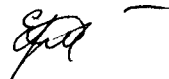


На правах рукописи



Ермакова Наталья Владимировна

**Исследование модификации множественной
лекарственной устойчивости опухолевых клеток**

03.00.04 биохимия

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

Пушино- 2005

Работа выполнена в Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН, г. Пушкино.

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
Корыстов Юрий Николаевич.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
Новоселова Елена Григорьевна,

кандидат биологических наук
Безлепкин Владимир Георгиевич.

Ведущая организация:

Филиал института
биоорганической химии РАН

Защита состоится 26 декабря 2005 г. в 10³⁰ на заседании диссертационного совета Д 002.066.01 при Институте фундаментальных проблем биологии РАН по адресу: 142290, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская 2, ИФПБ РАН.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института фундаментальных проблем биологии РАН.

Автореферат разослан «25» ноября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Г.Н. Назарова.

2006-4
28944

2.258405

Общая характеристика работы

Актуальность темы. Работа посвящена исследованию множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток и возможности ее модификации с помощью ингибиторов транспортных белков и повышения оксигенации опухоли.

Онкологические заболевания стоят на втором месте по причине смертности во всем мире. Химиотерапия онкологических заболеваний часто сталкивается с проблемой множественной лекарственной устойчивости опухолей, при которой опухоль приобретает устойчивость к широкому ряду лекарственных препаратов различной структуры и механизма действия. Одной из причин развития устойчивости служит сверхэкспрессия в опухолевых клетках специфических АТФ-зависимых транспортных белков, откачивающих лекарственные препараты из клетки. Эффективным способом подавления МЛУ является использование ингибиторов транспортных белков; другой способ - подавление экспрессии генов, кодирующих эти белки.

Используемые на данный момент в клинике ингибиторы токсичны по отношению к нормальным клеткам и малоэффективны. Поиск селективных и эффективных ингибиторов транспортных белков является задачей первоочередной важности для химиотерапии.

Вопрос регуляции экспрессии генов транспортных белков слабо освещен в литературе. Есть данные о возможном подавлении множественной лекарственной устойчивости активными формами кислорода, однако эти данные противоречивы.

Цель работы: Целью настоящей работы явилось исследование подавления и регуляции множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток с помощью ингибиторов транспортных белков и путем изменения уровня активных форм кислорода в опухолевых клетках.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. Изучить влияние авермектинов на множественную лекарственную устойчивость клеток лимфолейкоза P388 и штамма P388BP, устойчивого к винкристину.
2. Изучить влияние авермектинов на множественную лекарственную устойчивость клеток рака гортани человека HEP-2 и штамма HEP-2TP, устойчивого к таксолу.
3. Оценить противоопухолевые эффекты авермектинов *in vivo*.
4. Исследовать возможность усиления противоопухолевых эффектов винкристина авермектинами *in vivo*.
5. Изучить зависимость множественной лекарственной устойчивости клеток P388BP от срока роста опухоли.
6. Оценить изменение уровня активных форм кислорода по мере роста опухолей P388BP.
7. Определить влияние увеличения оксигенации опухолей P388BP с помощью гипероксии и перфторана на множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток.



Научная новизна работы. Данные об активности природных макролактонов - авермектинов в отношении множественной лекарственной устойчивости в литературе отсутствуют. Впервые показано, что авермектины подавляют множественную лекарственную устойчивость клеток лимфолейкоза Р388 и штамма Р388ВР, устойчивого к винкристину, и опухолевых клеток НЕР-2 и штамма НЕР-2ТР, устойчивого к таксолу. Также впервые исследовано действие авермектинов на рост опухолей *in vivo* и на противоопухолевый эффект винкристина *in vivo*. Показано, что авермектины существенно замедляют рост опухолей и усиливают противоопухолевый эффект винкристина в малых концентрациях.

Впервые показано, что множественная лекарственная устойчивость асцитной опухоли лимфолейкоза Р388ВР, устойчивой к винкристину, увеличивается по мере роста опухоли вследствие уменьшения в ней активных форм кислорода. Введение перфторана увеличивает концентрацию активных форм кислорода в опухоли, замедляет её рост и снижает множественную лекарственную устойчивость.

Практическая значимость работы. Полученные данные могут послужить основой для повышения эффективности химиотерапии злокачественных заболеваний.

Апробация работы и публикации. Материалы диссертации были представлены на VII, VIII и IX международных конференциях молодых ученых «Биология- наука XXI века» (г. Пушкино, 2003, 2004 и 2005 гг); на Международном Биофизическом Конгрессе (15th IUPAB, 5th EBSA International Biophysics Congress, Montpellier, France, 2005).

По материалам работы опубликовано 9 печатных работ в рецензируемых журналах, из них 7 статей в отечественных журналах и 2 статьи в зарубежных журналах.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена на 120 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Список цитированной литературы состоит из 184 источников. Диссертация содержит 25 рисунков и 4 таблицы.

Обзор литературы. Обзор литературы состоит из 2 разделов. Первый раздел посвящен механизмам множественной лекарственной устойчивости, описаны клеточные и неклеточные механизмы, рассмотрена роль транспортных белков. Рассмотрены известные литературные данные об ингибиторах транспортных белков. Во втором разделе описывается регуляция множественной лекарственной устойчивости. Уделяется внимание противоречивости данных о роли сигнальных систем клетки и активных форм кислорода в регуляции устойчивости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Объекты исследования. Объектом исследования являлись клетки лимфолейкоза Р388, клетки карциномы Эрлиха и клетки рака гортани человека НЕР-2. Был получен устойчивый к

винкристину штамм клеток P388BP, также был получен устойчивый к таксолу штамм клеток Нер-2ТР.

2. Определение экспрессии П-гликопротеина. Экспрессию П-гликопротеина в клетках P388BP проверяли с помощью полимеразной цепной реакции (Schneider et al., 2001; Takara et al., 2003; Baran et al., 2005). Тотальную мРНК выделяли с помощью гуанидин тиоционат содержащего раствора и последующей фенол-хлороформной экстракции. Обратную транскрипцию проводили, используя олиго- dT ("Fermentas", США), ПЦР проводили с помощью набора PCR Master Mix ("Fermentas", США), амплифицировали на амплификаторе "Терпик" ("ДНК-технология", Россия).

3. Определение чувствительности опухолевых клеток к различным агентам по критериям выживаемости клеток и повреждению ядер в опытах in vitro. Авермектины были получены, очищены и предоставлены фирмой "Фармбиомед", Москва. Использовали препараты авермектинов А1, А2, В1, В2 и комплекс авермектинов аверсектин С и аверсект 3. В экспериментах также использовали: циклоспорин А ("Sigma", США), цисплатину (цисплатина(II) диамин дигидрохлорид, "Sigma", США); перекись водорода (Россия). Винкристин ("Gedeon Richter", Венгрия) разводили в физиологическом растворе с добавлением 0.9% бензилового спирта. Перед инкубацией in vitro к клеткам добавляли исследуемые агенты. Гибель клеток P388 и P388BP определяли по уменьшению их количества (лизис) и прокраске 0.04%- ным раствором трипанового синего ("Serva", Германия). Повреждение ядер оценивали по конденсации (лихноз) и фрагментации (апоптоз) хроматина. Гибель клеток Нер-2 и Нер-2ТР регистрировали по уменьшению их количества, определяемого окрашиванием 0.02% фиолетовым кристаллическим ("Sigma", США) и измерению оптической плотности на спектрофотометре Multiscan Plus.

4. Определение чувствительности опухолей к различным агентам in vivo. Влияние агентов на рост опухолей определяли по изменению их размеров (для солидных опухолей) и количества клеток (для асцитных опухолей) по сравнению с контролем. Объем солидных опухолей определяли по формуле: $V = (axb^2)/2$, где а- максимальный, b- минимальный размеры опухоли. По соотношению средних объемов опухолей в контрольных и опытных группах определяли торможение роста: $TPO = (V_k - V_o)/V_k \times 100\%$, где V_k и V_o – средние объемы опухолей в контрольных и опытных группах соответственно.

5. Определение МЛУ в клетках лимфолейкоза P388 и P388BP. МЛУ клеток P388 и P388BP определяли по изменению скорости образования кальцеина в клетках из ацетоксиметилового эфира кальцеина при действии известного ингибитора МЛУ – циклоспорина А. За основу была взята методика Homolya (Homolya et al., 1993), отработанная нами для клеток P388 (Ермакова и др., 2004). Клетки выделяли, отмывали, помещали в кювету и определяли базовый уровень флуоресценции. Затем в кювету помещали 2 мкМ Co^{2+} (Essodaigui et al., 1998). Кинетику образования кальцеина в клетках регистрировали после добавления к клеткам 100 нМ кальцеина-АМ ("Molecular Probes", США) при постоянном перемешивании

на спектрофлуориметре Perkin-Elmer MF44, длины волн возбуждения и эмиссии 493 и 515 нм, соответственно. Для определения скорости образования кальцеина при ингибировании активного транспорта кальцеина-АМ из клеток в кювету добавляли 1 мкг/мл циклоспорина А (“Sigma”, США).

МЛТУ также определяли по накоплению в клетках кальцеина за определённый срок инкубации в среде. Клетки выделяли, отмывали, инкубировали с добавлением агентов, затем добавляли кальцеин-АМ. Через 10 мин клетки собирали, осаждали, осадок суспендировали в среде без фенолового красного с пониженным содержанием кальция (“Sigma”, США). Количество кальцеина в клетках определяли по интенсивности его флуоресценции на спектрофлуориметре Perkin-Elmer MF44, длины волн возбуждения и эмиссии 493 и 515 нм, соответственно.

6. Определение МЛТУ в клетках рака гортани человека HEP-2. МЛТУ клеток рака гортани человека HEP-2 определяли по скорости выхода из клеток родамина 123 (R123) (“ICN”, США) (Wielinga et al., 2000). Клетки HEP-2 высевали на стеклянные пластинки, инкубировали в CO₂ инкубаторе. Через сутки инкубации клетки отмывали и нагружали их R123 в присутствии циклоспорина А. Пластинку с клетками ставили в кювету в раствор Хэнкса с 0.5% сыворотки, 37°C, и определяли увеличение количества R123 в среде при постоянном перемешивании. Через 4 мин добавляли ингибиторы в необходимой концентрации. Количество всего R123 в клетках определяли добавлением в кювету 0,02% дигитонина (“Sigma”, США). Относительное количество R123 в клетках (N) определяли по формуле: $N = 1 - \{(I_t - I_0) / (I_{max} - I_0)\}$, где I_t , I_0 , I_{max} – флуоресценция R123 в среде в моменты времени t , 0 и максимальная, после добавления дигитонина, соответственно. Затем определяется отношение скоростей выхода родамина 123 в контроле и после добавления ингибитора, R-1. Это соотношение минус единица характеризует МЛТУ.

7. Определение активных форм кислорода в клетках лимфолейкоза P388 и P388BP Относительную концентрацию активных форм кислорода (АФК) в клетках опухоли определяли по интенсивности флуоресценции 2',7'-дихлорфлуоресцеина (ДХФ) по методу (Bass et al., 1983; Tan et al., 1998). За 30 мин до забоя всем мышам внутрибрюшинно вводили 2',7'-дихлорфлуоресцин диацетат (ДХФ-ДА), 0.36 мг/мышь. После забоя мышей опухолевые клетки извлекали, помещали 1 млн. клеток в раствор Хэнкса с 0.5% сыворотки, 37°C, и измеряли интенсивность флуоресценции при постоянном перемешивании на спектрофлуориметре Perkin-Elmer MF44 при длинах волн возбуждения и эмиссии 475 и 525 нм, соответственно.

8. Введение перфторана и создание условий гипероксии. Для увеличения концентрации кислорода в клетках опухоли мышей помещали на 1.5 час в камеру, содержащую 95% O₂ и 5% CO₂ — гипероксия или за 1.5 час до забоя внутрибрюшинно вводили 0.5 мл перфторана (аптечный препарат).

9. Статистическая обработка результатов. Для опытов, выполненных в трех и более повторностях, определяли средние арифметические значения и стандартные отклонения. Различия между группами считали достоверными при $p < 0.05$ при расчете с использованием t -критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Часть 1. Авермектины — новый класс ингибиторов множественной лекарственной устойчивости

Один из способов подавления множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) - подбор эффективных ингибиторов транспортных белков. Существующие на данный момент ингибиторы не снимают МЛУ полностью при клинически достижимых концентрациях (Fisher, Sikis, 1995). Авермектины - соединения макролидной природы, продукты жизнедеятельности *Streptomyces avermitilis*, применяются в ветеринарии и клинике человека как противопаразитарные препараты. Есть единичные данные об ингибировании П-гликопротеина синтетическим аналогом авермектина В1 - ивермектином. В настоящей работе впервые изучено влияние отдельных природных авермектинов и их комплексов на множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток.

1.1. Влияние авермектинов на МЛУ клеток лимфолейкоза P388 и P388BP.

1.1.1. Оценка МЛУ штамма клеток лимфолейкоза P388BP, устойчивого к винкристину.

Известно, что обработка популяции клеток противоопухолевыми препаратами приводит к отбору устойчивых клеток, выживающих при больших дозах агентов. Нами был получен штамм клеток лимфолейкоза P388BP, устойчивый к винкристину. Для клеток дикого типа концентрация винкрестина, вызывающая гибель 50% клеток, IC50, составляет 14 нМ. После введения винкрестина устойчивость клеток возрастает с каждым пассажем: IC50 для клеток после второго, четвертого и шестого введения винкрестина составляет 160, 350 и 1624 нМ, соответственно. Также было показано, что штамм после шестого введения винкрестина более устойчив к агенту, чем дикий тип, по критерию повреждения ядер (Korystov et al., 2004). Штамм после шестого введения винкрестина был обозначен как P388BP.

Штамм P388BP также обладал устойчивостью к рубомицину: IC50 клеток P388 составляет 347 нМ, а клеток P388BP 3540 нМ.

Мы исследовали влияние цисплатины и перекиси водорода, не являющихся субстратами транспортных белков, на устойчивые клетки лимфолейкоза P388BP. Было показано, что чувствительность штамма P388BP к этим агентам такая же, как у родительской линии P388. Это позволяет сделать вывод, что устойчивость нашего штамма клеток лимфолейкоза к винкристину обусловлена повышением экспрессии транспортных белков.

Экспрессию П-гликопротеина в клетках P388BP проверяли с помощью полимеразной цепной реакции (Schneider et al., 2001; Takara et al., 2003; Vagan et al., 2005). Показано, что уровень экспрессии гена *mdr1* в клетках P388 дикого типа меньше, чем в клетках P388BP (рис.1).

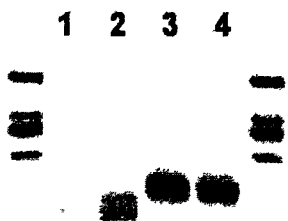


Рис.1. Электрофореграмма результатов ПЦР-анализа экспрессии гена *mdr1* в клетках P388 и P388BP. 1- *mdr1* в клетках P388, 2- *mdr1* в клетках P388BP, 3- β -актин в клетках P388, 4- β -актин в клетках P388BP.

1.1.2. Модификация противоопухолевого эффекта винкристина на клетках P388 и P388BP авермектинами.

Авермектины A1, A2, B1 и B2 не влияли на выживаемость клеток до концентрации 1000 нМ включительно. При исследовании влияния авермектинов на транспорт и чувствительность клеток к другим агентам их использовали в нетоксичных концентрациях.

Показано, что авермектин B1 в концентрации 300 нМ снижает IC₅₀ винкристина для клеток P388 с 14 нМ до 11 нМ (в 1.3 раза), для клеток P388BP с 1624 нМ до 32 нМ (в 51 раз) (рис. 2а и 2б).

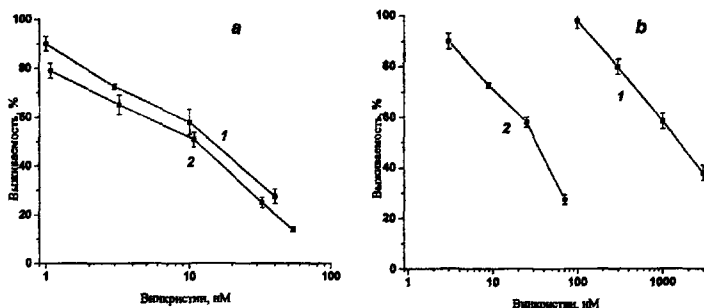


Рис. 2. Влияние винкристина (1) и винкристина в сочетании с авермектином B1, 300 нМ (2) на выживаемость клеток P388 (а) и P388BP (б).

Было изучено влияние различных природных авермектинов на выживаемость клеток P388BP, обработанных нетоксичной для устойчивых клеток концентрацией винкристина, 100 нМ. Из рис. 3 видно, что модифицирующие концентрации авермектинов, увеличивающие чувствительность к винкрестину на 50% (MC₅₀), составляют 15, 59, 74, 209, 460 и 107 нМ для авермектинов A1, A2, B2, B1, ивермектина и циклоспорина А,

соответственно. Наиболее эффективным для клосток Р388ВР оказался авермектин А1, он в 7 раз активнее циклоспорины А, а наименее активным - ивермектин.

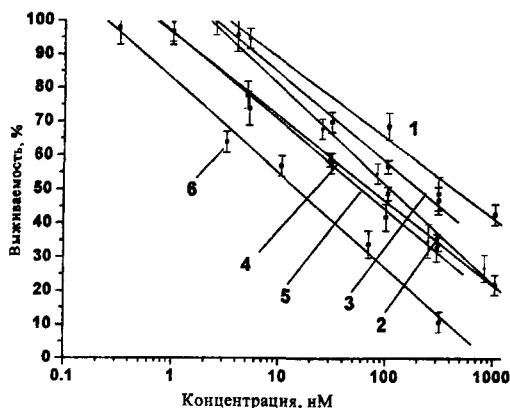


Рис. 3. Влияние ивермектина (1), циклоспорины А (2), авермектинов В1 (3), В2 (4), А2 (5), А1 (6) на выживаемость клеток Р388ВР в присутствии винкристина, 100 нМ.

Также исследовали влияние авермектинов на чувствительность клеток Р388 и Р388ВР к платидиаму. Показано, что авермектин В1 не влияет на действие платидиама. Это подтверждает, что модифицирующий эффект авермектинов связан с ингибированием транспортных белков МЛУ.

1.1.3. Действие авермектинов на активность транспортных белков МЛУ.

С помощью кальцеина-АМ мы исследовали способность природных авермектинов подавлять активность белков МЛУ. Были определены зависимости увеличения кальцеина в клетках Р388ВР от концентрации ингибиторов для всех авермектинов. В таблице 1 представлены концентрации агентов, увеличивающие количество кальцеина в клетках вдвое.

Таблица 1. Концентрации ингибиторов, увеличивающие флуоресценцию кальцеина в клетках Р388ВР в 2 раза (C_2).

Агент	Цик.А	Авер-н А1	Авер-н А2	Авер-н В1	Авер-н В2	Аверсектин С	Ивермек-н
C_2 , нМ	108	210	240	385	104	144	270

Как видно из таблицы, активность авермектинов по подавлению транспорта кальцеина-АМ сопоставима с активностью циклоспорины А, максимальный эффект достигался при обработке клеток авермектином В2.

Таким образом, впервые исследовано действие природных авермектинов на множественную лекарственную устойчивость клеток лимфолейкоза мышей Р388 и

резистентного к винкристину штамма Р388ВР. Обнаружено, что авермектины в нетоксичных концентрациях повышают чувствительность клеток Р388 и Р388ВР к винкристину. Самым эффективным оказались авермектины А1 и А2. Также показано, что авермектины подавляют транспорт флуоресцирующего субстрата транспортных белков кальцеина-АМ.

1.2. Влияние авермектинов на МЛУ клеток рака гортани человека НЕР-2 и НЕР-2ТР.

1.2.1 Оценка МЛУ штамма клеток НЕР-2ТР, устойчивого к таксолу

Был получен штамм клеток рака гортани человека НЕР-2, устойчивый к таксолу. IC50 таксола равна 1.66 нМ для штамма НЕР-2ТР и 0.03 нМ для клеток НЕР-2 (рис. 4). Штамм НЕР-2ТР также обладал устойчивостью к винкристину. IC50 винкристина для этого штамма на порядок выше, чем для чувствительных клеток: IC50 для НЕР-2ТР равно 151 нМ, а для НЕР-2 15.7 нМ (рис. 5).

Таксол, как и винкристин, является субстратом Пгп (Mistry, Stewart, 2001), а приобретенная множественная устойчивость клеток НЕР-2ТР, по-видимому, обусловлена сверхэкспрессией транспортных белков МЛУ.

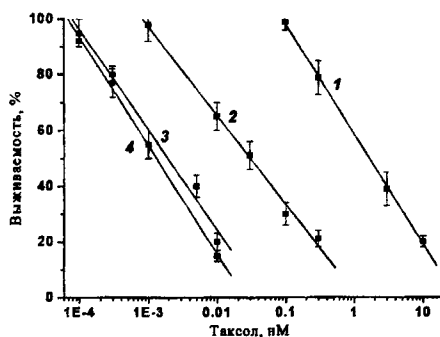


Рис. 4. Влияние таксола на выживаемость клеток НЕР-2 (1), НЕР-2ТР (2), и таксола в сочетании с авермектином В1, 300 нМ, на выживаемость клеток НЕР-2 (3) и НЕР-2ТР (4).

1.2.2 Модификация эффекта противоопухолевых препаратов на клетки НЕР-2 и НЕР-2ТР авермектинами.

Авермектины А1, А2, В1 и В2 не влияли на выживаемость клеток до концентрации 1000 нМ включительно. При исследовании влияния авермектинов на транспорт и чувствительность клеток к другим агентам их использовали в нетоксичных концентрациях.

Было показано, что авермектин В1 в концентрации 300 нМ снижает IC50 таксола для клеток НЕР-2 с 0.03 нМ до 0.002 нМ (в 15 раз), а для НЕР-2ТР с 1.66 нМ до 0.0014 нМ (в 1185 раз) (рис. 4). Клетки дикого типа НЕР-2 также обладают некоторой устойчивостью, которая снимается добавлением авермектинов. Авермектин В1 повышал чувствительность клеток НЕР-2ТР и НЕР-2 также к винкристину. Авермектин В1 300 нМ снижает IC50 винкристина для клеток НЕР-2ТР с 151 нМ до 13 нМ (в 12 раз), а для клеток НЕР-2 с 15.7 нМ до 4.3 нМ (в 3.6 раза) (рис. 5).

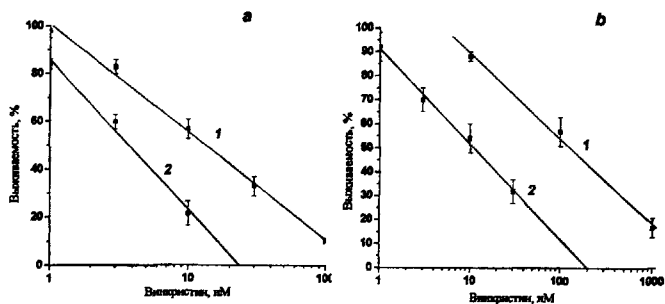


Рис. 5. Влияние винкристина (1) и винкристина в сочетании с авермектином В1, 300 нМ, (2) на выживаемость клеток НЕР-2 (а) и НЕР-2ТР (б).

Сравнивали действие разных авермектинов на модификацию выживаемости клеток НЕР-2, подвергнутых воздействию таксола, 0.005 нМ, выживаемость при этой концентрации была принята за 100%. Как следует из рис. 6 концентрации агентов, модифицирующих выживаемость на 50% (МС50), составляют 35, 59, 107 и 200 нМ для А2, А1, В2, В1, соответственно. Следовательно, авермектины группы А более эффективны в подавлении устойчивости клеток НЕР-2ТР к противоопухолевым препаратам.

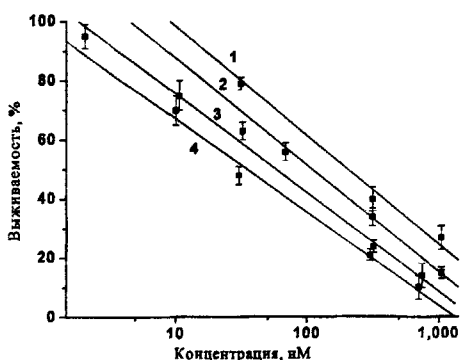


Рис. 6. Влияние авермектинов В1 (1), В2 (2), А1 (3), А2 (4) на выживаемость клеток Нер-2 в присутствии таксола, 0.005 нМ.

1.2.3. Действие авермектинов на активность транспортных белков клеток НЕР-2.

Действие авермектинов на транспортные системы клеток, обеспечивающие МЛТУ, было проведено методом определения скорости выхода из клеток родамина 123. Определяли отношение скоростей выхода родамина 123 из клеток НЕР-2 в контроле и при добавлении ингибитора (R-1). Действие авермектина А1 сравнивали с эффектом известного ингибитора МЛТУ циклоспорина А. На рис. 7 показана зависимость R-1 от концентраций авермектина А1 и циклоспорина А. Величина максимума зависимости R-1 от концентрации ингибиторов, определяемая отношением скоростей выхода родамина 123 без ингибиторов и при полном подавлении активного транспорта служит характеристикой МЛТУ клеток. Ингибирующую

эффективность агентов отражает их концентрация, при которой R-1 равно половине максимальной величины. Обнаружили, что авермектин A1 в 2 раза эффективнее циклоспорина А. Снижение величины R-1 с увеличением концентрации ингибиторов больше концентрации, при которой R-1 максимально, по-видимому, обусловлено увеличением пассивной проницаемости мембраны под воздействием ингибиторов, являющихся гидрофобными агентами. Токсичность авермектинов и циклоспорина А для клеток при концентрациях больше 1000 нМ также обусловлена действием на мембрану.

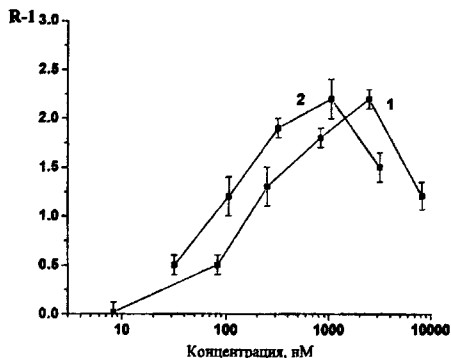


Рис.7. Зависимость (R-1) для циклоспорина А (1) и авермектина A1 (2) на клетках Нер-2

Таким образом, впервые исследовано действие природных авермектинов на множественную лекарственную устойчивость клеток Нер-2. Показано, что авермектины в нетоксичных концентрациях повышают чувствительность клеток дикого типа и устойчиво к таксолу штамма к винкристину и таксолу и ингибируют откачку из клеток субстратов транспортных белков. Обнаружены индивидуальные различия авермектинов: наиболее активны авермектины группы А. Сравнение с циклоспорином А показало, что авермектин A1 в 2 раза эффективнее подавляет активность транспортных белков, обуславливающих МЛУ.

1.3. Противоопухолевые эффекты авермектинов.

В литературе информация о действии авермектинов на опухолевые клетки *in vivo* отсутствует. Нашей задачей было изучить действие природных авермектинов и их комплексов на рост асцитных и солидных перевиваемых опухолей животных *in vivo*.

1.3.1. Действие аверсектина С на асцитную опухоль лимфолейкоз Р388.

Исследовали влияние аверсектина С на рост асцитной опухоли лимфолейкоз мышей Р388. Мышам внутрибрюшинно вводили препарат в исследуемых концентрациях, а через 7 суток мышей забивали и подсчитывали количество опухолевых клеток в брюшной полости.

При введении аверсектина С 1 мкг/г через двое суток после прививки одно, дву-, трех- и четырехкратно с интервалом в 1 сутки количество клеток в опухоли уменьшается линейно с ростом суммарной дозы аверсектина С и при суммарной дозе 4 мкг/г снижается до 8% от контроля (рис. 8).

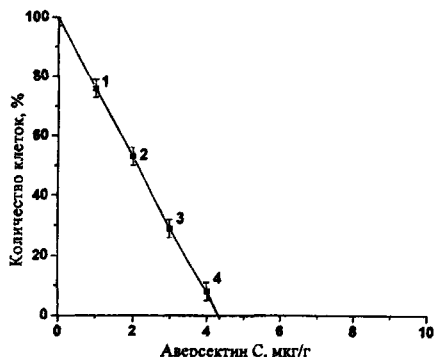


Рис.8. Влияние аверсектина С, 1 мкг/г, на рост асцитной опухоли Р388 в брюшной полости мышей DBA2. 1 -Аверсектин С вводился однократно через 2 суток после прививки опухоли, 2- двукратно с интервалом в 1 сутки, 3- трехкратно с интервалом в 1 сутки, 4- четырехкратно с интервалом в 1 сутки.

1.3.2. Действие аверсектина С на солидную карциному Эрлиха.

Исследовали влияние введения аверсектина С на рост солидной карциномы Эрлиха. Препарат вводили через сутки после прививки в дозе 3 мкг/г. Изучали эффективность аверсектина С при различных способах введения, показали, что при введении препарата внутрибрюшинно эффект максимален. Внутрибрюшинно вводили разные дозы аверсектина С и измеряли объем опухоли на различных сроках роста. Показано, что аверсектин С подавляет рост солидной карциномы Эрлиха, и эффект возрастает с увеличением дозы вплоть до 9 мкг/г.

1.3.3. Влияние авермектина В1 на рост солидной карциномы Эрлиха.

Изучали влияние авермектина В1 на рост солидной карциномы Эрлиха. При введении его *in vivo*, активность авермектина В1 сопоставима с активностью аверсектина С. При однократном введении 1 мкг/г авермектина В1 мышам с солидной карциномой Эрлиха через 5 суток после прививки торможение роста опухоли (ТРО) равно ТРО аверсектина С и составляет 57%. Однако ТРО аверсектина С снижается во времени гораздо медленнее, чем ТРО авермектина В1. Т.е., нарастание опухоли после введения комплекса авермектинов происходит медленнее, чем при введении чистого авермектина В1. Возможно, это обусловлено сочетанным действием комплекса авермектинов на организм, или же авермектины группы А, присутствующие в комплексе, также более активны в условиях *in vivo*, как и *in vitro*.

Таким образом, при введении *in vivo* авермектины способны тормозить рост опухолей. Наибольший эффект достигается при суммарной дозе больше 4 мкг/г.

1.4. Усиление противоопухолевых эффектов винкристина авермектинами *in vivo*.

Показано, что авермектины подавляют множественную лекарственную устойчивость опухолевых клеток *in vitro*. Интересным представляется исследовать влияние авермектинов на противоопухолевое действие лекарственных препаратов *in vivo*.

1.4.1. Действие винкристина в сочетании с авермектинами на солидную карциному Эрлиха.

Показано, что авермектин В1, 1 мкг/г, и аверсектин С, 1 мкг/г, увеличивают торможение роста солидной карциномы Эрлиха винкристином.

1.4.2 Действие винкристина в сочетании с авермектинами на лимфолейкоз Р388.

Сочетанное действие винкристина с авермектинами исследовали как на рост опухолей лимфолейкоз Р388, так и на среднюю продолжительность жизни (СПЖ) мышей с опухолями. Авермектин В1 не влиял на рост опухоли Р388 *in vivo* в концентрации до 1 мкг/г: выживаемость составляет $90 \pm 12\%$. На рис. 9 показано действие авермектина В1 на рост опухоли Р388, обработанной винкристином, 180 нг/г. Количество клеток в опухолях при данной концентрации винкристина принято за 100%. Показано, что авермектин В1 удваивает эффект винкристина в концентрации 55 нг/г.

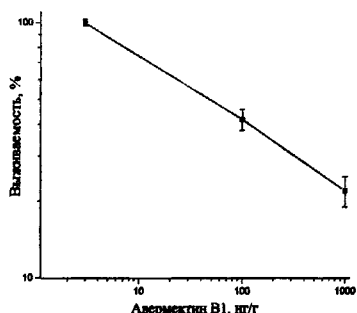


Рис.9. Влияние авермектина В1 на рост опухоли Р388 в сочетании с винкристином, 180 нг/г, *in vivo*.

Было изучено влияние авермектина В1 на СПЖ мышей. Все исследованные концентрации авермектина В1 (от 0,3 до 9 мкг/г) самостоятельно не влияли на продолжительность жизни животных. Однако совместное введение винкристина, 0,2 мкг/г, и авермектина В1, 1,5 мкг/г, увеличивало СПЖ: при введении одного винкристина она составляла $13 \pm 0,2$ суток (на 30% больше контрольной), а при добавлении авермектина В1 - $15 \pm 0,5$ суток (на 50% больше контрольной).

1.4.3 Противоопухолевое действие винкристина в сочетании с авермектинами на резистентный штамм Р388ВР.

Исследовали также сочетанное действие винкристина с авермектинами на лимфолейкоз Р388ВР, резистентный к винкристину. СПЖ мышей контрольной группы

составляла 11 ± 0.5 суток. Аверсект 3- природный комплекс авермектинов с преобладающим содержанием авермектинов группы А. Введение винкристина, 0.2 мкг/г, увеличивало СПЖ мышей до 14.7 ± 0.2 суток (на 33% больше контроля), а сочетанное действие винкристина с аверсектом 3, 0.3 мкг/г, — 16.7 ± 0.3 суток (на 52% больше контроля).

Таким образом, в данной работе впервые показано, что авермектины усиливают противоопухолевое действие винкристина *in vivo*. Также совместное введение авермектинов с винкристином повышает СПЖ мышей как с лимфолейкозом дикого типа, так и с устойчивым штаммом. СПЖ возрастает на 50%. Впервые показано различие в индивидуальных особенностях авермектинов в подавлении МЛУ.

Часть II. Регуляция МЛУ опухолей уровнем их оксигенации.

В нескольких работах (Wartenberg et al., 2000; Comerford et al., 2002) было показано, что гипоксические условия индуцируют экспрессию *mdr-1* в сфероидных опухолевых клетках простаты DU-145 и повышают их устойчивость к противоопухолевым препаратам. Мы исследовали влияние изменения уровня оксигенации клеток асцитной опухоли Р388ВР на МЛУ.

2.1. Зависимость МЛУ клеток Р388ВР от срока роста опухоли.

Исследовали изменение множественной лекарственной устойчивости по мере роста опухоли лимфолейкоза мышей Р388 и Р388ВР. Впервые было показано, что скорость образования кальцеина в клетках Р388ВР зависит от срока роста опухоли (таблица 2).

МЛУ минимальна в клетках дикого типа. В клетках Р388ВР МЛУ возрастает от 2х суточной опухоли к семисуточной. Для клеток Р388 дикого типа зависимости МЛУ от срока роста опухоли не было обнаружено.

Таблица 2. Скорость образования кальцеина в присутствии циклоспорина А (V2) и без него (V1) в клетках лимфолейкоза Р388 и Р388ВР.

	Р388 дикий тип	Р388ВР, 2 сут	Р388ВР, 3 сут	Р388ВР, 4 сут	Р388ВР, 7 сут
V1, пмоль/ 10^6 *мин	5.7 ± 1.0	2.9 ± 0.5	2.2 ± 0.2	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.2
V2, пмоль/ 10^6 *мин	9.1 ± 1	9.8 ± 0.3	8.7 ± 0.7	8 ± 0.9	8.2 ± 0.7
K, V2/V1	1.600 ± 0.14	3.380 ± 0.8	3.950 ± 0.7	5.000 ± 0.3	6.833 ± 0.6

Увеличение МЛУ по мере роста асцитной опухоли Р388ВР подтверждается также данными по чувствительности клеток к винкристину. IC50 винкристина равна 14, 101 и 1624

нМ для клеток Р388 дикого типа, клеток Р388ВР 3суточных и клеток Р388ВР 7 суток, соответственно. Т.е. по мере роста опухоли возрастает транспорт из клеток субстратов транспортных белков кальцеина-АМ и винкристина.

Таким образом, впервые показано, что рост опухоли Р388ВР сопровождается увеличением транспорта кальцеина-АМ, т.е. множественная лекарственная устойчивость клеток Р388ВР увеличивается по мере нарастания опухоли. При этом также увеличивается устойчивость опухоли к винкристину. В то же время уровень устойчивости опухоли дикого типа остается неизменным. Такая закономерность впервые обнаружена при росте асцитной опухоли.

2.2. Изменение активных форм кислорода по мере роста опухолей Р388ВР.

МЛУ асцитной опухоли Р388ВР возрастает по мере её роста. Можно предположить, что увеличение числа клеток запускает некие процессы, ведущие к активации механизмов устойчивости, и данные процессы не являются специфическими для определенного типа опухоли. Мы предположили, что, как и в других типах опухолей (Comerford et al., 2002; Wartenberg et al., 2002), причиной изменения МЛУ опухоли Р388ВР является изменение уровня ее оксигенации. Уровень АФК измеряли спектрофлуориметрически с помощью 2',7'-дихлорофлуоресцеин диацетата (ДХФ-ДА). Результаты представлены в таблице 3.

Измерение уровня АФК показало, что максимальный уровень флуоресценции ДХФ наблюдается в двухсуточной опухоли Р388ВР, он составляет 18.9 ± 1.0 . Затем флуоресценция ДХФ снижается до 12 ± 0.4 в четырехсуточной опухоли и до 3.6 ± 0.3 в семисуточной.

Таблица 3. Изменение уровня активных форм кислорода в клетках лимфолейкоза Р388 и Р388ВР.

	Р388, дикий тип, 7 сут	Р388ВР, 2 сут	Р388ВР, 4 сут	Р388ВР, 7 сут
АФК, отн. ед.	4.2 ± 0.5	18.9 ± 1.0	12 ± 0.4	3.6 ± 0.3

Как видно из таблицы, уровень флуоресценции ДХФ, и, соответственно, уровень АФК в клетках дикого типа на седьмой день роста близок к содержанию АФК в резистентном штамме. Как было показано выше, МЛУ клеток дикого типа на седьмой день не отличается от МЛУ на более ранних сроках. Таким образом, снижение уровня АФК не ведет само по себе к развитию устойчивости, но увеличивает её лишь у устойчивого штамма.

Возможны несколько причин изменения содержания АФК в брюшной полости мышей при росте опухоли. При перевивке лимфолейкоза Р388ВР количество клеток, попадающих в брюшную полость мыши, составляет $1-2 \cdot 10^6$. К седьмому дню количество клеток увеличивается до $4-6 \cdot 10^8$ и возросшее количество клеток является причиной гипоксии в

брюшной полости. С другой стороны, дополнительной причиной окислительного стресса на ранних сроках роста опухоли может быть миграция в опухоль лейкоцитов, которые известны как эффективные продуценты активных форм кислорода. В 2-3 суточной опухоли количество лейкоцитов (нейтрофилы, эозинофилы) составляет 2-5% от числа опухолевых клеток, а к 6-7 дню это соотношение падает до 0.4-0.6%.

Показано, что рост аспитной опухоли лимфолейкоза сопровождается уменьшением уровня активных форм кислорода в брюшной полости. Это связано с увеличением числа опухолевых клеток (гипоксия) и снижением числа лейкоцитов.

2.3. Влияние увеличения оксигенации опухолей Р388ВР с помощью гипероксии и перфторана на МЛУ опухолевых клеток.

Снижение МЛУ при повышении оксигенации опухоли позволяет предположить, что искусственное увеличение оксигенации опухоли приведет к повышению чувствительности клеток к противоопухолевым препаратам. Насыщая кислородом кровь, мы можем увеличить содержание кислорода и в опухоли, т.к. опухолевые клетки в брюшной полости контактируют с капиллярами. К этому приводит помещение животных в условия гипероксии или введение в кровь веществ, увеличивающих скорость обмена кислорода между клетками и сосудами. Одним из таких веществ является перфторан (Maevsky et al., 2005), мелкодисперсная эмульсия, увеличивающая площадь поверхности взаимодействия клеток с капиллярами брюшной полости.

Показано, что гипероксия и перфторан одинаково, в 2 раза, увеличивают содержание АФК в клетках Р388ВР (табл. 4).

Таблица 4. Влияние гипероксии и перфторана на образование АФК в клетках Р388ВР.

Условия	контроль	Перфторан	Гипероксия	Перфторан + Гипероксия
АФК, отн. ед.	3.6 ±0.2	7.0±0.5	7.3±0.5	7.7±0.3

Двукратное введение перфторана через 3 и 5 суток после прививки опухолей приводило к снижению количества опухолевых клеток в 2 раза. По-видимому, перфторан в брюшной полости создает окислительный стресс, а в работе Шапошниковой В.В с соавт. показано, что лейкозные клетки чувствительны к окислительному стрессу (Шапошникова и др., 2002). Также было обнаружено снижение МЛУ в 1.7 раза (табл.5).

Таблица 5. Количество клеток и МЛУ в 7 суточных опухолях Р388ВР в контроле и после двукратного введения перфторана.

Условия	Количество клеток, $\cdot 10^6$	МЛУ
Контроль	3.3 ± 0.3	6.8 ± 0.3
Перфторан	1.7 ± 0.4	3.8 ± 0.5

Полученные результаты показывают, что введение перфторана в асцитные опухоли может быть использовано для снижения их МЛУ перед химиотерапией.

Таким образом, в работе впервые показано, что по мере роста асцитной опухоли лимфолейкоза Р388ВР, уменьшается концентрация АФК в опухолевых клетках и возрастает их МЛУ. Концентрацию АФК в опухолевых клетках можно увеличить, выдерживая животных в условиях гипероксии или введением перфторана в опухоль. Двукратное введение перфторана уменьшает количество клеток в опухолях и снижает МЛУ опухолевых клеток.

ВЫВОДЫ:

1. Авермектины подавляют множественную лекарственную устойчивость клеток лимфолейкоза Р388ВР, устойчивого к винкристину, клеток рака гортани человека НЕР-2ТР, устойчивого к таксолу, и их диких типов.
2. Относительная эффективность различных авермектинов в ингибировании множественной лекарственной устойчивости зависит от типа клеток и транспортируемого субстрата.
3. Внутривентриальное введение авермектинов в нетоксичных концентрациях подавляет рост опухолей *in vivo*.
4. При внутривентриальном введении авермектины усиливают противоопухолевый эффект винкристина *in vivo*.
5. Множественная лекарственная устойчивость клеток лимфолейкоза Р388ВР увеличивается с ростом опухоли.
6. Уровень активных форм кислорода снижается по мере роста опухоли Р388ВР, а выдерживание животных в условиях гипероксии или введение перфторана увеличивает концентрацию активных форм кислорода в опухолевых клетках.
7. Внутривентриальное введение перфторана в опухоль Р388ВР снижает количество опухолевых клеток и уменьшает их множественную лекарственную устойчивость.

Список опубликованных работ по теме диссертации:

1. Сергеев П.В., Семейкин А.В., Федотчева Т.А., Самойликов Р.В., Камерницкий А.В., Левина И.С., Ржезников В.М., Гриненко Г.С., Корыстов Ю.Н., Ермакова Н.В., Шапошникова В.В., Шиямановский Н.Л. Исследование комбинированного действия доксорубицина и гестагенов на чувствительные и резистентные к доксорубицину клетки MCF-7. Бюлл.Эксп.Биол.иМед.,2003, т.136, №11, с.519-522.
2. Ермакова Н.В., Шапошникова В.В., Левитман М.Х., Ким Ю.А., Корыстов Ю.Н. Изменение множественной лекарственной устойчивости клеток лимфолейкоза P388, устойчивых к винкристину, при росте асцитной опухоли. Биологические мембраны, 2004, Т. 21, № 2, С. 102-106.
3. Корыстов Ю.Н., Шапошникова В.В., Ермакова Н.В., Кублик Л.Н., Новик Т.С., Мосин В.А., Кругляк Е.Б., Стерлина Т.С., Дриняев В.А. Модификация авермектинами чувствительности клеток НГр-2 к таксолу и винкристину. Биологические мембраны, 2004, Т. 21, № 3, С. 220-224.
4. Корыстов Ю.Н., Ермакова Н.В., Шапошникова В.В., Левитман М.Х., Новик Т.С., Мосин В.А., Кругляк Е.Б., Стерлина Т.С., Дриняев В.А. Авермектины увеличивают чувствительность клеток лимфолейкоза P388 к винкристину. Биологические мембраны, 2004, Т. 21, № 3, С.214-219.
5. Дриняев В.А., Мосин В.А., Кругляк Е.Б., Стерлина Т.С., Новик Т.С., Ермакова Н.В., Кублик Л.Н., Левитман М.Х., Шапошникова В.В., Корыстов Ю.Н. Противоопухолевое действие природных авермектинов. Антибиотики и химиотерапия, 2004, Т. 49, №5, С. 8-10.
6. Дриняев В. А., Мосин В. А., Кругляк Е. Б., Стерлина Т. С., Новик Т. С., Ермакова Н.В., Кублик Л.Н., Левитман М.Х., Шапошникова В.В., Корыстов Ю.Н. Модификация противоопухолевого эффекта винкристина природными авермектинами. Антибиотики и химиотерапия, 2004, Т. 49, №6, С. 3-5.
7. Yuri N. Korystov, Natalia V. Ernakova, Ludmila N. Kublik, Maria Kh. Levitman, Vera V. Shaposhnikova, Vladimir A. Mosin, Viktor A. Drinyaev, Elena B. Kruglyak, Tamara S. Novik and Tatiana S. Sterlina. Avermectins Inhibit Multidrug Resistance of Tumor Cells. Eur.J.Pharmacol., 2004, V.493, P.57-64.
8. Victor A. Drinyaev, Vladimir A. Mosin, Elena B. Kruglyak, Tamara S. Novik, Tatiana S. Sterlina, Natalia V. Ernakova, Ludmila N. Kublik, Maria Kh. Levitman, Vera V. Shaposhnikova, and Yuri N. Korystov. Antitumor Effect of Avermectins. Eur.J.Pharmacol., 2004, V.501, P.19-23.
9. Корыстов Ю.Н., Ермакова Н.В., Шапошникова В.В., Левитман М.Х., Ким Ю.А., Пушкин С.Ю. Введение перфторана в асцитную опухоль мышиногo лимфолейкоза снижает количество клеток и уменьшает их множественную лекарственную устойчивость. // Биологические мембраны, 2006, Т.23, №1, С.22-26..

10. Ермакова Н.В., Федотчева Т.А. Исследование ингибиторов множественной лекарственной устойчивости клеток по кинетике выхода родамина 123. Тезисы VII Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология- наука XXI века», г. Пушкино, 14-18 апреля 2003 г.
11. Ермакова Н.В. Изучение множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток на разных стадиях роста. Тезисы VIII Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология- наука XXI века», г. Пушкино, 17-21 мая 2004 г.
12. Ермакова Н.В. Изучение новых ингибиторов множественной лекарственной устойчивости опухолей. Тезисы IX Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология- наука XXI века», г.Пушино, 18-22 апреля 2005 г.
13. Ermakova N.V., V.V. Shaposhnikova, Y.N. Korystov. Multidrug resistance of tumor cell line P388 resistant to vincristine changes with tumor progression. 15th IUPAB and 5th EBSA International Biophysics Congress, Montpellier, France , August 27th-September 1st 2005.

Принято к исполнению 22/11/2005
Исполнено 23/11/2005

Заказ № 1350
Тираж 100 экз.

ООО «11-й ФОРМАТ» ИНН 7726330900
Москва, Варшавское ш., 36
(095) 975-78-56
(095) 747-64-70
www.autoreferat.ru

№ 25026

РИБ Русский фонд

2006-4

28977