

УДК 618.11– 006.6 – 076.5

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЛИНИИ MCF7/ADR

Т.А. Богуш^{1*}, С.А. Калюжный¹, М.Р. Четыркина², М.А. Ястребова^{1,2},
А.М. Щербаков¹, О.М. Рябинина¹, И.А. Мамичев¹, Е.А. Богуш¹,
А.А. Каменский²

(¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; ² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова; *e-mail: tatbogush@mail.ru)

Выявлены различия между чувствительными (MCF7) и резистентными (MCF7/ADR) клетками в экспрессии виментина и P-gp, что указывает на «сосуществование» двух механизмов лекарственной резистентности в клетках MCF7/ADR. Мезенхимальный фенотип эпителиальных клеток вносит значительно больший вклад в механизм резистентности в сравнении с гиперэкспрессией ABC-транспортера, так как разница в уровне экспрессии виментина между чувствительной и резистентной культурами значительно превосходит разницу в экспрессии P-gp.

Ключевые слова: MCF7, MCF7/ADR, культуры клеток рака молочной железы, лекарственная резистентность, эпителиально-мезенхимальный переход, виментин, P-gp, проточная цитофлуориметрия.

Резистентность к воздействию противоопухолевых препаратов остается серьезной проблемой противоопухолевой терапии. Механизмов резистентности много и разработка подходов к их преодолению требует точно охарактеризованных клеточных моделей. Линия рака молочной железы MCF7 – одна из широко используемых моделей для изучения механизмов реализации множественной лекарственной резистентности, обусловленной выбросом противоопухолевых препаратов из клетки при работе ABC-транспортеров [1, 2]. Из литературных источников известно, что линия MCF7/ADR обладает высоким уровнем резистентности к антрациклиновому препарату доксорубину, что связывают с повышенной экспрессией одного из ABC-транспортеров – P-gp [3]. Мы предположили, что высокий уровень лекарственной резистентности клеток MCF7/ADR может быть обусловлен и другими причинами, например, индукцией процесса эпителиально-мезенхимального перехода, который общепризнанно связан с агрессивностью заболевания и с высоким метастатическим потенциалом опухоли [4].

Для проверки этого предположения в клетках двух линий, принципиально различающихся по чувствительности к противоопухолевым препаратам (MCF7 и MCF7/ADR), проведена сравнительная оценка экспрессии двух молекулярных маркеров – P-gp и *de novo* экспрессии мезенхимального белка виментина, который считается специфиче-

ским маркером молекулярного фенотипа эпителиально-мезенхимального перехода.

Материалы и методы

Исследована культура клеток рака молочной железы линии MCF7, полученная при адаптации к росту в культуре клеток из плевральной жидкости при диссеминации опухоли по плевре, а также линия MCF7/ADR с индуцированной резистентностью к доксорубину. При иммунофлуоресцентном анализе с включением проточной цитофлуориметрии использованы первичные антитела к виментину (клон SP20, CRM312A), к P-gp (клон 4E3, ab10333) и к цитокератинам 8/18 (ЦК 8/18) (клон EP1628Y ab53280), а также вторичные антитела, конъюгированные с DL650 (ab98510 и ab98729). Методом Колмогорова–Смирнова (программа FlowJo 10.0.8) определены следующие параметры экспрессии маркеров: уровень (%) – количество специфически флуоресцирующих клеток в процентах по отношению к контролю (инкубация с вторичными антителами); интенсивность (усл. ед.) – отношение средней специфической интенсивности флуоресценции к аналогичному показателю в контроле; интегральный индекс – произведение доли клеток, экспрессирующих маркер, и интенсивности экспрессии маркера.

Результаты и обсуждение

Гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции после иммунофлуорес-

центного окрашивания антителами к ABC-транспортеру P-gp, мезенхимальному белку виментину и к эпителиальным цитокератинам представлены на рисунке.

Необходимо отметить, что уровень экспрессии P-gp в резистентных клетках MCF7/ADR приблизительно в 1,5 раза выше, чем в родительской линии MCF7, чувствительной к антрациклину (82 и 62% соответственно). Более существенны различия между резистентными и чувствительными клетками по интенсивности и индексу экспрессии P-gp – в 3 и 4 раза соответственно.

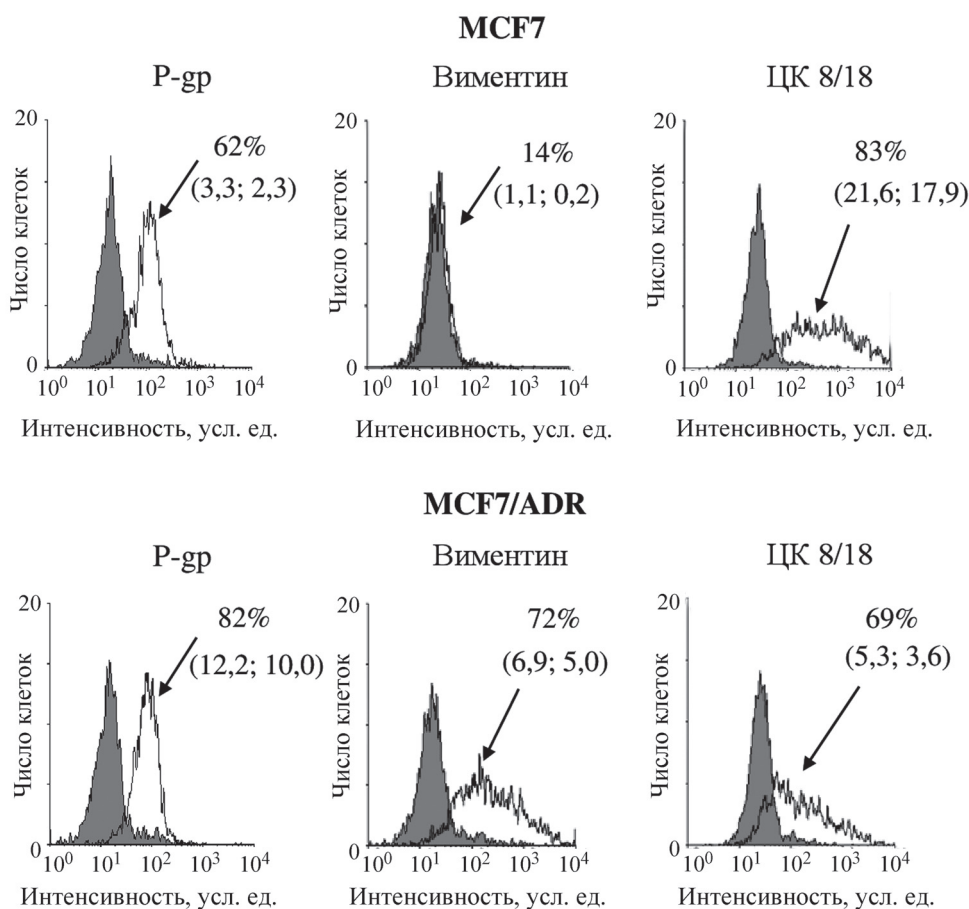
По *de novo* синтезу виментина клетки различались значительно, начиная с уровня экспрессии маркера. В резистентных клетках MCF7/ADR уровень показателя составил 72%, тогда как в клетках MCF7 – только 14%. Показатели интенсивности и индекса экспрессии виментина отличались еще более значительно. В резистентных клетках MCF7/ADR интенсивность экспрессии

маркера была выше более чем в 6 раз, а индекс – в 25 раз, чем в клетках линии MCF7.

Важно также отметить различия по частоте *de novo* экспрессии виментина в клетках, экспрессирующих эпителиальные цитокератины 8/18. В чувствительных клетках этот показатель составил около 17% (14% против 83%), а в резистентных клетках MCF7/ADR – достиг 100% (72% против 69%). Тот факт, что в клетках обеих культур отмечен высокий уровень экспрессии цитокератинов 8/18, подтвердил эпителиальную природу этих клеток и *de novo* коэкспрессию виментина практически во всех резистентных клетках MCF7/ADR.

Заключение

Результаты настоящей работы показали, что высокая резистентность к доксорубину клеток рака молочной железы линии MCF7 ассоциирована не только с гиперэкспрессией ABC-транспортера P-gp, но и с высоким уровнем эпителиально-ме-



Примеры гистограмм распределения клеток в зависимости от интенсивности клеточной флуоресценции при иммунофлуоресцентном окрашивании. По осям абсцисс указана интенсивность специфической флуоресценции (усл. ед.), по осям ординат указано число клеток. Окрашенные гистограммы получены после инкубации с вторичными антителами (контроль); прозрачные гистограммы получены после инкубации с первичными и вторичными антителами (опыт). Стрелками указан уровень экспрессии маркера в %; в скобках указаны соответственно интенсивность и индекс экспрессии маркера

зехимального перехода, который оценивали по специфическому маркеру мезенхимальных клеток – виментину. Этот белок выявлен во всех резистентных клетках линии MCF7/ADR, при этом коэкспрессия виментина и эпителиальных цитокиратинов наблюдалась в 100% этих клеток, что подтверждает возможность *de novo* экспрессии мезенхимального маркера в эпителиальных опухолевых клетках.

Выявленные различия между чувствительными и резистентными клетками в показателях экспрессии виментина и P-gp позволяют предположить «сосуществование» двух меха-

низмов лекарственной резистентности в клетках MCF7/ADR. При этом мезенхимальный фенотип эпителиальных клеток вносит значительно больший вклад в механизм резистентности по сравнению с гиперэкспрессией ABC-транспортеров.

Таким образом, клетки рака молочной железы линии MCF7/ADR представляют собой перспективную модель для поиска и изучения модификаторов лекарственной резистентности, ассоциированной с индукцией в эпителиальных опухолевых клетках эпителиально-мезенхимального перехода.

Работы с клеточными культурами поддержаны Российским научным фондом (проект № 14-15-00362).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gottesman M.M., Fojo T., Bates S.E. // Nat Rev Cancer. 2002. Vol. 2. N 1. P. 48.
2. Luqmani Y.A. // Med Princ Pract. 2005. Vol. 14. Suppl. N 1. P. 35.
3. Tsou S.H., Chen T.M., Hsiao H.T., Chen Y.H. // PLoS One. 2015. Vol. 10. N 1. P. 1.
4. Saxena M., Stephens M.A., Pathak H., Rangarajan A. // Cell Death Dis. 2011. N 2. P. 1.

Поступила в редакцию 12.04.18

MOLECULAR MECHANISMS OF DRUG RESISTANCE IN MCF7/ADR BREAST CANCER CELLS

T.A. Bogush^{1*}, S.A. Kalyuzhny¹, M.R. Chetyrkina², M.A. Yastrebova^{1,2},
A.M. Scherbakov¹, O.M. Ryabinina¹, I.A. Mamichev¹, E.A. Bogush¹, A.A. Kamensky²

(¹ FSBI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center» of the Ministry of Health of the Russian Federation; ² FSB Educational Institution of Higher Education M.V. Lomonosov Moscow State University; *e-mail: tatbogush@mail.ru)

It was revealed differences between expression of vimentin and P-gp in sensitive MCF7 and resistant MCF7/ADR cells thus demonstrating the “coexistence” of two drug resistance mechanisms in MCF7/ADR cells. Mesenchymal phenotype of epithelial cells contributes significantly to resistance mechanism in comparison with overexpression of the ABC-transporter the difference in vimentin expression levels between sensitive and resistant cell cultures is substantially higher compared with the difference in P-gp expression levels..

Key words: MCF7, MCF7/ADR, breast cancer cell cultures, drug resistance, epithelial-to-mesenchymal transition, vimentin, P-gp, flow cytometry.

Сведения об авторах: *Богущ Татьяна Анатольевна* – профессор, руководитель группы молекулярных маркеров опухолей лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (tatbogush@mail.ru); *Калюжный Сергей Андреевич* – мл. науч. сотр. группы молекулярных маркеров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (labmedchem@mail.ru); *Четыркина Маргарита Руслановна* – студентка биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (margarita.chetyrkina@yandex.ru); *Ястребова Маргарита Андреевна* – студентка биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (ritayastrebova2009@gmail.com); *Щербаков Александр Михайлович* – ст. науч. сотр. лаборатория онкопротеомики ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, канд. биол. наук (alex.scherbakov@gmail.com); *Рябинина Ольга Михайловна* – науч. сотр. группы молекулярных маркеров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (labmedchem@mail.ru); *Мамичев Иван Андреевич* – мл. науч. сотр. группы молекулярных маркеров лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Mamichev99@gmail.com); *Богущ Елена Александровна* – ст. науч. сотр. отделения клинической фармакологии и химиотерапии ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, канд. мед. наук; *Каменский Андрей Александрович* – зав. кафедрой физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, профессор, докт. биол. наук (kamensky_msu@mail.ru).