

Белки множественной лекарственной резистентности Pgp, MRP и BCRP как маркеры снижения эффективности тамоксифена при лечении рака молочной железы

Т.А. Богуш, Е.А. Дудко, Е.А. Богуш, Б.Е. Полоцкий, С.А. Тюляндин, М.И. Давыдов

РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Контакты: Татьяна Анатольевна Богуш bogush@med.chem.msu.ru

Изучено влияние антиэстрогена тамоксифена на взаимодействие моноклональных антител с маркерами множественной лекарственной резистентности: с Pgp и MRP1 — в культуре клеток T-лимфобластного лейкоза линии Jurkat; с BCRP — в культуре клеток рака шейки матки линии HeLa. В работе использованы методы иммунофлуоресцентного анализа и проточной цитофлуориметрии, первичные или вторичные моноклональные и изотипические антитела, меченные флуоресцентными красителями FITC и PE. После воздействия тамоксифена выявлено увеличение специфической флуоресценции и числа специфически флуоресцирующих клеток при инкубации с антителами к Pgp и BCRP, а также уменьшение показателей — при инкубации с антителами к MRP1. Это является прямым указанием на связывание тамоксифена с Pgp, BCRP и MRP1, результатом чего неизбежно станет снижение внутриклеточной концентрации антиэстрогена, доступного для взаимодействия с другими клеточными мишенями, в том числе и с рецепторами эстрогена. Авторы считают, что существуют все основания для того, чтобы рассматривать Pgp, BCRP и MRP1 в качестве маркеров снижения эффективности тамоксифена при лечении рака молочной железы с положительным статусом рецепторов эстрогена.

Ключевые слова: тамоксифен, белки множественной лекарственной резистентности, Pgp, MRP1, BCRP, рак молочной железы, предиктивные маркеры

The multidrug resistance proteins Pgp, MRP, and BCRP as markers for lowering the efficacy of tamoxifen in the treatment of breast cancer

T.A. Bogush, E.A. Dudko, E.A. Bogush, B.E. Polotsky, S.A. Tyulyandin, M.I. Davydov

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow

The antiestrogen tamoxifen was examined for its effect on the interaction of monoclonal antibodies with the multidrug resistance markers: with Pgp and MRP1 in the cultured T-lymphoblast leukemia cell line Jurkat and with BCRP in the cultured cervical cancer cell line HeLa. The investigation used immunofluorescence and flow cytometric assays, primary monoclonal and isotypic antibodies labeled with the fluorescent dyes FITC and PE. After tamoxifen use, there was an increase in specific fluorescence and the number of specifically fluorescent cells on incubation with Pgp and BCRP antibodies and a reduction in those on incubation with MRP1 antibodies. This directly indicates that tamoxifen binds to Pgp, BCRP, and MRP1, which inevitably results in a decrease in the intracellular concentration of the antiestrogen available for the interaction with other cellular targets, including that with estrogen receptors. The authors consider that there is every reason to consider Pgp, BCRP, and MRP1 as markers for lowering the efficacy of tamoxifen in the treatment of breast cancer with the positive estrogen receptor status.

Key words: tamoxifen, multidrug resistance proteins, Pgp, MRP1, BCRP, breast cancer, predictive markers

Введение

Несмотря на стремительное развитие гормональной противоопухолевой терапии и связанное с этим появление новых эффективных лекарств, тамоксифен является одним из наиболее ярких и неизменно эффективных «долгожителей» среди лекарственных препаратов, которые используют при лечении злокачественных новообразований. Это многолетний, так называемый золотой

стандарт, применяющийся при лечении рака молочной железы (РМЖ) с положительным статусом рецепторов эстрогена (РЭ). Тамоксифен — первый и наиболее «старый» таргетный препарат, который по-прежнему занимает лидирующую позицию в лечении РМЖ. При этом главным ограничением эффективности тамоксифена является врожденная и индуцированная в ходе терапии устойчивость к антиэстрогену.

Одна из возможных причин этого заключается в изменении структуры РЭ в опухоли, что делает невозможным взаимодействие их с тамоксифеном и, таким образом, препятствует проявлению антиэстрогенной активности последнего.

Определенную роль может играть и нарушение обширного спектра мишеней тамоксифена, отличных от РЭ, результатом чего является изменение воздействия антиэстрогена на различные ключевые точки сигнальных каскадов, активирующих пролиферацию клетки. Ниже представлены важнейшие молекулярные мишени тамоксифена.

Протеинкиназа С (ПКС) — это специфическая серин-треонин-протеинкиназа, которая экспрессируется практически во всех клетках млекопитающих и играет исключительно важную роль в передаче внутриклеточных сигналов. Субстратами ПКС в различных клетках служат ядерные белки, белки цитоскелета, ферменты. ПКС принимает участие в передаче широкого набора внешних сигналов, в том числе ряда сигналов, регулирующих клеточный рост.

На культурах клеток рака предстательной железы (РПЖ) человека РС3 и РС3-М выявлен цитотоксический эффект тамоксифена, который на молекулярном уровне был ассоциирован с понижением активности ПКС, последующей индукцией p21(waf1/cip1), дефосфорилированием Rb и остановкой клеточного цикла в фазе G1/S, причем такой же эффект давал и специфический ингибитор ПКС Ro31-8220 [1]. Подобное действие антиэстроген проявляет и в других типах опухолевых клеток, таких как гепатоклеточная карцинома [2] и астроцитомы [3]. Ингибирующее воздействие тамоксифена на ПКС показано и в экспериментах на клеточных линиях злокачественных глиом [4]. На способности ингибировать рост клеток глиом в культуре и снижать активность ПКС основывается применение тамоксифена в клинической практике при лечении опухолей головного мозга.

На культуре клеток РМЖ MCF-7 установлено, что антипролиферативное свойство тамоксифена связано с непосредственным взаимодействием с ПКС-эпсилон, ассоциированной с процессами дифференцировки и роста опухолевых клеток [5].

Значительный вклад в цитотоксичность тамоксифена вносит способность его активировать процессы программированной клеточной гибели — апоптоз [6]. При этом ингибирование путей трансдукции сигналов от фосфолипаз С и D, а также от ПКС под влиянием тамоксифена является одним из возможных механизмов, не зависящих от экспрессии РЭ. Отмечена способность тамоксифена индуцировать апоптоз посредством активации каспаз 8 и 9 в клетках РПЖ, не экспрессирующих РЭ [7]. Один из метаболитов тамоксифена — 4-гидрокси-

тамоксифен — стимулирует апоптоз в стромальных клетках предстательной железы [8]. Совместное применение тамоксифена и TRAIL (индуцирующего апоптоз лиганда, ассоциированного с фактором некроза опухоли — ФНО) приводит к уменьшению уровня антиапоптотических белков FLIP и Bcl-2 и увеличению уровня проапоптотических белков FADD, tBid, Вах, каспаз 8 и 9 в опухолях молочной железы независимо от статуса РЭ [9].

Митохондриальный путь активации программы апоптоза считают преобладающим при гибели клеток собственно в митозе. По данным исследования R. Nazarewicz et al. [10], тамоксифен способен стимулировать апоптоз и окислительный стресс посредством зависимого от митохондрий и NO-зависимого пути активации, при котором происходит увеличение концентрации Ca^{+2} в митохондриях. В результате стимуляции тамоксифеном митохондриальной NO-синтетазы наступает угнетение митохондриального дыхания, уменьшается высвобождение цитохрома С, повышается перекисное окисление липидов в митохондриях и снижается агрегация митохондрий [11, 12]. В результате этих процессов наступает апоптоз опухолевых клеток, который завершается образованием апоптотических телец и их фагоцитозом.

В качестве II типа программированной гибели клеток в настоящее время выделяют гибель клеток, при которой запускается программа аутофагии, т. е. деградация органелл и цитоплазматического материала при участии внутриклеточных мембранных структур. При использовании различных селективных модуляторов РЭ (в том числе и тамоксифена) происходит зависимое от дозы ингибирование клеточной гибели II типа [13]. В последующих работах продемонстрировано, что процесс активации аутофагии тамоксифеном начинается с деполимеризации актина и промежуточных филаментов [14]. Подтверждение того, что тамоксифен вызывает активацию аутофагии, получено также в серии работ, выполненных на клеточных линиях первичного и метастатического РМЖ [15], рака толстой кишки [16], а также лимфомы [17].

К III типу клеточной гибели, на который оказывает влияние тамоксифен, относят программированный некроз. Индуцировать некроз можно, если активировать программу апоптоза связыванием таких лигандов, как относящийся к семейству ФНО белок Fas, упоминавшийся выше TRAIL, а также вызывая гиперэкспрессию проапоптотического белка Вах, одновременно либо ингибируя активность каспаз, либо вызывая гиперэкспрессию антиапоптотических белков. Тамоксифен индуцирует апоптоз в опухолевых клетках, содержащих рецепторы к Fas, посредством регулирования экс-

прессии Fas-лиганда. Этим механизмом объясняют селективную стимуляцию апоптоза в остеокластах, предотвращающую возникновение резорбции костной ткани и развитие остеопороза [18].

Если проанализировать, в каких фазах клеточного цикла возможен тот или иной вариант гибели клеток, то складывается следующая картина. В отличие от апоптоза, который может возникать в разных фазах клеточного цикла, в том числе и собственно в митозе в форме митотической катастрофы, аутофагической гибели подвержены преимущественно непролиферирующие клетки. Однако если в пролиферирующих клетках подавлены механизмы апоптоза, например, инактивированы каспазы, то гибель пролиферирующих клеток осуществляется по механизму программированного некроза. Таким образом, комбинация различных вариантов клеточной гибели, индуцированной тамоксифеном, свидетельствует о гетерогенном воздействии антиэстрогена на опухоли.

В настоящее время общепризнано, что ангиогенез является необходимым условием для роста злокачественных опухолей и развития метастазов. В литературе накоплено большое число данных о том, что тамоксифен обладает антиангиогенными свойствами наравне с другими антиангиогенными препаратами [19]. В 2003 г. тамоксифен был включен в группу таргетных антиангиогенных препаратов [20].

Способность тамоксифена ингибировать ангиогенез испытана на классических моделях, используемых для изучения антиангиогенных свойств (исследование плотности микрососудов в фибросаркоме крыс, сосудистого «ростка» аортального кольца и хориоаллантаической оболочки куриного яйца и роговицы кроликов). Эффект подавления образования сосудов тамоксифеном широко изучен в исследованиях *in vivo* и *in vitro* и продемонстрирован на опухолевых моделях с/без экспрессии РЭ [21].

Существует несколько механизмов, объясняющих антиангиогенный эффект тамоксифена: способность ингибировать циклинзависимый рост эндотелиальных клеток [22], модулирование трансформирующего фактора роста-1 (TGF-1) в клетках РМЖ [23], ингибирование фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и основного фактора роста фибробластов (bFGF) [24].

VEGF служит ключевым фактором в промоции опухолевого ангиогенеза. Экспрессия VEGF усиливается в ответ на гипоксию, активацию онкогенов и различных цитокинов. VEGF вызывает пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, ингибирует апоптоз. Так, например, в тканях РМЖ экспрессия мРНК VEGF увеличена по сравнению с таковой в нормальной ткани.

Антиангиогенная активность антиэстрогенных препаратов (тамоксифен, нафоксидин, кломифен и ICI 182,780) не связана с наличием в опухоли РЭ, а обусловлена непосредственным ингибированием VEGF и bFGF, что описано в работе на 6-дневной модели хориоаллантаической мембраны куриного яйца. Помимо этого, показано, что тамоксифен ингибирует секрецию VEGF в клетках РМЖ человека линии MCF-7 с экспрессией РЭ [24].

Множество эффектов тамоксифена, не связанных с РЭ, порождает и множество причин, приводящих к снижению его эффективности в опухолях с экспрессией РЭ. Помимо нарушения воздействия тамоксифена на упомянутые выше клеточные мишени, резистентность к препарату может быть обусловлена активацией в опухолевой клетке сигнальных каскадов Ras/Raf/MAPK [25] и PI3K/Akt [26], транскрипционного фактора Nf-κB [27], факторов роста семейства ErbB [28], которые приводят к стимуляции пролиферации клеток не зависимым от эстрогенов путем. В последнее время широко обсуждается снижение эффективности тамоксифена при лечении РЭ+ РМЖ с экспрессией Her-2 [29].

В ходе анализа данных литературы мы пришли к заключению, что по крайней мере еще одной из причин, обуславливающих резистентность к тамоксифену, может быть экспрессия в опухолевых клетках маркеров множественной лекарственной резистентности — транспортных белков, осуществляющих выброс противоопухолевых препаратов из клеток. Основанием для этого послужили следующие факты. В экспериментах на культурах клеток и в опытах на животных показано, что тамоксифен усиливает специфическую активность ряда цитостатиков в отношении разных опухолей с фенотипом множественной лекарственной резистентности, ассоциированной с экспрессией одного из главных маркеров — Pgp [30, 31]. Кроме того, в различных опухолевых клетках отмечены взаимодействие тамоксифена с Pgp и конкуренция между рядом противоопухолевых препаратов, верапамилом и тамоксифеном за связывание с Pgp, что, по видимому, и приводит к появлению описанного феномена [32, 33].

Клинические наблюдения эффективности тамоксифена как ингибитора устойчивости, в том числе и к противоопухолевым препаратам с классическим механизмом множественной лекарственной резистентности, также свидетельствуют в пользу возможного взаимодействия тамоксифена с транспортными белками, осуществляющими выброс цитостатиков из клеток [34, 35].

С учетом этих факторов возникает вопрос: как может влиять взаимодействие тамоксифена с Pgp, а возможно и с другими транспортными белками

множественной лекарственной резистентности — MRP, BCRP и LRP, на эффект самого тамоксифена? Представляется очевидным, что в РЭ+-опухолях молочной железы с фенотипом множественной лекарственной резистентности конкуренция транспортных белков с РЭ за связывание тамоксифена может привести к уменьшению активной внутриклеточной концентрации антиэстрогена, взаимодействующего с рецепторами, а следовательно — к снижению антиэстрогенной эффективности тамоксифена.

Возможность существования такого механизма резистентности к тамоксифену исследована нами в прямых экспериментах с использованием метода проточной цитофлуориметрии при изучении влияния тамоксифена на взаимодействие моноклональных антител с маркерами множественной лекарственной резистентности — Pgp, MRP, BCRP.

Материалы и методы

Работа проведена на культурах опухолевых клеток человека с высоким уровнем экспрессии маркеров множественной лекарственной резистентности.

Клетки Т-лимфобластного лейкоза линии Jurkat культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки. Суспензию клеток в питательной среде осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 1500 об/мин и дважды промывали в фосфатном буферном растворе с pH 7,4.

Клетки рака шейки матки (РШМ) линии HeLa культивировали в среде DMEM, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки. Для получения одноклеточной суспензии монослой дважды промывали раствором фосфатного буфера с pH 7,4 и 20 мин инкубировали при температуре 37 °С с раствором Версена. Клетки снимали со дна флакона резиновым рабером, переносили в пробирку с раствором фосфатного буфера с pH 7,4 и пипетировали до получения одноклеточной суспензии.

Число клеток в полученных суспензиях подсчитывали в камере Горяева и доводили до концентрации 500 тыс./мл. Инкубацию с первичными и вторичными антителами проводили при температуре 4 °С по 30 мин соответственно. При оценке MRP1 в целях повышения проницаемости клеточной мембраны для антител в суспензию клеток добавляли Tween 20 до конечной концентрации 0,5% и инкубировали 20 мин при комнатной температуре с последующей отмывкой 10-кратным объемом фосфатного буферного раствора с pH 7,4.

В работе были использованы первичные моноклональные антитела, специфичные к внешнему эпитопу Pgp человека — мышинный иммуноглобулин класса IgG2a, клон 4E3 (Abcam), к MRP1 че-

ловека — мышинный IgG2a, клон MRPm5 (Abcam), к BCRP человека — мышинный IgG2b, клон 5D3, конъюгированный с флуоресцентным красителем PE (R&D). Также применяли изотипические — мышинный IgG2a (Abcam) и мышинный IgG2b, конъюгированный с PE (R&D) — и вторичные поликлональные антитела, меченные флуоресцентным красителем FITC, — к мышинному IgG2a, Fc-специфичные F(ab')₂ фрагменты (Sigma).

Первичные антитела к Pgp исследовали в диапазоне концентраций 0,3–10 мкг/мл, MRP1 — 0,3–5 мкг/мл. Вторичные антитела использовали в разведении 1:200. Антитела к BCRP изучали в концентрациях 0,6–5 мкг/мл.

При исследовании влияния тамоксифена (Sigma) на взаимодействие моноклональных антител с белками перед добавлением антител суспензию клеток инкубировали в течение 20 мин с антиэстрогеном в концентрации 50 мкМ.

Измерение флуоресценции проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson) с применением программного обеспечения FACSDiva 6.0. Для возбуждения флуоресценции использовали твердотельный лазер Coherent Sapphire с длиной волны испускаемого света 488 нм, регистрацию сигнала осуществляли по параметру FITC-H, который позволяет регистрировать флуоресценцию клеток, меченных флуорохромом FITC, при напряжении 500 В. Значение порога, отсекающего дебрисную фракцию, составляло 10 000, скорость ламинарного потока жидкости в капилляре была средней. Число анализируемых событий — 5000.

Количество специфически окрашенных клеток по сравнению с изотипическим контролем рассчитывали с помощью теста Колмогорова–Смирнова, встроенного в программу FlowJo, а интенсивность экспрессии — с применением программы WinMDI 2.9.

При микроскопическом исследовании регистрацию флуоресценции проводили на флуоресцентном микроскопе Nikon Eclipse Ti-S с увеличением объектов в 400 раз. Для получения фотографий и их цифровой обработки использовали программное обеспечение АСТ. Для возбуждения флуоресценции применяли фильтр 470/40 нм, а в качестве пропускающего — 535/50 нм.

Все эксперименты были проведены в ≥ 3 повторях.

Результаты

В качестве модели для изучения тамоксифена были выбраны клеточные линии с высоким уровнем экспрессии исследуемых белков, позволявшие четко выявить область линейной зависимости ин-

тенсивности флуоресценции и числа окрашенных клеток от концентрации антител. При работе в данной области можно увидеть как увеличение, так и уменьшение параметров окрашивания клеток моноклональными антителами к разным транспортным белкам, что и происходит при воздействии тамоксифена. По нашему мнению, такой подход повышает достоверность получаемых результатов и практически исключает ложноотрицательный ответ, который может быть получен при попадании в область нелинейной зависимости или отсутствия таковой при насыщающей концентрации антител.

Так, для клеток линии Jurkat (рис. 1а, з), специфически окрашенных антителами к Pgp, область линейной зависимости интенсивности флуоресценции и числа клеток лежит в диапазоне 1–5 мкг/мл антител. При этом количество специфически флуоресцирующих клеток увеличивается от 30 до 70 % соответственно, а превышение интенсивности специфической флуоресценции клеток по отношению к изотипическому контролю — с 2 до 3,2 раза.

Линейная зависимость интенсивности специфической флуоресценции и числа клеток линии Jurkat (рис. 1б, д), специфически окрашенных антителами к BCRP, выявлена в диапазоне 1,2–2,5 мкг/мл антител. При этих концентрациях количество окрашенных клеток составило 26 и 37 % соответственно, тогда как превышение интенсивности специфической флуоресценции клеток по отношению к изотипическому контролю — 1,5 и 2,2 раза.

Линейная зависимость интенсивности специфической флуоресценции и числа клеток линии HeLa, специфически окрашенных антителами к MRP1, лежит в диапазоне 0,6–2,5 мкг/мл антител (рис. 1в, е). При увеличении количества добавленных к клеткам моноклональных антител число специфически окрашенных клеток увеличивалось от 20 до 66 % соответственно, а интенсивность специфической флуоресценции по отношению к изотипическому окрашиванию возрастала в 1,2 и 2,5 раза.

Данные, представленные на рис. 2, демонстрируют влияние тамоксифена на параметры окрашивания клеток линии Jurkat при различных концентрациях моноклональных антител к Pgp. Видно, что в области линейной зависимости интенсивности флуоресценции от количества антител при воздействии тамоксифена интенсивность специфической флуоресценции клеток увеличилась. Максимальное превышение средней интенсивности флуоресценции клеток в 2,3 раза по сравнению с изотипическим контролем после инкубации с тамоксифеном отмечено при содержании антител 1,2 мкг/мл. После воздействия тамоксифена при этой концентрации специфических антител в 2,5 раза увеличилось и число флуоресцентно окрашенных клеток (см. рис. 2а, б).

На рис. 3 представлены примеры гистограмм распределения клеток по интенсивности специфической флуоресценции, демонстрирующие влияние

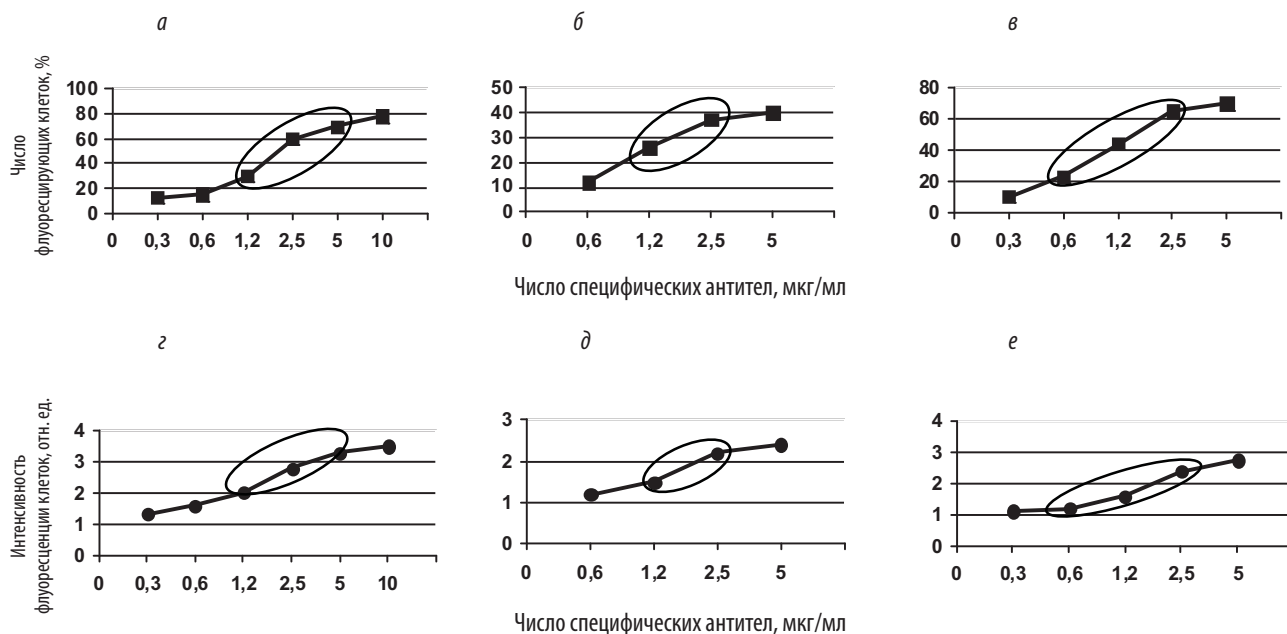


Рис. 1. Зависимое от концентрации моноклональных антител к Pgp, BCRP и MRP1 специфическое флуоресцентное окрашивание клеток человека — T-лимфобластного лейкоза линии Jurkat и РШМ линии HeLa: а, б, в — число флуоресцирующих клеток; г, д, е — интенсивность флуоресценции клеток; а, г — Pgp (Jurkat); б, д — BCRP (Jurkat); в, е — MRP1 (HeLa). Области линейной зависимости параметров флуоресцентного окрашивания клеток от концентрации антител выделены овалами

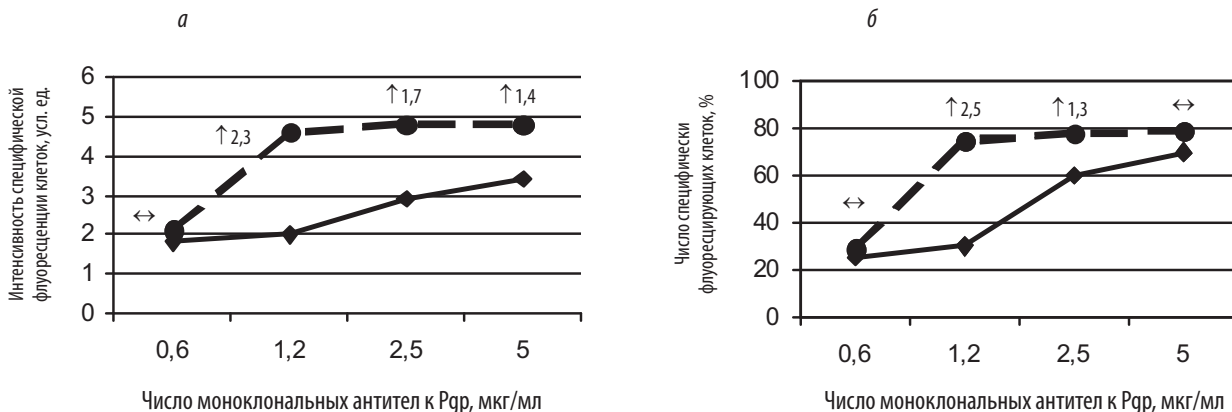


Рис. 2. Влияние тамоксифена на специфическое связывание моноклональных антител с Pgr в клетках T-лимфобластного лейкоза человека линии Jurkat: а — интенсивность специфической флуоресценции клеток; б — доля специфически флуоресцирующих клеток
 ■ — после инкубации с моноклональными антителами к Pgr;
 ● — после преинкубации с тамоксифеном и последующей инкубации с моноклональными антителами к Pgr
 Цифрами и стрелками указано изменение показателя при воздействии тамоксифена по сравнению с аналогичным показателем без воздействия антиэстрогена: ↑ — увеличение; ↔ — без изменения

тамоксифена на связывание моноклональных антител с Pgr в клетках T-лимфобластного лейкоза линии Jurkat в области линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации антител.

Отчетливо видно смещение гистограмм специфически флуоресцирующих клеток после инкубации с тамоксифеном вправо по сравнению с клетками, инкубированными только с антителами к Pgr, что указывает на увеличение окрашивания клеток и сопровождается повышением интенсивности специфической флуоресценции клеток, подвергшихся воздействию тамоксифена. При концентрации антител 1,2 мкг/мл доля специфически окрашенных клеток при воздействии тамоксифена

увеличилась в 2,5 раза — с 30 до 75 % (см. рис. 3а), а при концентрации 2,5 мкг/мл — в 1,4 раза: с 57 до 80 % (см. рис. 3б). Средняя интенсивность специфической флуоресценции клеток при этом повысилась при концентрации антител к Pgr 1,2 мкг/мл в 2,3 раза (см. рис. 3а), а при 2,5 мкг/мл — в 1,7 раза (см. рис. 3б).

Для визуализации выявленного эффекта тамоксифена (увеличение числа клеток, окрашенных моноклональными антителами к Pgr, а также интенсивности флуоресценции клеток) использован метод флуоресцентной микроскопии. На рис. 4 представлены фотографии клеток Jurkat, окрашенных моноклональными антителами к Pgr, без воздей-

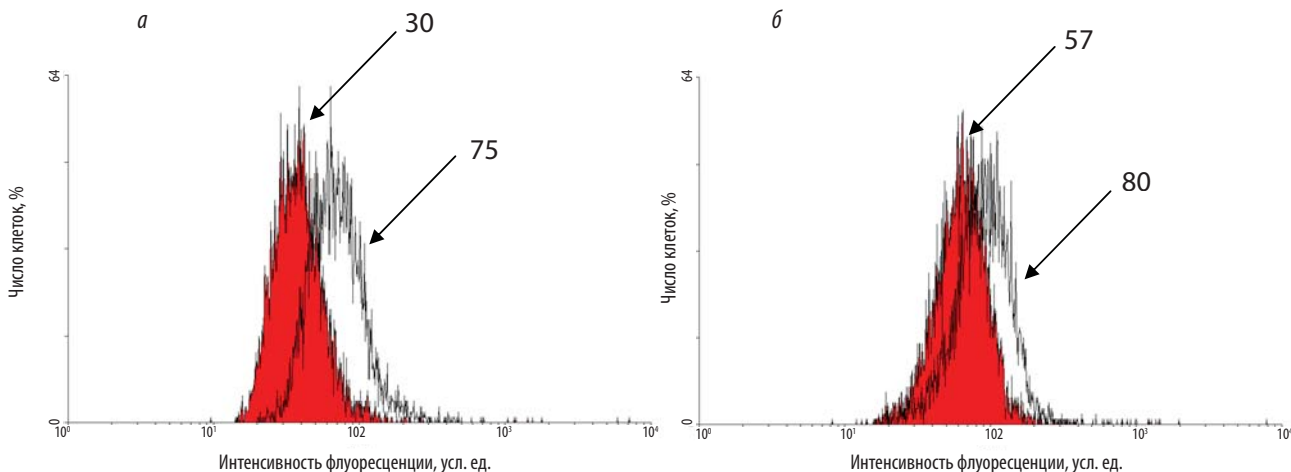


Рис. 3. Влияние тамоксифена на специфическое связывание моноклональных антител с Pgr в клетках линии Jurkat: а — концентрация моноклональных антител к Pgr 1,2 мкг/мл; б — 2,5 мкг/мл. Закрашенные гистограммы — интенсивность специфической флуоресценции клеток без воздействия тамоксифена, незакрашенные — после инкубации с тамоксифеном. Цифрами указана доля специфически флуоресцирующих клеток по отношению к показателю изотипического контроля — без воздействия и после воздействия тамоксифена

ствия (см. рис. 4а) и после воздействия (см. рис. 4б) тамоксифена. После инкубации с тамоксифеном отчетливо видно повышение не только интенсивности окрашивания отдельных клеток, но и увеличение числа ярко флуоресцирующих клеток. Таким образом, воздействие тамоксифена на специфическое флуоресцентное окрашивание моноклональными антителами к Pgp клеток Jurkat, обнаруженное с помощью флуоресцентной микроскопии, подтверждает данные, полученные методом точной цитофлуориметрии.

Данные, представленные на рис. 5, демонстрируют влияние тамоксифена на параметры флуоресцентного окрашивания клеток линии Jurkat при взаимодействии с моноклональными антителами, использованными в разных концентрациях, к другому маркеру множественной лекарственной резистентности — BCRP. Видно, что в области линейной

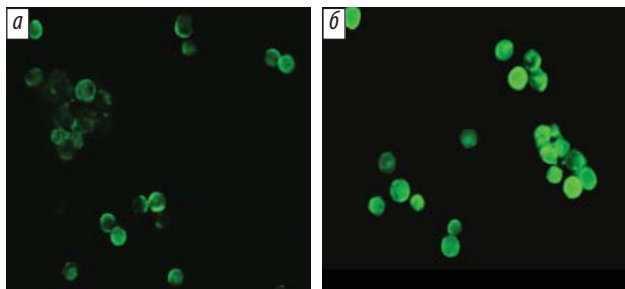


Рис. 4. Влияние тамоксифена на взаимодействие моноклональных антител с Pgp в клетках Т-лимфоblastного лейкоза человека линии Jurkat: а — специфическая флуоресценция клеток РШМ линии HeLa при взаимодействии с моноклональными антителами к Pgp без воздействия тамоксифена (контроль); б — после инкубации с тамоксифеном. Концентрация антител к Pgp — 1,2 мкг/мл

зависимости интенсивности флуоресценции от числа антител при воздействии тамоксифена флуоресценция клеток увеличилась. Максимальное превышение средней интенсивности флуоресценции клеток в 2 раза по сравнению с изотипическим контролем после инкубации с тамоксифеном отмечено при количестве специфических антител 1,2 мкг/мл (см. рис. 5а). После воздействия тамоксифена при этой концентрации специфических антител в 2 раза возросло и число флуоресцентно окрашенных клеток (см. рис. 5б).

На рис. 6 представлены примеры гистограмм распределения клеток по интенсивности специфической флуоресценции, демонстрирующие влияние тамоксифена на связывание моноклональных антител с BCRP в клетках Т-лимфоblastного лейкоза линии Jurkat в области линейной зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации антител. Отчетливо видно смещение гистограмм специфически флуоресцирующих клеток после инкубации с тамоксифеном вправо по сравнению с клетками, инкубированными только с антителами к BCRP. Это сопровождается повышением интенсивности специфической флуоресценции клеток, подвергшихся воздействию тамоксифена, при разных концентрациях моноклональных антител к BCRP в 2,1 и 1,7 раза и увеличением доли окрашенных клеток в 2 и 1,5 раза: с 25 до 50 и с 34 до 51 % соответственно (см. рис. 6а, б).

На рис. 7 приведены кривые изменения флуоресценции клеток РШМ линии HeLa при взаимодействии с моноклональными антителами к MRP1 в разных концентрациях. Видно, что после воздействия тамоксифена происходит уменьшение параметров флуоресцентного окрашивания клеток

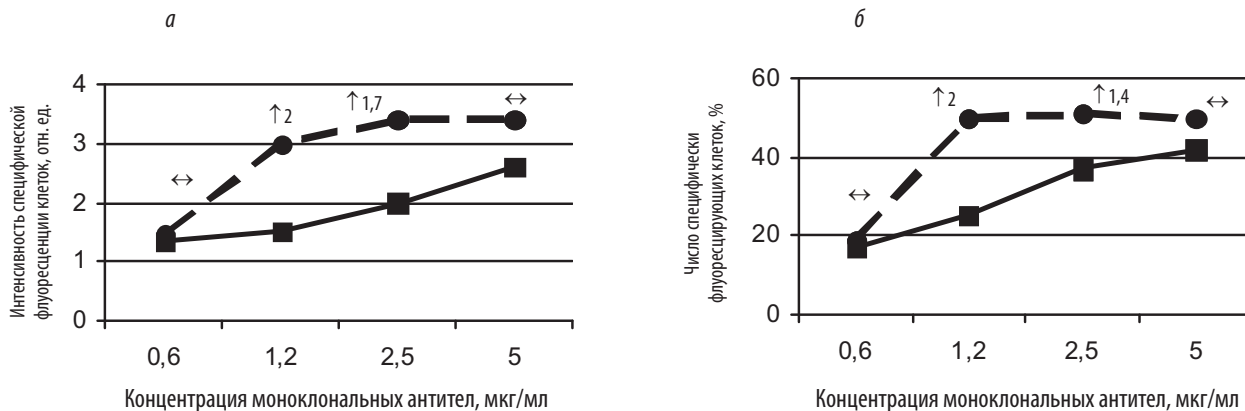


Рис. 5. Влияние тамоксифена на специфическое связывание моноклональных антител с BCRP в клетках Т-лимфоblastного лейкоза человека линии Jurkat: а — интенсивность специфической флуоресценции клеток; б — число специфически флуоресцирующих клеток
 ■ — после инкубации с моноклональными антителами к BCRP;
 ● — после преинкубации с тамоксифеном и последующей инкубации с моноклональными антителами к BCRP
 Цифрами и стрелками указано изменение показателя при воздействии тамоксифена по сравнению с аналогичным показателем без воздействия антиэстрогена: ↑ — увеличение; ↔ — без изменения

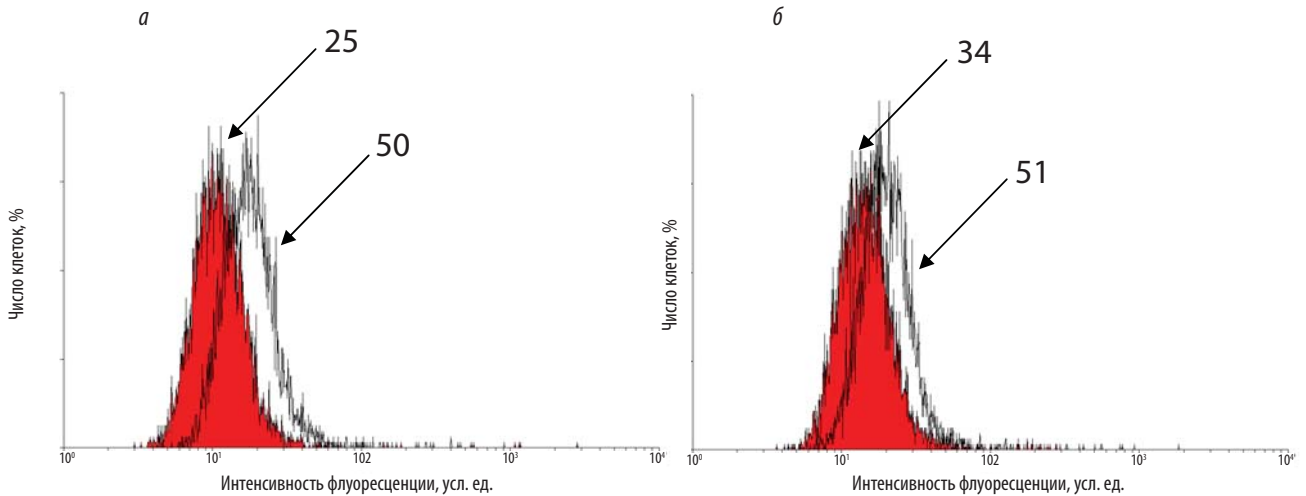


Рис. 6. Влияние тамоксифена на специфическое связывание моноклональных антител с BCRP в клетках линии Jurkat: а — концентрация моноклональных антител к Pgp 1,2 мкг/мл; б — 2,5 мкг/мл. Закрашенные гистограммы — интенсивность специфической флуоресценции клеток без воздействия тамоксифена, незакрашенные — после инкубации с тамоксифеном. Цифрами указана доля специфически флуоресцирующих клеток по отношению к показателю изотипического контроля — без воздействия и после воздействия тамоксифена

в области линейной зависимости от концентрации моноклональных антител. Средняя интенсивность специфической флуоресценции клеток при концентрации антител к Pgp 1,2 мкг/мл повысилась в 1,5, а при 2,5 мкг/мл — в 2,1 раза (см. рис. 7а). После воздействия тамоксифена отмечено также и уменьшение доли окрашенных клеток — на 27 и 45% при концентрации моноклональных антител 1,2 и 2,5 мкг/мл (см. рис. 7б).

Гистограммы распределения клеток линии HeLa в зависимости от интенсивности флуоресценции, демонстрирующие влияние тамоксифена на взаимодействие специфических антител с MRP1, представлены на рис. 8. При концентрациях антител 1,2 и 2,5 мкг/мл (см. рис. 8а и б соответственно)

видно отчетливое смещение гистограмм специфически флуоресцирующих клеток после инкубации с тамоксифеном влево по сравнению с клетками, инкубированными только с антителами к MRP1, что свидетельствует об уменьшении интенсивности окрашивания клеток.

При концентрации антител 1,2 мкг/мл доля специфически окрашенных клеток при воздействии тамоксифена снизилась в 2,3 раза — с 41 до 18% (см. рис. 8а), а при 2,5 мкг/мл — в 2,7 раза: с 66 до 24% (см. рис. 8б). Средняя интенсивность специфической флуоресценции клеток после инкубации с тамоксифеном при концентрации специфических антител 1,2 мкг/мл уменьшилась в 1,7 раза (см. рис. 8а), а при 2,5 мкг/мл — в 2,2 раза (см. рис. 8б).

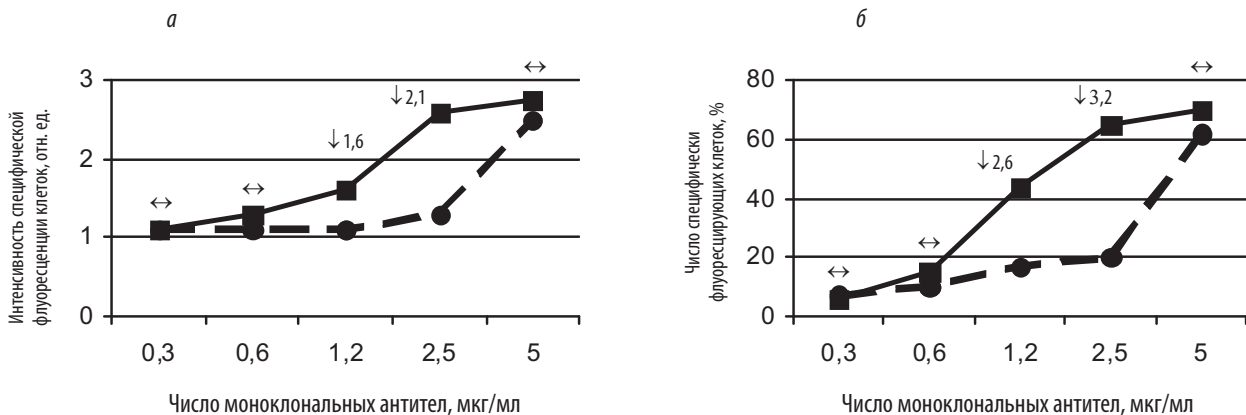


Рис. 7. Влияние тамоксифена на специфическое связывание моноклональных антител с MRP1 в клетках РШМ человека линии HeLa: а — интенсивность специфической флуоресценции клеток; б — доля специфически флуоресцирующих клеток ■ — после инкубации с моноклональными антителами к MRP1; ● — после инкубации с тамоксифеном и последующей инкубации с моноклональными антителами к MRP1 Цифрами и стрелками указано изменение показателя при воздействии тамоксифена по сравнению с аналогичным показателем без воздействия антиэстрогена: ↓ — уменьшение; ↔ — без изменения

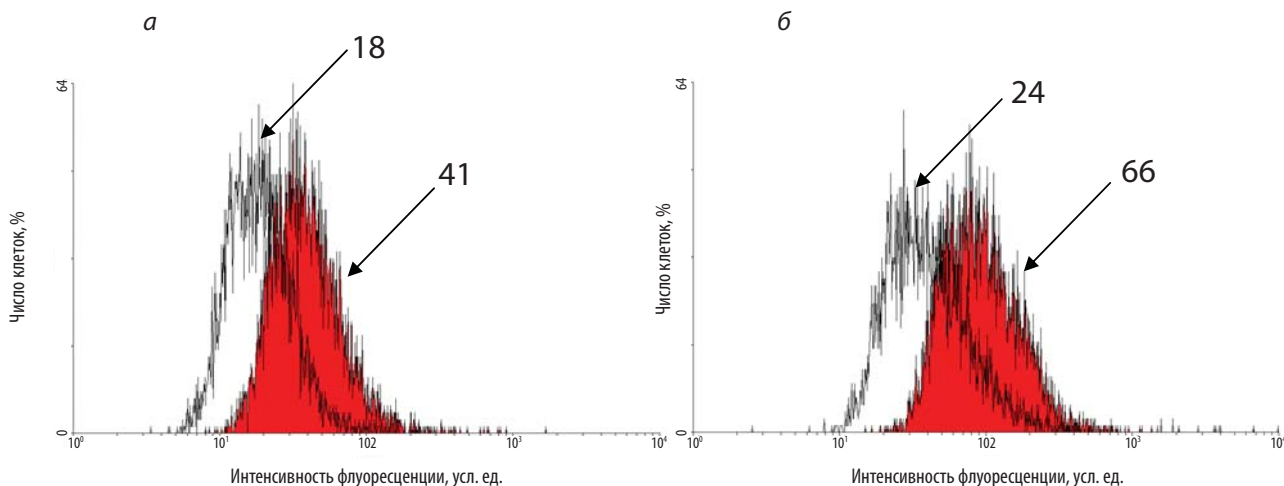


Рис. 8. Влияние тамоксифена на специфическое связывание моноклональных антител с MRP1 в клетках РШМ человека линии HeLa: а — концентрация моноклональных антител к MRP1 1,2 мкг/мл, б — 2,5 мкг/мл. Закрашенные гистограммы — интенсивность специфической флуоресценции клеток без воздействия тамоксифена, незакрашенные — после инкубации с тамоксифеном. Цифрами указана доля специфически флуоресцирующих клеток по отношению к показателю изотипического контроля — без воздействия и после воздействия тамоксифена

Аналогичное изменение флуоресценции клеток РШМ линии HeLa при взаимодействии с моноклональными антителами к MRP1 при воздействии тамоксифена выявлено с использованием флуоресцентной микроскопии. На рис. 9 представлены фотографии клеток HeLa после инкубации с моноклональными антителами к MRP1 без предварительного воздействия тамоксифена и после инкубации с антиэстрогеном (см. рис. 9б). Видно, что в интактной культуре (см. рис. 9а) практически все клетки после инкубации с антителами к MRP1 ярко флуоресцируют и лишь единичные — практически не окрашены. После воздействия тамоксифена (см. рис. 9б) ярко флуоресцирующие клетки в культуре отсутствуют, а большинство их светятся слабо или практически не флуоресцируют. Таким образом, при воздействии тамоксифена отмечено не

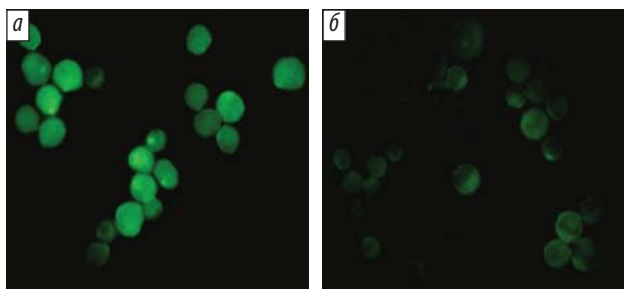


Рис. 9. Влияние тамоксифена на специфическое взаимодействие моноклональных антител с MRP1 в клетках РШМ человека линии HeLa: а — специфическая флуоресценция клеток РШМ линии HeLa при взаимодействии с моноклональными антителами к MRP1 без воздействия тамоксифена (контроль); б — после инкубации с тамоксифеном. Концентрация антител к MRP1 — 2,5 мкг/мл

только уменьшение числа клеток, специфически флуоресцирующих после взаимодействия с моноклональными антителами к MRP1, но и снижение интенсивности флуоресценции отдельных клеток.

Обсуждение

Результаты экспериментов, проведенных *in vitro* на культурах клеток человека, показали, что при воздействии тамоксифена происходит нарушение специфического взаимодействия моноклональных антител со всеми исследованными маркерами множественной лекарственной резистентности (Pgp, MRP1, BCRP). Различным был лишь характер нарушения специфического взаимодействия моноклональных антител с эпитопами белков и, как результат — различная направленность изменения флуоресцентного окрашивания клеток моноклональными антителами к разным транспортным белкам после воздействия тамоксифена.

Воздействие тамоксифена привело к увеличению интенсивности специфической флуоресценции и доли специфически окрашенных клеток моноклональными антителами к Pgp. Аналогичный эффект, сходный по выраженности и одинаковый по направленности, проявился и при воздействии тамоксифена на специфическое взаимодействие моноклональных антител с другим транспортным белком — BCRP. Принципиально отличным оказалось влияние тамоксифена на связывание моноклональных антител с MRP1: зафиксировано снижение специфического флуоресцентного окрашивания и уменьшение доли клеток, специфически окрашенных антителами к MRP1, после инкубации с антиэстрогеном.

Однако независимо от характера описанного нарушения связывания моноклональных антител с Pgp, MRP1 и BCRP сам факт возникновения такого нарушения при отсутствии влияния тамоксифена на связывание с клетками изотипических антител и на параметры автофлуоресценции свидетельствует о взаимодействии антиэстрогена с исследованными маркерами множественной лекарственной резистентности. При этом возможно либо «физическое» препятствование связыванию моноклональных антител с транспортными белками, либо изменение конфигурации эпитопов транспортных белков таким образом, что изменяется иммунореактивность моноклональных антител. Упомянутые выше различия в последствиях воздействия тамоксифена на связывание моноклональных антител с Pgp и BCRP по сравнению с MRP1 (увеличение специфического флуоресцентного окрашивания клеток против уменьшения соответственно) указывают на возможное отличие в механизме взаимодействия антиэстрогена с разными транспортерами.

Результатом подобного взаимодействия тамоксифена с Pgp, MRP1 и BCRP неизбежно должно явиться снижение внутриклеточной концентрации антиэстрогена, доступного для взаимодействия с другими клеточными мишенями. Применительно к обсуждаемой в данной работе антиэстрогенной активности препарата зарегистрировано снижение концентрации тамоксифена, способного связываться с РЭ опухоли. Последствия этого очевидны — уменьшение эффективности тамоксифена.

Следовательно, белки множественной лекарственной резистентности представляют некую внутриклеточную «ловушку», приводящую к уменьшению действующей внутриклеточной концентрации тамоксифена. В связи с этим существуют все основания рассматривать экспрессию данных белков как неблагоприятный фактор, снижающий антиэстрогенный эффект препарата. Иными словами, экспрессия в опухолевых клетках Pgp, MRP1 и/или BCRP может служить предиктивным маркером снижения эффективности тамоксифена при лечении РМЖ с положительным статусом РЭ.

Необходимо подчеркнуть, что речь не идет о классическом механизме множественной лекарственной резистентности, ассоциированной с выбросом противоопухолевых препаратов из клеток. В данном случае тамоксифен остается в клетке, но

внутриклеточная концентрация препарата, способного вступить в реакцию с РЭ, уменьшается за счет конкурентного связывания части препарата с белками множественной лекарственной резистентности — Pgp, MRP1 и/или BCRP.

Конечный результат в обоих случаях одинаков — понижение специфической эффективности тамоксифена. Тем не менее механизм принципиально различен, и это важно не только с теоретической, но и с практической точки зрения — с точки зрения подходов к клиническому выявлению этих неблагоприятных маркеров чувствительности к тамоксифену. Так, при оценке экспрессии в опухоли механизма множественной лекарственной резистентности, ассоциированной с выбросом цитостатиков из клеток, необходимо исследование функциональной активности транспортных белков. Для предсказания же существования в опухоли «конкурентного» механизма устойчивости к тамоксифену достаточно оценить только наличие в клетке транспортеров, что значительно легче в смысле проведения анализа. При этом очевидно, что чем выше содержание в клетке транспортных белков, тем больше должна быть их неблагоприятная значимость для предсказания резистентности к тамоксифену.

Подходы к преодолению обсуждаемого механизма снижения эффективности тамоксифена у больных РМЖ с положительным статусом РЭ реалистичны. Во-первых, это снижение вклада конкурентного связывания тамоксифена с белками множественной лекарственной резистентности в специфическое взаимодействие препарата с РЭ за счет повышения внутриклеточной концентрации тамоксифена. Этого можно достичь за счет повышения дозы тамоксифена в рамках рекомендованного терапевтического интервала, например, с 20 до 40 мг/сут. Во-вторых, в ряде случаев выявление Pgp, MRP1 и/или BCRP в РЭ+-опухолях молочной железы может стать дополнительным аргументом в пользу перевода пациента на другую линию гормональной терапии.

Заключение

Следует отметить, что «конкурентный» механизм устойчивости к тамоксифену, по-видимому, может реализоваться при взаимодействии препарата не только с белками множественной лекарственной резистентности, но и с другими клеточными его мишенями, описанными выше и не связанными с антиэстрогенным действием тамоксифена.

ЛИТЕРАТУРА

- Rohlf C., Blagosklonny M.V., Kyle E. et al. Prostate cancer cell growth inhibition by tamoxifen is associated with inhibition of protein kinase C and induction of p21(waf1/cip1). *Prostate* 1998;37(1):51–9.
- Cheng A.L., Chuang S.E., Fine R.L. et al. Inhibition of the membrane translocation and activation of protein kinase C, and potentiation of doxorubicin-induced apoptosis of hepatocellular carcinoma cells by tamoxifen. *Biochem Pharmacol* 1998;55(4):523–31.
- Sharif T.R., Sharif M. A novel approach for examining the anti-proliferative effect of protein kinase C inhibitors against human astrocytoma cells. *Int J Oncol* 1998;13(4):685–92.
- Lavie Y., Zhang Z.C., Cao H.T. et al. Tamoxifen induces selective membrane association of protein kinase C epsilon in MCF-7 human breast cancer cells. *Int J Cancer* 1998;77(6):928–32.
- Chen T.C., Su S., Fry D., Liebes L. Combination therapy with irinotecan and protein kinase C inhibitors in malignant glioma. *Cancer* 2003;97(9):2363–73.
- Ahn S.J., Yoon M.S., Hyuk S. et al. Phospholipase C-protein kinase C mediated phospholipase D activation pathway is involved in tamoxifen induced apoptosis. *J Cell Biochem* 2003;89(3):520–8.
- Isaac Y.K., Byung-Chul K., Do Hwan S. et al. Raloxifene, a mixed estrogen agonist/antagonist, induces apoptosis in androgen-independent human prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 2002;62:5365–9.
- Fu Y.M., Li Q.M., Zhang C.Y. et al. Effects of 40H-tamoxifen on the proliferation and apoptosis of prostate stromal cells. *Zhonghua Nan Ke Xue* 2007;13(7):620–3.
- Lagadec C., Adriaenssens E., Toillon R.A. et al. Tamoxifen and TRAIL synergistically induce apoptosis in breast cancer cells. *Oncogene* 2008;27(10):1472–7.
- Nazarewicz R.R., Zenebe W.J., Parihar A. et al. Tamoxifen induces oxidative stress and mitochondrial apoptosis via stimulating mitochondrial nitric oxide synthase. *Cancer Res* 2007;67(3):1282–90.
- Nagahara Y., Shiina I., Nakata K. et al. Induction of mitochondria-involved apoptosis in estrogen receptor-negative cells by a novel tamoxifen derivative, ridaifen-B. *Cancer Sci* 2008;99(3):608–14.
- Kallio A., Zheng A., Dahllund J. et al. Role of mitochondria in tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells. *Apoptosis* 2005;10(6):1395–410.
- Bursch W., Ellinger A., Kienzl H. et al. Active cell death induced by the anti-estrogens tamoxifen and ICI 164384 in human mammary carcinoma cells (MCF-7) in culture: the role of autophagy. *Carcinogenesis* 1996;17(8):1595–607.
- Bursch W., Hochegger K., Torok L. et al. Autophagic and apoptotic types of programmed cell death exhibit different fates of cytoskeletal filaments. *J Cell Sci* 2000;113(7):1189–98.
- Bilir A., Altinoz M.A., Erkan M. et al. Autophagy and nuclear changes in FM3A breast tumor cells after epirubicin, medroxyprogesterone and tamoxifen treatment in vitro. *Pathobiology* 2001;69(3):120–6.
- Scarlatti F., Bauvy C., Ventruti A. et al. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem* 2004;279(18):18384–91.
- Amaravadi R.K., Yu D., Lum J.J. et al. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007;117(2):326–36.
- Jordan V.C. Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy. *Eur J Cancer* 2008;44(1):30–8.
- O'Byrne K.J., Dalgleish A.G., Browning M.J. et al. The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease. *Eur J Cancer* 2000;36(2):151–69.
- Vainio H. Targeting angiogenesis — a novel mode in cancer chemoprevention. *Asian Pac J Cancer Prev* 2003;4(2):83–6.
- Cáceres W., González S. Angiogenesis and cancer: recent advances. *P R Health Sci J* 2003; 22(2):149–51.
- Gagliardi A.R., Hennig B., Collins D.C. Antiestrogens inhibit endothelial cell growth stimulated by angiogenic growth factors. *Anticancer Res* 1996;16(3):1101–6.
- Butta A., MacLennan K., Flanders K.C. et al. Induction of transforming growth factor beta 1 in human breast cancer in vivo following tamoxifen treatment. *Cancer Res* 1992;52(15):4261–4.
- Garvin S., Dabrosin C. Tamoxifen inhibits secretion of vascular endothelial growth factor in breast cancer in vivo. *Cancer Res* 2003;63:8742–8.
- McGlynn L.M., Kirkegaard T., Edwards J. et al. Ras/Raf-1/MAPK pathway mediates response to tamoxifen but not chemotherapy in breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2009;15(4):1487–95.
- Frogne T., Jepsen J.S., Larsen S.S. et al. Antiestrogen-resistant human breast cancer cells require activated protein kinase B/Akt for growth. *Endocr Relat Cancer* 2005;12(3):599–614.
- Zhou Y., Eppenberger-Castori S., Marx C. et al. Activation of nuclear factor-kappaB (NF-kappaB) identifies a high-risk subset of hormone-dependent breast cancers. *Int J Biochem Cell Biol* 2005;37(5):1130–44.
- Liu B., Ordóñez-Ercan D., Fan Z. et al. Downregulation of erbB3 abrogates erbB2-mediated tamoxifen resistance in breast cancer cells. *Int J Cancer* 2007;120(9):1874–82.
- O'Regan R.M., Osipo C., Ariazi E. et al. Development and therapeutic options for the treatment of raloxifene-stimulated breast cancer in athymic mice. *Clin Cancer Res* 2006;12(7):2255–63.
- Hotta T., Tanimura H., Yamaue H. Tamoxifen circumvents the multidrug resistance in fresh human gastrointestinal cancer cells. *J Surg Res* 1996;66(1):31–5.
- Shen L.Z., Hua Y.B., Yu X.M. Tamoxifen can reverse multidrug resistance of colorectal carcinoma in vivo. *World J Gastroenterol* 2005;11(7):1060–4.
- Safa A.R., Roberts S., Agresti M., Fine R.L. Tamoxifen aziridine, a novel affinity probe for P-glycoprotein in multidrug resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;202(1):606–12.
- Rao U.S., Fine R.L., Scarborough G.A. Antiestrogens and steroid hormones: substrates of the human P-glycoprotein. *Biochem Pharmacol* 1994;48(2):287–92.
- Chen Y.M., Perng R.P., Yang K.Y. et al. Combination chemotherapy with tamoxifen, ifosfamide, epirubicin and cisplatin in extensive-disease small-cell lung cancer. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei)* 2000;63(8):605–11.
- Yang C.H., Cheng A.L., Yeh K.H. et al. High dose tamoxifen plus cisplatin and etoposide in the treatment of patients with advanced, inoperable nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 1999;86(3):415–20.