.

Применение АТФ-подобных соединений для преодоления множественной лекарственной устойчивости

Транспортная активность белков семейства ABC, в том числе P-gp и BCRP, обеспечивает эффлюкс широкого спектра лекарственных препаратов из опухолевых клеток, тем самым определяя множественную лекарственную устойчивость опухолей. Предлагаемые на сегодняшний день ингибиторы ABC-транспортеров, действующие по принципу взаимодействия с субстрат-связывающей полостью, способны снижать выброс противоопухолевых препаратов из клеток. Тем не менее, их действие преимущественно направлено на один конкретный транспортер, несмотря на высокую гомологию между представителями семейства ABC. При этом, как было показано в нашей работе, в развитии устойчивости опухолевых клеток зачастую участвуют сразу несколько транспортеров.

Активность ABC-транспортеров и выброс противоопухолевых препаратов из клеток обеспечивается за счет связывания АТФ с консервативными нуклеотид-

связывающими доменами белков, что сопровождается энергетически значимым гидролизом фосфатных связей АТФ. Высвободившаяся при этом энергия затрачивается на активацию конформационных перестроек в трансмембранных доменах белков, приводящих к переносу противоопухолевых препаратов во внеклеточное пространство [175]. Таким образом, можно предположить, что предотвращение выброса препаратов может быть достигнуто за счет ограничения энергетического потребления транспортным белком.

Нуклеотид-связывающий домен является высококонсервативной структурой АВС-транспортеров, которая находится в цитоплазменной части белков. В составе как P-gp, так и BCRP присутствуют по два нуклеотид-связывающих домена, в которых попеременно осуществляется гидролиз молекул АТФ, тем самым обеспечивая непрерывность транспортного цикла белков. Блокирование даже одного нуклеотид-связывающего домена приводит к нарушению транспортного цикла и ингибированию эффлюкса [175]. Поэтому блокирование нуклеотид-связывающих доменов АВС-транспортеров соединениями, воспроизводящими лишь структуру АТФ, но не выполняющими его функции, принципиально может быть использовано для подавления эффлюкса химиотерапевтических агентов из опухолевых клеток.

Принимая во внимание необходимость разработки новых подходов к подавлению транспортной активности белков семейства АВС, эффективных в отношении нескольких представителей семейства, мы исследовали возможность применения АТФ-подобных соединений для преодоления множественной лекарственной устойчивости выведенной панели резистентных моделей.

Влияние на активность АВС-транспортеров

Существует несколько способов воспроизведения нуклеозидной структуры: сохранение рибозного остатка и искажение азотистого основания; замена рибозного остатка с сохранением азотистого основания; одновременная замена рибозного остатка и азотистого основания. Несмотря на крайне низкое

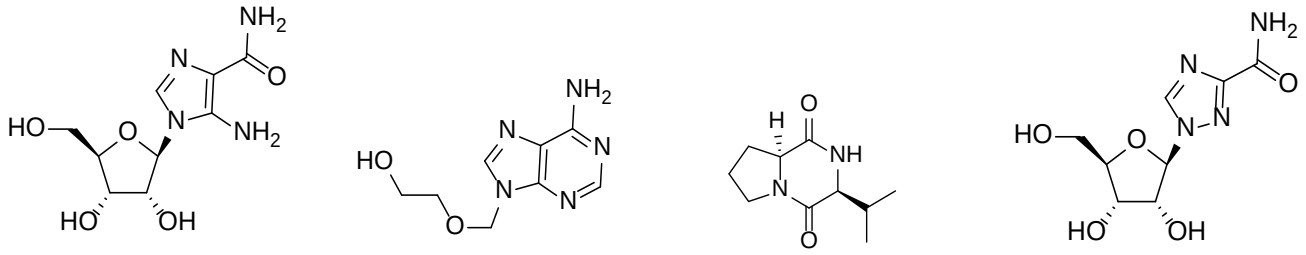
структурное сходство с аденозином в последнем случае, такие АТФ-подобные соединения на практике могут эффективно взаимодействовать с сайтами связывания нуклеотидов [175].

В связи с этим мы исследовали способность АТФ-подобных соединений различного типа ингибировать активность ABC-транспортеров на выведенной панели химиорезистентных моделей. В качестве исследуемых соединений использовали (Рисунок 27):

- AICAR (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибонуклеотид, аналог с искаженным азотистым основанием);

- SN202 (2-((6-амино-9H-пурин-9-ил)метокси)этан-1-ол, аналог с редуцированным рибозным остатком, разработка НИЛ «Молекулярная фармакология»);

- DKPP (производное дикетопиперазина, разработка НИЛ «Молекулярная фармакология»).



(а) (б) (в) (г)

Рисунок 27 – Структурные формулы АТФ-подобных соединений: AICAR (а), SN202 (б), DKPP (в), рибавирин (г).

Помимо трех типов АТФ-подобных соединений рассматривали также рибавирин (Рисунок 27), нуклеозидный аналог, в настоящее время используемый в терапии как эффективный противовирусный препарат. В качестве положительного контроля использовали АМФ.

Способность АТФ-подобных соединений снижать активность ABC-транспортеров оценивали по накоплению клетками различных красителей,

являющихся субстратами либо P-gp (R123), либо обоих транспортеров, P-gp и BCRP (hoechst 33342). Эффект от применения АТФ-подобных соединений сопоставляли с эффектами от использования модельных ингибиторов ABC-транспортеров – тариквидара (P-gp) и ортованадата натрия (P-gp и BCRP). Результаты оценки влияния исследованных АТФ-подобных соединений на активность рассматриваемых транспортных белков на примере химиорезистентной модели H1 представлены на Рисунках 28 и 29.

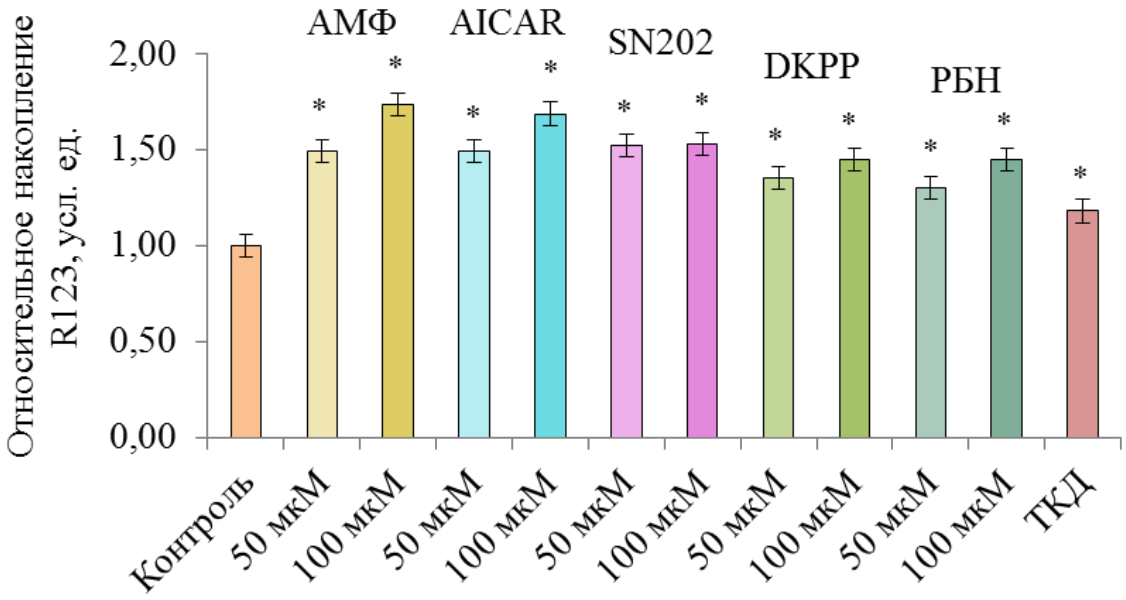


Рисунок 28 – Оценка транспортной активности P-gp по накоплению R123 клетками модели H1 в присутствии АТФ-подобных соединений. РБН – рибавирин, ТКД – тариквидар. Статистическую значимость различий относительно контроля оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

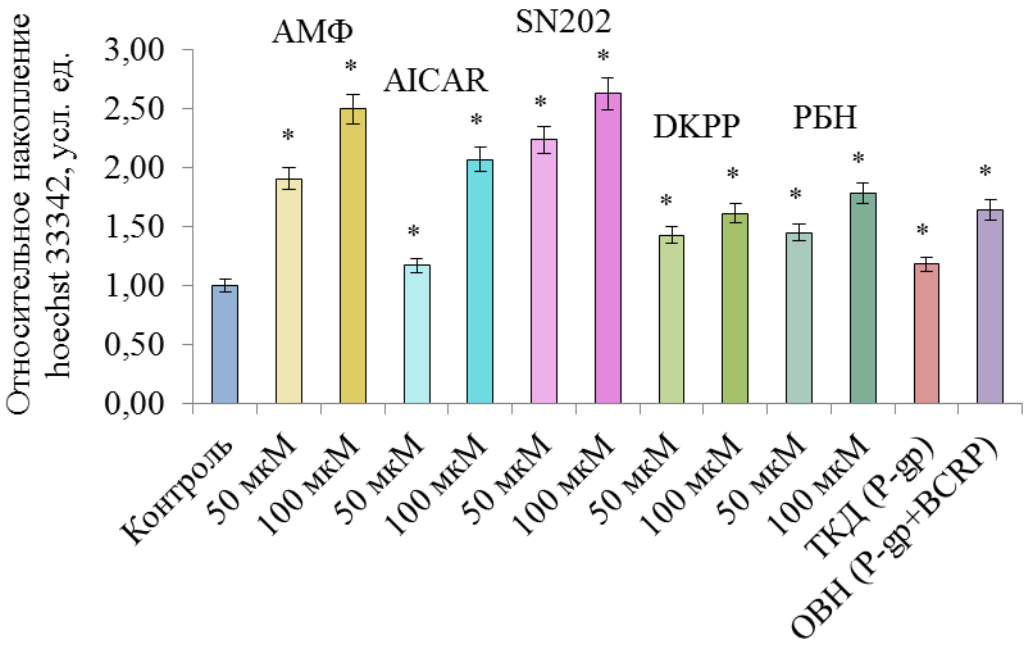


Рисунок 29 – Оценка транспортной активности BCRP по накоплению hoechst 33342 клетками модели H1 в присутствии АТФ-подобных соединений. РБН – рибавирин, ТКД – тариквидар, ОВН – ортованадат натрия. Статистическую значимость различий относительно контроля оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

Согласно полученным данным, все исследованные АТФ-подобные соединения проявляют ингибирующую активность в отношении P-gp, обеспечивая увеличение накопления клетками R123. Наблюдаемый эффект накопления во всех случаях был больше, чем при использовании селективного ингибитора P-gp тариквидара. Результаты исследования показывают, что АТФ-подобные соединения успешно ингибируют активность P-gp преимущественно в дозозависимой манере. Как и ожидалось, наилучшее ингибирование P-gp показал АМФ. Чуть хуже проявил себя AICAR, структура которого предполагает сохранение рибозного остатка и искажение азотистого основания. При этом рибавирин, относящийся к тому же структурному типу, что и AICAR, обеспечил лишь незначительное воздействие на P-gp и увеличение накопления клетками красителя R123.

Влияние АТФ-подобных соединений на интегральную транспортную активность P-gp и BCRP при окрашивании клеток красителем hoechst 33342, субстратом как P-gp, так и BCRP, также является дозозависимым. При этом сопоставляя эффект накопления R123 в присутствии АТФ-подобных соединений с аналогичными показателями накопления hoechst 33342, можно заключить, что более эффективными по отношению к BCRP являются АМФ, AICAR и SN202, при этом АМФ и SN202 демонстрируют значительное ингибирование транспортной активности во всех использованных концентрациях, а AICAR – только при повышенной концентрации.

Исходя из полученных результатов по оценке влияния АТФ-подобных соединений на транспортную активность в клетках резистентных моделей, можно сделать вывод, что DKPP и рибавирин проявляют преимущественное ингибирующее действие в отношении P-gp, в то время как АМФ, AICAR и SN202 воздействуют одновременно на оба транспортера, приводя тем самым к снижению их активности и накоплению клетками используемых в исследовании красителей.

Таким образом, проведенное исследование наглядно демонстрирует возможность использования АТФ-подобных соединений для снижения активности ABC-транспортеров. При этом каких-либо количественных зависимостей между структурой АТФ-подобного соединения и способностью ингибировать конкретный транспортный белок выявлено не было. Это говорит о перспективности применения АТФ-подобных соединений для ингибирования эффлюкса, обусловленного несколькими транспортными белками.

Сенсибилизация резистентных моделей

Потенциал рассматриваемых АТФ-подобных соединений для преодоления эффлюкса противоопухолевых препаратов из химиорезистентных клеток оценивали с помощью выведенной панели резистентных моделей. Для этого исследовали способность АТФ-подобных соединений повышать

чувствительность клеток моделей к препаратам различного механизма действия в условиях совместного применения.

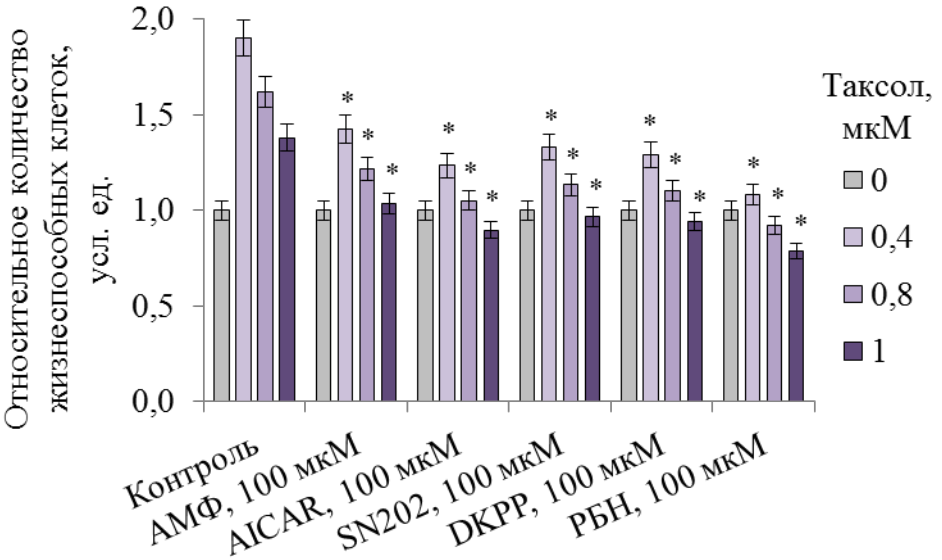
В качестве препаратов использовали представителей четырех рассмотренных ранее групп (таксол, доксорубицин, Mg132, нутлин-3a), критерием оценки служило снижение жизнеспособности клеток. Исследование жизнеспособности клеток резистентных моделей проводили при концентрации АТФ-подобных соединений, обеспечивающей максимальный эффект ингибирования белков P-gp и BCRP и накопления красителей в клетках. В то же время, для противоопухолевых препаратов были взяты различные концентрации, аналогично использованным в ходе исследования жизнеспособности клеток резистентных моделей при совместном применении с ингибиторами MDM2.

Применение АТФ-подобных соединений для восстановления чувствительности умеренно резистентных клеточных моделей к противоопухолевым препаратам обеспечило снижение жизнеспособности клеток практически в 2 раза в каждом из случаев совместного применения. Несмотря на то, что применение АТФ-подобных соединений давало схожий эффект во всем ряде соединений, рибавирин обеспечивал большее снижение жизнеспособности в случае совместного применения с противоопухолевыми препаратами. Полученный результат, как и в случае совместного применения препаратов с ингибиторами MDM2, еще раз подтверждает перспективность перепрофилирования активных соединений, в том числе клинически одобренных препаратов, для сенсибилизации резистентных опухолей.

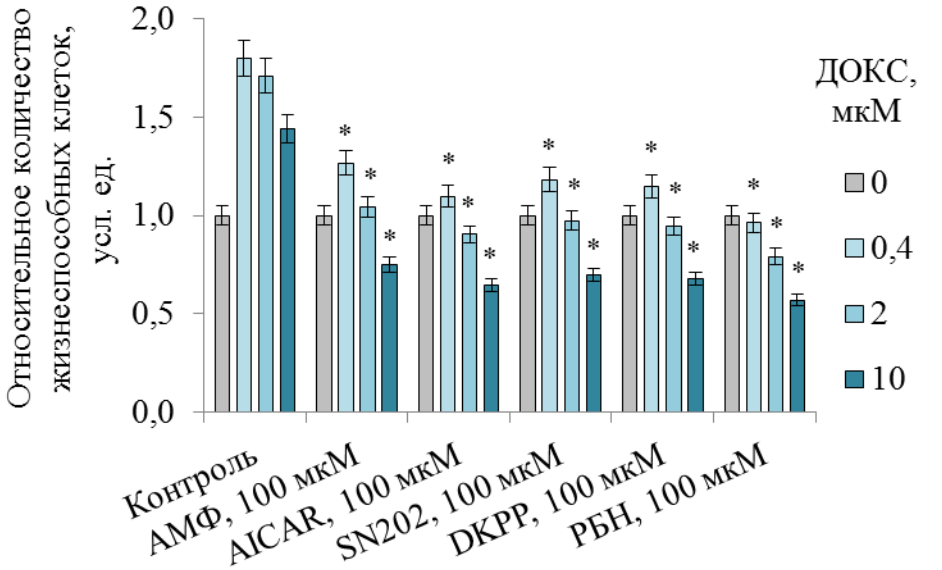
Следует отметить, что в случае клеточных моделей с высокой степенью резистентности, использование АТФ-подобных соединений не привело к существенному снижению жизнеспособности клеток при совместной обработке с таксолом (Рисунок 30). В случае совместного применения с доксорубицином, заметный эффект сенсибилизации наблюдался только при использовании повышенных концентраций препарата. В то же время совместное применение АТФ-подобных соединений с Mg132 позволило существенно повысить чувствительность клеток высокорезистентных моделей при использовании всего

ряда концентраций препарата. Наилучший сенсибилизирующий эффект на высокорезистентных моделей был получен при совместном применении АТФ-подобных соединений и нутлина-3а. При этом во всех случаях рибавирин, как и при исследовании умеренно резистентных клеток, оказал наиболее выраженный эффект восстановления чувствительности клеток к противоопухолевым препаратам.

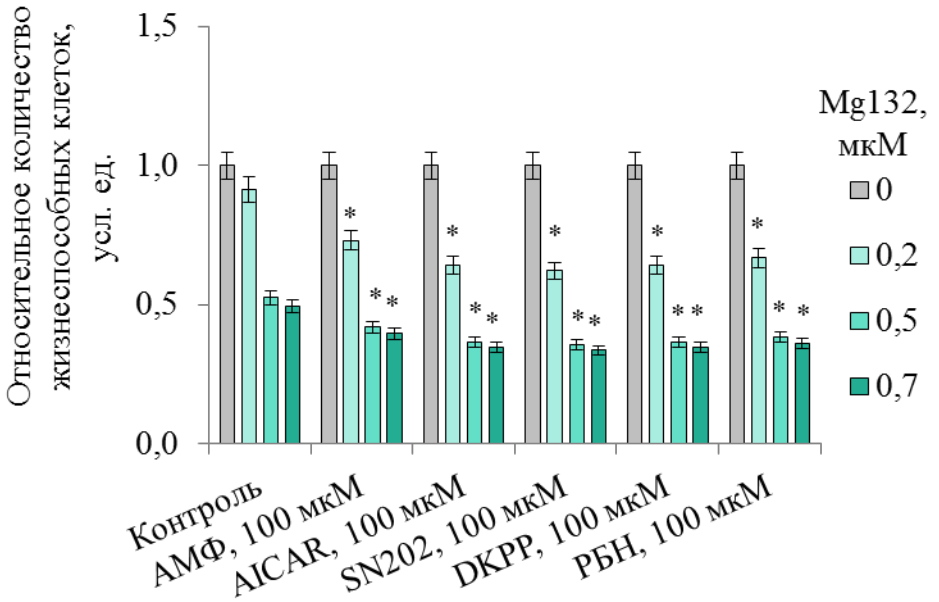
А



Б



В



Г

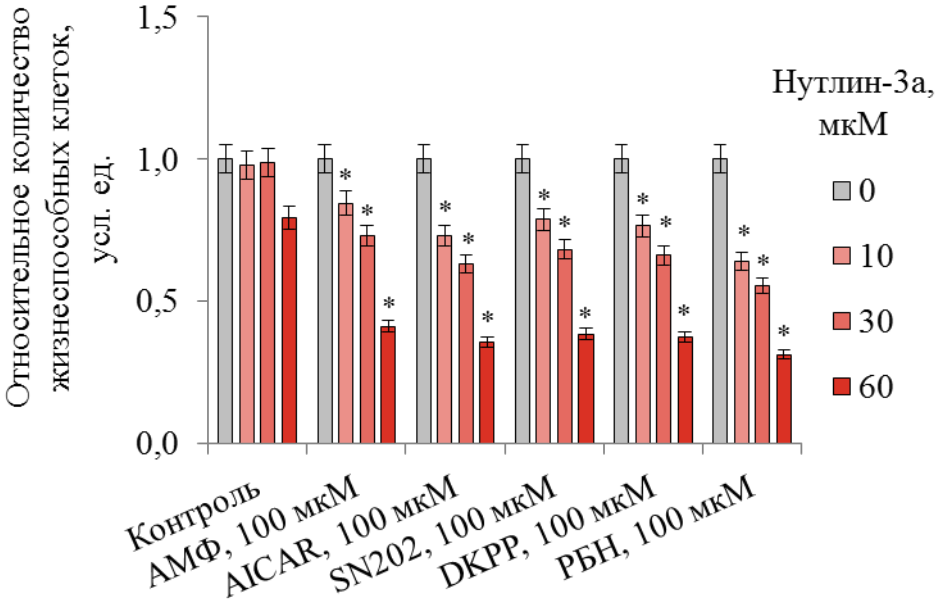


Рисунок 30 – Жизнеспособность клеток химиорезистентной модели H1 при действии таксола (А), доксорубицина (Б), Mg132 (В), нутлина-3а (Г) в присутствии АТФ-подобных соединений. РБН – рибавирин. Статистическую значимость различий относительно аналогичных значений контроля оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

Таким образом, в ходе исследования была подтверждена способность АТФ-подобных соединений восстанавливать чувствительность химиорезистентных опухолевых клеток при совместном применении с противоопухолевыми препаратами различных групп. На основе полученных результатов можно говорить о возможности использования АТФ-подобных соединений для преодоления устойчивости опухолевых клеток, обусловленной повышенной активностью ABC-транспортеров. Сенсибилизирующее действие, продемонстрированное для рибавирина, не только подтверждает эффективность такого подхода, но и в очередной раз свидетельствует о перспективности перепрофилировании препаратов, уже используемых в клинике, для преодоления ABC-транспортер-опосредованного эффлюкса противоопухолевых препаратов из клеток.

Взаимодействие АТФ-подобных соединений с ABC-транспортерами

Подтверждение непосредственного взаимодействия исследованных АТФ-подобных соединений с ABC-транспортерами проводили с помощью использованного ранее *in vitro* теста на АТФазную активность транспортного белка, разработанного для P-gp.

Так как предполагается, что все исследованные АТФ-подобные соединения способны конкурировать с АТФ за сайт связывания в нуклеотид-связывающем домене ABC-транспортеров, предотвращая гидролиз АТФ и энергетически-зависимую активность белков, непосредственное взаимодействие соединений с P-gp должно приводить к однозначному эффекту на АТФазную активность P-gp. При связывании АТФ-подобных соединений с P-gp по АТФ-связывающему сайту, должно наблюдаться снижение АТФазной активности белка.

Согласно полученным результатам, все исследованные АТФ-подобные соединения существенно изменяют АТФазную активность P-gp относительно базального уровня, что указывает на непосредственное связывание этих соединений с белком (Рисунок 31). При этом наблюдаемое снижение АТФазной

активности транспортера, что подтверждает предполагаемый механизм взаимодействия АТФ-подобных соединений с АВС-транспортерами и ингибирования их активности.

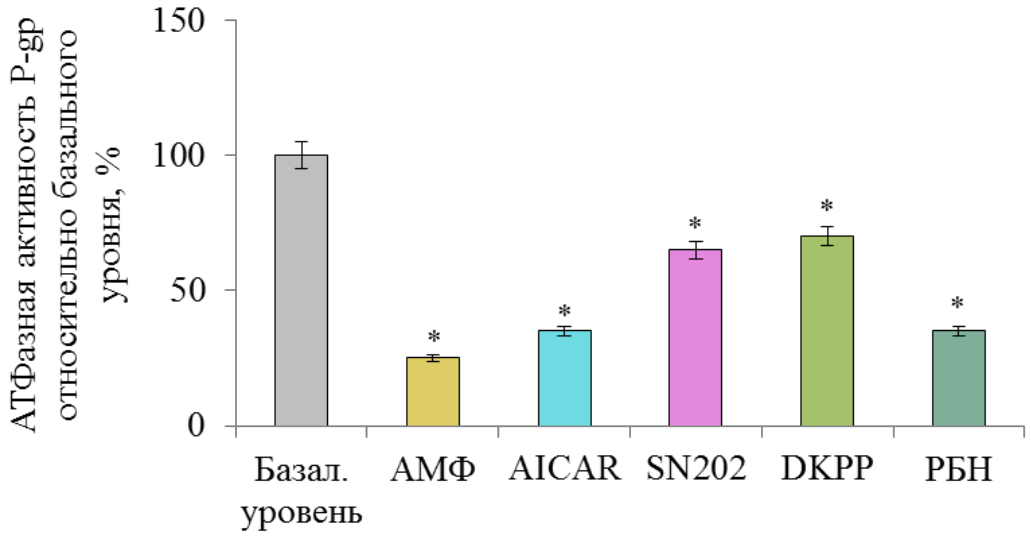


Рисунок 31 – АТФазная активность рекомбинантного P-gp в присутствии АТФ-подобных соединений. РБН – рибавирин. Статистическую значимость различий относительно базального уровня оценивали с помощью *t*–критерия Стьюдента, различия считали значимыми при $p<0,05$ (*).

Наибольшее снижение АТФазной активности P-gp отмечалось в присутствии АМФ, AICAR и рибавирина. Меньшее влияние на АТФазную активность белка оказали АТФ-подобные соединения SN202 и DKPP. Полученные результаты можно объяснить различиями в структуре соединений. В связи с тем, что нуклеотид-связывающий сайт является высоко консервативной структурой среди белков семейства АВС, предполагается, что взаимодействие АТФ-подобных соединений с BCRP будет иметь аналогичный характер.

Таким образом, продемонстрированное изменение АТФазной активности P-gp в присутствии исследованных АТФ-подобных соединений подтверждает непосредственное связывание соединений с транспортером. При этом эффективность снижения АТФазной активности при использовании АТФ-подобных соединений зависит от типа воспроизведения молекулы АТФ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы

Работу проводили с использованием клеточной линии аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 дикого типа, которая была получена от Bio-Rad, США.

Рутинное культивирование клеточных линий, выведение химиорезистентных опухолевых клеток, а также МТТ-анализ осуществляли с использованием питательной среды DMEM (Servicebio, Китай), эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС) (BioWest, Франция), фосфатно-солевого буфера (ФСБ) (ООО «Биолот», Россия), раствора Трипсина-Версена (1:1) (ООО «Биолот», Россия), антибиотиков: 50 000 ЕД/флакон пенициллина G и 50 мг/флакон стрептомицина (ООО «БиолоТ», Россия).

Анализ транспортной активности ABC-транспортеров проводили с применением среды Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific, США).

Выведение химиорезистентных опухолевых моделей осуществляли при использовании цитостатика таксола (паклитаксел) (Sigma-Aldrich, США), а также при долгосрочной обработке ингибитором MDM2 нутлином-3a (Sigma-Aldrich, США). В качестве ингибиторов ABC-транспортеров применяли тариквидар и ортованадат натрия (Sigma-Aldrich, США), красителей клеток – прижизненный митохондриальный краситель R123 (MedChemExpress LLC, США) и ядерный краситель hoechst 33342 (Invitrogen, США). При оценке развития множественной лекарственной устойчивости выведенных опухолевых моделей использовали ингибиторы MDM2 нутлин-3a и TR16 (собственная разработка НИЛ «Молекулярная фармакология» – СПбГТИ(ТУ), Россия), ингибитор протеасом Mg132 (MedChemExpress LLC, США), а также ингибитор топоизомеразы II доксорубицин (Nanjing Pars Biochem, Китай). При исследовании путей преодоления химиорезистентности опухолевых моделей использовали

ингибиторы MDM2 нутлин-3a, TR16 и AMG232 (Sigma-Aldrich, США), АТФ-подобные соединения – АМФ, AICAR, рибавирин (MedChemExpress LLC, США), а также DKPP, SN202 (собственные разработки НИЛ «Молекулярная фармакология» – СПбГТИ(ТУ), Россия). Стоковые растворы противоопухолевых соединений, АТФ-подобных соединений, тариквидара, R123 готовили в ДМСО (Applichem, Германия), ортованадата натрия и hoechst 33342 – в воде.

Анализ экспрессии генов проводили с использованием набора RNeasy Protect Mini Kit для выделения тотальной РНК (Qiagen, Германия), набора MMLV RT (Евроген, Россия) для синтеза кДНК и набора qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия) для проведения ПЦР. Определение экспрессии ABC-белков осуществляли методом иммуноцитохимического анализа с использованием антител к P-gp и BCRP с FITC и APC-метками (Cloud-Clone, Китай), соответственно, а также методом вестерн-блот анализа, применяя антитела к P-gp, BCRP и GAPDH с HRP (Cloud-Clone, Китай). В последнем случае использовали реактив для хемилюминесценции антител Novex ECL (Invitrogen, США). Жизнеспособность клеток в присутствии противоопухолевых соединений определяли с помощью реактива для МТТ-анализа (Диаэм, Россия). Для оценки АТФазной активности P-gp в присутствии соединений применяли набор Pgp-Glo Assay System (Promega, США).

Методы исследования

Культивирование эукариотических клеток

Клетки культивировали в соответствии с рекомендациями ATCC – в среде DMEM, содержащей L-глутамин и характеризующейся повышенным содержанием глюкозы, с 10% ЭБС и смесью антибиотиков (100 ЕД/мл пенициллина G и 0,1 мг/мл стрептомицина) при 37°C и 5% CO_2. Среду меняли каждые 2 дня, пересев клеток выполняли каждые 4 дня с использованием

раствора Трипсина-Версена (1:1). Долгосрочное хранение клеточных линий осуществляли посредством заморозки клеток в питательной среде при -80°С с последующим складированием в жидком азоте. В качестве криопротектора выступал ДМСО в концентрации 7,5%.

Выведение химиорезистентных клеточных моделей

Для выведения химиорезистентных клеточных моделей использовали подход, описанный в [9]. Химиорезистентные модели выводили посредством непрерывного культивирования клеток в среде DMEM в присутствии одного из следующих препаратов: цитостатика таксола и ингибитора MDM2 нутлина-3а. Начальные концентрации препаратов составляли 0,01 мкМ для таксола и 10 мкМ для нутлина-3а. По мере сопоставления скорости роста обрабатываемых клеток со скоростью роста клеток дикого типа концентрацию препаратов повышали в 2–3°раза.

Определение уровней экспрессии генов белков

Уровни экспрессии генов белков в химиорезистентных клетках определяли методом ПЦР-анализа в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР РВ). Тотальную РНК выделяли при помощи набора RNeasy Mini Kit в соответствии с протоколом производителя. Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV RT согласно протоколу: в реакционную смесь объемом 20 мкл добавляли 1 мкг РНК. Для проведения ПЦР использовали набор qPCRmix-HS SYBR. Реакционная смесь для ПЦР (25 мкл) включала 0,8 мкл матрицы, 1×смесь для ПЦР в реальном времени и 1 мкл праймера. При этом использовали амплификаторы T100 Thermal Cycler, CFX96 Touch Real-Time PCR (Bio-Rad, США). В качестве референсного гена выступал ген *GAPDH*. Результаты экспрессии генов в химиорезистентных клетках сопоставляли с уровнями

экспрессии генов в клетках дикого типа. Последовательности использованных праймеров представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Последовательности использованных в ПЦР-анализе праймеров

Ген	**Праймер**	**Последовательность (5’-3’)**
ABCB1	Прямой	GGGAGCTTAACACCCGACTTA
	Обратный	GCCAAAATCACAAGGGTTAGCTT
ABCG2	Прямой	AAGCCACAGAGATCATAGAGCC
	Обратный	TCTTCTTCTCACCCCCGGAA
ABCC1	Прямой	TCAGGAGCACACGAAAGTCC
	Обратный	AAGAAGCTCATGGGTGACCG
CDH1	Прямой	GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG
	Обратный	TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG
GAPDH	Прямой	GGGAAGGTGAAGGTCGGAGT
	Обратный	TTGAGGTCAATGAAGGGGTCA

Определение уровней экспрессии ABC-белков методом иммуноцитохимии

Оценку уровней экспрессии ABC-транспортеров в химиорезистентных клетках осуществляли по интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных антителами, специфическими к ABC-транспортерам [176]. Перед окрашиванием антителами клетки фиксировали 4% формальдегидом в ФСБ и пермеабилизировали с использованием 0,3% Tween 20 в ФСБ. После этого клетки окрашивали растворами антител к P-gp (конъюгированы с FITC) и BCRP (конъюгированы с APC) в буфере, содержащем 0,5% БСА в ФСБ, в течение 1 часа в темноте при комнатной температуре. Концентрация рабочего раствора антител

составила 0,01 мкг/мкл. Для окрашивания ядер клетки обрабатывали раствором красителя hoechst 33342 в концентрации 1,6 мкМ в ФСБ. После этого клетки направляли на анализ с использованием системы высокосодержательного анализа Operetta с фильтрами: brightfield (возбуждение – трансмиссия, λ испускания – 650–760 нм), FITC (λ возбуждения – 490–510 нм, λ испускания – 520–560 нм), APC (λ возбуждения – 620–640 нм, λ испускания – 650–760 нм), hoechst 33342 (λ возбуждения – 360–400 нм, λ испускания – 410–480 нм). В качестве контроля выступали клетки дикого типа.

Определение уровней экспрессии ABC-белков методом вестерн-блот анализа

Уровни экспрессии ABC-транспортеров в химиорезистентных моделях дополнительно оценивали методом вестерн-блот анализа [141]. Клеточные лизаты получены в результате снятия клеток с чашки в RIPA буфере с последующей обработкой ультразвуком и криообработкой при –80°C. Пробоподготовка полученных лизатов для гель-электрофореза предполагала добавление загрузочного буфера Лэммли, после чего смеси инкубировали в термостате при 95°C в течение 5 минут. Полученные пробы фракционировали в 10% полиакриламидном геле, при этом белковая нагрузка на лунку составила 35 мкг. Гель-электрофорез проводили при постоянном напряжении 130 В и комнатной температуре в течение 2 часов с использованием установки Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США).

Белковые фракции в геле переносили на мембрану из поливинилиденфторида методом «мокрого» переноса при постоянной силе тока 350 мА и температуре +4°C в течение 2 часов. При этом использовали установку Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США). Блокирование неспецифичных связываний на мембране осуществляли при выдерживании мембраны в 0,5% растворе БСА в ФСБ с 0,1% Tween 20 при комнатной температуре в течение 1 часа. В качестве отмывочного раствора выступал раствор 0,1% Tween 20 в ФСБ. Мембрану

последовательно инкубировали в растворах антител к P-gp и BCRP с HRP в 0,1% Tween 20 в ФСБ (1:250) при +4°С в течение ночи.

В качестве референсного белка выступал GAPDH, для детектирования которого мембрану инкубировали в растворе антител с HRP (1:1000) при комнатной температуре в течение 2,5 часов. После выдерживания мембраны в растворах антител осуществляли отмыв мембраны. Иммунодетекцию белков проводили с использованием реактива Novex ECL в системе визуализации ChemiDoc (Bio-Rad, США). Интенсивность белковых линий определяли с использованием программного обеспечения Image Lab. В качестве референсного белка выступал GAPDH, контроля – клетки дикого типа.

Оценка транспортной активности ABC-белков

Оценку транспортной активности в клетках химиорезистентных моделей проводили по степени накопления клетками флуоресцентных красителей R123 (C = 1 мкМ) [177] и hoechst 33342 (C = 1,25 мкМ) [178]. Клетки обрабатывали растворами красителей и модельных ингибиторов ABC-белков, а также исследуемых веществ в среде Opti-MEM. В качестве модельных ингибиторов ABC-транспортеров выступали тариквидар (C = 1 мкМ) [179] и ортованадат натрия (C = 200 мкМ) [180]. Содержание ДМСО в растворах составляло 0,5%. По истечении 30 минут растворы удаляли и свечение клеток фиксировали с использованием CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия).

Для контроля посева применяли систему высокосодержательного анализа Operetta CLS (PerkinElmer, США) с использованием фильтров: brightfield (возбуждение – трансмиссия, λ испускания – 650–760 нм), rhodamine 123 (λ возбуждения – 460–490 нм, λ испускания – 520–560 нм), hoechst 33342 (λ возбуждения – 360–400 нм, λ испускания – 410–480 нм). В качестве контролей выступали клетки дикого типа.

Оценку влияния исследованных соединений на активность ABC-транспортеров осуществляли по накоплению клетками химиорезистентных моделей красителей R123 (C = 1 мкМ) и hoechst 33342 (C = 1,25 мкМ) в присутствии ингибиторов MDM2 (C = 2,5, 5 и 10 мкМ) [2] и АТФ-подобных соединений (C = 50 и 100 мкМ) [175]. В качестве модельных ингибиторов выступали тариквидар (C = 1 мкМ) и ортованадат натрия (C = 200 мкМ), при этом контролем являлись окрашенные клетки химиорезистентных моделей с 0,5% ДМСО.

Определение жизнеспособности клеток методом МТТ-теста

МТТ-анализ применяли для оценки стабильности химиорезистентных моделей, устойчивости химиорезистентных моделей к действию противоопухолевых препаратов, а также для оценки влияния потенциальных ингибиторов ABC-транспортеров на восстановление чувствительности моделей к действию препаратов [146].

При оценке стабильности химиорезистентных моделей и определению устойчивости моделей к противоопухолевым препаратам клетки обрабатывали растворами противоопухолевых соединений в различных концентрациях в среде DMEM. В качестве контроля рассматривали клетки дикого типа, обработанные аналогичным образом в присутствии 0,5% ДМСО. Обработанные клетки выдерживали в течение 48 часов при 37°C и 5% CO_2. После этого растворы убирали и к клеткам добавляли раствор реактива МТТ в среде DMEM с последующим инкубированием при 37°C и 5% CO_2 в течение 3 часов. Удаление реактива МТТ сопровождалось внесением ДМСО к клеткам для растворения образовавшегося формазана. Измерение интенсивности абсорбции светового потока раствором формазана осуществляли с использованием планшетного ридера CLARIOstar.

При оценке влияния потенциальных ингибиторов АВС-транспортеров на жизнеспособность клеток химиорезистентных моделей в присутствии противоопухолевых препаратов использовали растворы ингибиторов MDM2 (C = 10 мкМ), а также АТФ-подобных соединений (C = 100 мкМ) в DMEM. В данном случае, контролем выступали клетки химиорезистентных моделей, обработанные различными концентрациями противоопухолевых препаратов с содержанием 0,5% ДМСО, без внесения исследуемых соединений.

Оценка АТФазной активности Р-гликопротеина

Влияние ингибиторов MDM2 и АТФ-подобных соединений на АТФазную активность АВС-транспортеров определяли при помощи набора для проведения люминесцентного анализа Pgp-GloTM. Рекомбинантный встроенный в мембрану Р-гликопротеин обрабатывали 0,5% ДМСО, растворами исследуемых соединений (C = 10 мкМ для ингибиторов MDM2 и C = 100 мкМ для АТФ-подобных соединений), а также модельных ингибиторов транспортера тариквидара (C = 1 мкМ) и ортованадата натрия (C = 200 мкМ). В пробы вносили раствор MgATP и спустя 40 минут при 37°C и 5% CO_2 добавляли реагент для обнаружения непрореагировавшего АТФ на основе люциферазы. Свечение фиксировали с использованием планшетного ридера CLARIOstar.

Для полного блокирования АТФазной активности белка использовали ортованадат натрия. Разница между неиспользованным АТФ P-gp при внесении ортованадата натрия и без обработки была обозначена как базальная АТФазная активность транспортера, которая выступала в качестве контроля. Сопоставляя долю неиспользованного белком АТФ в присутствии ортованадата натрия с аналогичным показателем при добавлении соединений, определяли АТФазную активность P-gp при определенной обработке.

Статистический анализ

Все эксперименты проводили не менее чем в трех повторностях. Статистический анализ полученных результатов осуществляли с использованием программ Microsoft Excel 2010 и Origin 2019b. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Статистическую значимость оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p<0,05$.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Множественная лекарственная устойчивость опухолей является серьезной проблемой клинической онкологии. Причиной развития химиорезистентности опухолевых клеток служит активация различных механизмов клеточной защиты. Наиболее универсальным и наиболее распространенным механизмом, лежащим в основе МЛУ более 90% вторичных опухолей, является эффлюкс противоопухолевых препаратов за счет активности транспортных белков семейства ABC. Считается, что снижение активности этих транспортеров представляет собой способ преодоления химиорезистентности, однако существующие методы блокирования транспорта неэффективны, что определяет необходимость разработки новых подходов.

Целью настоящего исследования является разработка подходов к преодолению ABC-транспортер-опосредованной МЛУ опухолей. Для достижения поставленной цели были обозначены задачи, основной из которых стала разработка инструмента, позволяющего проводить исследования на клеточных моделях. Была создана панель химиорезистентных моделей на основе аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 с различной степенью устойчивости к таксолу, цитостатическому препарату, входящему в список ЖНВЛП. Было показано, что модели характеризуются стабильной резистентностью, которая обусловлена повышенной экспрессией генов P-gp и BCRP на генном и белковом уровнях. Формирование фенотипа МЛУ у созданных моделей было подтверждено с помощью препаратов различного механизма действия, а сами модели были использованы для оценки экспериментальных подходов к ингибированию ABC-транспортеров.

В рамках работы было проведено комплексное исследование способности ингибиторов MDM2, представляющих собой таргетные противоопухолевые препараты, подавлять ABC-опосредованный эффлюкс химиотерапевтических агентов. Снижение транспортной активности P-gp и BCRP при действии

ингибиторов MDM2 было показано посредством оценки накопления клетками химиорезистентных моделей различных красителей – субстратов транспортеров. При этом были отмечена специфичность ингибирования относительно конкретного транспортера в зависимости от структуры использованного ингибитора MDM2. Сенсибилизирующую способность ингибиторов подтверждали в результате оценки жизнеспособности клеточных моделей при действии противоопухолевых препаратов различных групп. Дополнительно показано, что применение ингибиторов MDM2 является безопасным с точки зрения развития резистентности. Таким образом, было предложено использование ингибиторов MDM2 в качестве перспективного подхода для снижения активности ABC-белков и преодоления резистентности опухолевых клеток.

На основании результатов, полученных в ходе исследования резистентных характеристик клеточных моделей, предложен новый подход к преодолению ABC-транспортер-опосредованной резистентности и подавлению выброса противоопухолевых препаратов из клеток за счет применения АТФ-подобных соединений, взаимодействующих с транспортерами по АТФ-связывающим сайтам. Показана способность АТФ-подобных соединений снижать активность транспортных белков по накоплению клетками химиорезистентных моделей красителей-субстратов транспортеров P-gp и BCRP. Применение АТФ-подобных соединений также обеспечило заметное восстановление чувствительности клеточных моделей к действию противоопухолевых препаратов различных групп, а также ингибиторов MDM2. Снижение АТФазной активности P-gp при использовании АТФ-подобных соединений подтверждает механизм действия соединений посредством блокирования нуклеотид-связывающего домена транспортеров благодаря структурному сходству с АТФ. Полученные результаты позволяют говорить о том, что комбинированное применение АТФ-подобных соединений представляет собой стратегию по преодолению лекарственной устойчивости клеток, обусловленной активностью ABC-транспортеров.

Таким образом, в рамках данной работы впервые были получены модели аденокарциномы толстой кишки человека, устойчивые к широко используемому

противоопухолевому препарату таксолу, и предложены два подхода к преодолению множественной лекарственной устойчивости опухолей, обусловленной повышенной активностью ABC-транспортеров. Созданные модели могут быть в дальнейшем использованы для глубокого исследования механизмов, задействованных в формировании фенотипа множественной лекарственной устойчивости. Кроме того, модели с клинически релевантными характеристиками химиорезистентности могут быть использованы для оценки активности новых ингибиторов ABC-транспортеров. Исследованные в ходе работы ингибиторы MDM2 и АТФ-подобные соединения являются перспективными ингибиторами ABC-транспортеров, а также могут рассматриваться в качестве основы для создания новых целевых соединений. Следует отметить, что представители обозначенных групп соединений, проходящие клинические испытания (AMG232 и нутлин-3a) или уже прошедшие их (AICAR и рибавирин) могут быть внедрены в клиническую практику в кратчайшие сроки, что представляет собой практическую ценность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АМФ – аденозинмонофосфорная кислота;

АТФ – аденозинтрифосфорная кислота;

БСА – бычий сывороточный альбумин;

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения;

ДМСО – диметилсульфоксид;

ЖНВЛП – жизненно необходимые и важнейшие лекарственные препараты;

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота;

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость;

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид;

НСД – нуклеотид-связывающий домен;

ОВН – ортованадат натрия;

ОТ-ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией;

ТКД – тариквидар;

ТМД – трансмембранный домен;

ФСБ – фосфатно-солевой буфер;

ЭБС – эмбриональная бычья сыворотка;

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход;

ABC – (англ. *ATP-Binding Cassette transporters*) АТФ-связывающие транспортеры;

ABC-транспортеры/ABC-белки – трансмембранные транспортные белки семейства ABC;

ABCB1 – (англ. *ATP Binding Cassette subfamily B member 1*) 1 член B подсемейства АТФ-связывающих транспортеров;

ABCC1 – (англ. *ATP Binding Cassette subfamily C member 1*) 1 член C подсемейства АТФ-связывающих транспортеров;

ABCG2 – (англ. *ATP Binding Cassette subfamily G member 2*) 2 член G подсемейства АТФ-связывающих транспортеров;

AICAR – акадезин;

AMG232 – навтемадлин;

APC – аллофикоцианин;

ATCC – (англ. *American Type Culture Collection*) Американская коллекция типовых культур;

BCRP – (англ. *Breast Cancer Resistance Protein*) белок устойчивости рака молочной железы;

CDH1 – ген белка Е-кадгерина (кадгерина-1);

DKPP – производное дикетопиперазина;

FITC – флуоресцеин-5-изотиоцианат;

GAPDH – (англ. *Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase*) глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа;

HCT116 – клеточная линия аденокарциномы толстой кишки человека;

MgATP – аденозинтрифосфат магния;

MG132 – пептидный альдегид;

MRP1 – (англ. *Multidrug Resistance-associated Protein 1*) 1 белок множественной лекарственной устойчивости;

P-gp – (англ. *Permeability Glycoprotein*) Р-гликопротеин;

SN202 – 2-((6-амино-9Н-пурин-9-ил)метокси)этан-1-ол;

TR16 – 3-((2-(4-хлорбензил)-1-(4-хлорфенил)-3-оксоизоиндолин-1-ил)окси)-2,2-диметилпропил-(2S)-2-амино-2-фенилацетат;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Здравоохранение в России. 2023: Статистический сборник // Росстат. – М., 2023. – 179 с.

2. New Insights into chemoresistance mediated by mdm2 inhibitors: the benefits of targeted therapy over common cytostatics / T. Grigoreva, A. Sagaidak, D. Novikova, V. Tribulovich // Biomedicines. – 2024. – Vol. 12. – Iss. 3. – P. 547.

3. Моргун, А. В. Прогностическая значимость Р-гликопротеина в развитии химиорезистентности при онкологических заболеваниях / А. В. Моргун // Сибирский медицинский журнал. – 2007. – № 3. – С. 11–16.

4. Bukowski, K. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy / K. Bukowski, M. Kciuk, R. Kontek // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – Vol. 21. – Iss. 9. – P. 3233.

5. Chien, A. J. Cellular mechanisms of resistance to anthracyclines and taxanes in cancer: intrinsic and acquired / A. J. Chien, M. M. Moasser // Seminars in Oncology. – 2008. – Vol. 35. – P. S1–S14.

6. Ye, Z. The impact of ATP-binding cassette transporters on metabolic diseases / Z. Ye, Y. Lu, T. Wu // Nutrition & Metabolism. – 2020. – Vol. 17. – Iss. 1. – P. 61.

7. Resistance to paclitaxel induces glycophenotype changes and mesenchymal-to-epithelial transition activation in the human prostate cancer cell line PC-3 / L. M. Da Fonseca, D. M. Calvalhan, J. O. Previato [et al.] // Tumor Biology. – 2020. – Vol. 42. – Iss. 9. – P. 1010428320957506.

8. Yu, M. Reversal of ATP-binding cassette drug transporter activity to modulate chemoresistance: why has it failed to provide clinical benefit? / M. Yu, A. Ocana, I. F. Tannock // Cancer Metastasis Reviews. – 2013. – Vol. 32. – P. 211–227.

9. Characterization of acquired paclitaxel resistance of breast cancer cells and involvement of ABC transporter / V. Nemcova-Furstova, D. Kopperova, K. Balusıkova [et al.] // Toxicology and Applied Pharmacology. – 2016. – Vol. 310. – P. 215–228.

10. Paul, S. GSTO1 confers drug resistance in HCT‑116 colon cancer cells through an interaction with TNFαIP3/A20 / S. Paul, M. Bhardwaj, S. C. Kang // International Journal of Oncology. – 2022. – Vol. 61. – Iss. 5. – P. 1–12.

11. Taxifolin resensitizes multidrug resistance cancer cells via uncompetitive inhibition of P-glycoprotein function / H. J. Chen, Y. L. Chung, C. Y. Li [et al.] // Molecules. – 2018. – Vol. 23. – Iss. 12. – P. 3055.

12. Targeting multidrug resistance in cancer / G. Szakacs, J. K. Paterson, J. A. Ludwig [et al.] // Nature Reviews Drug Discovery. – 2006. – Vol. 5. – Iss. 3. – P. 219–234.

13. Werle, M. New-generation efflux pump inhibitors / M. Werle, H. Takeuchi, A. Bernkop-Schnurch // Expert Review of Clinical Pharmacology. – 2008. – Vol. 1. – Iss. 3. – P. 429–440.

14. Phase I trial of doxorubicin with cyclosporine as a modulator of multidrug resistance / N. L. Bartlett, B. L. Lum, G. A. Fisher [et al.] // Journal of Clinical Oncology. – 1994. – Vol. 12. – Iss. 4. – P. 835–842.

15. P-glycoprotein expression and in vitro reversion of doxorubicin resistance by verapamil in clinical specimens from acute leukaemia and myeloma / E. Solary, J. M. Bidan, F. Calvo [et al.] // Leukemia. – 1991. – Vol. 5. – Iss. 7. – P. 592–597.

16. Enhanced oral bioavailability of paclitaxel by coadministration of the P-glycoprotein inhibitor KR30031 / J. S. Woo, C. H. Lee, C. K. Shim, S. J. Hwang // Pharmaceutical Research. – 2003. – Vol. 20. – Iss. 1. – P. 24–30.

17. In vivo circumvention of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance of tumor cells with SDZ PSC 833 / D. Boesch, C. Gaveriaux, B. Jachez [et al.] // Cancer Research. – 1991. – Vol. 51. – Iss. 16. – P. 4226–4233.

18. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, M. Laversanne, H. Sung [et al.] // CA: a Cancer Journal for Clinicians. – 2024. – Vol. 74. – Iss. 3. – P. 229–263.

19. Global cancer burden growing, amidst mounting need for services // Saudi Medical Journal. – 2024. – Vol. 45. – Iss. 3. – P. 326–327.

20. Wang, J. J. Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments / J. J. Wang, K. F. Lei, F. Han // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2018. – Vol. 22. – Iss. 12. – P. 3855–3864.

21. Subotic, S. Surgical treatment of localised renal cancer / S. Subotic, S. Wyler, A. Bachmann // European Urology Supplements. – 2012. – Vol. 11. – Iss. 3. – P. 60–65.

22. Jafri, S. H. Neoadjuvant chemotherapy in lung cancer / S. H. Jafri, G. Mills // Therapy. – 2011. – Vol. 8. – Iss. 1. – P. 23–31.

23. Barazzuol, L. Prevention and treatment of radiotherapy-induced side effects / L. Barazzuol, R. P. Coppes, P. van Luijk // Molecular Oncology. – 2020. – Vol. 14. – Iss. 7. – P. 1538–1554.

24. Colleoni, M. Navigating the challenges of endocrine treatments in premenopausal women with ER-positive early breast cancer / M. Colleoni, E. Munzone // Drugs. – 2015. – Vol. 75. – Iss. 12. – P. 1311–1321.

25. Szeto, G. L. Integrative approaches to cancer immunotherapy / G. L. Szeto, S. D. Finley // Trends in Cancer. – 2019. – Vol. 5. – Iss. 7. – P. 400–410.

26. MDM2 inhibitors as a platform for the design of P-glycoprotein inhibitors / T. Grigoreva, A. Romanova, A. Sagaidak [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2020. – Vol. 30. – Iss. 18. – P. 127424.

27. Свирновский, А. И. Резистентность опухолевых клеток к терапевтическим воздействиям как медико-биологическая проблема / А. И. Свирновский // Международные обзоры: клиническая практика и здоровье. – 2014. – № 4. – С. 15–38.

28. Cross-resistance among sequential cancer therapeutics: an emerging issue / R. Loria, P. Vici, F. S. Di Lisa [et al.] // Frontiers in Oncology. – 2022. – Vol. 12. – P. 877380.

29. Loss of HER2 and decreased T-DM1 efficacy in HER2 positive advanced breast cancer treated with dual HER2 blockade: the SePHER study / G. Bon, L. Pizzuti, V. Laquintana [et al.] // Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2020. – Vol. 39. – Iss. 1. – P. 1–14.

30. Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer / T. G. Oliver, K. L. Mercer, L. C. Sayles [et al.] // Genes & Development. – 2010. – Vol. 24. – Iss. 8. – P. 837–852.

31. Brasseur, K. Chemoresistance and targeted therapies in ovarian and endometrial cancers / K. Brasseur, N. Gevry, E. Asselin // Oncotarget. – 2017. – Vol. 8. – Iss. 3. – P. 4008–4042.

32. Pick, A. Structure–activity relationships of new inhibitors of breast cancer resistance protein (ABCG2) / A. Pick, H. Muller, M. Wiese // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2008. – Vol. 16. – Iss. 17. – P. 8224–8236.

33. Inhibition of the ERCC1-XPF structure-specific endonuclease to overcome cancer chemoresistance / E. M. McNeil, K. R. Astell, A. M. Ritchie [et al.] // DNA Repair. – 2015. – Vol. 31. – P. 19–28.

34. Chemical inhibitor targeting the replication protein A-DNA interaction increases the efficacy of Pt-based chemotherapy in lung and ovarian cancer / A. K. Mishra, S. S. Dormi, A. M. Turchi [et al.] // Biochemical Pharmacology. – 2015. – Vol. 93. – Iss. 1. – P. 25–33.

35. Targeting BRCA1-BER deficient breast cancer by ATM or DNA-PKcs blockade either alone or in combination with cisplatin for personalized therapy / N. Albarakati, T. M. Abdel-Fatah, R. Doherty [et al.] // Molecular Oncology. – 2015. – Vol. 9. – Iss. 1. – P. 204–217.

36. Chandrasekhar, C. Novel mutations in the kinase domain of BCR-ABL gene causing imatinib resistance in chronic myeloid leukemia patients / C. Chandrasekhar, P. S. Kumar, P. V. G. K. Sarma // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9. – Iss. 1. – P. 2412.

37. Drug metabolizing enzymes and their inhibitors role in cancer resistance / S. Pathania, R. Bhatia, A. Baldi [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2018. – Vol. 105. – P. 53–65.

38. Tumoral expression of drug and xenobiotic metabolizing enzymes in breast cancer patients of different ethnicities with implications to personalized medicine / Y. Li, A. Steppi, Y. Zhou [et al.] // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7. – Iss. 1. – P. 4747.

39. Santos, S. Small molecule inhibitors of multidrug resistance gene (MDR1) expression: preclinical evaluation and mechanisms of action / S. Santos, A. Paulo // Current Cancer Drug Targets. – 2013. – Vol. 13. – Iss. 8. – P. 814–828.

40. Autocrine production of interleukin 6 causes multidrug resistance in breast cancer cells / D. Conze, L. Weiss, P. S. Regen [et al.] // Cancer Research. – 2001. – Vol. 61. – Iss. 24. – P. 8851–8858.

41. Autocrine production of interleukin-6 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells / Y. Wang, X. L. Niu, Y. Qu [et al.] // Cancer Letters. – 2010. – Vol. 295. – Iss. 1. – P. 110–123.

42. Multiple roles of extracellular fibroblast growth factors in lung cancer cells / T. Suzuki, H. Yasuda, K. Funaishi [et al.] // International Journal of Oncology. – 2015. – Vol. 46. – Iss. 1. – P. 423–429.

43. Koehn, L.M. ABC transporters: an overview / L. M. Koehn // The ADME Encyclopedia: a Comprehensive Guide on Biopharmacy and Pharmacokinetics. – 2022. – P. 1-10.

44. Taxanes in cancer treatment: activity, chemoresistance and its overcoming / L. Mosca, A. Ilari, F. Fazi [et al.] // Drug Resistance Updates. – 2021. – Vol. 54. – P. 100742.

45. Choi, Y. H. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development / Y. H. Choi, A. M. Yu // Current Pharmaceutical Design. – 2014. – Vol. 20. – Iss. 5. – P. 793–807.

46. Structure of the human lipid exporter ABCA1 / H. Qian, X. Zhao, P. Cao [et al.] // Cell. – 2017. – Vol. 169. – Iss. 7. – P. 1228–1239.

47. Ablation of the ATP-binding cassette transporter, Abca2 modifies response to estrogen-based therapies / J. T. Mack, C. B. Brown, T. E. Garrett [et al.] // Biomedicine & Pharmacotherapy. – 2012. – Vol. 66. – Iss. 6. – P. 403–408.

48. Pasello, M. The ABC subfamily A transporters: multifaceted players with incipient potentialities in cancer / M. Pasello, A. M. Giudice, K. Scotlandi // Seminars in Cancer Biology. – 2020. – Vol. 60. – P. 57–71.

49. Implication of ABC transporters in non-proliferative diseases / T. A. Grigoreva, A. V. Sagaidak, D. S. Novikova, V. G. Tribulovich // European Journal of Pharmacology. – 2022. – Vol. 935. – P. 175327.

50. Juliano, R. L. A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants / R. L. Juliano, V. Ling // Biochimica et Biophysica Acta. – 1976. – Vol. 455. – Iss. 1. – P. 152–162.

51. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins / P. Borst, R. Evers, M. Kool, J. Wijnholds // Journal of the National Cancer Institute. – 2000. – Vol. 92. – Iss. 16. – P. 1295–1302.

52. Hoffmann, U. The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in disposition of xenobiotics and drug resistance / U. Hoffmann, H. K. Kroemer // Drug Metabolism Reviews. – 2004. – Vol. 36. – Iss. 3–4. – P. 669–701.

53. Herget, M. Intracellular peptide transporters in human – compartmentalization of the “peptidome” / M. Herget, R. Tampe // Pflügers Archiv: European Journal of Physiology. – 2007. – Vol. 453. – Iss. 5. – P. 591–600.

54. Lankat-Buttgereit, B. The transporter associated with antigen processing TAP: structure and function / B. Lankat-Buttgereit, R. Tampe // FEBS Letters. – 1999. – Vol. 464. – Iss. 3. – P. 108–112.

55. Noe, J. Functional expression of the canalicular bile salt export pump of human liver / J. Noe, B. Stieger, P. J. Meier // Gastroenterology. – 2002. – Vol. 123. – Iss. 5. – P. 1659–1666.

56. Bile salt export pump (BSEP/ABCB11) can transport a nonbile acid substrate, pravastatin / M. Hirano, K. Maeda, H. Hayashi [et al.] // The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2005. – Vol. 314. – Iss. 2. – P. 876–882.

57. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line / S. Cole, G. Bhardwaj, J. Gerlach [et al.] // Science. – 1992. – Vol. 258. – Iss. 5088. – P. 1650–1654.

58. Up-regulation and cytoprotective role of epithelial multidrug resistance-associated protein 1 in inflammatory bowel disease / H. Blokzijl, A. van Steenpaal, S.

Vander Borght [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 2008. – Vol. 283. – Iss. 51. – P. 35630–35637.

59. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates / I. Leier, G. Jedlitschky, U. Buchholz [et al.] // The Journal of Biological Chemistry. – 1994. – Vol. 269. – Iss. 45. – P.27807–27810.

60. Lu, S.C. Glutathione synthesis / S. C. Lu // Biochimica et Biophysica Acta. – 2013. – Vol. 1830. – Iss. 5. – P.3143–3153.

61. Hlavac, V. Role of family D ATP-binding cassette transporters (ABCD) in cancer / V. Hlavac, P. Soucek // Biochemical Society Transactions. – 2015. – Vol. 43. – Iss. 5. – P.937–942.

62. Tian, Y. The biological regulation of ABCE1 / Y. Tian, X. Han, D. Tian // IUBMB Life. – 2012. – Vol. 64. – Iss. 10. – P.795–800.

63. ABCF2, an Nrf2 target gene, contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells / L. Bao, J. Wu, M. Dodson [et al.] // Molecular Carcinogenesis. – 2017. – Vol. 56. – Iss. 6. – P.1543–1553.

64. Patel, S. B. ABCG5 and ABCG8: more than a defense against xenosterols / S. B. Patel, G. A. Graf, R. E. Temel // Journal of Lipid Research. – 2018. – Vol. 59. – Iss. 7. – P.1103–1113.

65. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells / L. A. Doyle, W. Yang, L. V. Abruzzo [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1998. – Vol. 95. – Iss. 26. – P. 15665–15670.

66. Brackman, D. J. Reverse translational research of ABCG2 (BCRP) in human disease and drug response / D. J. Brackman, K. M. Giacomini // Clinical Pharmacology & Therapeutics. – 2018. – Vol. 103. – Iss. 2. – P. 233–242.

67. Domenichini, A. ABC transporters as cancer drivers: potential functions in cancer development / A. Domenichini, A. Adamska, M. Falasca // Biochimica et Biophysica Acta. – 2019. – Vol. 1863. – Iss. 1. – P. 52–60.

68. Dano, K. Active outward transport of daunomycin in resistant Ehrlich ascites tumor cells / K. Dano // Biochimica et Biophysica Acta. – 1973. – Vol. 323. – Iss. 3. – P. 466–483.

69. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the mdr1 (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells / C. J. Chen, J. E. Chin, K. Ueda [et al.] // Cell. – 1986. – Vol. 47. – Iss. 3. – P. 381–389.

70. Expression of a full-length cDNA for the human MDR1 gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine / K. Ueda, C. Cardarelli, M. M. Gottesman, I. Pastan // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1987. – Vol. 84. – Iss. 9. – P. 3004–3008.

71. Cole, S. P. C. Patterns of cross-resistance in a multidrug-resistant small-cell lung carcinoma cell line / S. P. C. Cole // Cancer Chemotherapy and Pharmacology. – 1990. – Vol. 26. – Iss. 4. – P. 250–256.

72. Intestinal transport of irinotecan in Caco-2 cells and MDCK II cells overexpressing efflux transporters Pgp, cMOAT, and MRP1 / F. R. Luo, P. V. Paranjpe, A. Guo [et al.] // Drug Metabolism and Disposition. – 2002. – Vol. 30. – Iss. 7. – P. 763–770.

73. Circumvention of breast cancer resistance protein (BCRP)-mediated resistance to camptothecins in vitro using non-substrate drugs or the BCRP inhibitor GF120918 / M. Maliepaard, M. A. van Gastelen, A. Tohgo [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2001. – Vol. 7. – Iss. 4. – P. 935–941.

74. BCRP/MXR/ABCP expression in topotecan-resistant human breast carcinoma cells / C. H. Yang, E. Schneider, M. L. Kuo [et al.] // Biochemical Pharmacology. – 2000. – Vol. 60. – Iss. 6. – P. 831–837.

75. Resistance to daunorubicin, imatinib, or nilotinib depends on expression levels of ABCB1 and ABCG2 in human leukemia cells / P. Kosztyu, R. Bukvova, P. Dolezel, P. Mlejnek // Chemico-Biological Interactions. – 2014. – Vol. 219. – P. 203–210.

76. The multidrug-resistant phenotype associated with overexpression of the new ABC half-transporter, MXR (ABCG2) / T. Litman, M. Brangi, E. Hudson [et al.] // Journal of Cell Science. – 2000. – Vol. 113. – Iss. 11. – P. 2011–2021.

77. Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) / S. M. He, R. Li, J. R. Kanwar, S. F. Zhou // Current Medicinal Chemistry. – 2011. – Vol. 18. – Iss. 3. – P. 439–481.

78. Ji, B. S. Reversal of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance by CJX1, an amlodipine derivative, in doxorubicin-resistant human myelogenous leukemia (K562/DOX) cells / B. S. Ji, L. He, G. Q. Liu // Life Sciences. – 2005. – Vol. 77. – Iss. 18. – P. 2221–2232.

79. Allen, J. D. A mutation hot spot in the Bcrp1 (Abcg2) multidrug transporter in mouse cell lines selected for doxorubicin resistance / J. D. Allen, S. C. Jackson, A. H. Schinkel // Cancer Research. – 2002. – Vol. 62. – Iss. 8. – P. 2294–2299.

80. Jin, J. The pH sensitive probe 5-(and-6)-carboxyl seminaphthorhodafluor is a substrate for the multidrug resistance-related protein MRP1 / J. Jin, A. T. Jones // International Journal of Cancer. – 2009. – Vol. 124. – Iss. 1. – P. 233–238.

81. Establishment and partial characterization of an epirubicin-resistant gastric cancer cell line with upregulated ABCB1 / A. V. Felipe, A. A. Moraes, J. de Oliveira [et al.] // Asian Pacific Journal of Cancer Prevention. – 2014. – Vol. 15. – Iss. 16. – P. 6849–6853.

82. Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells / M. Brangi, T. Litman, M. Ciotti [et al.] // Cancer Research. – 1999. – Vol. 59. – Iss. 23. – P. 5938–5946.

83. P-glycoprotein (P-gp/Abcb1), Abcc2, and Abcc3 determine the pharmacokinetics of etoposide / J. S. Lagas, L. Fan, E. Wagenaar [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2010. – Vol. 16. – Iss. 1. – P. 130–140.

84. Mouse breast cancer resistance protein (Bcrp1/Abcg2) mediates etoposide resistance and transport, but etoposide oral availability is limited primarily by P-

glycoprotein / J. D. Allen, S. C. Van Dort, M. Buitelaar [et al.] // Cancer Research. – 2003. – Vol. 63. – Iss. 6. – P. 1339–1344.

85. Cellular pharmacology of mitoxantrone in p-glycoprotein-positive and -negative human myeloid leukemic cell lines / U. Consoli, N. T. Van, N. Neamati [et al.] // Leukemia. – 1997. – Vol. 11. – Iss. 12. – P. 2066–2074.

86. Molecular cloning of cDNAs which are highly overexpressed in mitoxantrone-resistant cells: demonstration of homology to ABC transport genes / K. Miyake, L. Mickley, T. Litman [et al.] // Cancer Research. – 1999. – Vol. 59. – Iss. 1. – P. 8–13.

87. Overcoming P-glycoprotein-mediated drug resistance with noscapine derivatives / D. Muthiah, G. K. Henshaw, A. J. DeBono [et al.] // Drug Metabolism and Disposition. – 2019. – Vol. 47. – Iss. 2. – P. 164–172.

88. Reversal of ABCB1-related multidrug resistance by ERK5-IN-1 / F. Wang, D. Li, Z. H. Zheng [et al.] // Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. – 2020. – Vol. 39. – Iss. 1. – P. 50.

89. Acquisition of docetaxel resistance in breast cancer cells reveals upregulation of ABCB1 expression as a key mediator of resistance accompanied by discrete upregulation of other specific genes and pathways / S. N. Hansen, D. Westergaard, M. B. H. Thomsen [et al.] // Tumor Biology. – 2015. – Vol. 36. – Iss. 6. – P. 4327–4338.

90. Ajabnoor, G. M. A. Paclitaxel resistance is associated with switch from apoptotic to autophagic cell death in MCF-7 breast cancer cells / G. M. A. Ajabnoor, T. Crook, H. M. Coley // Cell Death & Disease. – 2012. – Vol. 3. – Iss. 1. – P. e260.

91. Up-regulation of breast cancer resistance protein plays a role in HER2-mediated chemoresistance through PI3K/Akt and nuclear factor-kappa B signaling pathways in MCF7 breast cancer cells / W. Zhang, W. Ding, Y. Chen [et al.] // Acta Biochimica et Biophysica Sinica. – 2011. – Vol. 43. – Iss. 8. – P. 647–653.

92. Involvement of MDR1 P-glycoprotein in multifactorial resistance to methotrexate / M. D. Norris, D. De Graaf, M. Haber [et al.] // International Journal of Cancer. – 1996. – Vol. 65. – Iss. 5. – P. 613–619.

93. Overexpression of wild-type breast cancer resistance protein mediates methotrexate resistance / E. L. Volk, K. M.Farley, Y. Wu [et al.] // Cancer Research. – 2002. – Vol. 62. – Iss. 17. – P. 5035–5040.

94. Characterisation of the roles of ABCB1, ABCC1, ABCC2 and ABCG2 in the transport and pharmacokinetics of actinomycin D in vitro and in vivo / C. R. Hill, D. Jamieson, H. D. Thomas [et al.] // Biochemical Pharmacology. – 2013. – Vol. 85. – Iss. 1. – P. 29–37.

95. Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells / M. Bebawy, V. Combes, E. Lee [et al.] // Leukemia. – 2009. – Vol. 23. – Iss. 9. – P. 1643–1649.

96. The drug efflux protein, P-glycoprotein, additionally protects drug-resistant tumor cells from multiple forms of caspase-dependent apoptosis / M. J. Smyth, E. Krasovskis, V. R. Sutton, R. W. Johnstone // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1998. – Vol. 95. – Iss. 12. – P. 7024–7029.

97. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps / J. I. Fletcher, M. Haber, M. J. Henderson, M. D. Norris // Nature Reviews Cancer. – 2010. – Vol. 10. – Iss. 2. – P. 147–156.

98. Katoh, S. Y. Involvement of MDR1 function in proliferation of tumour cells / S. Y. Katoh, M. Ueno, N. Takakura // Journal of Biochemistry. – 2008. – Vol. 143. – Iss. 4. – P. 517–524.

99. Dean, M. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily / M. Dean, A. Rzhetsky, R. Allikmets // Genome Research. – 2001. – Vol. 11. – Iss. 7. – P. 1156–1166.

100. MRP1 gene expression level regulates the death and differentiation response of neuroblastoma cells / A. E. Peaston, M. Gardaneh, A. V. Franco [et al.] // British Journal of Cancer. – 2001. – Vol. 85. – Iss. 10. – P. 1564–1571.

101. Begicevic, R. R. ABC transporters in cancer stem cells: beyond chemoresistance / R. R. Begicevic, M. Falasca // International Journal of Molecular Sciences. – 2017. – Vol. 18. – Iss. 11. – P. 2362.

102. Blockade of G protein-coupled receptors and the dopamine transporter by a transmembrane domain peptide: novel strategy for functional inhibition of membrane proteins in vivo / S. R. George, G. Y. K. Ng, S. P. Lee [et al.] // Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. – 2003. – Vol. 307. – Iss. 2. – P. 481–489.

103. Mechetner, E. B. Efficient inhibition of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance with a monoclonal antibody / E. B. Mechetner, I. B. Roninson // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 1992. – Vol. 89. – Iss. 13. – P. 5824–5828.

104. Liu, B. Cyclo-oxygenase 2 up-regulates the effect of multidrug resistance / B. Liu, L. Qu, H. Tao // Cell Biology International. – 2010. – Vol. 34. – Iss. 1. – P. 21–25.

105. Gli1 is a potential target for alleviating multidrug resistance of gliomas / D. Cui, Q. Xu, K. Wang, X. Che // Journal of the Neurological Sciences. – 2010. – Vol. 288. – Iss. 1–2. – P. 156–166.

106. Human pregnane X receptor and resistance to chemotherapy in prostate cancer / Y. Chen, Y. Tang, M. T. Wang [et al.] // Cancer Research. – 2007. – Vol. 67. – Iss. 21. – P. 10361–10367.

107. Down-regulation of pregnane X receptor contributes to cell growth inhibition and apoptosis by anticancer agents in endometrial cancer cells / H. Masuyama, H. Nakatsukasa, N. Takamoto, Y. Hiramatsu // Molecular Pharmacology. – 2007. – Vol. 72. – Iss. 4. – P. 1045–1053.

108. Kowalski, P. Reversal of different drug-resistant phenotypes by an autocatalytic multitarget multiribozyme directed against the transcripts of the ABC transporters MDR1/P-gp, MRP2, and BCRP / P. Kowalski, P. Surowiak, H. Lage // Molecular Therapy. – 2005. – Vol. 11. – Iss. 4. – P. 508–522.

109. Sioud, M. Promises and challenges in developing RNAi as a research tool and therapy / M. Sioud // Methods in Molecular Biology. – 2011. – Vol. 703. – P. 173–187.

110. Biodistribution and pharmacokinetic analysis of paclitaxel and ceramide administered in multifunctional polymer-blend nanoparticles in drug resistant breast cancer model / L. E. van Vlerken, Z. Duan, S. R. Little [et al.] // Molecular Pharmaceutics. – 2008. – Vol. 5. – Iss. 4. – P. 516–526.

111. Naito, M. Competitive inhibition by verapamil of ATP-dependent high affinity vincristine binding to the plasma membrane of multidrug-resistant K562 cells without calcium ion involvement / M. Naito, T. Tsuruo // Cancer Research. – 1989. – Vol. 49. – Iss. 6. – P. 1452–1455.

112. Functional assay and structure-activity relationships of new third-generation P-glycoprotein inhibitors / H. Muller, I. K. Pajeva, C. Globisch, M. Wiese // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2008. – Vol. 16. – Iss. 5. – P. 2448–2462.

113. Quinine as a multidrug resistance inhibitor: a phase 3 multicentric randomized study in adult de novo acute myelogenous leukemia / E. Solary, B. Drenou, L. Campos [et al.] // Blood. – 2003. – Vol. 102. – Iss. 4. – P. 1202–1210.

114. Milroy, R. A randomised clinical study of verapamil in addition to combination chemotherapy in small cell lung cancer. West of Scotland lung cancer research group, and the Aberdeen oncology group / R. Milroy // British Journal of Cancer. – 1993. – Vol. 68. – Iss. 4. – P. 813–818.

115. Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: cancer and leukemia group B study 9720 / M. R. Baer, S. L. George, R. K. Dodge [et al.] // Blood. – 2002. – Vol. 100. – Iss. 4. – P. 1224–1232.

116. Phase I trial of XR9576 in healthy volunteers demonstrates modulation of P-glycoprotein in CD56+ lymphocytes after oral and intravenous administration / A. Stewart, J. Steiner, G. Mellows [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2000. – Vol. 6. – Iss. 11. – P. 4186–4191.

117. Falasca, M. Investigational ABC transporter inhibitors / M. Falasca, K. J. Linton // Expert Opinion on Investigational Drugs. – 2012. – Vol. 21. – Iss. 5. – P. 657–666.

118. A phase III randomized study of oral verapamil as a chemosensitizer to reverse drug resistance in patients with refractory myeloma. A southwest oncology group study / W. S. Dalton, J. J. Crowley, S. S. Salmon [et al.] // Cancer. – 1995. – Vol. 75. – Iss. 3. – P. 815–820.

119. Cyclosporin A combined with vincristine, doxorubicin and dexamethasone (VAD) compared with VAD alone in patients with advanced refractory multiple myeloma: an EORTC-HOVON randomized phase III study (06914) / P. Sonneveld, S. Suciu, P. Weijermans [et al.] // British Journal of Haematology. – 2001. – Vol. 115. – Iss. 4. – P. 895–902.

120. Phase III study of PSC-833 (valspodar) in combination with vincristine, doxorubicin, and dexamethasone (valspodar/VAD) versus VAD alone in patients with recurring or refractory multiple myeloma (E1A95): a trial of the eastern cooperative oncology group / W. R. Friedenberg, M. Rue, E. A. Blood [et al.] // Cancer. – 2006. – Vol. 106. – Iss. 4. – P. 830–838.

121. Phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy / A. Sandler, M. Gordon, D. P. De Alwis [et al.] // Clinical Cancer Research. – 2004. – Vol. 10. – Iss. 10. – P. 3265–3272.

122. Pleban, K. Inhibitors of P-glycoprotein – lead identification and optimization / K. Pleban, G. Ecker // Mini Reviews in Medicinal Chemistry. – 2005. – Vol. 5. – Iss. 2. – P. 153–163.

123. Duan, Z. NSC23925, identified in a high-throughput cell-based screen, reverses multidrug resistance / Z. Duan, E. Choy, F. J. Hornicek // PLoS One. – 2009. – Vol. 4. – Iss. 10. – P. e7415.

124. Discovery of phenylselenoether-hydantoin hybrids as ABCB1 efflux pump modulating agents with cytotoxic and antiproliferative actions in resistant T-lymphoma / W. Ali, G. Spengler, A. Kincses [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2020. – Vol. 200. – P. 112435.

125. Computer-aided search for 5-arylideneimidazolone anticancer agents able to overcome ABCB1-based multidrug resistance / A. Kaczor, N. Szemeredi, K. Kucwaj-Brysz [et al.] // ChemMedChem. – 2021. – Vol. 16. – Iss. 15. – P. 2386–2401.

126. In vitro evaluation of the multidrug resistance reversing activity of novel imidazo[4,5-b]pyridine derivatives / S. Bourichi, H. Misbahi, Y. K. Rodi [et al.] // Anticancer Research. – 2018. – Vol. 38. – Iss. 7. – P. 3999–4003.

127. An insight into the structure of 5-spiro aromatic derivatives of imidazolidine-2,4-dione, a new group of very potent inhibitors of tumor multidrug resistance in T-lymphoma cells / E. Zeslawska, K. Kucwaj-Brysz, A. Kincses [et al.] // Bioorganic Chemistry. – 2021. – Vol. 109. – P. 104735.

128. A multiple-targets alkaloid nuciferine overcomes paclitaxel-induced drug resistance in vitro and in vivo / R. M. Liu, P. Xu, Q. Chen [et al.] // Phytomedicine. – 2020. – Vol. 79. – P. 153342.

129. Clinical perspective of FDA approved drugs with P-glycoprotein inhibition activities for potential cancer therapeutics / J. I. Lai, Y. J. Tseng, M. H. Chen [et al.] // Frontiers in Oncology. – 2020. – Vol. 10. – P. 561936.

130. Yu, J. In vitro-to-in vivo extrapolation of transporter inhibition data for drugs approved by the US food and drug administration in 2018 / J. Yu, I. Ragueneau-Majlessi // Clinical and Translational Science. – 2020. – Vol. 13. – Iss. 4. – P. 693–699.

131. Novel inhibitors of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) among marketed drugs / F. Deng, N. Sjostedt, M. Santo [et al.] // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2023. – Vol. 181. – P. 106362.

132. Evaluation of antipsychotic drugs as inhibitors of multidrug resistance transporter P-glycoprotein / J. S. Wang, H. J. Zhu, J. S. Markowitz [et al.] // Psychopharmacology. – 2006. – Vol. 187. – Iss. 4. – P. 415–423.

133. Differences in assessment of macrolide interaction with human MDR1 (ABCB1, P-gp) using rhodamine-123 efflux, ATPase activity and cellular accumulation assays / V. Munic, Z. Kelneric, L. Mikac, V. E. Haber // European Journal of Pharmaceutical Sciences. – 2010. – Vol. 41. – Iss. 1. – P. 86–95.

134. Interaction of omeprazole, lansoprazole and pantoprazole with P-glycoprotein / C. Pauli-Magnus, S. Rekersbrink, U. Klotz, M. F. Fromm // Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology. – 2001. – Vol. 364. – Iss. 6. – P. 551–557.

135. McCormick, A. In vitro assessment of the roles of drug transporters in the disposition and drug-drug interaction potential of olaparib / A. McCormick, H. Swaisland // Xenobiotica. – 2017. – Vol. 47. – Iss. 10. – P. 903–915.

136. Evaluation of in vitro absorption, distribution, metabolism, and excretion and assessment of drug-drug interaction of rucaparib, an orally potent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor / M. Liao, S. Jaw-Tsai, J. Beltman [et al.] // Xenobiotica. – 2020. – Vol. 50. – Iss. 9. – P. 1032–1042.

137. Targeting pharmacokinetic drug resistance in acute myeloid leukemia cells with CDK4/6 inhibitors / A. Sorf, S. Sucha, A. Morell [et al.] // Cancers. – 2020. – Vol. 12. – Iss. 6. – P. 1596.

138. Ribociclib inhibits P-gp-mediated multidrug resistance in human epidermoid carcinoma cells / L. Zhang, B. Ye, Y. Lin [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2022. – Vol. 13. – P. 867128.

139. Modulation of paclitaxel resistance by annexin IV in human cancer cell lines / E. Han, S. K. Tahir, S. P. Cherian [et al.] // British Journal of Cancer. – 2000. – Vol. 83. – Iss. 1. – P. 83–88.

140. Paclitaxel resistance and the role of miRNAs in prostate cancer cell lines / H. Samli, M. Samli, B. Vatansever [et al.] // World Journal of Urology. – 2019. – Vol. 37. – Iss. 6. – P. 1117–1126.

141. Establishment of drug-resistant cell lines under the treatment with chemicals acting through different mechanisms / T. Grigoreva, A. Sagaidak, A. Romanova [et al.] // Chemico-Biological Interactions. – 2021. – Vol. 344. – P. 109510.

142. MDR1 inhibition reverses doxorubicin-resistance in six doxorubicin-resistant canine prostate and bladder cancer cell lines / E. M. Packeiser, L. Engels, I. Nolte [et al.] // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – Iss. 9. – P. 8136.

143. Cross-resistance studies of isogenic drug-resistant breast tumor cell lines support recent clinical evidence suggesting that sensitivity to paclitaxel may be strongly compromised by prior doxorubicin exposure / B. Guo, D. J. Villeneuve, S. L. Hembruff [et al.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 2004. – Vol. 85. – Iss. 1. – P. 31–51.

144. Autophagy inhibition re-sensitizes pulse stimulation-selected paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis / J. Wen, S. Yeo, C. Wang [et al.] // Breast Cancer Research and Treatment. – 2015. – Vol. 149. – Iss. 3. – P. 619–629.

145. Biophysical characterization of MDR breast cancer cell lines reveals the cytoplasm is critical in determining drug sensitivity / H. M. Coley, F. H. Labeed, H. Thomas, M. P. Hughes // Biochimica et Biophysica Acta. – 2007. – Vol. 1770. – Iss. 4. – P. 601–608.

146. The MTT assay: utility, limitations, pitfalls, and interpretation in bulk and single-cell analysis / M. Ghasemi, T. Turnbull, S. Sebastian, I. Kempson // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Vol. 22. – Iss. 23. – P. 12827.

147. Effects of folate deficiency on gene expression in the apoptosis and cancer pathways in colon cancer cells / P. Novakovic, J. M. Stempak, K. J. Sohn, Y. I. Kim // Carcinogenesis. – 2006. – Vol. 27. – Iss. 5. – P. 916–924.

148. Class III beta-tubulin, a marker of resistance to paclitaxel, is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and intraepithelial neoplasia / K. M. Lee, D. Cao, A. Itami [et al.] // Histopathology. – 2007. – Vol. 51. – Iss. 4. – P. 539–546.

149. Taxol differentially modulates the dynamics of microtubules assembled from unfractionated and purified beta-tubulin isotypes / W. B. Derry, L. Wilson, I. A. Khan [et al.] // Biochemistry. – 1997. – Vol. 36. – Iss. 12. – P. 3554–3562.

150. Synthesis and discovery novel anti-cancer stem cells compounds derived from the natural triterpenoic acids / X. Liu, B. Li, Z. Zhang [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2018. – Vol. 61. – Iss. 23. – P. 10814–10833.

151. Cytotoxic constituents of Aspergillus terreus from the rhizosphere of Opuntia versicolor of the Sonoran Desert / E. K. Wijeratne, T. J. Turbyville, Z. Zhang [et al.] // Journal of Natural Products. – 2003. – Vol. 66. – Iss. 12. – P. 1567–1573.

152. Design, synthesis, and bioactivities of steroid-linked taxol analogues as potential targeted drugs for prostate and breast cancer / C. Liu, J. S. Strobl, S. Bane [et al.] // Journal of Natural Products. – 2004. – Vol. 67. – Iss. 2. – P. 152–159.

153. Ent-Kaurane diterpenoids from Isodon scoparius / Y. Zhao, J. X. Pu, S. X. Huang [et al.] // Journal of Natural Products. – 2009. – Vol. 72. – Iss. 1. – P. 125–129.

154. Fluoroalkane thioheterocyclic derivatives and their antitumor activity / G. Li, Q. Sun, D. Wang [et al.] // European Journal of Medicinal Chemistry. – 2015. – № 93. – P. 423–430.

155. Phenylimino-10H-anthracen-9-ones as novel antimicrotubule agents – synthesis, antiproliferative activity and inhibition of tubulin polymerization / H. Prinz, P. Schmidt, K. J. Bohm [et al.] // Bioorganic & Medicinal Chemistry. – 2011. – Vol. 19. – Iss. 14. – P. 4183–4191.

156. JBIR-22, an inhibitor for protein-protein interaction of the homodimer of proteasome assembly factor 3 / M. Izumikawa, J. Hashimoto, T. Hirokawa [et al.] // Journal of Natural Products. – 2010. – Vol. 73. – Iss. 4. – P. 628–631.

157. Synthesis and pharmacological evaluation of N-(3-(1H-indol-4-yl)-5-(2-methoxyisonicotinoyl)phenyl)methanesulfonamide (LP-261), a potent antimitotic agent / R. S. Shetty, Y. Lee, B. Liu [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2011. – Vol. 54. – Iss. 1. – P. 179–200.

158. Toward highly potent cancer agents by modulating the C-2 group of the arylthioindole class of tubulin polymerization inhibitors / G. La Regina, R. Bai, W. M. Rensen [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2013. – Vol. 56. – Iss. 1. – P. 123–149.

159. Synthesis, evaluation, and mechanism study of novel indole-chalcone derivatives exerting effective antitumor activity through microtubule destabilization in vitro and in vivo / J. Yan, J. Chen, S. Zhang [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2016. – Vol. 59. – Iss. 11. – P. 5264–5283.

160. Total synthesis and biological evaluation of potent analogues of dictyostatin: modification of the C2-C6 dienoate region / I. Paterson, N. M. Gardner, E. Guzman, A.

E. Wright // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2008. – Vol. 18. – Iss. 23. – P. 6268–6272.

161. Targeting the delivery of glycan-based paclitaxel prodrugs to cancer cells via glucose transporters / Y. S. Lin, R. Tungpradit, S. Sinchaikul [et al.] // Journal of Medicinal Chemistry. – 2008. – Vol. 51. – Iss. 23. – P. 7428–7441.

162. New bioactive dihydrofuranocoumarins from the roots of the tunisian Ferula Iutea (Poir.) Maire / S. B. Salem, A. Jabrane, F. Harzallah-Skhiri, H. B. Jannet // Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. – 2013. – Vol. 23. – Iss. 14. – P. 4248–4252.

163. Mirzayans, R. Intratumor heterogeneity and treatment resistance of solid tumors with a focus on polyploid/senescent giant cancer cells (PGCCs) / R. Mirzayans, D. Murray // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – Vol. 24. – Iss. 14. – P. 11534.

164. Chemoresistance to paclitaxel induces epithelial-mesenchymal transition and enhances metastatic potential for epithelial ovarian carcinoma cells / H. Kajiyama, K. Shibata, M. Terauchi [et al.] // International Journal of Oncology. – 2007. – Vol. 31. – Iss. 2. – P. 277–283.

165. Acquisition of paclitaxel resistance via PI3K dependent epithelial mesenchymal transition in A2780 human ovarian cancer cells / F. Du, X. Wu, Y. Liu [et al.] // Oncology Reports. – 2013. – Vol. 30. – Iss. 3. – P. 1113–1118.

166. The characteristics of Hep-2 cell with multiple drug resistance induced by taxol / L. Li, C. J. Alice, D. Pin [et al.] // Otolaryngology – Head and Neck Surgery. – 2007. – Vol. 137. – Iss. 4. – P. 659–664.

167. Duz, M. B. Differential expression of ABCB1, ABCG2, and KLF4 as putative indicators for paclitaxel resistance in human epithelial type 2 cells / M. B. Duz, O.F. Karatas // Molecular Biology Reports. – 2021. – Vol. 48. – P. 1393–1400.

168. NVP-CGM097, an HDM2 inhibitor, antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1-mediated drug resistance / M. Zhang, X. Y. Chen, X. D. Dong [et al.] // Frontiers in Oncology. – 2020. – Vol. 10. – P. 1219.

169. The role of eukaryotic and prokaryotic ABC transporter family in failure of chemotherapy / R. El-Awady, E. Saleh, A. Hashim [et al.] // Frontiers in Pharmacology. – 2017. – Vol. 7. – P. 535.

170. Pharmacokinetic–pharmacodynamic guided optimisation of dose and schedule of CGM097, an HDM2 inhibitor, in preclinical and clinical studies / S. Bauer, G. D. Demetri, E. Halilovic [et al.] // British Journal of Cancer. – 2021. – Vol. 125. – Iss. 5. – P. 687–698.

171. Reversal of P-glycoprotein–mediated multidrug resistance by the murine double minute 2 antagonist nutlin-3 / M. Michaelis, F. Rothweiler, D. Klassert [et al.] // Cancer Research. – 2009. – Vol. 69. – Iss. 2. – P. 416–421.

172. Structurally diverse MDM2–p53 antagonists act as modulators of MDR-1 function in neuroblastoma / L. Chen, Y. Zhao, G. C. Halliday [et al.] // British Journal of Cancer. – 2014. – Vol. 111. – Iss. 4. – P. 716–725.

173. Chemotherapeutic drugs: Cell death-and resistance-related signaling pathways. Are they really as smart as the tumor cells? / M. Mollaei, Z. M. Hassan, F. Khorshidi, L. Langroudi // Translational Oncology. – 2021. – Vol. 14. – Iss. 5. – P. 101056.

174. MDM2 antagonist nutlin-3a reverses mitoxantrone resistance by inhibiting breast cancer resistance protein mediated drug transport / F. Zhang, S. L. Throm, L. L. Murley [et al.] // Biochemical Pharmacology. – 2011. – Vol. 82. – Iss. 1. – P. 24–34.

175. ATP mimetic attack on the nucleotide-binding domain to overcome ABC transporter mediated chemoresistance / T. A. Grigoreva, A. V. Sagaidak, S. V. Vorona [et al.] // ACS Medicinal Chemistry Letters. – 2022. – Vol. 13. – Iss. 12. – P. 1848–1855.

176. Expression and functional activity of breast cancer resistance protein (BCRP, ABCG2) transporter in the human choriocarcinoma cell line BeWo / M. Ceckova, A. Libra, P. Pavek [et al.] // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. – 2006. – Vol. 33. – Iss. 1–2. – P. 58–65.

177. Characterization of rhodamine-123 as a tracer dye for use in in vitro drug transport assays / S. Forster, A. E. Thumser, S. R. Hood, N. Plant // PloS One. – 2012. – Vol. 7. – Iss. 3. – P. e33253.

178. Fluorescence-based transport assays revisited in a human renal proximal tubule cell line / P. Caetano-Pinto, M. J. Janssen, L. Gijzen [et al.] // Molecular Pharmaceutics. – 2016. – Vol. 13. – Iss. 3. – P. 933–944.

179. Fox E. Tariquidar (XR9576): a P-glycoprotein drug efflux pump inhibitor / E. Fox, S. E. Bates // Expert Review of Anticancer Therapy. – 2007. – Vol. 7. – Iss. 4. – P. 447–459.

180. Pessoaa J. C. Vanadium compounds in medicine / J. C. Pessoaa, S. Etcheverry, D. Gambinoc // Coordination Chemistry Reviews. – 2015. – Vol. 301. – P. 24–48.