

На правах рукописи

Кондрашева Ирина Григорьевна

**ИЗУЧЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК
МЕЛАНОМЫ ЧЕЛОВЕКА К ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ**

03.00.04 – биохимия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва – 2008

Диссертация выполнена в Государственном учреждении здравоохранения г. Москвы "Московский научно-исследовательский институт медицинской экологии" Департамента здравоохранения г. Москвы

Научный руководитель доктор биологических наук, профессор
Москалева Елизавета Юрьевна

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Белушкина Наталья Николаевна

доктор биологических наук,
Берман Альберт Ефимович

Ведущая организация Институт биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова РАН.

Защита состоится "11" декабря 2008 г. в _____ часов на заседании
Диссертационного совета Д 001.010.01. при ГУ НИИ БМХ РАМН по адресу:
119121, Москва, ул. Погодинская, д.10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИ БМХ
РАМН.

Автореферат разослан " ____ " _____ 2008 г.

Ученый секретарь Диссертационного совета,
кандидат химических наук

Е.А. Карпова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

Актуальность проблемы. Меланома – чрезвычайно злокачественная опухоль, развивающаяся из меланоцитов и характеризующаяся высокой природной устойчивостью к противоопухолевым препаратам, биохимические механизмы которой не известны (Serrone L. et al., 1999; Helmbach H. et al., 2003).

Действие большей части противоопухолевых препаратов приводит к индукции апоптоза в опухолевых клетках в результате повреждения молекулы ДНК или других внутриклеточных мишеней (Zhivotovsky V. et al., 2003). Кроме того, важную роль при действии и химиотерапевтических средств и опухолеспецифических цитотоксических лимфоцитов (ЦТЛ) играет Fas-зависимый путь индукции апоптоза (Friesen C. et al., 1999, Classen C. et al., 1999). В тоже время существуют метаболические системы, препятствующие повреждению клеток. Это процессы, формирующие уровень внутриклеточных антиоксидантов; системы репарации ДНК; генетические особенности, приводящие к блокированию индукции и ингибированию процессов апоптоза; белки теплового шока, в частности Hsp70, и АТФ-зависимые транспортеры, обеспечивающие выброс токсических веществ из клеток, и тем самым препятствующие образованию их эффективных концентраций. В клетках меланомы обнаружены гены ABC-транспортеров (ABC – ATP-binding cassette) ABCB1 (MDR1), ABCB5, ABCC1 (MRP1) и ABCG2 (BCRP), кодирующие белки, которые осуществляют АТФ-зависимый транспорт как гидрофобных, так и некоторых гидрофильных соединений из клеток в среду (Gottesman M.M. et.al., 2002; Choi C.H., 2005; Frank N.Y. et.al., 2005; Monzani E. et.al., 2007). Вариабельность активности каждой из названных систем может приводить к формированию различных механизмов резистентности клеток меланомы к противоопухолевой терапии.

В связи с этим **целью работы** явилось исследование биохимических механизмов устойчивости клеток меланомы человека различных линий к действию противоопухолевых препаратов и новых подходов к ее снижению.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие **задачи:**

- изучение чувствительности клеток меланомы человека различных линий к противоопухолевым препаратам с разным механизмом действия и к новому препарату N¹,N⁶-бис[2,2,6,6-тетраakis(трифторметил)-3,6-дигидро-2H-1,3,5-оксадиазин-4-ил]-1,6-гександиамину (БТОГ);
- изучение содержания белка MDR1 на мембране клеток разных линий меланомы человека и его связи с устойчивостью клеток к противоопухолевым препаратам;
- исследование накопления Rho-123 клетками меланомы и скорости его выхода для оценки функциональной активности ABC-транспортёров;
- изучение содержания белка Hsp70 в клетках меланомы человека как фактора устойчивости к противоопухолевым препаратам;
- анализ содержания белков Fas и FasL в клетках меланомы человека различных линий и их связи с чувствительностью клеток меланомы к действию противоопухолевых препаратов и ЦТЛ;
- исследование влияния рекомбинантного белка MIS человека (rhMIS) на выживаемость клеток меланомы человека и их чувствительность к дакарбазину.

Научная новизна работы. Впервые показано, что новый препарат БТОГ обладает высокой противомеланомной активностью, которая не зависит от содержания белка MDR1 в опухолевых клетках.

Впервые обнаружено, что в клетках меланомы человека с фенотипом MDR1⁻ происходит быстрое выведение Rho-123, чувствительное к верапамилу.

Впервые показано, что верапамил повышает чувствительность клеток меланомы человека с фенотипом MDR1⁻ к действию доксорубина, дакарбазина и препарата БТОГ.

Впервые показано, что все линии меланомы человека содержат значительную фракцию клеток, не включающих Rho-123, размер которой не зависит от действия верапамила (за исключением линии MDR1⁺) и возрастает

при действии противоопухолевых препаратов.

Впервые показано, что обнаруженный в клетках меланомы человека высокий уровень содержания белка Hsp70 коррелирует с их устойчивостью к противоопухолевым препаратам.

Впервые показано, что rhMIS сенсibiliзирует клетки меланомы человека к действию дакарбазина, а повторная обработка клеток белком rhMIS приводит к усилению его антипролиферативного и сенсibiliзирующего действия.

Практическая значимость исследования. Обнаруженная высокая противомеланомная MDR1-независимая активность нового препарата N¹,N⁶-бис[2,2,6,6-тетраakis-(три-фторметил)-3,6-дигидро-2H-1,3,5-оксадиазин-4-ил]-1,6-гександиамина (БТОГ) позволяет рекомендовать этот препарат для проведения доклинических испытаний на животных.

Выявленное повышение чувствительности клеток меланомы человека к дакарбазину в присутствии верапамила может быть использовано в клинической практике при лечении меланомы.

Обнаруженное снижение выживаемости клеток меланомы человека в присутствии белка rhMIS, и его способность сенсibiliзировать клетки меланомы к действию дакарбазина, позволяют рекомендовать этот белок для клинических исследований.

Апробация работы. Результаты исследований были доложены на Всероссийском форуме с международным участием "Дни иммунологии в Санкт-Петербурге" (2004 г., Санкт-Петербург), II Всемирном конгрессе по иммунопатологии и аллергии (2004 г., Москва), XIV Российском Национальном Конгрессе "Человек и лекарство" (2007 г., Москва), XI Российском Онкологическом конгрессе с международным участием (2007 г., Москва), Российской конференции по меланоме совместно со Всемирной рабочей группой по меланоме и Европейской школой онкологии (2008 г., Москва).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ: 4 статьи, из них 3 опубликованы в журналах, состоящих в перечне ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, рекомендованных ВАК и 6

публикаций представленных материалами конференций.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 141 странице машинописного текста и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований и их обсуждение, заключение, выводы и список цитированной литературы, включающий 189 источников. Работа иллюстрирована 27 рисунками и 16 таблицами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.

1. Культивирование клеток меланомы человека. Клетки перевиваемых линий меланомы человека Bro-B19 и MS культивировали в среде DMEM, а Mel-3 - Mel-10 - в полной культуральной среде, состоящей из смеси сред RPMI-1640 и DMEM в соотношении 1:1, содержащей 10% сыворотки плодов крупного рогатого скота (СПК) и 50 мкг/мл гентамицина в пластиковых культуральных флаконах в CO₂-инкубаторе при +37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO₂.

2. Определение цитотоксической активности различных препаратов *in vitro*. Выживаемость клеток после инкубации с исследуемыми соединениями в различных концентрациях в течение 72 часов в 96-луночных планшетах определяли с помощью МТТ-теста по методу Mossman (1983). Для этого за 3 часа до окончания инкубации в каждую лунку добавляли раствор МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил-тетразолий бромид). Затем среду удаляли, кристаллы формазана растворяли в ДМСО и измеряли интенсивность окраски. Выживаемость клеток оценивали в процентах от соответствующего контроля и по кривым выживаемости рассчитывали IC50 – концентрацию препарата, при которой наблюдается гибель 50% клеток.

3. Исследование содержания белка MDR1 на мембране клеток проводили с использованием моноклональных антител (МкАт) к белку MDR1, меченных фикоэритрином (клон UIC2), в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Анализировали интенсивность флуоресценции с помощью проточного цитофлуориметра EPICS-XL и определяли значение средней интенсивности флуоресценции (MFI).

4. Исследование накопления флуоресцентного красителя Rho-123 клетками меланомы человека и скорости его выхода из клеток. К суспензии клеток в бессывороточной среде добавляли Rho-123 (0,1 мкг/мл), и инкубировали их 60 мин при +37°C. Для исключения погибших клеток, в пробу добавляли раствор йодистого пропидия (2 мкг/мл) непосредственно перед цитофлуориметрией. Флуоресценцию клеток измеряли с помощью проточного цитофлуориметра EPICS-XL в красной и зеленой области спектра при длине волны возбуждения 488 нм и полосой пропускания для зеленой области спектра – 525 нм (FL1), а для красной – 620 нм (FL3). Анализировали 50 000 тыс. клеток.

5. Внутриклеточное окрашивание клеток МкАт к Hsp70. Клетки меланомы промывали ФСБ с 1% БСА и 0,1% NaN₃ и фиксировали в 2% параформальдегиде. Клетки пермеабилizировали в течение 5 минут при комнатной температуре в буфере для пермеабилizации (отмывочный буфер, содержащий 0,5% сапонины и 1% инактивированной сыворотки человека). Пробы инкубировали с ФИТЦ-мечеными МкАт к Hsp70 клон 3A3 (“HyTest”, Финляндия) в течение 1 часа при +4⁰С, отмывали, фиксировали 2% параформальдегидом и измеряли их флуоресценцию на цитофлуориметре EPICS-XL (“Coulter Electronics”, США).

6. Иммуноблотинг проводили по стандартному протоколу Towbin et al. (1979). После фракционирования лизатов клеток с помощью Ds-Na-ПААГ-электрофореза по Laemmli, переносили белки на мембрану с использованием установки для электропереноса (Hoefler TE 70 series, “Amersham Pharmacia Biotech”). Мембрану инкубировали с первичными МкАт к Hsp70 (клон 3A3) и к β-актину, после чего проводили инкубацию со вторичными антителами, мечеными пероксидазой хрена. Иммунокомплексы на мембране проявляли, используя субстрат, содержащий 3,3-диаминобензидин, хлорнафтол и H₂O₂.

7. Исследование содержания белков Fas и FasL в опухолевых клетках проводили с помощью иммуноцитохимического метода при окрашивании клеток, фиксированных на стеклах 4% параформальдегидом, с

использованием непрямого стрептавидин-биотин-пероксидазного метода. Использовали антитела к Fas клон UT2 ("Сорбент") и к FasL клон G247-4 ("Pharmingen") при визуализации специфического связывания с помощью световой микроскопии и цифровой камеры DXM 1200 ("NIKON").

8. Приготовление лимфоцитов и дендритных клеток (ДК). Лимфоциты выделяли из фракции мононуклеарных лейкоцитов периферической крови после отделения моноцитов с помощью адгезии. ДК получали из моноцитов с использованием цитокинов ГМ-КСФ и ИЛ-4, нагружали лизатом опухолевых клеток и индуцировали созревание ДК, добавляя "Лейкинферон" и ФНОальфа. Опухолевые клетки лизировали при замораживании-оттаивании суспензии клеток в фосфатно-солевом буфере (ФСБ).

9. Индукция меланомаспецифических ЦТЛ с помощью ДК. Для индукции ЦТЛ 2×10^6 лимфоцитов и 100×10^5 ДК, обработанных опухолевыми антигенами, инкубировали в питательной среде IMDM с 10% СПК в 24-луночных планках. На следующий день и дважды в неделю в последующем к культурам добавляли 30 ед/мл ИЛ-2. Раз в неделю культуры рестимулировали нагруженными лизатом ДК. После двух рестимуляций лимфоциты использовали для анализа цитотоксической активности (ЦТА).

10. Определение ЦТА лимфоцитов человека. К опухолевым клеткам-мишеням в 96-луночной планшете добавляли суспензию лимфоцитов в соотношении клетки-мишени:клетки-эффекторы, равном от 1:1 до 1:40. Через 72 ч инкубации лимфоциты отмывали, опухолевые клетки окрашивали МТТ по методу Mossman (1983) и измеряли количество выживших клеток. ЦТА лимфоцитов рассчитывали по формуле: $ЦТА = [A_{\text{мишень}} - A_{\text{мишень+эффектор}}] : A_{\text{мишень}} \times 100\%$, где $A_{\text{мишень+эффектор}}$ и $A_{\text{мишень}}$ – оптическая плотность проб, где инкубировались опухолевые клетки-мишени с клетками-эффекторами и только клетки-мишени, соответственно.

11. Исследование связывания rhMIS с поверхностной мембраной клеток проводили с использованием rhMIS-ФИТЦ при его инкубации с клетками при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 1 часа. После отмывания клетки фиксировали 2% параформальдегидом. Выявление MIS-связывающего белка внутри клеток

проводили, как описано в п.8 при внутриклеточном окрашивании МкАт к Hsp70. Интенсивность флуоресценции измеряли с помощью проточного цитофлуориметра EPICS-XL.

12. Статистическая обработка. Статистическую обработку результатов по методу Стьюдента и корреляционный анализ проводили с использованием компьютерной программы "Origin".

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ.

1. Исследование чувствительности клеток меланомы человека к противоопухолевым препаратам с различным механизмом действия и N¹,N⁶-бис[2,2,6,6-тетраakis-(трифторметил)-3,6-дигидро-2H-1,3,5-оксадиазин-4-ил]-1,6-гександиамину (БТОГ).

Исследование проведено при использовании двух известных перевиваемых линий меланомы человека из международных коллекций - MS и Bro-B19 и восьми новых линий, полученных из фрагментов опухолей. Значения IC50 дакарбазина, паклитакселя, доксорубицина и БТОГ определяли в параллельных экспериментах (табл.1). Непролиферирующие (нестимулированные) лимфоциты человека были достаточно устойчивы к исследованным препаратам, но среди меланом 1 из 10 линий была более устойчива к дакарбазину, чем лимфоциты (Mel-7), 1 из 10 – к доксорубицину (Mel-8) и 1 из 10 к паклитакселю (Mel-7). При сравнении меланом с пролиферирующими лимфоцитами обнаружено, что из 10 линий 5 были более устойчивы, чем лимфоциты к дакарбазину, 8 – к доксорубицину и 5 к паклитакселю. Таким образом, клетки меланомы человека различных линий устойчивы к действию противоопухолевых препаратов по сравнению с пролиферирующими и даже покоящимися нормальными клетками человека и чувствительность отдельных линий значительно варьирует.

При исследовании нового препарата БТОГ обнаружено, что 2 из 10 линий меланом более устойчивы к этому препарату, чем покоящиеся лимфоциты и 4 из 10 линий меланом более устойчивы, чем стимулированные конканавалином А лимфоциты. Препарат БТОГ, так же как и дакарбазин, в отличие от доксорубицина и паклитакселя, был высоко активен как

Таблица 1. Чувствительность клеток различных линий меланомы и лимфоцитов человека к противоопухолевым препаратам с разным механизмом действия.

Линия клеток	Дакарбазин	Доксорубицин	Паклитаксель	БТОГ
	IC50, mM	IC50, мкМ		
Bro-B19	0,14±0,08	0,08±0,01	0,04±0,02	0,38±0,04
MS	0,12±0,01	0,08±0,02	0,05±0,01	0,50±0,04
Mel-3	2,07±0,19	0,13±0,01	0,3±0,12	0,76±0,08
Mel-4	0,12±0,02	0,63±0,15	3,64±0,09	0,51±0,30
Mel-5	0,15±0,05	0,15±0,07	5,65±0,35	0,70±0,15
Mel-6	2,30±0,15	0,14±0,03	56,30±0,41	1,28±0,27
Mel-7	5,90±0,24	0,64±0,08	>150	3,64±0,10
Mel-8	0,12±0,07	4,53±0,30	2,76±0,02	0,67±0,08
Mel-9	2,30±0,18	2,80±0,25	0,17±0,01	4,25±0,32
Mel-10	1,37±0,45	0,39±0,01	0,05±0,01	1,40±0,15
Нестимулированные лимфоциты	3,47±0,32	2,90±0,28	>100	1,82±0,14
Стимулированные Кона лимфоциты	0,32±0,03	0,10±0,01	1,58±0,21	0,68±0,05

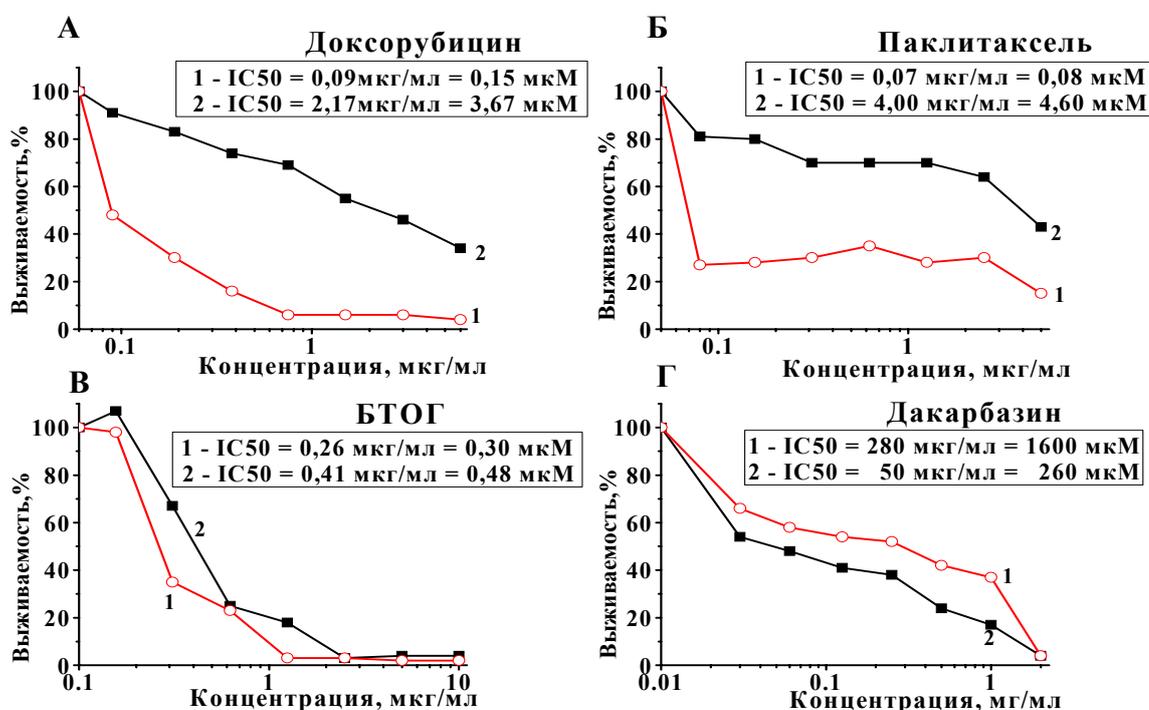


Рис.1. Чувствительность клеток исходной (1) и резистентной MDR1⁺ (2) линии хронической миелогенной лейкемии человека K562 к противоопухолевым препаратам.

в отношении исходных клеток линии K562, так и в отношении резистентных клеток K562^{Adr} с высоким уровнем белка MDR1 (рис.1).

Таким образом, препарат БТОГ обладает высокой противомеланомной активностью и обращает множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток, обусловленную MDR1.

2. Исследование содержания белка MDR1 в клетках разных линий меланомы человека и его связь с устойчивостью клеток к противоопухолевым препаратам.

Данные, полученные при исследовании содержания белка MDR1 на поверхностной мембране клеток, позволили разделить изученные линии на две группы: с фенотипом MDR1⁻ и MDR1⁺. Группу MDR1⁻ составили клетки 6 из 10 линий, в которых присутствовало от 0,2 до 3,3% MDR1⁺ клеток с очень низким содержанием этого белка. Группу MDR1⁺ составили 4 из 10 линий клеток, в которых доля MDR1⁺ клеток составляла от 17,8 до 72,5% с высоким содержанием белка MDR1. Значение MFI для клеток этих линий меланомы составляло от 2,3 до 9,0 усл. ед. Результаты исследования чувствительности линий меланом человека с фенотипом MDR1⁻ и MDR1⁺ к различным противоопухолевым препаратам представлены в таблице 2.

Таблица 2. Чувствительность MDR1⁻ и MDR1⁺ линий меланом человека к различным противоопухолевым препаратам.

Название препарата	IC50, мкМ	
	MDR1 ⁻ Bro-B19, MS, Mel-5 - 7, -10	MDR1 ⁺ Mel-3, -4, -8, -9
Дакарбазин	1460±950	1150±600
Доксорубицин	0,24±0,09	2,65±1,01*
БТОГ	1,32±0,49	1,54±0,90

* $p < 0,005$

Полученные результаты свидетельствуют о том, что цитотоксическое действие дакарбазина и препарата БТОГ не зависит от присутствия MDR1 на клеточной мембране меланом. По данным табл.1 можно заключить, что MDR1⁺ линии меланом были более устойчивы и к паклитакселю, но чувствительность отдельных линий клеток к паклитакселю сильно

варьировала, что не позволило использовать средние значения IC50 для сравнения чувствительности MDR1⁻ и MDR1⁺ линий.

Присутствие даже небольшой доли MDR1⁺-клеток среди клеток меланом отдельных линий свидетельствует о том, что при химиотерапии препаратами аналогичными доксорубину существует высокая вероятность быстрого развития множественной лекарственной устойчивости меланом и что природная устойчивость клеток меланом различных линий к химиотерапевтическим препаратам обусловлена иными механизмами, не связанными с функционированием белка MDR1.

3. Исследование накопления родамина-123 и скорости его выхода из клеток меланом человека с фенотипом MDR1⁻ и MDR1⁺.

Накопление Rho-123 клетками меланом разных линий и скорости его выхода для оценки функциональной активности белков-транспортеров исследовали с использованием проточной цитофлуориметрии. Для регистрации накопления Rho-123 флуоресценцию измеряли одновременно в зеленой (525 нм) и красной (620 нм) области спектра (рис.2А, Б) или только в зеленой области (рис.2В, Г). При изучении клеток меланом человека разных линий оказалось, что все проанализированные линии содержали как клетки, активно накапливающие Rho-123, так и клетки, не накапливающие Rho-123 и образующие по этому признаку побочную популяцию – side population – SP (рис.2, табл.3, 4).

Клетки разных линий значительно отличались по способности накапливать Rho-123 (табл.3). Накопление красителя клетками MDR1⁻ было достоверно и существенно более высоким, чем накопление Rho-123 клетками MDR1⁺, что свидетельствует об активном участии белка MDR1 в выбросе красителя из таких клеток. Обработка клеток ингибитором белка MDR1 верапамилем приводила к классическому увеличению накопления красителя только в линии Mel-8 с высоким уровнем MDR1. В остальных линиях клеток воздействие VP вызывало даже снижение накопления Rho-123 (табл.3).

Для анализа скорости выхода Rho-123 клетки после инкубации с красителем отмывали и инкубировали в растворе Хенкса в присутствии и без

VP в течение 60 мин и измеряли интенсивность флуоресценции клеток.

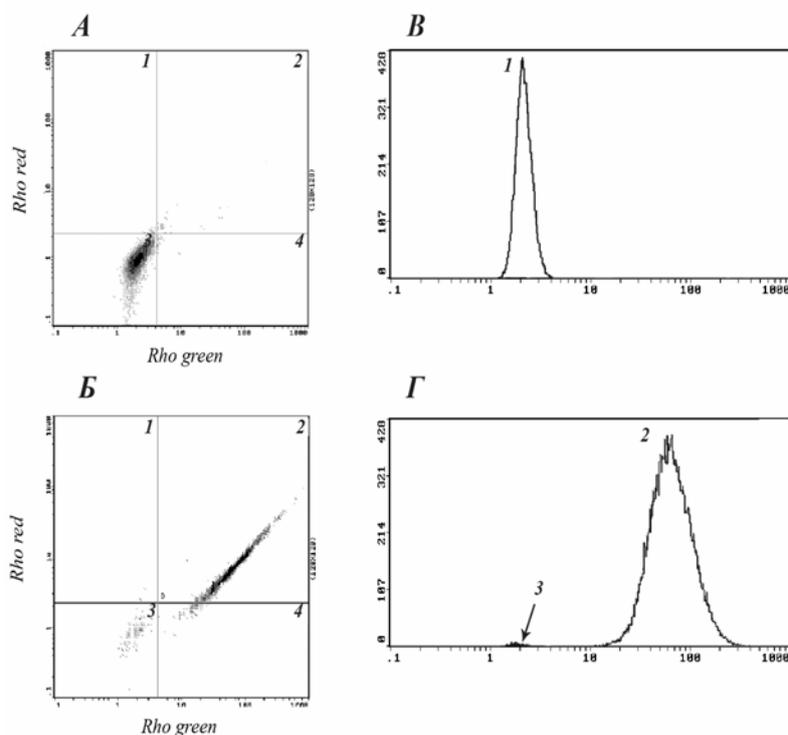


Рис.2. Исследование накопления Rho-123 клетками меланомы человека линии Bro-B19 с помощью проточной цитофлуориметрии при анализе флуоресценции в красной и в зеленой области спектра (А, Б) или только в зеленой области (В, Г). А, В - аутофлуоресценция клеток, Б, Г – флуоресценция клеток после инкубации с Rho-123. А, Б - по оси абсцисс интенсивность зеленой флуоресценции, по оси ординат – красной флуоресценции, усл.ед; В, Г – по оси абсцисс – интенсивность зеленой флуоресценции, усл.ед, по оси ординат – количество клеток, усл.ед., 1 – аутофлуоресценция клеток, 2 – клетки, накапливающие Rho-123, 3 - клетки, не накапливающие Rho-123 (SP).

Таблица 3. Накопление Rho-123 клетками различных линий меланомы человека без и в присутствии ингибитора активности MDR1 верапамила (VP). Приведены средние значения трех независимых экспериментов или данные отдельных экспериментов. MFI – средняя интенсивность флуоресценции окрашенных Rho-123 клеток.

Линия клеток	Фенотип MDR1	MFI, усл. ед.	
		Без VP	В присутствии VP
Bro-B19	MDR1 ⁻	69,6±19,4	27,3±2,0
MS		28,4	21,5
Mel-5		90,8	79,7
Mel-10		61,6±13,5	39,3±4,1
Mel-8	MDR1 ⁺	4,5±0,1*	18,4±6,0**

* $p < 0,005$ для клеток линий с фенотипом MDR1⁺ и MDR1⁻;

** $p < 0,005$ для клеток одной линии без и с верапамилом.

Показано, что клетки меланом различных линий существенно различались по способности выбрасывать Rho-123 и по чувствительности этого процесса к VP. Так скорость выхода составила 3,5; 20,4; 22,0; 39,0 и 19,4 % от исходного уровня Rho-123 за час, а степень ингибирования выхода

Rho-123 в присутствии VP составила 60,0; 50,1; 61,8; 78,7 и 27,3% для линий Bro-B19, MS, Mel-5, Mel-8 и Mel-10, соответственно.

Белок MDR1 в линиях с фенотипом MDR1⁻ может присутствовать в следовых количествах, но, как следует из данных по накоплению Rho-123 в присутствии VP (табл.3), VP не влияет на накопление красителя в таких клетках. В то же время, как сказано выше, VP ингибировал выход Rho-123 из клеток меланом всех MDR1⁻ линий. Это позволяет предположить, что в клетках меланом присутствует другой транспортер, способный активно выводить Rho-123 из клеток, и также как MDR1 чувствительный к VP.

Для определения вклада в устойчивость клеток меланомы с фенотипом MDR1⁻ процессов, чувствительных к VP, на примере линии Mel-10 исследовали чувствительность клеток данной линии к противоопухолевым препаратам в присутствии VP.

Обнаружено, что в присутствии VP чувствительность клеток повышается ко всем исследованным препаратам. В случае совместного действия доксорубина и VP чувствительность возрастает почти в 4 раза (IC₅₀ снижается с 0,3 до 0,08 мкМ); в случае дакарбазина – почти в 3 раза (IC₅₀ снижается с 2,0 до 0,7 мМ) и в 1,5 раза при действии БТОГ (IC₅₀ снижается с 3,0 до 2,1 мкМ).

В предыдущих экспериментах было показано (табл.2), что цитотоксическое действие препаратов дакарбазин и БТОГ не зависит от присутствия белка MDR1. Однако, полученные данные по сенсibiliзирующему действию VP для этих препаратов в линии с фенотипом MDR1⁻, подтверждают предположение о присутствии в клетках меланомы линии Mel-10 другого переносчика, отличного от MDR1, но также чувствительного к специфическому для MDR1 ингибитору VP. Для такого переносчика(ов), по-видимому, субстратом является не только доксорубин, но и дакарбазин и этот переносчик также обуславливает устойчивость клеток не только к доксорубину, но и к дакарбазину.

Величина SP в разных линиях колебалась от 0,9% (Mel-10) до 2,7% (MS), а в линии Mel-8 достигала 65,1% (табл.4). При анализе влияния VP на размер

SP оказалось, что ее снижение в присутствии ингибитора обнаруживается только для клеток линии Mel-8 с высоким уровнем белка MDR1. Полученные результаты позволяют однозначно считать, что если белок MDR1 присутствует в значительном количестве на плазматической мембране клеток, то он имеет определяющее значение в формировании SP, как в случае линии Mel-8. После ингибирования MDR1 верапамилом в этой линии SP сохраняется, но ее размер снижается в среднем до 4%, что свидетельствует о присутствии и участии в формировании SP и других транспортеров, отличных от MDR1. В остальных исследованных линиях размер SP не зависел от присутствия MDR1, т.к. обработка VP клеток других линий меланомы с фенотипом MDR1⁻ не влияла на размер SP (табл.4).

Чтобы оценить влияние на размер SP обработки клеток меланомы противоопухолевыми препаратами, были поставлены эксперименты с клетками линий MDR1⁻ и MDR1⁺, которые обрабатывали препаратами в концентрации IC50 и через 72 часа исследовали размер SP.

Таблица 4. Размер SP в различных линиях меланомы человека после инкубации с Rho-123 без и в присутствии ингибитора активности MDR1 верапамила (VP).

Линия клеток	Фенотип MDR1	Доля неокрашенных клеток (SP), %	
		Без VP	В присутствии VP
Bro-B19	MDR1 ⁻	1,5±0,6	2,5±0,3
MS		2,7±0,2	2,3±0,3
Mel-5		2,0±1,2 0,5 [•]	- 0,6 [•]
Mel-10		0,9±0,3	0,9±0,5
Mel-8	MDR1 ⁺	65,1±4,0	4,1±1,1*

*- $p < 0,005$ при действии VP; • - данные одного эксперимента.

Показано, что в MDR1⁻ клетках в указанных условиях наблюдали увеличение SP при действии доксорубина во всех трех исследованных линиях, а при действии дакарбазина - только в двух, а в линии Mel-10 наблюдали снижение размера SP (рис.3А).

В клетках линии Mel-8 MDR1⁺, как следует из рис.3Б, ни один из двух

исследованных препаратов не снижал размер SP, более того, при действии всех препаратов отмечено увеличение размера SP. При измерении SP в обработанных доксорубицином клетках линии Mel-8 в присутствии VP обнаружено, что размер SP возрастал с 2,7% в контроле до 50,1%. При измерении SP в тех же условиях после действия дакарбазина наблюдали снижение размера SP по сравнению с размером SP контрольных клеток, обработанных VP, с 2,7 до 1,5%. Полученные результаты свидетельствуют о том, что после обработки клеток доксорубицином, но не дакарбазином, в составе SP возрастает доля клеток, устойчивых к действию VP, что может быть связано с индукцией в этих условиях других ABC-транспортеров, отличных от MDR1.

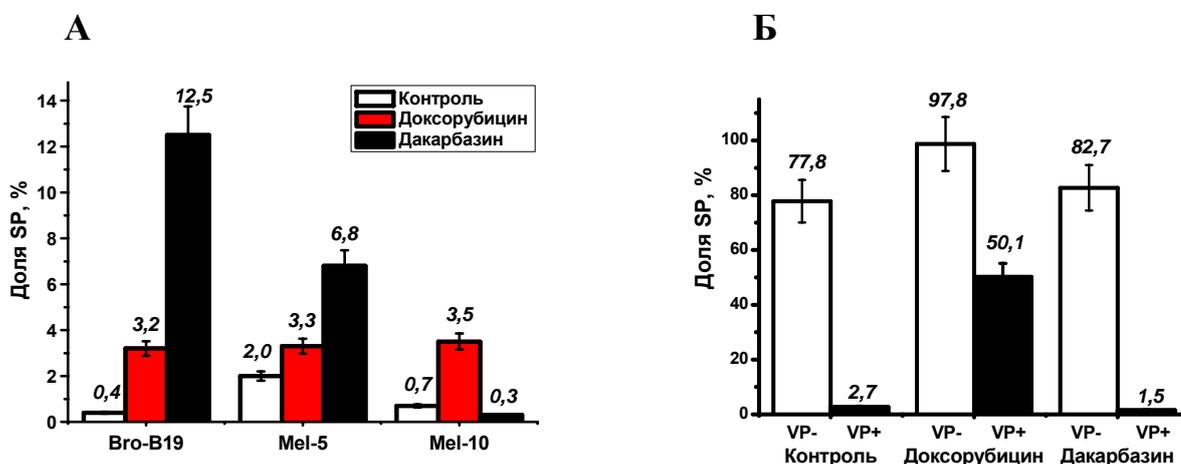


Рис.3. Содержание SP в линиях меланомы человека с фенотипом MDR1⁻ (А) и в линии Mel-8 с фенотипом MDR1⁺ (Б) через 72 часа после обработки противоопухолевыми препаратами в концентрации IC50. Размер SP исследовали: А - без VP, Б – без VP (VP-) и в присутствии VP (VP+).

Таким образом, все исследованные линии меланом человека содержат SP, размер которой составляет в линиях MDR1⁻ от 0,9 до 2,7% и не изменяется при исследовании накопления Rho-123 в присутствии ингибитора активности белка MDR1 верапамила. Формирование SP в этих клетках определяется транспортерами, отличными от MDR1. При высоком содержании и активности этого белка размер SP может достигать 65% (Mel-8).

Присутствие в меланомах фракции высоко резистентных клеток, образующих SP, свидетельствует о том, что именно они могут сохраняться при химиотерапии и определять рецидивирование опухоли и развитие

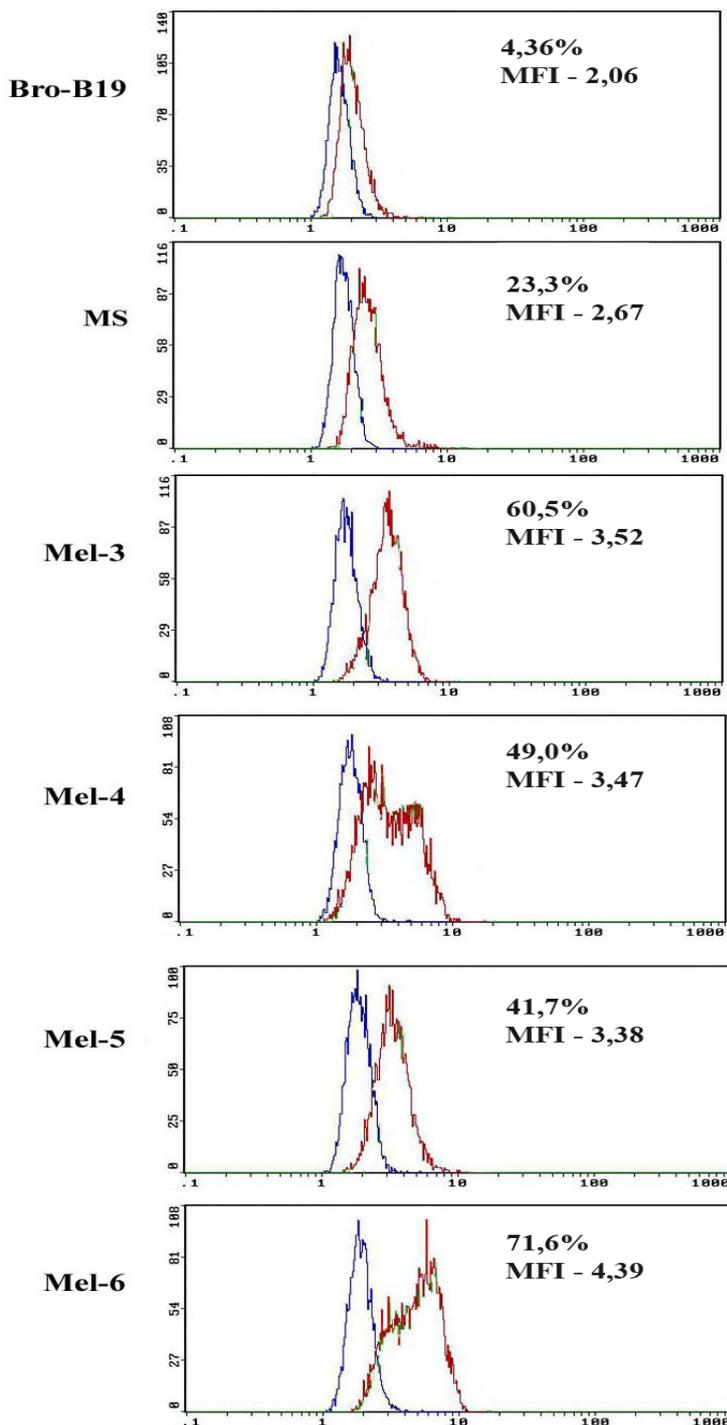
множественной лекарственной устойчивости благодаря высокой активности как белка MDR1, так и белков-транспортеров, отличных от MDR1, природу которых предстоит выяснить.

4. Содержание белка Hsp70 в клетках меланомы человека как фактор устойчивости к противоопухолевым препаратам.

В клетках меланомы человека различных линий исследовали содержание белка Hsp70 в стандартных условиях (Hsp70) и после индукции при тепловом стрессе при прогревании до +42⁰С в течение 1 часа и последующего культивирования в стандартных условиях (Hsp70_t). На рис.4 приведены гистограммы интенсивности флуоресценции клеток меланомы различных линий после внутриклеточного иммунофлуоресцентного окрашивания Hsp70 ФИТЦ-мечеными МкАт. Из приведенных данных видно, что белок Hsp70 был обнаружен во всех линиях меланом, но содержание этого белка значительно варьировало в клетках различных линий. Необходимо отметить, что среди клеток некоторых линий (Mel-4, Mel-6) обнаруживается высокая гетерогенность клеток по содержанию Hsp70.

Динамика изменения уровня Hsp70_t после воздействия теплового шока отличалась в клетках меланом различных линий: у линий с низким исходным уровнем Hsp70 (MS и Bro-B19) уровень Hsp70_t возрастал только через 24 часа после теплового шока. В клетках линии Mel-6 с наиболее высоким исходным уровнем Hsp70 уровень Hsp70_t незначительно повышался через 5 часов и возвращался к исходному значению через 24 часа. Высокое содержание этого белка в клетках меланомы человека может быть отражением стрессового состояния этих клеток. Действительно, при индукции Hsp70 с помощью теплового шока дополнительное повышение его содержания было незначительным. Для оценки вклада Hsp70 в развитие устойчивости клеток меланомы человека анализировали связь между содержанием Hsp70 и чувствительностью опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам. При анализе корреляции устойчивости клеток меланомы к препаратам паклитаксель, доксорубицин, БТОГ и дакарбазин с уровнем Hsp70 обнаружена прямая корреляция между

устойчивостью клеток меланомы человека к дакарбазину ($R=0,77$), паклитакселю ($R=0,83$) и БТОГ ($R=0,89$). В случае паклитакселя и БТОГ



корреляция была статистически значимой ($p<0,05$). Корреляции между уровнем Hsp70 и устойчивостью клеток меланомы к доксорубину не выявлено, но клетки с низким содержанием Hsp70 (линии Bro-B19 и MS) были достоверно более чувствительны к доксорубину, чем линии с его высоким содержанием.

Рис.4. Hsp70 в клетках меланом при внутриклеточном окрашивании ФИТЦ-меченными антителами к Hsp70.

Левый пик – аутофлуоресценция клеток; правый – флуоресценция при внутриклеточном окрашивании. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, усл.ед.; по оси ординат – количество клеток, усл.ед.

Полученные результаты позволяют заключить, что уровень Hsp70 в клетках меланомы вносит значительный вклад в их устойчивость к противоопухолевым препаратам.

5. Исследование содержания белков Fas и FasL в клетках меланомы человека различных линий: связь с чувствительностью к противоопухолевым препаратам и к действию ЦТЛ.

При исследовании содержания белков Fas и FasL с помощью иммуноцитохимического анализа выявлены значительные различия в содержании этих белков в клетках различных линий меланомы человека. В двух линиях - Bro-B19 и Mel-4 - обнаружено отсутствие белка Fas, в трех линиях его содержание было низким, в четырех – высоким. Белок Fas обнаруживался в цитоплазме и на мембране клеток. FasL обнаружен во всех исследованных линиях, кроме Mel-7. В четырех линиях обнаружен высокий уровень белка FasL. FasL был выявлен на мембране и в перинуклеарной области клеток. В линиях Mel-5, Mel-8 и Mel-9 при этом одновременно отмечено присутствие и FasL и Fas, что позволяет предполагать существование дефектов в системе проведения сигнала индукции апоптоза через рецептор Fas в этих линиях, и, следовательно, устойчивость таких клеток к Fas-зависимому апоптозу.

При сравнении чувствительности клеток меланом к противоопухолевым препаратам с уровнем белков Fas и FasL статистически значимой связи между этими показателями не обнаружено.

Для исследования роли белка Fas в чувствительности клеток меланомы человека к действию меланомаспецифических ЦТЛ использовали ЦТЛ, индуцированные с помощью ДК. Для нагрузки ДК опухолеспецифическими антигенами их инкубировали либо с лизатом клеток меланомы-мишени, либо со смесью лизатов нескольких меланом для использования одинаковых для всех линий опухолеспецифических антигенов. В этих экспериментах были использованы три линии клеток меланомы человека: MS и Mel-5 - Fas⁺ линии и Bro-B19 - Fas⁻ линия. Результаты этих экспериментов, представленные на рис.5, свидетельствуют, о том, что исследованные клетки меланом различаются по чувствительности к ЦТЛ: высоко устойчивой оказалась линия Bro-B19, а чувствительными - линии MS и Mel-5. При этом линия Bro-B19 была устойчива к действию ЦТЛ, индуцированных при нагрузке ДК как

лизатом клеток линии Bro-B19, так и смесью лизатов трех меланом, т. е. при использовании общих антигенов для всех линий. Высокая устойчивость клеток Fas⁻ линии Bro-B19 к действию меланомаспецифических ЦТЛ, подтверждает важную роль Fas-зависимого пути индукции апоптоза опухолевых клеток под действием ЦТЛ. Отсутствие этого белка в клетках меланомы может быть причиной их устойчивости к индукции апоптоза. Приводить к устойчивости к действию ЦТЛ могут и дефекты в системе проведения сигнала индукции апоптоза, предполагаемые в клетках меланомы из-за одновременного присутствия белков Fas и FasL.

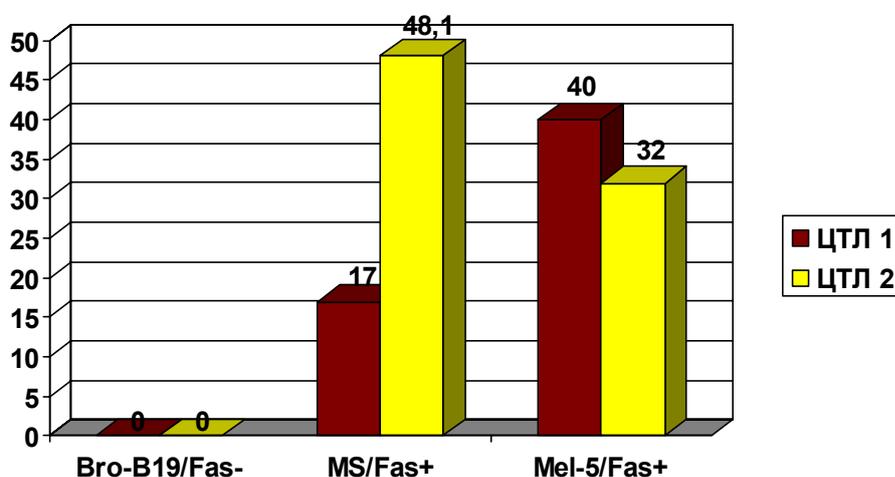


Рис.5. Чувствительность клеток Fas⁻ и Fas⁺ меланомы человека к меланомаспецифическим ЦТЛ, индуцированным ДК, нагруженными лизатами клеток меланомы-мишени (ЦТЛ 1) или смесью лизатов меланом (ЦТЛ 2).

Таким образом, в клетках меланомы различных линий содержание белков Fas и FasL не может служить маркером устойчивости этих клеток к действию противоопухолевых препаратов. В тоже время как отсутствие белка Fas, так и высокий уровень белка FasL свидетельствуют об устойчивости таких опухолевых клеток к действию опухолеспецифических ЦТЛ, а, следовательно, и об устойчивости таких опухолей ко многим методам клеточной иммунотерапии.

7. Исследование влияния рекомбинантного белка MIS человека на выживаемость клеток меланомы человека и их чувствительность к дакарбазину.

При изучении связывания ФИТЦ-меченного rhMIS с культивируемыми

опухолевыми клетками меланомы различных линий показано, что rhMIS связывается с поверхностной мембраной опухолевых клеток (за исключением линии Mel-8), и что все опухолевые клетки содержат рецептор MIS внутри клеток. Содержание рецепторов MIS на клеточной мембране было пропорционально их количеству в клетке ($r=0,74$, $p=0,05$).

Показано, что выживаемость клеток в присутствии rhMIS снижалась в тех линиях клеток, где этот рецептор обнаруживался на клеточной мембране. Повторное добавление rhMIS к опухолевым клеткам приводило к усилению их гибели. Показано, что однократная обработка клеток линии MS препаратом rhMIS за 30 мин до добавления дакарбазина повышала их чувствительность к действию этого противоопухолевого препарата, и значение IC50 снижалось с 0,61 до 0,40 мМ. Повторная обработка клеток меланомы rhMIS усиливала его сенсibiliзирующее действие: значение IC50 снижалось до 0,24 мМ. Полученные результаты позволяют заключить, что белок rhMIS может служить эффективным модификатором биологического ответа клеток меланомы человека на дакарбазин – наиболее эффективный при этом заболевании противоопухолевый препарат.

ВЫВОДЫ.

1. Обнаружена высокая MDR1-независимая цитотоксическая активность нового препарата N¹,N⁶-бис[2,2,6,6-тетраakis(трифторметил)-3,6-дигидро-2H-1,3,5-оксадиазин-4-ил]-1,6-гександиамин (БТОГ) в отношении клеток меланомы человека.
2. Белок MDR1 определяет природную устойчивость клеток меланомы человека только в отдельных случаях (в 4 из 10 линий) и только к доксорубину, но не к дакарбазину и препарату БТОГ.
3. В клетках меланомы человека с фенотипом MDR1⁻ обнаружено быстрое и чувствительное к верапамилу выведение Rho-123 и сенсibiliзирующее действие верапамила в отношении не только доксорубина, но и дакарбазина и препарата БТОГ.

4. Обнаружено, что все линии меланомы человека содержат значительную фракцию клеток, не включающих Rho-123, размер которой не зависит от действия верапамила (за исключением линий MDR1⁺) и возрастает при действии противоопухолевых препаратов.

5. В клетках меланомы человека обнаружен высокий уровень содержания белка Hsp70, который коррелирует с их устойчивостью к противоопухолевым препаратам.

6. В клетках меланомы человека различных линий обнаружены нарушения в системе Fas/FasL в виде отсутствия белка Fas и/или высокого уровня белка FasL. При отсутствии Fas обнаружена устойчивость клеток к действию опухолеспецифических ЦТЛ.

7. Белок rhMIS обладает антипролиферативной активностью в отношении клеток меланомы человека, имеющих рецепторы к этому белку, и сенсibiliзирует их к действию дакарбазина. Повторная обработка клеток белком rhMIS приводит к усилению его противоопухолевого и сенсibiliзирующего действия.

Рекомендации по практическому использованию результатов диссертации.

1. Целесообразно проведение доклинических испытаний нового препарата БТОГ на животных для изучения возможности его применения в клинической практике в качестве противомеланомного препарата.

2. Рекомендуется проведение доклинических испытаний сенсibiliзирующего действия верапамила при использовании дакарбазина для лечения меланомы.

3. Рекомендуется проведение клинических исследований совместного действия белка rhMIS и дакарбазина для повышения эффективности химиотерапии при меланоме.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Кондрашева И.Г., Филатов А.В., Москалева Е.Ю., Попова О.Н., Северин Е.С., Северин С.Е. Характеристика моноклональных антител UT1 и UT2 к белку Fas и исследование экспрессии белков Fas и FasL и Fas-зависимого апоптоза в опухолевых клетках человека различных линий //Иммунология. - 2004. - Т. 2. – С. 68-72.
2. Кутняк О.В., Кондрашева И.Г., Гукасова Н.В., Кешелава В.В., Корженевский Д.А., Коростелев С.А., Северин С.Е., Северин Е.С. Индукция меланомаспецифических ЦТЛ с помощью дендритных клеток, нагруженных смесью лизатов клеток различных линий меланомы человека//Материалы конференции "Дни иммунологии в Санкт-Петербурге-2004". - Медицинская иммунология. – Санкт-Петербург, 2004. – Т. 6(3-5). - С. 458-459.
3. Кондрашева И.Г., Хомякова А.В., Москалева Е.Ю. Индукция апоптоза лимфоцитов человека при их взаимодействии с опухолевыми клетками *in vitro*//Тезисы II Всемирного конгресса по иммунопатологии и аллергии. - Аллергология и иммунология. – Москва, 2004. – Т. 5, №1. – С. 35.
4. Кутняк О.В., Кондрашева И.Г., Гукасова Н.В., Кешелава В.В., Корженевский Д.А., Коростелев С.А., Северин С.Е., Северин Е.С. Сравнение эффективности индукции меланомаспецифических ЦТЛ с помощью дендритных клеток, нагруженных лизатом сингенных и смесью аллогенных опухолевых клеток//Физиология и патология иммунной системы. – 2005. - №7. - С. 25-31.
5. Кондрашева И.Г., Москалева Е.Ю., Крюкова Л.Ю., Крюков Л.Н., Северин С.Е. Противомеланомная активность полифторсодержащего производного 1,3,5-оксадиазина//Материалы XIV Российского Национального Конгресса "Человек и лекарство". – Москва, 2007. - С. 616.
6. Северин С.Е., Крюкова Л.Ю., Крюков Л.Н., Посыпанова Г.А., Кондрашева И.Г., Москалева Е.Ю., Северин Е.С. Полифторсодержащие производные 1,3,5-оксадиазина как новый класс потенциальных противоопухолевых соединений//Материалы XI Российского Онкологического конгресса. – Москва, 2007. - С. 239-240.

7. Кондрашева И.Г., Гукасова Н.В., Москалева Е.Ю., Попова О.Н., Макаров В.А., Морозова Н.С., Северин С.Е., Северин Е.С. Вклад белка gp170 и белка теплового шока Hsp70 в устойчивость клеток меланомы человека к противоопухолевым препаратам//Материалы XI Российского Онкологического конгресса. – Москва, 2007. - С. 171-172.
8. Родина А.В., Гукасова Н.В., Макаров В.А., Кондрашева И.Г., Хомякова А.В., Попова О.Н., Москалева Е.Ю., Северин С.Е. Антипролиферативная активность ghMIS человека и локализация его рецептора в различных линиях опухолевых клеток человека//Материалы XI Российского Онкологического конгресса. – Москва, 2007. - С. 239.
9. Родина А.В., Гукасова Н.В., Макаров В.А., Кондрашева И.Г., Хомякова А.В., Попова О.Н., Москалева Е.Ю., Северин С.Е. Локализация рецепторов, связывающих MIS, в различных линиях опухолевых клеток человека//Биохимия. – 2008 – Т. 73. - Вып. 7. - С. 989-998.
10. Кондрашева И.Г., Москалева Е.Ю., Крюкова Л.Ю., Крюков Л.Н., Попова О.Н., Северин С.Е., Северин Е.С. Чувствительность клеток меланомы человека к новому полифторсодержащему производному 1,3,5-оксадиазина в сравнении с известными химиотерапевтическими препаратами//Молекулярная медицина. – 2008. - №2. - С. 28-33.