

МЕХАНІЗМИ РЕЗИСТЕНТНОСТІ РАКОВИХ КЛІТИН ДО ПРОТИПУХЛИННИХ ПРЕПАРАТІВ

Грищук Р.Я., Коваль С.В.,
Шейн А.В., Мізерний Р.О., Овечко М.Є.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

Огляд присвячено узагальненню результатів експериментальних досліджень стосовно стійкості ракових клітин до дії протипухлинних препаратів. Охарактеризовано медико-біологічні аспекти формування стійкості ракових клітин до лікарських препаратів. Наведено загальні механізми формування резистентності клітин до ліків. Розглянуто проблему множинної резистентності. Проаналізовано одні з найкраще вивчених механізмів, клінічне значення яких на формування стійкості є доведеним, зокрема, роль Р-глікопротеїну та глутатіону.

Ключові слова: рак, резистентність до ліків, множинна резистентність клітин, протипухлинні препарати, біохімія.

Постановка проблеми. Формування резистентності ракових клітин до лікувального впливу є головною причиною, яка перешкоджає досягненню позитивного результату при застосуванні хіміотерапії, яка в багатьох аналогічних випадках онкологічних захворювань виявляла свою ефективність. Тому, на сьогодні розробка нових підходів до вирішення цієї проблеми є одним із найактуальніших напрямків розвитку сучасної медицини. Для цього потребується, як детальне вивчення механізмів формування хіміорезистентності злоякісних клітин, так і розробка методів підвищення чутливості до лікарських препаратів без порушення структури і функцій здорових клітин.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. Загальну проблематику формування резистентності клітин до лікувального впливу та, зокрема, стійкості до протипухлинних препаратів розглянуто у працях таких дослідників як І. Чорна, І. Висоцька, О. Резніков, Б. Копнін, В. Чехун, Д. Микитенко, Н. Лук'янова, І. Погрібний, І. Полушкіна та багато інших.

Виділення невирішених раніше частин загальної проблеми. Віддаючи належне внеску попередників, відзначимо, що однією з невирішених раніше частин загальної проблеми є узагальнення результатів проведених досліджень, з метою вивчення механізму формування множинної резистентності клітин до впливу протипухлинної терапії.

Мета статті. Основною метою є узагальнення експериментальних та клінічних досліджень, присвячених механізмам формування стійкості ракових клітин до лікарських препаратів.

Виклад основного матеріалу дослідження. На сьогодні ідентифіковано низку механізмів залучених до формування множинної стійкості ракових клітин до протипухлинних препаратів або іонізуючого випромінювання. Наявні факти зумовлюють необхідність розробки комбінованих підходів з метою подолання резистентності.

Сучасній науці відомо чимало внутрішньоклітинних та позаклітинних механізмів формування стійкості ракових клітин до впливів, які мають на меті їх знищення, зокрема:

- виведення з клітини в позаклітинний простір чужорідних речовин;
- секвестрування хімічних сполук всередині цитоплазматичних везикул;

- моделювання механізмів залучених до контролю функціонування внутрішньоклітинні компонентів, які є мішенями дії протипухлинних препаратів;

- окиснення за допомогою системи монооксигеназ ліпофільних токсичних сполук з утворенням водорозчинних речовин, що можуть виводитись із клітини;

- підвищення репарації ДНК;

- порушення передачі апоптичного сигналу;

- кон'югування токсичних сполук шляхом підвищення активності ензимних систем з утворенням менш токсичних речовин;

Загалом, ефективність внутрішньоклітинних механізмів захисту залежить від генетичних особливостей організму, тканинних особливостей та регуляції життєво важливих процесів у клітині під час проведення лікування та у залежності від його інтенсивності і тривалості. Слід відзначити, що деструктивний вплив препаратів може зумовити ушкодження клітин та, як наслідок, розвиток диспластичних і апластичних процесів, або ж за участі онкогенів – набуття клітиною здатності до безмежного поділу, без збереження специфічної клітинної функції, що зумовлює розвиток пухлин з новою силою.

Практика свідчить, що резистентність ракових клітин може формуватися на основі кількох захисних механізмів, проте в переважній більшості випадків переважає один з механізмів. Одними з найкраще досліджених механізмів формування стійкості, клінічна значимість яких для певних форм онкологічних захворювань доведена, є такі:

- активація трансмембранних транспортних протеїнів (зокрема, Р-глікопротеїну);

- активація ензимів системи глутатіону;

Р-глікопротеїн – це трансмембранний протеїн, який складається з двох однакових доменів, кожний з яких включає шість гідрофобних трансмембранних ділянок (молекулярна маса 170 кДа (gp170, Pgp)). Його поліпептидний ланцюг 12 разів перетинає плазматичну мембрану клітини та має два центри зв'язування з АТФ, наявність яких свідчить про енергозалежність функціонування протеїну [17; 21]. Результати досліджень вказують на те, що 12 трансмембранних доменів формують пори або канали, через які Pgp активно виводить чужорідні речовини.

Цей процес забезпечується перенесенням енергії гідролізу АТФ від двох АТФ-зв'язуючих доменів [21]. Його активність зумовлює резистентність пухлинних клітин до багатьох лікарських препаратів (антрациклінових антибіотиків, алкалоїдів рослинного походження, пуроміцину, грамїцидину D, тощо) [4; 6].

P-глікопротеїн людини кодується геном *mdr1*, який належить до родини *mdr* та локалізується в хромосомі 7. Вважається, що формування резистентності можуть зумовлювати зміну в рівні експресії гену *mdr1* та збільшення його дози – через ампліфікацію ділянки геному, яка містить ген *mdr1*, та ще п'яти або шести зчеплених з ним генів [7; 11]. Зокрема, було показано забезпечення стійкості клітин CHLV-79 RJK до бромистого етидію в зростаючих концентраціях в наслідок ампліфікації генів *mdr*, або підвищення їх експресії [1; 2].

Завдяки широкомасштабним дослідженням на сьогодні є достатньо підстав вважати, що при проведенні ступінчастої селекції на вироблення стійкості до окремих цитотоксичних речовин (наприклад, антибіотиків) ракові клітини *in vitro* набувають перехресну резистентність до груп цитостатиків (різних за походженням та структурою). При цьому відзначається, що спектри лікарських засобів, до яких розвивається перехресна резистентність, а також механізми її забезпечення, визначаються вибором того чи іншого селективного агента.

До регулювання активності P-глікопротеїну залучені протеїнкінази А та С (участь інших типів протеїнкіназ обговорюється). Так, у роботі [8] досліджувалася активність протеїнкінази С в клітинах клонів, які набули резистентності до бромистого етидію в концентраціях 1 і 10 мкг/мл. Було встановлено, що в клітинах стійких клонів, які відрізняються за проліферативними характеристиками один від одного та від клітин вихідної популяції, активність протеїнкінази С на першому етапі селекції збільшувалася у фракції мембран, а при подальшому збільшенні стійкості зростала як в мембранах, так і в цитозолі. Культивування резистентних клітин за присутності бромистого етидію мало наслідком підвищення активності ензиму.

Чимало досліджень доводять існування залежності між диференціюванням та експресією генів, які кодують P-глікопротеїн внаслідок дії хіміотерапевтичних препаратів [13]. Зокрема, у роботі [16] показано, що індукування еритроїдного диференціювання під дією еритроїдного фактора диференціювання (EDF) відбувається в резистентних до вінкрістину клітинах K562 та клітинах батьківської лінії. При цьому EDF зменшував експресію P-глікопротеїну чим доведено його роль у регулюванні функції P-глікопротеїну в вінкрістин-резистентних клітинах.

Варто відзначити, що чимало дослідів із культивованими клітинами доводять, що механізм формування множинної резистентності до протипухлинних препаратів характеризується змінами в морфології та фізіології клітин, зокрема, зміною показників розпластованості клітин, інтенсивності поділу, внутрішньоклітинного мембранного транспорту, їх метастатичної активності [10].

Також слід згадати результати дослідів із клітинами гострого мієлоїдного лейкозу, які демонструють, що менш зрілі клітини характеризуються нижчими темпами накопичення даунорубіцину. В той час як більш диференційовані клітини характеризуються вищими темпами накопичення. Це дозволило констатувати, що диференційовані клітини в зразках гострого мієлоїдного лейкозу краще накопичують і утримують ксенобіотик [14].

Також множинна резистентність ракових клітин може визначатися протеїнами родини ABC, зокрема АТФ-залежний MRP (multidrug resistance associated protein), який забезпечує їх стійкість приблизно до того ж кола протипухлинних препаратів, що і P-глікопротеїн. Слід зазначити що надекспресія MRP призводить до збільшення секреції глутатіону, а також до підсилення АТФ-залежного транспорту деяких кон'югатів [18].

Глутатіон (GSH) є трипептидом, який синтезується в організмі з глутамінової кислоти, цистеїну і гліцину. Найважливішими функціями глутатіону є антиоксидантна, іммунопротекторна та детоксифікаційна дія. Порушення регуляції метаболізму глутатіону можуть спричинити виникнення ракових пухлин. Підвищена кількість глутатіону виявляється в клітинних лініях, резистентних до алкілюючих сполук (ембіхіну, хлорбутину, мелфалану, циклофосфаміду та інших). Хімічну взаємодію між глутатіоном та алкілюючими сполуками каталізує група ензимів глутатіон-S-трансфераз (GST), різні ізоформи яких, ймовірно, взаємодіючи з різними ліками, підвищуючи ступінь їх детоксикації. Таким чином, можна стверджувати, що активація цих ензимів є одним з механізмів формування резистентності ракових клітин до протипухлинних препаратів [9].

Цей висновок підтверджують дані багатьох досліджень. Зокрема, у праці [5] було показано, що рівень глутатіону в клітинах лейкозу P388, резистентних до циклоплатаму, був майже в 10 разів вищим, відносно батьківських клітин цієї лінії. При цьому активність глутатіонпероксидази і глутатіонредуктази була в 2 рази, а ферментів глутатіон-S-трансфераз – в 1,5 рази вищою в клітинах резистентного штаму в порівнянні з чутливим, що вказує на їх роль у виникненні резистентності ракових клітин (лейкозу P388) до дії цього препарату.

У праці [7] відзначається, що ензими, які пришвидшують синтез глутатіону в клітині, також можуть залучатись до формування резистентності, однак їх роль у цьому процесі на сьогодні не достатньо досліджена. Зі змінами системи глутатіону також пов'язують резистентність клітин до алкілюючих агентів та препаратів типу антрациклінів та вінкрістину.

Результати інших досліджень [20; 19] вказують на те, що в клітинній лінії MCV, яка характеризується виробленою стійкістю до 4-нітрохінолін-1-оксиду, спостерігається надекспресія P-глікопротеїну та підвищення активності глутатіон-S-трансферази. При цьому така синергетична резистентність до цього агента пов'язана з активуванням утворення 4-NQO-глутатіон-кон'югатів, які виводяться з клітин за допомогою P-глікопротеїну.

Вищенаведене дозволяє зробити висновок про те, що глутатіон є компонентом для частини ензимів, які мають велике значення для захисної системи організму. Значна кількість типів злоякісних новоутворень містять багато глутатіону, який дозволяє їм сформувати резистентність до радіо- та хімотерапевтичних засобів.

Висновки та перспективи подальших досліджень. Узагальнення всього вищенаведеного стосовно механізмів резистентності ракових клітин до дії протипухлинних препаратів дозволяє констатувати, що в більшості випадків доречно

говорити про формування множинної стійкості до лікувальних впливів. Визначення нових механізмів клітинних взаємодій, які зумовлюють залучення протеїнів та їх генів до системи захисту клітин від ушкоджень, а також вивчення їх транспортних та сигнальних шляхів є перспективними напрямками дослідження проблематики резистентності пухлинних клітин до лікарських засобів, адже їх біологічна різноманітність є першопричиною перешкод ефективній діагностиці факторів резистентності, і цим посилює актуальність подальших досліджень у цьому напрямку.

Список літератури:

1. Амплификация и сверхэкспрессия генов *mdr* в клетках китайского хомячка CHLV-79 RJK, устойчивых к бромистому этидию, сочетается с наличием кариотипических маркеров амплификации / Т. М. Гринчук [и др.] // Цитология. – 1993. – № 6/7. – С. 86-97.
2. Амплификация и сверхэкспрессия генов семейства MDR в устойчивых к бромистому этидию клетках китайского хомячка CHO-K1 и в гибридах чувствительных и устойчивых клеток / Л. А. Липская [и др.] // Цитология. – 1994. – № 12. – С. 1236-1244.
3. Волкова Т. О. Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам. Экологические аспекты / Т. О. Волкова, У. С. Багина // Принципы экологии. – 2012. – № 2. – С. 4-20.
4. Изменчивость кариотипа клеток китайского хомячка CHLV-79 RJK, характеризующихся множественной лекарственной устойчивостью, обусловленная амплификацией генов семейства MDR / Т. М. Гринчук [и др.] // Цитология. – 1996. – № 2. – С. 161-171.
5. Исследование биохимических механизмов резистентности к новому противоопухолевому препарату амин(циклопентиламин)-S(-)-малатоплатине (II) (циклоплатаму) / Л. Ю. Дедерер [и др.] // Биохимия. 1995. Т. 60. № 4. С. 602-609.
6. Исследование механизмов лекарственной устойчивости двух клеточных линий хронического промиелолейкоза человека линии K562, резистентных к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II адриамицину и этопозиду / М. Б. Меликсетян [и др.] // Цитология. – 1999. – № 7. – С. 615-622.
7. Невзглядова О. В. Множественная устойчивость эукариотических клеток, обусловленная Р-гликопротеином / О. В. Невзглядова, П.Я. Шварцман // Молекулярная биология. – 1992. – № 3. – С. 487-499.
8. Некрасова Т. П. Различия в активности протеинкиназы С в клетках CHO-K1 и в клетках клонов этой линии, устойчивых к бромистому этидию // Цитология. – 1993. – № 8. – С. 38-45.
9. Ставровская А. А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Биохимия. – 2000. – № 1. – С. 112-126.
10. Эритроидная дифференцировка сублиний клеток K562, резистентных к 2-(4'-диметил-аминостирил)хинолин-1-оксиду или 4-нитрохинолин-1-оксиду, значительно усиливается при обработке тимидином / А. Г. Анисимов [и др.] // Известия РАН. Серия «Биология» – 2003. – № 1. – С. 37-46.
11. Borst P. Genetic mechanisms of drug resistance: a review // Acta Oncologica. – 1991. – № 30. – P. 87-101.
12. Combined activity of interleukin-1 alpha or TNF-alpha and doxorubicin on multidrug resistant cell lines: evidence that TNF and DXR have synergistic antitumor and differentiation-inducing effects / N. Borsellino [et al.] // Anticancer Research. – 1994. – № 14. – P. 2643-2648.
13. Differentiation and multidrug resistance in response to drug treatment in the K562 human leukaemia cell line / D. C. Marks [et al.] // British Journal of Haematology. – 1993. – № 1. – P. 83-89.
14. Heterogeneity of isolated mononuclear cells from patients with acute myeloid leukemia affects cellular accumulation and efflux of daunorubicin / E. Knaust [et al.] // Haematologica. – 2000. – № 85. – P. 124-132.
15. Increase in the level of P-glycoprotein mRNA expression in multidrug-resistant K562 cell lines treated with sodium butyrate is not accompanied with erythroid differentiation / H. Shibata [et al.] // Japanese Journal of Cancer Research. – 1990. – № 12. – P. 1214-1217.
16. Inhibition by erythroid differentiation factor (activin A) of P-glycoprotein expression in multidrug-resistant human K562 erythroleukemia cells / J. Okabe-Kado [et al.] // Cancer Research. – 1991. – № 10. – P. 2582-2586.
17. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdrI* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells / C. J. Chen [et al.] // Cell. – 1986. – № 47. – P. 381-389.
18. Loe D. W. Biology of the multidrug resistance-associated protein, MRP / D.W. Loe, R.G. Deepley, S.P.Cole // European Journal of Cancer. – 1996. – № 32. – P. 945-957.
19. Morrow C. S. Role of multidrug-resistance protein 2 in glutathione S-transferase P1-1-mediated resistance to 4-nitroquinoline 1-oxide toxicities in HepG2 cells / C. S. Morrow, P. K. Smitherman, A. J. Townsend // Molecular Carcinogenesis. – 2000. – № 3. – P. 170-178.
20. Multidrug resistance protein and glutathione S-transferase P1-1 act in synergy to confer protection from 4-nitroquinoline 1-oxide toxicity / C. S. Morrow [et al.] // Carcinogenesis. – 1998. – № 1. – P. 109-115.
21. Roninson I. B. Structure and evolution of P-glycoprotein / I. B. Roninson. – Plenum Press: New York, 1991. – P. 189-209.
22. Sensitivity of K562 human chronic myelogenous leukemia blast cells transfected with a human multidrug resistance cDNA to cytotoxic drugs and differentiating agents / W. N. Hait [et al.] // The Journal of Clinical Investigation. – 1993. – № 91. – P. 2207-2215.
23. Treatment of cells K562/4-NQO and K562/2-DQO with chemical compounds of multidrug resistance leads to apoptosis / Т. О. Волкова [et al.] // Bioinformatics of Genome Regulation and Structure / Systems of Biology. – Novosibirsk, 2012. – P. 40-42.
24. Wang S. Clinical study of multi-drug resistance gene (MDR1) expression in primary ovarian cells / S. Wang, G. Cai // Journal of Tongji Medical University. – 1998. – № 18. – P. 58-60.

**Грищук Р.Я., Коваль С.В.,
Шейн А.В., Мизерный Р.А., Овечко М.Е.**

Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца

МЕХАНИЗМЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ РАКОВЫХ КЛЕТОК К ПРОТИВООПУХОЛЕВЫМ ПРЕПАРАТАМ

Аннотация

Обзор посвящен обобщению результатов экспериментальных исследований устойчивости раковых клеток к действию противоопухолевых препаратов. Охарактеризованы медико-биологические аспекты формирования устойчивости раковых клеток к лечебным препаратам. Приведены общие механизмы формирования резистентности клеток к лекарствам. Рассмотрена проблема множественной резистентности. Рассмотрены одни из наиболее изученных механизмов, клиническое значение которых для формирования устойчивости является доказанным, в частности, роль Р-гликопротеина и глутатиона.

Ключевые слова: рак, резистентность к лекарствам, множественная резистентность клеток, противоопухолевые препараты, биохимия.

**Hryshchuk R.Ya., Koval S.V.,
Shein A.V., Mizernyi R.A., Ovechko M.E.**

National Medical University named after A.A. Bogomolets

MECHANISMS OF RESISTANCE CANCER CELLS TO ANTINEOPLASTIC DRUGS

Summary

The review is devoted to the generalization of experimental results related to the development of cancer cells resistance to the action of anticancer drugs. In the review, the biomedical aspects of the problem connected with formation of cancer cells resistance to therapeutics are characterized. There were presented the general mechanisms of cell resistance to drugs. The most studied mechanisms, the clinical significance of which on the resistance formation is proven, especially the role of p-glycoprotein and glutathione, are analyzed.

Keywords: cancer, drug resistance, multidrug resistant cells, anticancer drugs, biochemistry.