На правах рукописи

САГАЙДАК
Александра

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

1.5.4 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», научно-исследовательская лаборатория «Молекулярная фармакология»

Научный руководитель: кандидат химических наук **Новикова Дарья Сергеевна**

Официальные оппоненты: **Имянитов Евгений Наумович**
доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент Российской академии наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, научный отдел биологии опухолевого роста, руководитель отдела

Зарубаев Владимир Викторович
доктор биологических наук, федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», лаборатория экспериментальной вирусологии, заведующий лабораторией

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук

Защита состоится «___» _____ 2025 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 24.1.158.02 при федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной медицины» (197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12) по адресу: 197022, Санкт-Петербург, Каменноостровский пр., д. 71.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного научного учреждения «Институт экспериментальной медицины» (197022, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, д. 12) и на сайте https://iemspb.ru/external/saigadak-alex/.

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат медицинских наук Мухин Валерий Николаевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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. 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). Для пациентов с резистентными опухолями остается только паллиативная терапия, поэтому возможность преодоления резистентности становится жизненно важной при лечении онкологических больных.

В основе резистентности опухолевых клеток могут лежать различные механизмы адаптации к химиотерапевтическим препаратам. Наиболее распространенным и универсальным механизмом является повышенный эффлюкс, обусловленный действием белков-транспортеров семейства ABC. В здоровых клетках функционирование ABC-транспортеров обеспечивает выброс нежелательных низкомолекулярных соединений: метаболитов и ксенобиотиков. В опухолевых клетках экспрессия белков-транспортеров не только изначально повышена, но и усиливается в ответ на химиотерапию, обеспечивая развитие резистентности.

Один из способов преодоления ABC-транспортер-обусловленной химиорезистентности заключается в снижении функциональной активности транспортных белков, что позволяет дольше удерживать препараты в клетках. Существующие подходы к блокированию транспорта за счет ABC-белков, в основе которых лежит как прямое ингибирование, так и опосредованное воздействие через сигнальные пути, регулирующие их экспрессию, обладают серьезными недостатками и оказываются неэффективными в клинических испытаниях. В связи с этим поиск эффективного подхода к преодолению ABC-транспортер-опосредованной устойчивости остается актуальным.

Степень разработанности темы исследования

Поиск путей преодоления ABC-транспортер-опосредованной лекарственной устойчивости опухолевых клеток предполагает использование клеточных моделей, которые релевантно воспроизводят механизмы резистентности нативных клеток. На данный момент выведено достаточно большое количество клеточных линий с ABC-транспортер-опосредованной резистентностью к препаратам различного механизма действия, в том числе на основе одного из самых распространенных видов рака – аденокарциномы толстой кишки человека. 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 большинстве исследований транспортер-опосредованная резистентность связывается с гиперэкспрессией лишь одного из транспортных белков. В качестве доказательства этого факта демонстрируется сенсибилизация клеток при ингибировании конкретного белка-транспортера. В то же время ABC-транспортеры характеризуются перекрывающейся субстратной специфичностью и, обладая высокой гомологией, могут функционировать сообща при развитии резистентности.

На данный момент не существует единого подхода к преодолению ABC-транспортер-опосредованной резистентности, как и общепризнанного определения ингибиторов ABC-транспортеров. Единственное фактическое условие, позволяющее приписать соединению ABC-транспортер ингибирующую активность, это способность снижать выброс ксенобиотиков из

клетки. Множество природных и сконструированных соединений, а также уже известных препаратов было исследовано на предмет проявления ими свойств по снижению выброса различных противоопухолевых агентов. 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.

Цель и задачи

Целью работы являлась разработка подходов к преодолению ABC-транспортер-опосредованной резистентности раковых клеток. Для достижения 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 МЛУ.
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 противоопухолевого препарата и АТФ-подобного соединения представляет собой стратегию по преодолению лекарственной устойчивости клеток, обусловленной активностью ABC-транспортеров.

Научная новизна

В ходе работы впервые получены и охарактеризованы химиорезистентные клеточные линии аденокарциномы толстой кишки человека HCT116, устойчивые к различным концентрациям таксола в диапазоне от 10 нМ до 2,3 мкМ. Показано, что резистентность полученных клеточных моделей обусловлена гиперэкспрессией сразу двух транспортеров семейства ABC – P-gp и BCRP. Отмечено, что использование таксола приводит к развитию МЛУ к препаратам 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 приводит к формированию МЛУ.

Проведено комплексное исследование способности таргетных противоопухолевых препаратов (ингибиторов MDM2) подавлять ABC-опосредованный эффлюкс. Показано, что ингибиторы MDM2 являются безопасными с точки зрения развития ABC-транспортер-

опосредованной резистентности. Использование ингибиторов MDM2 является перспективным для снижения активности ABC-белков и преодоления резистентности опухолевых клеток.

Предложен новый подход к подавлению выброса 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 (НСД) транспортных белков, что предотвращает связывание АТФ и его гидролиз и снижает активность ABC-транспортеров.

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 дальнейшего исследования клеточных процессов, изменяющихся 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 МЛУ 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 для преодоления химиорезистентности не только 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 применения 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 исследования

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. Разделы труда состоят из: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка 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, № 23-13-00344).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Создание химиорезистентных моделей

Клеточные модели химиорезистентности, полученные путем культивирования опухолевых клеток в присутствии химиотерапевтических препаратов, позволяет в наибольшей степени воспроизвести естественные условия формирования резистентности. На данный момент не существует общепринятого протокола выведения подобных моделей. При выведении резистентных культур важными параметрами являются исходная концентрация препарата, схема и продолжительность культивирования. Эти параметры могут варьироваться в зависимости от клеточной линии и ожидаемого результата. В нашей работе данный принцип был использован для получения клеток аденокарциномы толстой кишки человека HCT116, обладающих устойчивостью к различным концентрациям цитостатика таксола, который относится к первому поколению препаратов таксанового ряда и обладает антимитотическим действием.

Наиболее значимым параметром при создании химиорезистентных клеточных моделей является концентрация химиотерапевтического агента, используемая при первичной обработке клеточных культур. Выбор исходной концентрации препарата фактически определяет дальнейшую схему выведения моделей. В общем случае, для первичной обработки клеток следует использовать концентрации, оказывающие цитотоксический эффект, который клетки способны будут перенести, активировав необходимые механизмы устойчивости. В литературе можно найти данные по оценке цитотоксического действия таксола в течение различных

периодов времени, при этом значения IC_{50} различаются в 20 раз в зависимости от линии опухолевых клеток. Так как в исследовании использовали протокол оценки выживаемости, включающий 48-часовую экспозицию клеток, и для этого промежутка времени отсутствовали данные по IC_{50} таксола в культуре клеток HCT116, мы провели серию экспериментов и рассчитали этот параметр для используемой нами клеточной линии (Рисунок 1). На основании полученного значения IC_{50} выбирали концентрацию таксола для первичной обработки клеток с целью получения химиорезистентных моделей.

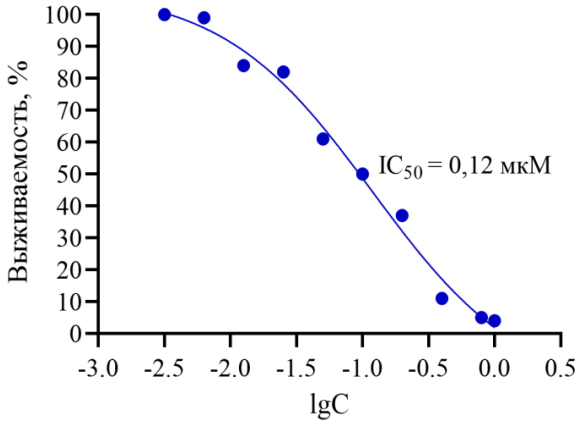


Рисунок 1 – Выживаемость клеток HCT116 дикого типа в присутствии различных концентраций таксола (48 ч).

Создание клеточных моделей химиорезистентности осуществляли посредством продолжительного культивирования опухолевых клеток с постоянным присутствием таксола в среде. В качестве исходной концентрации использовали 0,01 мкМ, что в 10 раз меньше значения IC_{50}. После полной адаптации клеток начинали новый этап культивирования, при котором концентрацию таксола увеличивали в 2–3 раза. Таким образом была получена панель химиорезистентных линий, начиная от моделей с низкой степенью резистентности и кончая высокорезистентными клеточными моделями (Таблица 1).

Таблица 1 – 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. Тем не менее, положительный результат был достигнут при повышении концентрации таксола до 2,3 мкМ и данная модель стала последней в панели выведенных резистентных линий. 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. Выведение каждой химиорезистентной клеточной модели сопровождалось определенной продолжительностью культивирования, которая определялась степенью активизации адаптационных механизмов клеток.

На основании использованной концентрации таксола, а также продолжительности выведения, полученные химиорезистентные модели были разделены на 3 группы. Все выведенные клеточные модели характеризуются значительной устойчивостью к таксолу относительно клеток дикого типа, что проявляется в существенном увеличении значений IC_{50} таксола. Индекс резистентности для полученных моделей составил от 7 до 7128 (Таблица 2).

Таблица 2 – Значения IC_{50} концентраций таксола 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*	$7{,}1 \cdot 10^{3}$

Для полученных моделей была проведена оценка стабильности химиорезистентных характеристик и морфологических параметров. Показано, что модели группы S (низкая резистентность) быстро теряют свои химиорезистентные характеристики при культивировании без таксола в среде. Химиорезистентные модели группы M (умеренная резистентность) сохраняют стабильную устойчивость к таксолу в течение двух недель, однако уже через месяц после удаления препарата из среды отмечается существенное снижение резистентности клеток (Рисунок 2, А). В случае моделей группы H (высокая резистентность) устойчивость клеток к таксолу сохраняется вплоть до месяца культивирования в стандартных условиях (Рисунок 2, Б). Использование данной группы моделей в рамках *in vitro* исследований возможно на протяжении длительного времени. Полученные результаты подтверждают вовлечение в формирование резистентности механизмов различных уровней для рассмотренных групп химиорезистентных моделей.

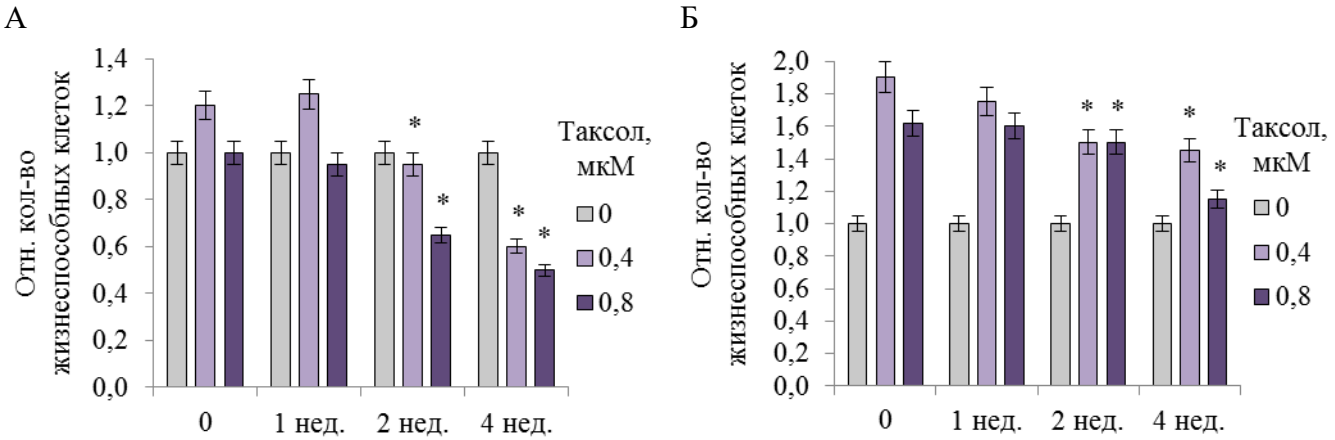


Рисунок 2 – Жизнеспособность клеток химиорезистентных моделей с умеренной (на примере M1, А) и высокой (на примере H1, Б) резистентностью при действии таксола после культивирования в стандартных условиях. * $p<0{,}05$ относительно модели, культивируемой в присутствии таксола (*t*–критерий Стьюдента).

Интересным является тот факт, что при отмене препарата у моделей с развитой резистентностью наблюдаются признаки стресса. Таксол становится необходимым компонентом питательной среды, оказывая на клетки стимулирующее действие. Можно предположить, что зависимость клеток от таксола возникает на фоне задействования механизмов, участвующих в формировании устойчивости клеток в процессе канцерогенеза. При выведении химиорезистентных клеточных моделей было также отмечено изменение ряда морфологических параметров относительно клеток дикого типа: отмечалось повышение доли округлых клеток, подверженных цитотоксическому действию препарата, увеличение размера

клеток, ухудшение адгезии клеток и формирование веретенообразной формы клеток с наличием псевдоподий (Рисунок 3). Все это свидетельствует об увеличении потенциала клеток к эпителиально-мезенхимальному переходу (ЭМП) и метастазированию.

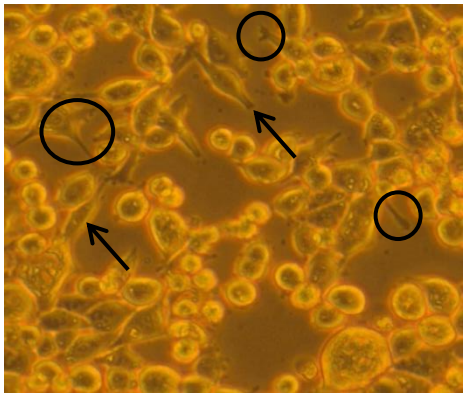


Рисунок 3 – Веретенообразная форма (отмечено стрелкой) химиорезистентных клеток и образование псевдоподий (отмечено окружностью) на примере модели M1.

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. Перекрестная устойчивость к таксанам обусловлена активацией механизмов, обеспечивающих снижение стабилизации таксанами β-тубулина микротрубочек. Наряду с перекрестной устойчивостью формируется устойчивость клеток к другим препаратам с иным механизмом действия. При этом ключевым белком-транспортером, определяющим развитие МЛУ при терапии таксолом и другими представителями группы, является Р-гликопротеин.

Сам феномен лекарственной устойчивости к препаратам отличающегося механизма действия может определяться различными механизмами. При этом наиболее универсальным и распространенным механизмом является повышенный эффлюкс препаратов, который осуществляется АТФ-зависимыми белками-транспортерами семейства ABC. Среди известных на сегодняшний день транспортеров, терапевтически значимыми являются три представителя: Р-гликопротеин (P-gp), белок устойчивости рака молочной железы человека (BCRP), а также белок множественной лекарственной устойчивости (MRP1). Так как ABC-транспортеры характеризуются перекрывающейся субстратной специфичностью, а раковые клетки способны запускать компенсаторные механизмы для обеспечения необходимого интегрального эффекта, мы предположили, что в случае формирования 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.

Вклад транспортеров семейства ABC в формировании резистентности у клеток HCT116 оценивали в первую очередь по уровню экспрессии генов транспортеров. Исследование проводили на полученных моделях с умеренной и высокой резистентностью. Модели с низкой резистентностью не рассматривали в связи с нестабильностью устойчивости. Экспрессию генов ABC-транспортеров оценивали методом ПЦР-анализа, в качестве контроля рассматривали клетки дикого типа, нормализацию результатов проводили относительно экспрессии гена домашнего хозяйства GAPDH. Согласно полученным данным, в клетках дикого типа наблюдается достаточно равномерное распределение по экспрессии генов рассматриваемых транспортеров. В клетках резистентных моделей, в свою очередь, наблюдается резкое увеличение экспрессии генов как P-gp, так и BCRP. При этом по мере развития устойчивости

моделей отмечается более интенсивное нарастание экспрессии гена BCRP по сравнению с P-gp (Рисунок 4), что соответствует разделению моделей по степени резистентности на умеренную и высокую. 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. Предполагается, что этот уровень является минимально необходимым для обеспечения выброса субстратов, специфичных исключительно для MRP1.

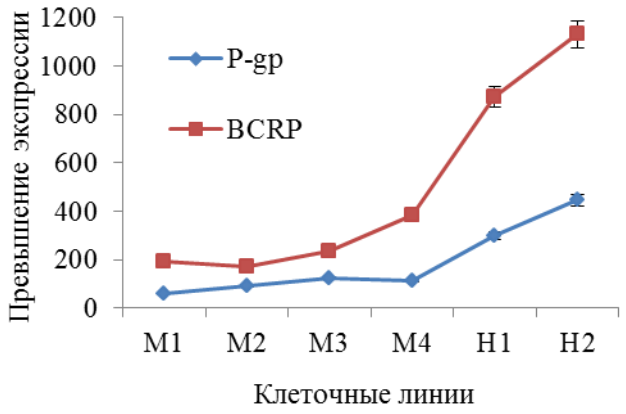


Рисунок 4 – Превышение уровня экспрессии генов ABC-транспортеров в химиорезистентных моделях относительно контрольного уровня.

Наблюдаемое увеличение экспрессии генов транспортеров говорит об их потенциальном участии в формировании фенотипа МЛУ, но 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 проводили для P-gp и BCRP, для которых было показано увеличение экспрессии генов. Оценку экспрессии на белковом уровне проводили двумя различными методами, методом иммуноцитохимического анализа и вестерн-блот анализа, что позволяет получить достоверные данные по содержанию белков в клетках резистентных моделей.

Иммуноцитохимический анализ проводили с помощью имиджинговой системы и селективных к соответствующему белку антител, содержащих флуоресцентную метку. Согласно полученным результатам, экспрессия как P-gp, так и BCRP планомерно увеличивается с повышением степени химиорезистентности моделей. 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. Наблюдаемые тенденции согласуются с данными экспрессии генов, а также подтверждают ABC-транспортер-опосредованный характер устойчивости моделей с превалированием BCRP над P-gp. Тем не менее, данные по экспрессии белков P-gp и BCRP, полученные иммуноцитохимическим методом, нельзя сравнить между собой в связи с различной аффинностью используемых антител, а также различной интенсивностью флуоресценции конъюгированных меток. Поэтому уровни экспрессии P-gp и BCRP в клетках дополнительно оценивали методом вестерн-блот анализа. 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 5).

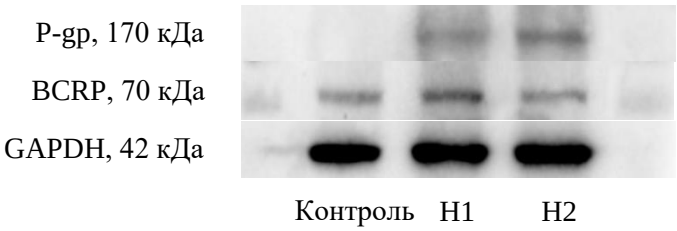


Рисунок 5 – Пример анализа уровней экспрессии P-gp и BCRP в контрольных клетках и моделях H1 и H2 относительно GAPDH.

Таким образом, в ходе исследования было продемонстрировано 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 говорит о том, что устойчивость опухолевых клеток к таксолу может формироваться индивидуальным образом в зависимости от типа клеток.

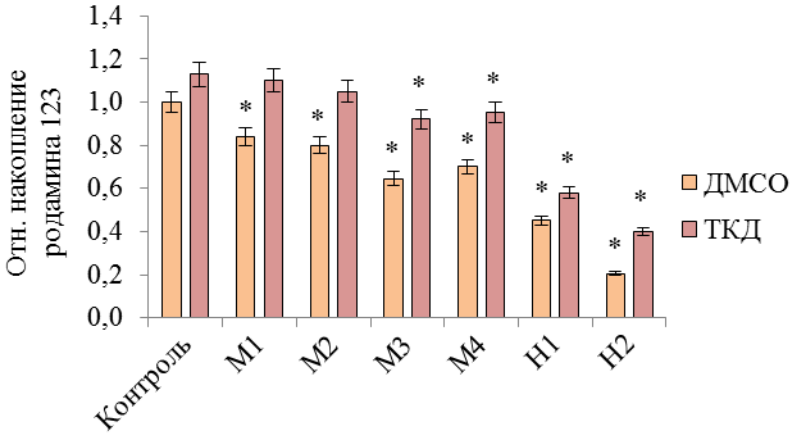


Рисунок 6 – Оценка транспортной активности P-gp по накоплению родамина 123 в резистентных моделях. ТКД – тариквидар. * $p<0,05$ относительно контроля (*t*–критерий Стьюдента).

Оценку транспортной активности P-gp в клетках химиорезистентных моделей определяли по накоплению клетками флуоресцентного митохондриального красителя, субстрата P-gp, родамина 123. При этом учитывали эффект от использования тариквидара, ингибитора третьего поколения, обладающего высоким сродством к P-gp. Было показано снижение накопления родамина 123 клетками химиорезистентных моделей с увеличением степени резистентности клеток, что согласуется с полученными ранее данными и подтверждает факт P-gp-опосредованной резистентности (Рисунок 6). 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 уровни накопления родамина 123 восстанавливаются до уровней, сопоставимых с контролем. В случае моделей с высокой степенью резистентности восстановления до уровня контроля не было достигнуто при используемой концентрации тариквидара.

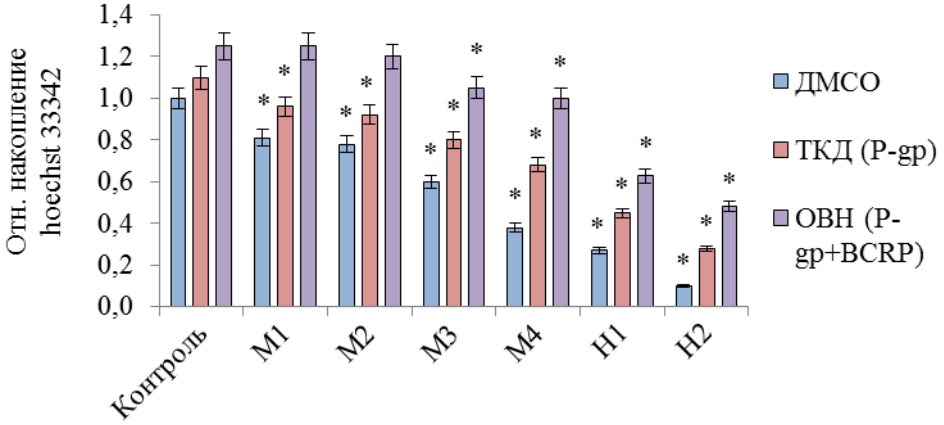


Рисунок 7 – Оценка интегральной транспортной активности P-gp и BCRP по накоплению hoechst 33342 в резистентных моделях. ТКД – такриквидар, ОВН – ортованадата натрия. * $p<0,05$ относительно контроля (*t*–критерий Стьюдента).

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, который является неселективный ингибитором ABC-транспортеров и оказывает ингибирующее действие как на P-gp, так и BCRP. Согласно полученным данным, относительное накопление hoechst 33342 также существенно снижается по мере усиления резистентности разработанных моделей (Рисунок 7). Использование ингибиторов тариквидара и ортованадата натрия, в свою очередь, обеспечивает увеличение накопления красителя в клетках моделей. 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 активизацию как P-gp, так и BCRP в клетках химиорезистентных моделей, но и небольшое преобладание вклада BCRP в развитие фенотипа МЛУ.

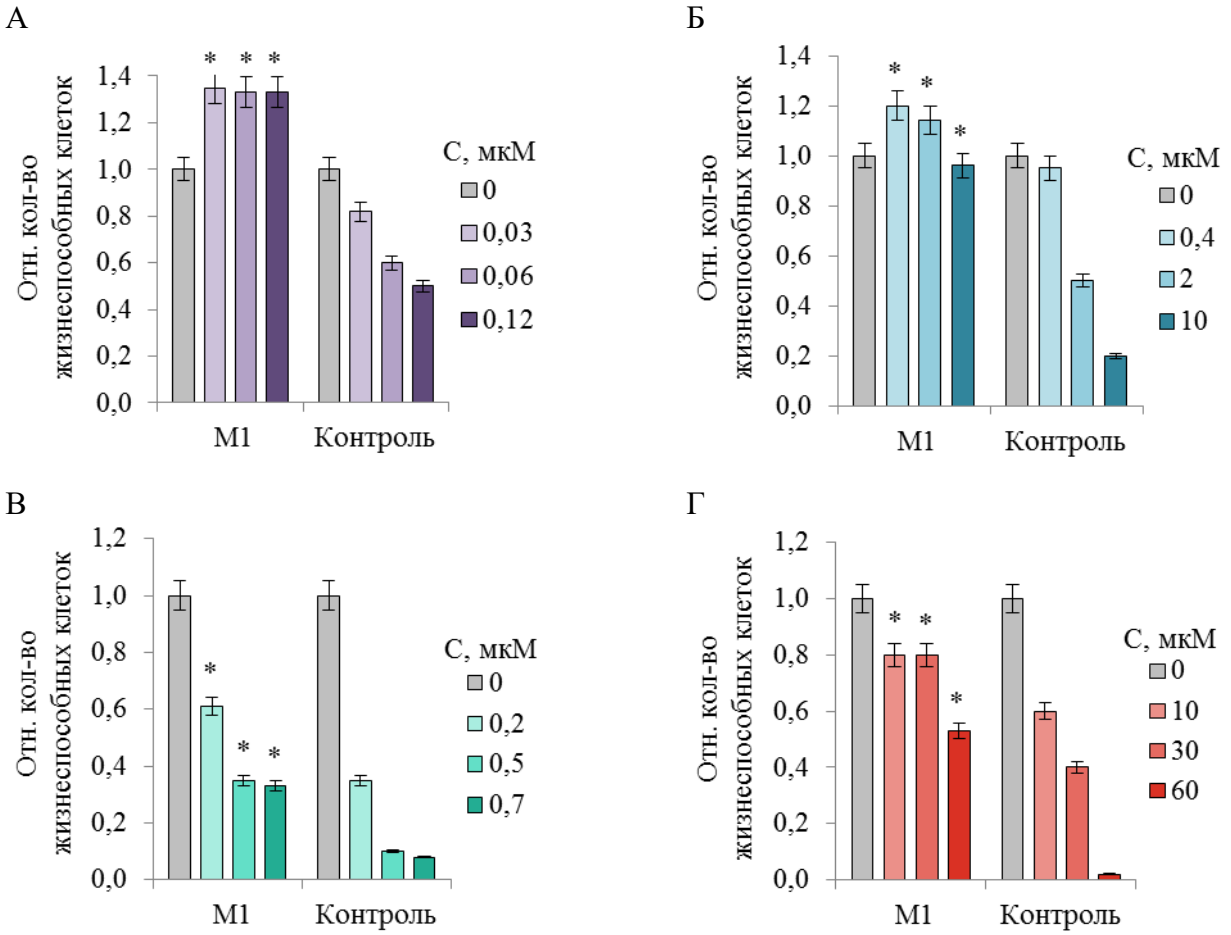


Рисунок 8 – Жизнеспособность клеток химиорезистентной модели M1 и контрольных клеток в присутствии противоопухолевых соединений. А – таксола; Б – доксорубицина; В – Mg132; Г – нутлина-3а. * $p<0,05$ относительно контрольной линии (*t*–критерий Стьюдента).

Полученные результаты говорят о выраженной транспортной активности P-gp и BCRP в клетках химиорезистентных моделей, что говорит о потенциале формирования устойчивости полученных моделей к химиотерапевтическим агентам, действующим по другим механизмам. В случае, когда клетки резистентны к двум и более препаратам различного механизма действия на фоне повышенной экспрессии транспортных белков семейства ABC, то говорят о формировании фенотипа МЛУ. Для определения профиля лекарственной устойчивости полученных резистентных моделей, была исследована чувствительность клеток к таксолу, а

также другим противоопухолевым препаратам, действующим 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, результаты сопоставляли с результатами воздействия препаратов на клетки дикого типа. Согласно полученным данным, выведенные модели продемонстрировали сниженную чувствительность ко всем исследованным препаратам в рассмотренных концентрациях, что хорошо видно уже на клеточной модели M1 (Рисунок 8). 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-3а, 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.

Таким образом, продемонстрированная резистентность выведенных моделей к препаратам четырех различных групп однозначно указывает на развитие ABC-транспортер-опосредованной МЛУ опухолевых клеток. Стабильные резистентные характеристики моделей и подтвержденный фенотип МЛУ полученных моделей позволяет использовать их в качестве инструмента для разработки подходов к сенсибилизации резистентных клеток.

Способы преодоления химиорезистентности

Предполагается, что для преодоления ABC-транспортер-опосредованной химиорезистентности опухолевых клеток можно использовать низкомолекулярные ингибиторы белков семейства ABC. При этом основная сложность разработки таких ингибиторов заключается в том, что они сами по себе не обладают терапевтическим потенциалом, а используются в комбинации с химиотерапевтическими агентами. Все предлагаемые на сегодняшний день 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.

Наиболее актуальным подходом к преодолению ABC-транспортер-обусловленной резистентности клеток 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.

Применение ингибиторов MDM2 для преодоления МЛУ

Ингибиторы MDM2 представляют собой группу проапоптотических агентов, находящихся на стадии клинических испытаний. Они способствуют восстановлению активности онкосупрессора p53 посредством предотвращения его связывания E3-убиквитин лигазой MDM2, при этом для некоторых представителей отмечается способность взаимодействовать с одним из транспортных белков семейства ABC – P-gp. Ингибиторы MDM2, обладая собственной таргетной противоопухолевой активностью, могут выступать как самостоятельные агенты для борьбы с опухолями, характеризующимися ABC-транспортер-опосредованной химиорезистентностью. Исходя из этого, мы оценили эффективность известных и разработанных нами ранее ингибиторов MDM2 в преодолении МЛУ выведенной

панели резистентных моделей. В качестве ингибиторов MDM2 рассматривали структуры различных химических классов:

- нутлин-3а (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»).

Для того, чтобы ингибиторы MDM2 можно было эффективно использовать на резистентных клетках, они должны обладать способностью снижать транспортную активность, в первую очередь, белков P-gp и BCRP. Согласно полученным результатам по оценке влияния ингибиторов MDM2 на транспортную активность P-gp, все исследованные ингибиторы дозозависимым образом способствуют накоплению родамина 123 в клетках химиорезистентных моделей, при этом значительный эффект накопления отмечается также в клетках высокорезистентных моделей (Рисунок 9, А). Эффект от использования ингибиторов MDM2 в наименьшей концентрации (2,5 мкМ) был сопоставим с эффектом от использования тариквидара, что подтверждает потенциал ингибиторов MDM2 для использования в качестве ингибиторов P-gp.

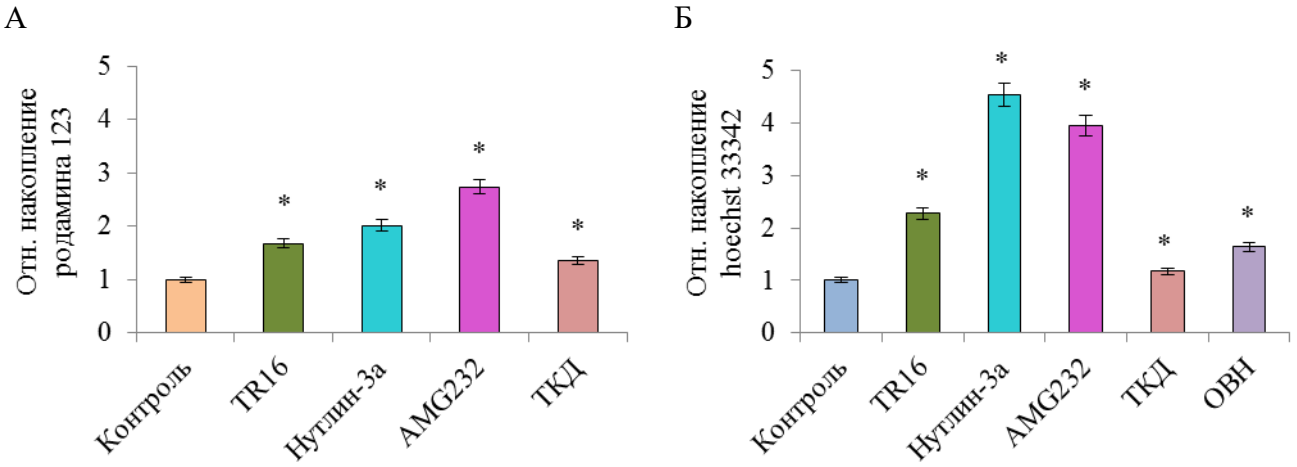


Рисунок 9 – Оценка транспортной активности P-gp по накоплению родамина 123 (А) и BCRP по накоплению hoechst 33342 (Б) клетками модели H1 в присутствии ингибиторов MDM2 (C = 10 мкМ). ТКД – тариквидар, ОВН – ортованадат натрия. * p<0,05 относительно контроля (t-критерий Стьюдента).

Оценку влияния ингибиторов MDM2 на активность второго транспортера – BCRP проводили косвенным путем по накоплению ядерного красителя hoechst 33342, являющегося субстратом как P-gp, так и BCRP. Влияние ингибиторов MDM2 на активность P-gp оценивали по сопоставлению результатов накопления красителей R123 и hoechst 33342 при использовании исследуемых соединений и тариквидара. Степень ингибирования BCRP, в свою очередь, оценивали по разнице накопления красителя hoechst 33342 и R123 при использовании ингибиторов MDM2 и тариквидара. Комплексная оценка влияния ингибиторов 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. Тем не менее, заметное влияние ингибиторов MDM2 на активность BCRP было зафиксировано только при повышенных концентрациях используемых соединений (Рисунок 9, Б).

Таким образом, было показано, что ингибиторы MDM2 обладают способностью снижать активность белков P-gp и BCRP. При этом соединения AMG232 и TR16 преимущественно ингибируют P-gp, а нутлин-3а проявляет универсальные ингибирующие способности сразу к двум транспортерам (P-gp и BCRP). Выявленная способность ингибиторов MDM2 снижать

активность ABC-транспортеров говорит о потенциале соединений по преодолению МЛУ опухолевых клеток, что было в дальнейшем подтверждено в ходе оценки жизнеспособности клеток выведенных моделей при совместном применении ингибиторов MDM2 с препаратами трех рассмотренных ранее групп, к которым клетки развили устойчивость. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ингибиторы MDM2 способны восстанавливать чувствительность клеток выведенных моделей, в том числе характеризующихся высокой степенью резистентности ко всем рассматриваемым противоопухолевым препаратам различного механизма действия (Рисунок 10).

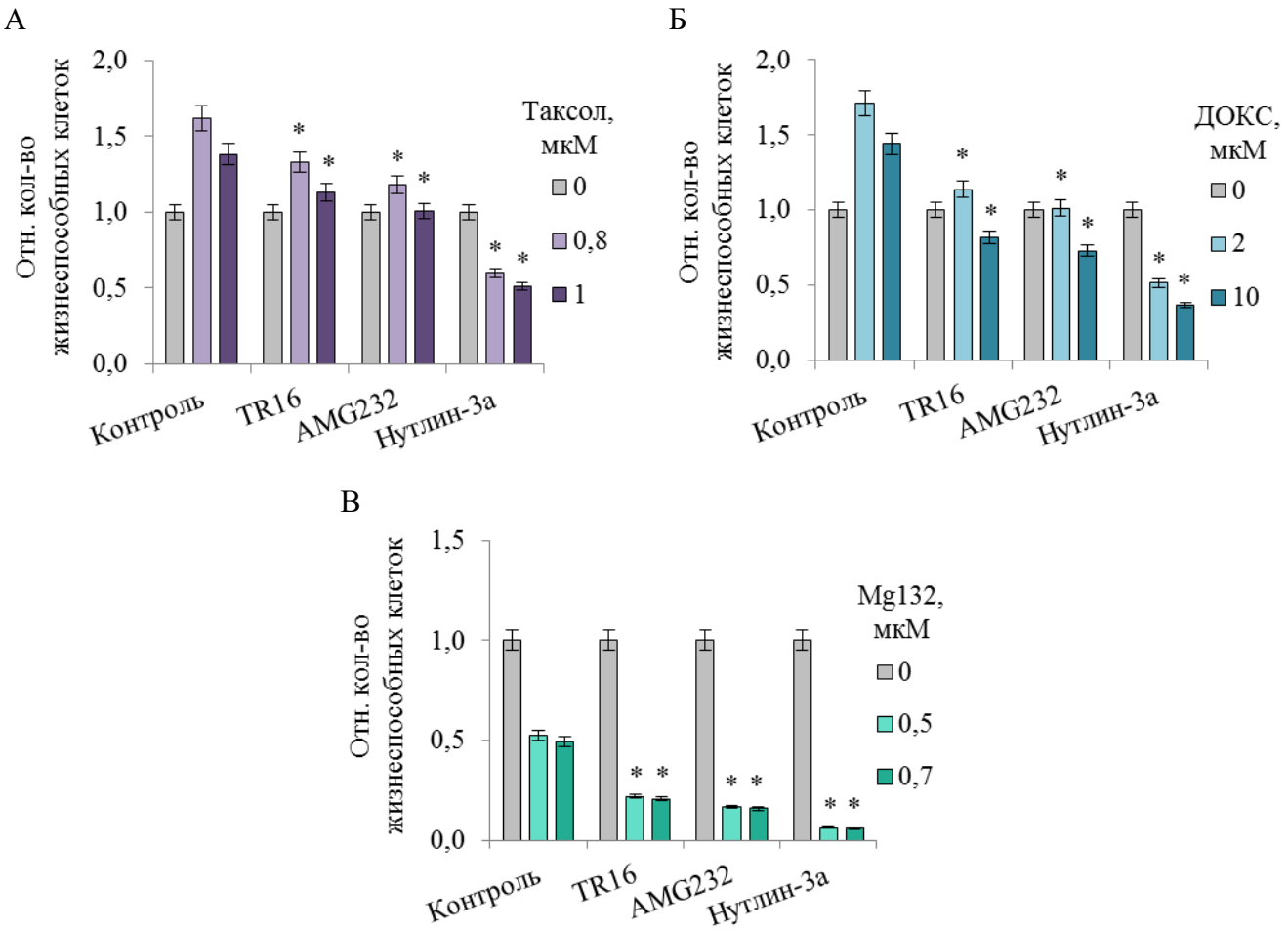


Рисунок 10 – Жизнеспособность клеток химиорезистентной модели H1 при действии таксола (А), доксорубицина (Б), Mg132 (В) в присутствии ингибиторов MDM2 (C = 10 мкМ). * p<0,05 относительно контроля (t–критерий Стьюдента).

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. Это может быть связано с тем, что в выведенных моделях устойчивость клеток обусловлена в большей степени активностью BCRP, к которому нутлин-3а, как было показано ранее, проявляет большее сродство.

Для того, чтобы подтвердить, что способность ингибиторов MDM2 снижать активность ABC-транспортеров и преодолевать МЛУ обусловлена их непосредственным взаимодействием с транспортерами, было проведено *in vitro* исследование по оценке влияние ингибиторов MDM2 на потребление АТФ рекомбинантным белком P-gp, то есть на АТФазную активность белка, методом люминесцентного анализа. Показано, что ингибиторы MDM2 изменяют АТФазную активность рекомбинантного P-gp относительно базального уровня, при этом

наблюдаемый эффект схож с эффектом применения ингибитора тариквидара, связывающегося с трансмембранным доменом транспортера, что свидетельствует о прямом взаимодействии нутлина-3а, AMG232 и TR16 с P-gp. К сожалению, подобного *in vitro* теста, позволяющего детектировать непосредственное взаимодействие субстратов и белка BCRP, пока не разработано. Тем не менее, учитывая высокую гомологию транспортеров, а также опираясь на ряд расчетных экспериментов, можно предположить, что все исследованные ингибиторы MDM2 также напрямую взаимодействуют с BCRP.

Помимо проведенных экспериментов, подтверждающих потенциал ингибиторов MDM2 для преодоления химиорезистентности, была проведена оценка безопасности длительного применения таких таргетных агентов на клетках HCT116. В рамках этого была сделана попытка вывести клеточную модель с устойчивостью к наиболее изученному ингибитору MDM2 нутлину-3а. Однако выработать резистентность к нутлину-3а не удалось, а длительная обработка максимально возможной концентрацией нутлина-3а не приводила к существенному изменению уровней экспрессии генов клинически значимых ABC-транспортеров, что говорит о безопасности использования ингибиторов MDM2 с точки зрения развития ABC-транспортер-опосредованной устойчивости.

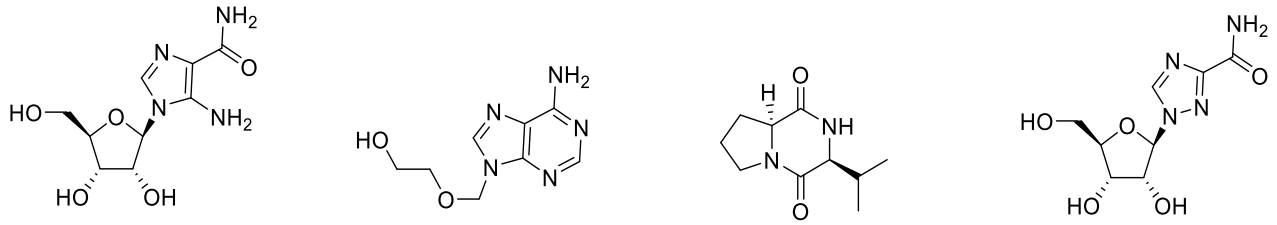
Применение АТФ-подобных соединений для преодоления МЛУ

Ингибиторы ABC-транспортеров, связывающиеся с трансмембранным доменом белков, способны снижать выброс противоопухолевых препаратов. Однако, несмотря на высокую гомологию представителей семейства ABC ингибиторы весьма субстрат-селективны. При этом, как было нами показано, в развитии устойчивости клеток зачастую участвует несколько транспортеров.

Активность ABC-транспортеров и выброс ксенобиотиков из клетки обеспечивается за счет связывания АТФ с консервативными нуклеотид-связывающими доменами белков, что сопровождается энергетически выгодным гидролизом фосфатных связей АТФ. Полученная при этом энергия затрачивается на конформационные перестройки, приводящие к переносу субстрата во внеклеточное пространство. Предотвращение выброса противоопухолевых препаратов может быть достигнуто за счет снижения энергоснабжения транспортных белков. В частности, использование соединений, воспроизводящих структуру АТФ, но не выполняющих его функцию, может привести к блокированию нуклеотид-связывающих доменов ABC-транспортеров и подавлению эффлюкса химиотерапевтических агентов.

Мы исследовали возможность применения АТФ-подобных соединений для преодоления МЛУ выведенной панели резистентных моделей. При этом рассматривали соединения в различной степени воспроизводящие структуру АТФ (Рисунок 11):

- AICAR (5-аминоимидазол-4-карбоксамид-рибонуклеотид, аналог с искаженным азотистым основанием);
- SN202 (2-((6-амино-9Н-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 11 – Структурные формулы АТФ-подобных соединений: AICAR (а), SN202 (б), DKPP (в), рибавирин (г).

Помимо трех типов АТФ-подобных соединений рассматривали также рибавирин, нуклеозидный аналог, успешно прошедший клинические испытания и 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 красителей, являющихся субстратами либо P-gp (родамин 123), либо обоих транспортеров, P-gp и BCRP (hoechst 33342). Эффект от применения АТФ-подобных соединений сопоставляли с эффектами от модельных ингибиторов – тариквидара (P-gp) и ортованадата натрия (P-gp и BCRP). Согласно полученным данным, все соединения в дозозависимой манере ингибируют P-gp, обеспечивая увеличение накопления клетками родамина 123. Эффект накопления красителя во всех случаях был больше, чем при использовании селективного ингибитора P-gp тариквидара, в то же время наилучшее ингибирование P-gp показал АМФ, структурно наиболее близкий АТФ (Рисунок 12, А). По результатам сопоставления накопления родамина 123 в присутствии АТФ-подобных соединений и тариквидара с аналогичными показателями накопления hoechst 33342, более эффективными по отношению к BCRP являются АМФ, AICAR и SN202 (Рисунок 12, Б).

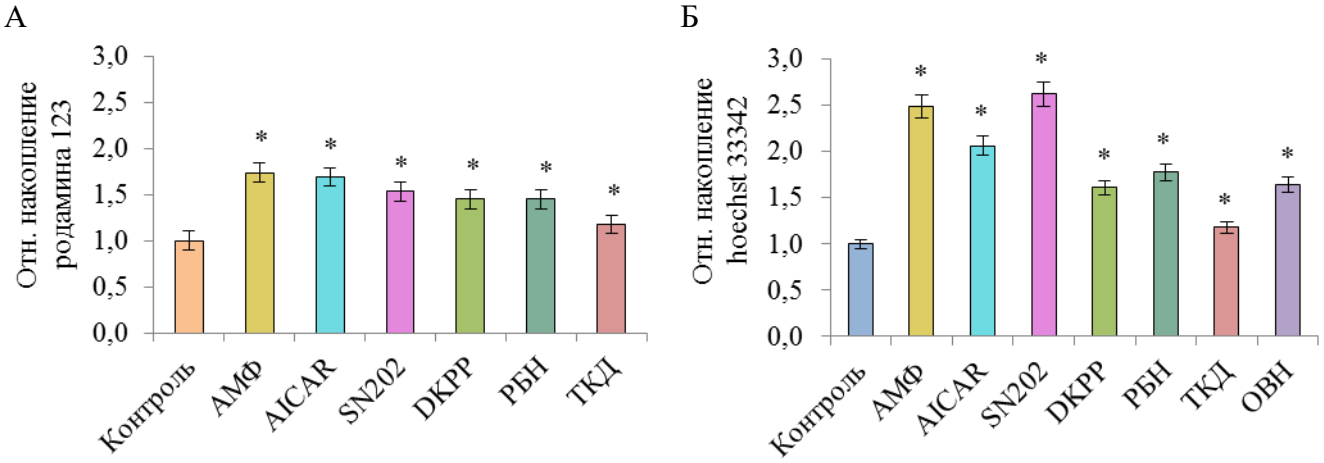


Рисунок 12 – Оценка транспортной активности P-gp по накоплению родамина 123 (А) и BCRP по накоплению hoechst 33342 (Б) клетками моделей на примере H1 в присутствии АТФ-подобных соединений (*C* = 100 мкМ). РБН – рибавирин, ТКД – тариквидар, ОВН – ортованадат натрия. * $p<0,05$ относительно контроля (*t*–критерий Стьюдента).

Проведенное исследование демонстрирует возможность использования АТФ-подобных соединений для снижения активности ABC-транспортеров. При этом каких-либо зависимостей между структурой соединений и субстратной селективностью выявлено не было, что может быть использовано для ингибирования различных транспортных белков. В связи с обнаруженной способностью АТФ-подобных соединений ингибировать ABC-транспортеры, мы оценили возможность их использования для преодоления МЛУ. При этом исследовали способность АТФ-подобных соединений в условиях совместного с препаратом применения снижать жизнеспособность выведенных резистентных моделей. Согласно полученным данным комбинированное применение позволяет восстановить чувствительность умеренно резистентных клеточных моделей к противоопухолевым препаратам. В случае моделей с высокой степенью резистентности, использование АТФ-подобных соединений не привело к существенному снижению жизнеспособности при совместной обработке с таксолом; при совместной обработке с доксорубицином заметная сенсибилизация наблюдался только при повышенных концентрациях препарата (Рисунок 13).

Рибавирин оказал наиболее выраженный эффект восстановления чувствительности клеток как с умеренной, так и с высокой степенью резистентности. Это в очередной раз свидетельствует о перспективности перепрофилировании препаратов, уже используемых в клинике, для преодоления ABC-транспортер-опосредованного эффлюкса.

Подтверждение непосредственного взаимодействия АТФ-подобных соединений с ABC-транспортерами проводили с помощью использованного ранее *in vitro* теста на АТФазную активность транспортного белка, разработанного для P-gp. Изменение АТФазной активности P-gp, фиксируемое методом люминесцентного анализа указывает на прямое взаимодействие соединений с транспортером. Так как предполагается, что все исследованные соединения способны конкурировать с АТФ за сайт связывания, предотвращая гидролиз АТФ и ингибируя энергетически-зависимую активность белков, непосредственное взаимодействие АТФ-подобных соединений с P-gp должно приводить к снижению АТФазной активности P-gp, что и наблюдалось в эксперименте. В связи с тем, что нуклеотид-связывающий домен является консервативным элементом белков семейства ABC, предполагается, что взаимодействие АТФ-подобных соединений с BCRP будет иметь аналогичный характер. Тем не менее, на основе уже полученных результатов можно говорить о возможности использования АТФ-подобных соединений для преодоления резистентности, обусловленной повышенной активностью нескольких ABC-транспортеров.

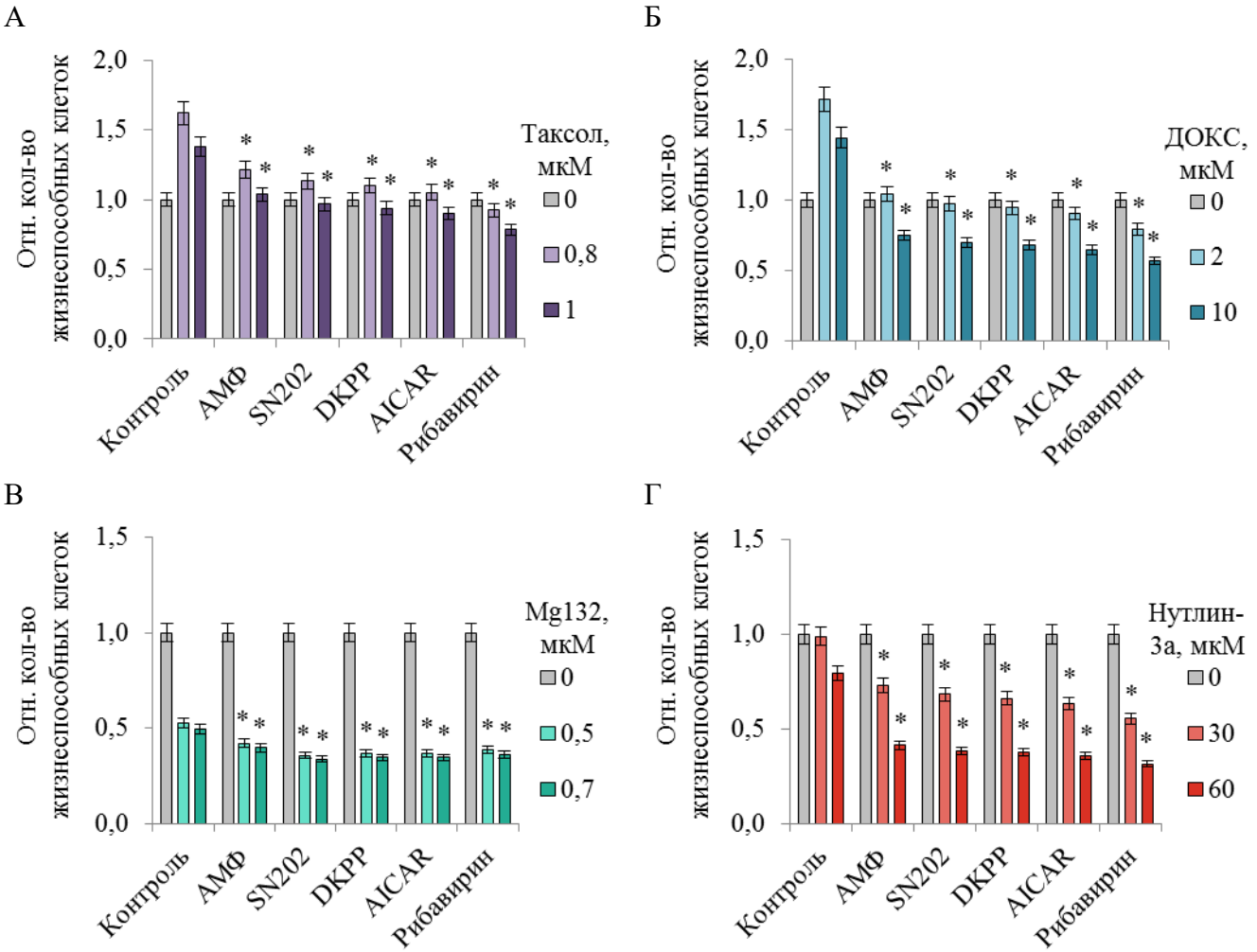


Рисунок 13 – Жизнеспособность клеток химиорезистентной модели H1 при действии таксола (А), доксорубицина (Б), Mg132 (В), нутлина-3а (Г) в присутствии АТФ-подобных соединений (*C* = 100 мкМ). * $p<0,05$ относительно контроля (*t*–критерий Стьюдента).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Работу проводили с использованием клеточной линии аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 дикого типа (Bio-Rad).

В работе использовали: соединения таксол (паклитаксел) (Sigma-Aldrich), Mg132 (MedChemExpress LLC), доксорубицин (Nanjing Pars Biochem), нутлин-3а (Sigma-Aldrich), AMG232 (Sigma-Aldrich), TR16 (собственная разработка НИЛ «Молекулярная фармакология» – СПбГТИ(ТУ)), АМФ, AICAR, рибавирин (MedChemExpress LLC), DKPP, SN202 (собственные разработки НИЛ «Молекулярная фармакология» – СПбГТИ(ТУ)), тариквидар, ортованадат натрия (Sigma-Aldrich), родамин 123 (MedChemExpress LLC), hoechst 33342 (Invitrogen); наборы RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen), MMLV RT, qPCRmix-HS SYBR (Евроген), Pgp-Glo Assay System (Promega); антитела к P-gp и BCRP с FITC и APC-метками, к P-gp, BCRP и GAPDH с HRP меткой (Cloud-Clone); реактивы MTT (Диаэм) и Novex ECL (Invitrogen).

Методы исследования

Культивирование эукариотических клеток

Клетки культивировали в соответствии с рекомендациями ATCC – в среде DMEM с L-глутамином и повышенным содержанием глюкозы, 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).

Выведение химиорезистентных клеточных моделей

Химиорезистентные модели выводили посредством непрерывного культивирования клеток в среде DMEM в присутствии таксола или нутлина-3а. Начальные концентрации составляли 0,01 мкМ для таксола и 10 мкМ для нутлина-3а. По мере уравнивания скорости роста обрабатываемых клеток со скоростью роста клеток дикого типа концентрацию препаратов повышали в 2–3 раза.

Определение жизнеспособности клеток методом MTT-теста

Клетки обрабатывали растворами препаратов, а также растворами исследуемых соединений (C = 10 мкМ для ингибиторов MDM2 и C = 100 мкМ для АТФ-подобных соединений) в среде DMEM. Клетки выдерживали в течение 48 ч при 37°C и 5% CO_2. Растворы убирали и к клеткам добавляли раствор реактива MTT в среде DMEM, инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в течение 3 ч. Удаление реактива MTT сопровождалось внесением ДМСО для растворения образовавшегося формазана. Интенсивность абсорбции светового потока раствора формазана измеряли на планшетном ридере CLARIOstar. Интенсивность абсорбции коррелировала с жизнеспособностью клеток. В качестве контроля использовали клетки дикого типа или химиорезистентные, обработанные растворами препаратов с 0,5% ДМСО.

Определение уровней экспрессии генов белков

Уровни экспрессии генов белков определяли методом ПЦР-анализа в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР РВ). Тотальную РНК выделяли при помощи набора RNeasy Mini Kit. Синтез кДНК проводили с использованием набора MMLV RT. Для проведения ПЦР использовали набор qPCRmix-HS SYBR. При этом использовали амплификаторы T100 Thermal Cycler, CFX96 Touch Real-Time PCR. 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:
ABCB1: F – GGGAGCTTAACACCCGACTTA, R – GCCAAAATCACAAGGGTTAGCTT;
ABCG2: F – AAGCCACAGAGATCATAGAGCC, R – TCTTCTTCTCACCCCCGGAA;
ABCC1: F – TCAGGAGCACACGAAAGTCC, R – AAGAAGCTCATGGGTGACCG);
CDH1: F – GCCTCCTGAAAAGAGAGTGGAAG, R – TGGCAGTGTCTCTCCAAATCCG;
GAPDH: F – GGGAAGGTGAAGGTCGGAGT, R – TTGAGGTCAATGAAGGGGTCA.

Определение уровней экспрессии ABC-белков методом иммуноцитохимии

Уровни экспрессии ABC-транспортеров в клетках оценивали по интенсивности флуоресценции клеток, окрашенных антителами, специфичными к ABC-транспортерам. Клетки фиксировали 4% формальдегидом в ФСБ и пермеабилизировали с использованием 0,3% Tween 20 в ФСБ, после чего окрашивали растворами антител к P-gp и BCRP в буфере, содержащем 0,5% БСА в ФСБ, в течение часа в темноте при комнатной температуре. Концентрация рабочего раствора антител – 0,01 мкг/мкл. Ядра клеток окрашивали раствором hoechst 33342 в ФСБ (C = 1,6 мкМ). После этого клетки исследовали в системе 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 использовали клетки дикого типа.

Определение уровней экспрессии ABC-белков методом вестерн-блот анализа

Клеточные лизаты получали снятием клеток с чашки в RIPA буфере с последующей обработкой ультразвуком и криообработкой при –80°С. К лизатам добавляли загрузочного буфера Лэммли и инкубировали при 95°С в течение 5 мин. Пробы фракционировали в 10% полиакриламидном геле. Гель-электрофорез проводили при постоянном напряжении 130 В и комнатной температуре в течение 2 ч на установке Mini-PROTEAN Tetra. Белковые фракции в геле переносили на мембрану из поливинилиденфторида методом «мокрого» переноса при постоянной силе тока 350 мА и температуре 4°С в течение 2 ч. Блокирование неспецифичных связываний осуществляли при выдерживании мембраны в 0,5% растворе БСА в ФСБ с 0,1% Tween 20 при комнатной температуре в течение 1 ч. 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. Референсным белком выступал GAPDH, который определяли в результате инкубирования мембраны в растворе антител с HRP (1:1000) при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Иммунодетекцию белков проводили с использованием реактива Novex ECL в системе визуализации ChemiDoc. В качестве контроля использовали клетки дикого типа.

Оценка транспортной активности ABC-белков

Оценку транспортной активности ABC-белков проводили по степени накопления клетками флуоресцентных красителей родамина 123 (C = 1 мкМ) и hoechst 33342 (C = 1,25 мкМ). Клетки обрабатывали растворами красителей и модельных ингибиторов, а также исследуемых веществ в среде Opti-MEM. В роли модельных ингибиторов выступали тариквидар (C = 1 мкМ) и ортованадат натрия (C = 200 мкМ). Исследовались ингибиторы MDM2 (C = 2,5, 5 и 10 мкМ) и АТФ-подобные соединения (C = 50 и 100 мкМ). Через 30 мин растворы удаляли, свечение клеток фиксировали на планшетном ридере Для контроля посева применяли систему Operetta с фильтрами: 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 использовали клетки дикого типа или клетки химиорезистентных моделей с 0,5% ДМСО.

Оценка АТФазной активности P-gp

АТФазную активность P-гликопротеина определяли при помощи набора для проведения люминесцентного анализа Pgp-GloTM. Встроенный в мембрану рекомбинантный P-gp обрабатывали 0,5% ДМСО, растворами исследуемых соединений (C = 10 мкМ для ингибиторов MDM2 и C = 100 мкМ для АТФ-подобных соединений), а также модельного ингибитора тариквидара (C = 1 мкМ) и ортованадата натрия (C = 200 мкМ). В пробы вносили раствор MgATP и спустя 40 мин при 37°C и 5% CO_2 добавляли реагент на основе люциферазы для обнаружения непрореагировавшего АТФ. Свечение фиксировали на планшетном ридере.

Статистический анализ

Все эксперименты проводили не менее чем в трех повторностях. Статистический анализ 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 является серьезной проблемой клинической онкологии. Причиной развития химиорезистентности опухолевых клеток служит активация различных механизмов клеточной защиты. Наиболее универсальным механизмом, лежащим в основе МЛУ более 90% вторичных опухолей, является эффлюкс противоопухолевых препаратов за счет активности транспортных белков семейства ABC. Снижение активности 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. Для достижения поставленной цели были обозначены задачи, основной из которых стала разработка инструмента – панели резистентных моделей на основе аденокарциномы толстой кишки человека HCT116 с различной степенью устойчивости к таксолу. Модели характеризовались стабильной резистентностью, обусловленной повышенной экспрессией генов P-gp и BCRP на генном и белковом уровнях. Наличие фенотипа МЛУ было подтверждено с помощью препаратов различного механизма действия, а сами модели были использованы для разработки подходов к ингибированию ABC-транспортеров.

Было проведено комплексное исследование способности ингибиторов MDM2 подавлять ABC-опосредованный эффлюкс. Снижение транспортной активности P-gp и BCRP при действии ингибиторов MDM2 было показано посредством оценки накопления клетками различных красителей – субстратов транспортеров. Была отмечена специфичность ингибирования конкретного транспортера в зависимости от структуры ингибитора MDM2. Сенсибилизирующую способность ингибиторов подтверждали оценкой жизнеспособности клеток при действии препаратов различных групп. Дополнительно было показано, что применение ингибиторов MDM2 является безопасным с точки зрения развития резистентности. Таким образом, использование ингибиторов MDM2 является перспективным для снижения активности ABC-белков и преодоления резистентности.

Предложен новый подход к преодолению ABC-транспортер-опосредованной резистентности за счет применения АТФ-подобных соединений, взаимодействующих с АТФ-связывающими сайтами транспортеров. Показана способность таких соединений снижать активность транспортных белков P-gp и BCRP. Применение АТФ-подобных соединений также обеспечило восстановление чувствительности клеточных моделей к действию препаратов различных групп, а также ингибиторов MDM2. Снижение АТФазной активности P-gp подтверждает механизм действия посредством блокирования нуклеотид-связывающего домена транспортеров. Полученные результаты говорят о том, что комбинированное применение АТФ-

подобных соединений представляет собой стратегию по преодолению лекарственной устойчивости клеток, обусловленной активностью ABC-транспортеров.

Таким образом, впервые были получены модели аденокарциномы толстой кишки человека, устойчивые к широко используемому противоопухолевому препарату таксолу, и предложены два подхода к преодолению МЛУ, обусловленной повышенной активностью ABC-транспортеров. Созданные модели могут быть в дальнейшем использованы для глубокого исследования механизмов, задействованных в формировании МЛУ. Кроме того, модели с релевантными характеристиками химиорезистентности могут быть использованы для оценки активности новых ингибиторов ABC-транспортеров. Исследованные в работе ингибиторы MDM2 и АТФ-подобные соединения являются ингибиторами ABC-транспортеров и могут рассматриваться в качестве основы для создания новых соединений. Следует отметить, что представители обозначенных групп соединений, проходящие клинические испытания (AMG232 и нутлин-3а) или уже прошедшие их (AICAR и рибавирин), могут быть внедрены в клиническую практику в кратчайшие сроки, что представляет собой практическую ценность.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. 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;

2. 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;

3. 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;

4. 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;

5. 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.

Работы, опубликованные в сборниках материалов научных конференций:

1. Специфика разработки ингибиторов ABC-экспортеров на примере P-гликопротеина / Т. А. Григорьева, А. А. Романова, **А. Сагайдак**, В. Г. Трибулович // Сборник тезисов докладов VI Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии. МОБИ-ХИМФАРМА 2020». – 2020. – С. 26;

2. Создание клеточных линий с индуцированной транспортер-опосредованной химиорезистентностью / **А. Сагайдак**, А. А. Романова, Т. А. Григорьева, В. Г. Трибулович // Сборник тезисов докладов VI Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии. МОБИ-ХИМФАРМА 2020». – 2020. – С. 158;

3. Трибулович, В. Г. Моделирование конформационной лабильности белков-мишеней при разработке низкомолекулярных препаратов / В. Г. Трибулович, Д. С. Новикова, **А. В. Сагайдак** // Сборник материалов XXVII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – 2020. – С. 73–74;

4. **Сагайдак, А. В.** Выведение клеточных линий с ABC-транспортер-связанной химиорезистентностью / **А. В. Сагайдак**, Т. А. Григорьева, В. Г. Трибулович // Материалы XI научной конференции «Традиции и Инновации». – 2020. – С. 171;

5. Фирстова, В. Г. Влияние противоопухолевых агентов на транспортную активность ABC-экспортеров / В. Г. Фирстова, **А. В. Сагайдак**, Т. А. Григорьева // Сборник тезисов Научной конференции для молодых ученых «LifeSciencePolytech». – 2021. – С. 45;

6. Щербакова, А. Е. Миметики АТФ и их влияние на транспортную активность белков множественной лекарственной устойчивости / А. Е. Щербакова, Д. С. Новикова, **А. В. Сагайдак** // Сборник тезисов Научной конференции для молодых ученых «LifeSciencePolytech». – 2021. – С. 36;

7. **Сагайдак, А. В.** Оценка вклада ABC-транспортеров в химиорезистентность опухолевой клеточной линий, устойчивой к паклитакселу / **А. В. Сагайдак**, А. А. Романова, Т. А. Григорьева // Материалы XXVII Всероссийской конференции молодых ученых с международным участием «Актуальные проблемы биомедицины – 2021». – 2021. – С. 282–283;

8. **Sagaidak, A. V.** Study on biological activity of mdm2 inhibitors in the context of tumor chemoresistance development / **A. V. Sagaidak**, A. A. Romanova // Book of abstracts of the XII International conference on chemistry for young scientists “Mendeleev 2021”. – 2021. – P. 640;

9. **Сагайдак, А. В.** Новая мишень для преодоления множественной лекарственной устойчивости гиперпролиферирующих клеток / **А. В. Сагайдак** // Сборник тезисов статей Всероссийской научно-практической конференции им. Жореса Алферова. – 2022. – С. 69–70;

10. **Сагайдак, А. В.** Создание клеточных моделей с ABC-транспортер-опосредованной устойчивостью / **А. В. Сагайдак** // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – 2022. – С. 574–576;

11. **Сагайдак, А. В.** Активация ABC-транспортер-опосредованных механизмов химиорезистентности клеточной линии HCT116 / **А. В. Сагайдак**, Я. А. Григорьев, А. Д. Зенина // Научный журнал Цитология. – 2022. – Т. 64. – № 7. – С. 688;

12. **Сагайдак, А. В.** Пан-ингибиторы эффлюкс-транспортеров семейства ABC для преодоления химиорезистентности опухолей / **А. В. Сагайдак**, Т. А. Григорьева // Сборник тезисов докладов VIII Междисциплинарной конференции «Молекулярные и биологические аспекты химии, фармацевтики и фармакологии. МОБИ-ХИМФАРМА 2023». – 2023. – С. 33;

13. **Сагайдак, А. В.** Подавление ABC-транспортер-опосредованной химиорезистентности при помощи миметиков АТФ / **А. В. Сагайдак**, Д. Н. Киндт // Сборник материалов XIII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – 2023. – С. 130–133;

14. Тест-система для оценки эффективности ингибиторов ABC-транспортеров / **А. В. Сагайдак**, Т. А. Григорьева, Д. С. Новикова, В. Г. Трибулович // Сборник тезисов докладов XXII Менделеевского съезда по общей и прикладной химии в 7 томах. – 2024. – Т. 5. – С. 327.