

УДК 616.091:616-006

**Е. М. Андреева, Н. Л. Миронова, О. А. Шкляева,  
Н. А. Попова, М. А. Зенкова**

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН  
просп. Лаврентьева, 8, Новосибирск, 630090, Россия  
Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск  
просп. Лаврентьева, 10, Новосибирск, 630090, Россия  
E-mail: aem@ngs.ru

### **УЧАСТИЕ ГЕНОВ *MDR1A*, *MDR1B*, *P53* И *BCL-2* В ФОРМИРОВАНИИ УСТОЙЧИВОСТИ КЛЕТОК ЛИМФОСАРКОМЫ RLS МЫШЕЙ К ТЕРАПЕВТИЧЕСКОМУ ДЕЙСТВИЮ ЦИКЛОФОСФАНА**

Возникновение лекарственной устойчивости опухолей связывают в частности с нарушениями экспрессии генов, белковые продукты которых вовлечены в механизмы апоптоза (*p53*, *bcl-2*) или в транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану (*mdr1a*, *mdr1b*). В работе проведено сравнение уровня экспрессии генов *mdr1a*, *mdr1b*, *p53* и *bcl-2* методом ОТ-ПЦР в клетках первичных культур опухолей, полученных из перевиваемых лимфосарком LS и RLS мышей. Опухоль LS чувствительна к апоптогенному действию циклофосфана. Опухоль RLS, полученная из опухоли LS путем пассирования на низких концентрациях циклофосфана, резистентна к терапевтическому действию высоких концентраций циклофосфана. Показано, что для опухоли RLS по сравнению клетками опухоли LS характерны повышенные уровни экспрессии генов *mdr1b* и *bcl-2* и пониженные – *mdr1a* и *p53*. Все это свидетельствует о значительной гетерогенности клеток, составляющих опухоль, которая позволяет ей адаптироваться к изменяющимся условиям и приобретать фенотип множественной лекарственной устойчивости. Таким образом, выбор адекватной схемы лечения, применение которой не способствовало бы появлению опухолевых клеток с лекарственной устойчивостью, является вопросом чрезвычайной важности.

*Ключевые слова:* множественная лекарственная устойчивость, лимфосаркома мышей, циклофосфан; гены *mdr1a*, *mdr1b*, *p53*, *bcl-2*.

Лекарственная устойчивость является значительным препятствием на пути успешного лечения злокачественных новообразований. Исследования последних лет показали, что молекулярные механизмы лекарственной устойчивости разнообразны: она может определяться включением механизмов, характеризующих разные этапы осуществления токсического действия химиопрепарата на клетку – от ограничения накопления вещества внутри клетки до отмены программы гибели клетки, индуцируемой веществом [1].

Снижение накопления цитотоксического препарата в клетке может быть результатом увеличения скорости его выведения. Главную роль в этом процессе отводят трансмембранному белку Р-гликопротеину, который функционирует как энергозависимый насос, способный выводить из клетки широкий спектр цитотоксических веществ [2]. Р-гликопротеин является продуктом гена *mdr1*, увеличение уровня экспрессии кото-

рого коррелирует с приобретением опухолевыми клетками фенотипа множественной лекарственной устойчивости [3].

С другой стороны, эффективность терапевтического действия ряда противораковых препаратов зависит от способности этих веществ запускать в чувствительных опухолевых клетках апоптоз [4] и, следовательно, какие-либо нарушения механизмов апоптоза в малигнизированных клетках могут повлечь за собой устойчивость к химиопрепаратам. К наиболее часто встречающимся нарушениям относят изменение уровня экспрессии гена онкосупрессора *p53* и антиапоптотического гена *bcl-2* [5; 6].

В нашем распоряжении есть две перевиваемые лимфосаркомы LS и RLS мышей, которые характеризуются оппозитной чувствительностью к терапевтическому действию циклофосфана: опухоль LS является высокочувствительной, а RLS – резистентной. Причем терапевтический эффект циклофосфана на клетки опухоли LS опосреду-

ется запуском в них апоптоза [7]. Субштамм RLS был получен из LS путем многократных внутримышечных перевивок рецидивов этой опухоли, возникающих после воздействия циклофосфаном при постепенном повышении дозы. Подобное приобретение устойчивости к противоопухолевым препаратам после курса химиотерапии широко распространено и в клинической практике [8].

**Целью** работы являлось сравнение уровня экспрессии генов *mdr1a*, *mdr1b*, *p53* и *bcl-2*, способных приводить к формированию фенотипа множественной лекарственной устойчивости, в двух субштаммах лимфосаркомы LS и RLS мышей.

### Материал и методы

Определение активности противоопухолевых препаратов *in vivo*. В опытах использованы четырехмесячные самцы мыши линии CBA/Lac (CBA), полученные в виварии Института цитологии и генетики СО РАН. Их содержали группами по 8 особей одного пола в пластиковых боксах при естественном режиме освещения и обеспечивали им свободный доступ к воде и пище. В работе использовали перевиваемые субштаммы LS и RLS лимфосаркомы мышей, которые поддерживаются в асцитной форме. Оценку активности противоопухолевых препаратов проводили на внутримышечных трансплантатах опухолей. На 10-й день после прививки опухоли животным однократно внутривенно вводили циклофосфан (циклофосфамид; «Биохимик», Россия) в дозе 150 мг/кг или адриабластин (адриамицин; «Pharmacia & Upjohn», Италия) в дозе 16 мг/кг. Противоопухолевую активность препаратов оценивали по торможению роста опухоли (ТРО), определяемому на 6-й день после введения препарата по следующей формуле:

$$\text{ТРО} = (M_k - M_3) / M_k \times 100 \%,$$

где  $M_k$  и  $M_3$  – средние значения массы опухоли у контрольных и экспериментальных животных соответственно.

Первичные культуры клеток LS и RLS получали из асцитных форм соответствующих опухолей. Клетки культивировали при температуре 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Использовали среду для культивирования IMDM («Sigma», США), содержащую 10 %

эмбриональную бычью сыворотку и 1 % раствор антибиотиков.

Чувствительность клеток первичных культур LS и RLS к цитостатикам (винбластин, цитарабин и доксорубин) определяли с помощью МТТ теста [9]. Оптическую плотность образцов определяли при длине волны 570 нм на многоканальном спектрофотометре MicroPlate Reader («ThermoLabsystems», Финляндия).

Уровень экспрессии мРНК генов определяли методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР). Для этого из клеток культивируемых линий LS и RLS выделяли суммарную РНК [10]. Далее проводили синтез кДНК в буфере с использованием суммарной клеточной РНК, рандомизированного праймера и обратной транскриптазы М-MLV (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) при 37 °С в течение одного часа. Полученные образцы кДНК сразу же использовали для проведения ПЦР.

ПЦР проводили на амплификаторе Hybaid OMN-E («Hybaid», Англия) в буфере с использованием кДНК, полученной с суммарной клеточной РНК, термостабильной ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus* (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) и ген-специфичных праймеров (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск), последовательность которых приведена в табл. 1. Праймеры к  $\beta$ -актину добавляли в реакционную смесь, содержащую праймеры к исследуемому гену, после 5-го цикла ПЦР. Всего было проведено 28 (для генов *mdr1a* и *mdr1b*) и 31 (для генов *bcl-2* и *p53*) циклов амплификации при следующих условиях: денатурация – 95 °С, 1 мин; отжиг – 57 °С, 1 мин; синтез – 72 °С, 1 мин.

Продукты ПЦР разделяли с помощью электрофореза в 8 % полиакриламидном геле для генов *mdr1a* и *mdr1b* и в 2 % агарозном геле для *bcl-2* и *p53*. Гель окрашивали бромистым этидием, фотографировали в ультрафиолетовом свете с последующей компьютерной денситометрией (Gel-Pro Analyzer 4.0). Для определения уровня экспрессии мРНК интегральную оптическую плотность (ИОП) полос, соответствующих ген-специфическим ПЦР продуктам, нормировали на ИОП  $\beta$ -актин специфического продукта.

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета

Таблица 1. Последовательность ген-специфичных праймеров, использованных для проведения ПЦР

Ген	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера	Длина получаемого продукта ПЦР (п. н.)
<i>mdr1a</i>	5'gcaggttgctagacaggtgtg3'	5'gagcgccactccatggataa3'	69
<i>mdr1b</i>	5'ctgctgtggcgtatttggg3'	5'tggcagaatactggcttctgct3'	121
$\beta$ -актин*	5'agccatgtacgtacccatcca3'	5'tctccggagtccatcacaaatg3'	81
<i>bcl-2</i>	5'tcgcagagatgtccagtcagc3'	5'catcccagcctccgttatcc3'	255
<i>p53</i>	5'gaaccgccgacctatccttac3'	5'gtttgggcttctccttgat3'	412
$\beta$ -актин**	5'tctccctcacgccatcct3'	5'tccgcctagaagcacttgc3'	625

Примечание: Праймеры к  $\beta$ -актину, использованные в реакционной смеси при проведении ПЦР для определения уровня экспрессии мРНК генов: \* – *mdr1a* или *mdr1b*; \*\* – *bcl-2* или *p53*.

программ Statistica: различия между группами оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

### Результаты исследования и обсуждение

Оценка активности химиопрепаратов *in vivo*, проведенная на внутримышечных трансплантатах опухолей, показала, что после внутривенного введения 150 мг/кг циклофосфана мышам, лимфосаркома LS полностью регрессировала. Торможение роста опухоли LS в этом случае составило 100 %, тогда как введение такой же дозы циклофосфана животным затормаживало развитие лимфосаркомы RLS только на 42 %. Однако лимфосаркома LS оказалась менее чувствительной к противоопухолевому антибиотику адриабластину: его введение приводило к торможению роста опухоли на 83 %; ТРО после введения адриабластина для опухоли RLS составило 51 %.

Исследование чувствительности клеток первичных культур LS и RLS к цитостатикам, широко используемым в противораковой химиотерапии, и определение дозы препаратов, вызывающих гибель 50 % клеток ( $IC_{50}$ ) при инкубации с препаратами в течение 2-х суток, проведенное с помощью МТТ-теста, показало, что  $IC_{50}$  винбластина в 1,48, доксорубицина – в 2,86 и цитарабина – в 1,59 раза больше для клеток линии RLS по сравнению с клетками исходного субштамма лимфосаркомы LS (табл. 2). Таким образом, RLS, прошедшая селекцию под действием возрастающих доз циклофосфана *in vivo*, приобрела устойчивость *in vivo* к адриабластину, а также к винбластину, доксорубицину и цитарабину *in vitro*.

Анализ методом ОТ-ПЦР выявил, что все исследуемые гены (*mdr1a*, *mdr1b*, *p53* и *bcl-2*) экспрессируются как в клетках исходного субштамма лимфосаркомы LS, так и в клетках резистентной опухоли RLS (рис. 1, А). Однако уровни экспрессии этих генов существенно отличаются: экспрессия мРНК гена *mdr1b* в 2,5, а *bcl-2* – в 6,7 раза выше в клетках линии RLS по сравнению с клетками линии LS; в то время как экспрессия мРНК генов *mdr1a* и *p53* ниже в 4,0 и 2,0 раза соответственно (рис. 1, Б). Таким образом, мы видим изменение уровней экспрессии всех исследуемых генов в клетках лимфосаркомы RLS по сравнению с клетками исходной лимфосаркомы LS.

Полученные различия по экспрессии мРНК генов *bcl-2* и *p53* представляются закономерными. Исходя из представления, что опухоль представляет собой гетерогенную популяцию клеток, очевидно, что после воздействия низких доз химиопрепарата преимущество получают те клетки, которые способны избежать цитотоксического эффекта. При попадании в организм опухоленосителя циклофосфан, как и многие другие лекарственные препараты, подвергается метаболическим изменениям, протекающим преимущественно в клетках печени, а также некоторых опухолей и приводящих к образованию фосфорамид мустарда [11]. Последний является активным алкилирующим агентом и способен приводить к образованию поперечных связей в молекуле ДНК. Такое повреждение ДНК приводит к активации *p53* и запуску апоптоза по так называемому внутреннему пути [12]. Одним из промежуточных эффекторов осуществления этого механизма апоптоза являются митохондрии, во внешнюю мембрану которых встраиваются белки-каналы, принадлежащие

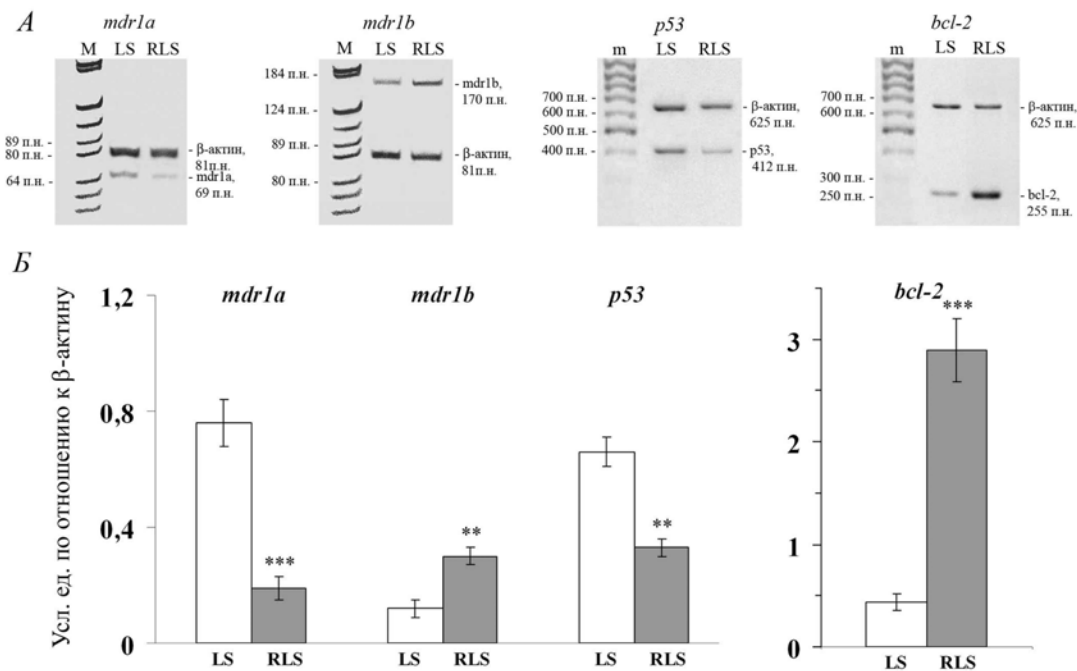


Рис. 1. Уровни экспрессии мРНК генов *mdr1a*, *mdr1b*, *p53* и *bcl-2* в клетках первичных культур LS и RLS:

А – электрофоретический анализ продуктов ОТ-ПЦР в 8 % нативном полиакриламидном геле (*mdr1a* и *mdr1b*) и в 2 % агарозном геле (*bcl-2* и *p53*) с последующим окрашиванием бромистым этидием, ген  $\beta$ -актина использован в качестве внутреннего контроля. М – маркер длины фрагментов ДНК pBR322 DNA / BsuRI (HaeIII), Fermentas, Литва, m – маркер длины фрагментов ДНК GeneRuler™ 50bp DNA Ladder (Fermentas, Литва);

Б – количественная обработка результатов ОТ-ПЦР (\*\* –  $p < 0,01$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  по сравнению с клетками линии LS)

Таблица 2. Чувствительность клеток первичных культур LS и RLS к цитостатикам (определение  $IC_{50}$ ) (нМ)

Линия	$IC_{50}$		
	Винбластин	Доксорубицин	Цитарабин
LS	4,2 ± 0,4	81,9 ± 6,6	397,0 ± 10,6
RLS	6,2 ± 0,5*	234,4 ± 11,2***	632,0 ± 6,9***

Примечание:  $IC_{50}$  – концентрация препарата, при которой погибает 50% клеток; \* –  $p < 0,05$ , \*\*\* –  $p < 0,001$  по сравнению с клетками первичной культуры LS.

к проапоптотическим членам семейства *Bcl-2*. В результате этих событий из-за обводнения матрикса происходит разрыв внешней мембраны митохондрий и выход в цитоплазму цитохрома С. Цитохром С, соединяясь с фактором Araf-1, способен активировать иницирующую каспазу 9, которая, в свою очередь, активирует эффекторные каспазы, приводя к осуществлению процесса апоптоза в клетке [13]. Если считать, что именно такой механизм работает на самом деле, то в отборе под влиянием циклофосфана будут выигрывать те клетки, у которых снижена экспрессия гена *p53*, воспринимающего повреждения ДНК и/или повышена экспрессия антиапоптотического

гена *bcl-2*, белковый продукт которого препятствует образованию каналов в мембране митохондрий, а следовательно, препятствует и запуску апоптоза.

Что касается уровней экспрессии генов *mdr1a* и *mdr1b* в клетках опухолей LS и RLS, то здесь не все представляется очевидным. Известно, что для белкового продукта этих генов – Р-гликопротеина – циклофосфан и его метаболиты не являются специфическими субстратами [14], поэтому увеличение уровня экспрессии гена *mdr1b* в клетках лимфосаркомы RLS не может быть объяснено с точки зрения увеличения выведения цитотоксических веществ из клетки.

Повышенный уровень экспрессии гена *mdr1a* объясняет относительную устойчивость клеток лимфосаркомы LS к действию адриабластина *in vivo* (адриабластин входит в число специфических для Р-гликопротеина субстратов) [14]. Однако экспрессия этого гена в клетках RLS снижается в 4 раза, а для этой опухоли характерна еще меньшая чувствительность к цитостатикам – субстратам Р-гликопротеина как *in vivo*, так и *in vitro*.

Для того чтобы объяснить полученные данные, необходимо предположить, что:

1) циклофосфан или, по крайней мере, его метаболиты, все же являются субстратом для Р-гликопротеина (пусть с невысокой степенью специфичности), причем для Р-гликопротеина, кодируемого геном *mdr1b*. Только в этом случае под давлением циклофосфана будут получать преимущество те клетки, у которых повышен уровень экспрессии этого гена;

2) Р-гликопротеин, кодируемый геном *mdr1b*, вносит гораздо больший вклад в возникновение множественной лекарственной устойчивости лимфосаркомы RLS, чем кодируемый геном *mdr1a* (при других условиях исходный субштамм опухоли LS должен не отличаться или даже быть менее чувствительным к цитостатикам – субстратам Р-гликопротеина, чего на самом деле мы не наблюдаем). То, что Р-гликопротеины, кодируемые разными генами (*mdr1a* и *mdr1b*) отличаются по специфичности к субстратам, описано некоторыми исследователями [15]. А то, что циклофосфан или его метаболиты являются субстратами для Р-гликопротеина, требует дальнейшего исследования.

### Заключение

Анализ изменения профиля экспрессии генов в клетках лимфосаркомы RLS по сравнению с клетками исходного субштамма LS показал, что появлению резистентности к химиопрепаратам как *in vivo*, так и *in vitro* способствует, по крайней мере, повышение экспрессии генов *mdr1b* и *bcl-2*, а также снижение экспрессии гена *p53*. Все это свидетельствует о значительной гетерогенности клеток, составляющих опухоль, которая позволяет ей адаптироваться к из-

меняющимся условиям. Поэтому выбор адекватных методов химиотерапии, применение которых не способствовало бы появлению опухолевых клеток, обладающих фенотипом множественной лекарственной устойчивости, представляется чрезвычайно важным не только для экспериментальной, но и для клинической медицины.

### Список литературы

1. Ставровская А. А. Клеточные механизмы множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток // Биохимия. 2000. Т. 1. С. 112–126.
2. Ford J. M., Hait W. N. Pharmacology of drugs that alter multidrug resistance in cancer // Pharmacology Reviews. 1990. Vol. 42. P. 155–199.
3. Garraway L. A., Chabner B. MDR1 inhibition: less resistance or less relevance? // European Journal of Cancer. 2002. Vol. 38. P. 2337–2340.
4. Fisher D. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold // Cell. 1994. Vol. 78. P. 539–542.
5. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents / P. M. O'Connor, J. Jackman, I. Bae et al. // Cancer Research. 1997. Vol. 57. P. 4285–4300.
6. Dive C. Avoidance of apoptosis as a mechanism of drug resistance // Journal of Internal Medicine. 1997. Vol. 740. Suppl. P. 139–145.
7. Циклофосфамид-индуцированный апоптоз клеток мышины лимфосаркомы в условиях *in vivo* / В. И. Каледин, В. П. Николин, Т. А. Агеева и др. // Вопр. онкологии. 2000. Т. 46, № 5. С. 588–593.
8. Changes in neoplastic cell features and sensitivity to mitotane during mitotane-induced remission in a patient with recurrent, metastatic adrenocortical carcinoma / M. Seki, K. Nomura, D. Hirohara et al. // Endocrine-Related Cancer. 1999. Vol. 6. P. 529–533.
9. Evaluation of a tetrazolium-based semi-automated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing / J. Carmichael, W. G. DeGraff, A. F. Gazdar et al. // Cancer Research. 1987. Vol. 47. P. 936–942.

10. *Chattopadhyay N. et al.* Inexpensive SDS / phenol method for RNA extraction from tissues / N. Chattopadhyay, R. Kher, M. Godbole // *Biotechniques*. 1993. Vol. 15. P. 24–26.

11. *Boddy A. V., Yule S. M.* Metabolism and pharmacokinetics of oxazaphosphorines // *Clinical Pharmacokinetics*. 2000. Vol. 38. P. 291–304.

12. *Schwartz P. S., Waxman D. J.* Cyclophosphamide induces caspase 9-dependent apoptosis in 9L tumor cells // *Molecular Pharmacology*. 2001. Vol. 60. P. 1268–1279.

13. *Green D. R., Reed J. C.* Mitochondria and apoptosis // *Science*. 1998. Vol. 281. P. 1309–1312.

14. *Sakaeda T. et al.* MDR1 Genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics / T. Sakaeda, T. Nakamura, K. Okumura // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2002. Vol. 25. P. 1391–1400.

15. *Alternate* overexpression of two phosphoglycoprotein genes is associated with changes in multidrug resistance in a J774.2 cell line / L. Lothstein, S. I-Hong Hsu, S. B. Horwitz et al. // *The Journal of Biological Chemistry*. 1989. Vol. 264. P. 16054–16058.

*Материал поступил в редколлегию 28.02.2006*

E. M. Andreeva, N. L. Mironova, O. A. Shklyayeva, N. A. Popova, M. A. Zenkova

**Implication *mdr1a*, *mdr1b*, *p53* and *bcl-2* genes in resistance of mice lymphosarcoma RLS to therapeutic effect of cyclophosphamide**

Molecular mechanisms of drug resistance were shown to be diverse. It can be associated with the alteration in the expression of genes coding family of transmembrane transporter proteins (*mdr1a*, *mdr1b*) or proteins involving in the execution of apoptosis (*p53*, *bcl-2*). In this work we compare expression of the *mdr1a*, *mdr1b*, *p53* and *bcl-2* genes in the cells of tumor primary cultures that were obtained from transplantable mice lymphosarcomas LS and RLS. LS tumor displays high sensitivity to therapeutic effect of cyclophosphamide. Lymphosarcoma RLS was derived from lymphosarcoma LS by passing at low concentration of cyclophosphamide in mice. This tumor displays resistance to high dose of cyclophosphamide. We have shown that RLS tumor is characterized by high level of expression of the *mdr1b* and *bcl-2* genes and low expression level of *mdr1a* and *p53* genes as compared with LS tumor. So we can conclude that population of tumor cells is very heterogeneous, that resulting in tumor possibility to adapt to variable injurious conditions and to acquire multidrug resistance phenotype. Thus, the choice of adequate therapy is very important.

*Keywords:* multidrug resistance, mice lymphosarcoma, cyclophosphamide; *mdr1a*, *mdr1b*, *p53*, *bcl-2* genes.