

В.Ф. Чехун, академік НАН України, д.м.н., професор, Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, м. Київ

# Резистентність пухлин до медикаментозних засобів: від механізмів формування до шляхів подолання



В.Ф. Чехун

Продовження. Початок в №1/2011.

## Ферменти метаболізму у формуванні РМЗ

Значна роль у виникненні РМЗ належить комплексу ферментів метаболізму, що включають глутатіонзалежну систему (GSH) детоксикації, у тому числі глутатіон-S-трансферазу (GST), цитохром Р450, металотіонеїни та ін. До найбільш інтегрованої та широко досліджуваної частини біохімічного захисту систем організму належить GST, що експресується в клітинах усіх тканин та органів ссавців. Основна активність цього ферменту на 90% реалізується в цитозолі, і лише близько 10% активності (спрямованої на знешкодження цитостатиків) сконцентровано в мікросомах, мітохондріальному матриксі та ядерних мембранах.

Глутатіон – небілковий тіол, сульфгідрильні групи якого взаємодіють із реакційно здатними групами лікарських засобів з утворенням низькоактивних гідрофільних кон'югатів, які завдяки відповідним білкам – GST-х транспортерам – знижують їх концентрацію в пухлинних клітинах. Хімічна взаємодія між глутатіоном та алкілюючими сполуками каталізується групою ферментів GST, ізоформи якого активуються у разі взаємодії з різними класами цитостатиків. Досить часте синхронне підвищення активності транспортних білків і GST може свідчити про скоординовану регуляцію різних захисних систем клітини, однак взаємодія навіть такого рівня систем не завжди дозволяє повністю розкрити механізми виникнення РМЗ. Так, зокрема, встановлено, що надмірна експресія цитозольної форми GST є ключовою ланкою в розвитку резистентності до доксорубіцину клітин лінії MCF раку молочної залози, до цисплатину клітин лінії G3361 меланоми. У ході дослідження механізмів формування РМЗ було з'ясовано, що під час МТ, зокрема препаратами антрациклінового ряду, свою специфічну активність вони реалізують не стільки за рахунок взаємодії з певними мішенями, скільки за рахунок ініціації утворення високореакційних ОН-радикалів, які є пусковим явищем каскаду ланцюгових реакцій утворення органічних перекисів і перекисних радикалів, спрямованих на цитотоксичну дію. І саме завдяки вираженій пероксидазній активності GST ефективно інактивує органічні перекиси.

Щодо механізму формування резистентності до цисплатину в клітинних лініях, інкубованих із значними цитостатиками, значно підвищується рівень глутатіону і/або зростає активність ферменту  $\gamma$ -глутамілцистеїнсинтетази ( $\gamma$ -ГЦС), який ініціює його синтез. Зміна рівня глутатіону і ферментів, що його метаболізують, є найважливішою складовою механізму зменшення активності не лише цисплатину, а й низки препаратів алкілюючого ряду. Так, наприклад, досліджуючи взаємодію ферментів метаболізму глутатіону після трансфекції гена ферменту  $\gamma$ -ГЦС у клітинах раку легень людини виявлено двократне підвищення рівня глутатіону, підвищення активності глутатіон-S-х-помпи в 1,6 раза,

зменшення акумуляції цисплатину в 1,5 раза та резистентність у 6,7 раза більшу порівняно з клітинами батьківської лінії. Натомість виснаження внутрішньоклітинного глутатіону з допомогою інгібітора його синтезу – бутіонінсульфоксиміну – не впливало на виникнення резистентності до цисплатину. Однак при цьому зберігалася висока активність глутатіон-S-х-помпи, яка через утворення глутатіон-S-Pt-кон'югату навіть у разі виснаження субстрату (глутатіону) зменшує внутрішньоклітинну концентрацію цитостатика.

У формуванні РМЗ активну участь беруть металотіонеїни, які у вільному стані є нуклеофільними сполуками та зв'язують електрофільні цитостатики типу цисплатину, адриаміцину, блеоміцину та ін. У модельних системах після трансфекції гена металотіонеїну клітини набувають резистентність до цитостатиків, а у хворих із вираженою його експресією в пухлинних клітинах значно погіршуються прогностичні показники. Так, наприклад, у разі лікування хворих на рак стравоходу цисплатиною 5-річна виживаність пацієнтів із металотіонеїнопозитивними пухлинами становила 26%, а з металотіонеїнегативними – 56%.

## Репараційні процеси ДНК у формуванні РМЗ

Поруч із транспортною та детоксуючими системами до формування РМЗ активно залучаються ДНК-репараційні системи шляхом індукції або інгібування топоізомерази I та II, що впливають на топологію ДНК у клітині. ДНК-топоізомераза бере активну участь у конденсації хроматину і регуляції процесів реплікації, транскрипції та репарації. Відомо, що за нормальних умов комплекс ДНК-топоізомераза швидко розпадається. У разі мутації гена ДНК-топоізомерази II, з яким часто пов'язують РМЗ, виявлено зниження або активності, або кількості цього ферменту. Водночас показано, що низка протипухлинних препаратів є інгібіторами топоізомерази I і II, що значно підвищує ефективність репарації ураженої ДНК. Однак інгібування ферменту може відбуватися в той момент, коли ланцюги ДНК розірвані, при цьому топоізомераза II задіяна у зв'язуванні цих ланцюгів, захищає і стабілізує останню. Крім того, весь процес завершується утворенням комплексу препарат-фермент-ДНК, який може приводити до запуску апоптотичної програми клітини або до її некрозу, якщо своєчасно не відбувається його елімінація та активація репараційних процесів. Експериментальними та клінічними дослідженнями доведено, що зміна активності зазначених ферментів і репараційних процесів чітко корелює з посиленням експресії генів *mdr-1* і активністю ключових генів апоптотичної програми клітини.

## Мережа сигнальних каскадів у формуванні РМЗ і молекулярний профіль резистентних клітин

Підвищена стійкість клітини до запуску цього процесу є однією з ключових проблем пухлинного росту та розвитку РМЗ. Особливий інтерес онкологів до

апоптозу пов'язаний із тим, що в певних дозах і режимах МТ променева терапія і гіпертермія можуть як індукувати, так і інгібувати цей процес. Відомо, що значна кількість цитостатиків пошкоджує код систем сигнальної трансдукції, які забезпечують життєдіяльність клітини і проходження клітинного циклу. Однак цитотоксична дія більшості з них реалізується перш за все шляхом індукції апоптозу. Ключову роль у цьому процесі відіграє функціональна активність систем ліганд – рецептор CD95-L/CD95 і продуктів генів родини P53, BCL-2 PTEN та ін. Першою ланкою запуску апоптотичної програми цитостатиком є система ліганд-рецептор CD95- $\alpha$ /CD95 (FasL/Fas або APO-1) інтегрального білка мембрани, що проникає в позаклітинне середовище і може взаємодіяти як із протипухлинним препаратом, так і з власною розчинною формою чи іншими цитокинами, які включають відповідну ланцюгову реакцію. Порушення у функціонуванні зазначеної системи викликані мутацією гена рецептора CD95, який блокує розвиток апоптотичної програми та знижує ефективність МТ, сприяючи розвитку РМЗ. Проте найбільш дослідженим, а можливо, і найважливішим елементом у відповіді клітини на стресорні впливи, в тому числі і МТ, є «дикий» тип гена *wt-P53* і кодований ним білок *p53*, який блокує клітинний цикл у фазі G1-S, що приводить до зупинки реплікації ураженої ДНК, створює умови для її видалення або репарації ураженої ділянки. Така послідовність подій засвідчує, що клітина подолала наслідки негативного впливу і продовжує подальший поділ із забезпеченням ознак нормального потомства. Коли ж репараційні процеси не включаються або запізнюються, може запуститися програма апоптозу або некрозу, що дозволяє еліминувати таку клітину. Однак, якщо з якихось причин у системі контролю відбуваються певні мутації, що забезпечують перевагу проліферативним сигналам, вона продовжує ділитися, створюючи клони трансформованих клітин. Незважаючи на численні дані стосовно часті гена *wt-P53* у РМЗ, питання статусу його продуктів у процесі формування такого явища в пухлинних клітинах залишається відкритим. Невизначеність обумовлена існуванням двох протилежних точок зору стосовно експресії P53 дикого типу (*wt-P53*). З одного боку, цей білок має збільшувати чутливість до МТ, оскільки забезпечує входження клітин в апоптоз, з іншого – знижувати чутливість за рахунок зупинки клітинного циклу для репарації ДНК. Клітини, в яких відсутній *wt-P53*, є практично резистентними до індукції апоптозу. Вищезазначене дозволяє стверджувати, що продукт гена *wt-P53* є критичним компонентом сигнального каскаду клітинного циклу. Крім зазначеного, важливо враховувати, що експресія *wt*-гена впливає на активність цілої низки генів-онкосупресорів (P15, P16, P21, P27 та ін.), білки яких пригнічують активність циклінозалежних кіназ – ферментів

поділу клітин. Тому мутована форма P53 у процесі бластної трансформації може ініціювати проходження клітинного циклу і після ураження ДНК. Як наслідок, пухлинні клітини набувають ознак модифікованого рівня чутливості до дії цитостатиків. Підтвердженням такого розвитку подій є результати досліджень на 60 лініях пухлинних клітин, культивованих більш ніж із 100 протипухлинними препаратами, що дозволило виявити пряму кореляцію між статусом гена P53 у клітинах і їх чутливістю до цитостатиків. Характер активації і регуляції цього гена та його відповідь на стимули залежать не лише від стресового фактора, а й від типової та видової приналежності тканин та ін. Отже, різні терапевтичні агенти залежно від механізму дії не тільки іншими способами активують P53 – передача сигнальних стимулів теж може відбуватися різними шляхами, що відіграє ключову роль у чутливості пухлинних клітин до МТ. Таким чином, P53 відіграє важливу роль у прояві ступеня чутливості пухлинних клітин до МТ, однак характер його впливу може визначатись і суттєво змінюватись залежно від механізму їх дії, видової та тканинної приналежності клітин, а також тих генетичних, епігенетичних та молекулярно-біологічних змін, що виникли в злоякісній клітині, та прогресії пухлинного росту.

Порушення функції *wt-P53* гена може виникнути внаслідок блокади його активності низкою ендогенних протеїнів і цитокинів з утворенням мутантного типу *mt-P53*. До найбільш вивчених функціональних антагоністів *wt*-гена P53 належать родини онкогенів BCL-2, продукти яких є головними учасниками процесу злоякісної трансформації клітин у зв'язку з безпосередньою участю частини цих білків в антиапоптотичній, а частини – в проапоптотичній програмі. Гіперекспресія білків Bcl-2 та Bcl-xL спостерігається у значній кількості неопластичних процесів, у більшості з яких вона асоціюється ще й з резистентністю пухлинних клітин до дії протипухлинних препаратів. Так, у досліджах з використанням клітин, трансфікованих генами білків Bcl-2 і Bcl-xL, виникала виражена резистентність до низки цитостатиків.

Дані клінічних досліджень стверджують, що підвищена експресія BCL-2 у разі деяких видів лімфом, лейкозів, нейробластоми, раку передміхурової залози та яєчника є маркером РМЗ. Однак у хворих на рак легень і молочної залози спостерігається зворотна картина: підвищена експресія BCL-2 є показником високого ступеня чутливості пухлини до МТ. Пояснення такого явища можна знайти у зміні співвідношення в цій родині антиапоптотичних Bcl-2 та Bcl-xL та проапоптотичного білка Bax, здатного утворювати гетеродимери з Bcl-2, що і визначає в подальшому схильність останнього до участі в апоптотичній програмі. У досліджах на клітинах, трансфікованих геном білка Bax, значно зростала чутливість до дії цитостатиків.



У розвитку РМЗ, крім вищезазначених факторів, суттєва роль належить системі, яка забезпечує передачу сигналів шляхом включення продукту гена пухлинного супресора – РТЕН. Білок РТЕН має гомологію з тирозинфосфатазами і тензином, що дозволяє йому брати участь у дефосфорильованні субстратів як за тирозиновим, так і за треоніновим механізмом та пригнічувати активність фосфатидил-інозит-3-кіназного РКВ/АКТ сигнального шляху. Важливо зазначити, що саме протеїнкіназа В/АКТ є активним регулятором виживання клітин. Клітини, дефектні на функцію гена РТЕН, виявляють певний ступінь резистентності не лише до протипухлинних препаратів як індукторів апоптозу, а й до впливу ультрафіолетового опромінення, теплового шоку та інших факторів.

Дослідження молекулярних механізмів виникнення РМЗ, аналіз та систематизація отриманих даних в інтегральних схемах перебігу внутрішньоклітинних процесів чутливих та резистентних клітин має особливе значення не лише для всебічного розуміння загальнобіологічних закономірностей злоякісного процесу, а й для розробки та використання в клінічній практиці науково обґрунтованих підходів до її подолання та підвищення ефективності терапії хворих (рис. 2). Складність проблеми РМЗ полягає в тому, що маркери, які характеризують це явище, не є унікальними, а виявляються лише зміною кількісного співвідношення регуляторних молекул. Варто зазначити, що частота генетичних порушень у малігнізованих клітинах більш ніж на три порядки вища, ніж у їх нормальних попередників. Клітина, що виживає в умовах цитостатичної терапії, набуває додаткових структурно-функціональних змін на різних рівнях своєї організації.

#### Позапухлинні маркери РМЗ: об'єкт визначення та перспективи застосування

Аналіз даних доступної літератури та результати власних досліджень свідчать про існування та вклад інших факторів РМЗ. Обговорення кожного окремого механізму формування РМЗ не виключає їх одночасного взаємозв'язку та участі інших процесів, які визначають систему захисту клітини від цитотоксичного ураження. Ступінь чутливості пухлинної клітини залежить від особливостей її мікрооточення та глибини генетичної нестабільності. На жаль, темпи формування молекулярного захисту в пухлинній клітині більш виражені порівняно з нормальною. У клітинах злоякісного фенотипу накопичуються численні генетичні аномалії, які під впливом цитостатиків прискорюють процеси селекції та адаптації і повертають її на зворотний шлях еволюційного процесу, що сприяє прогресії пухлинної хвороби.

Експериментальними та клінічними дослідженнями співробітників нашого інституту переконливо показано наявність взаємозв'язку між фенотипом клітин РМЗ пухлин та нормальних тканин, що відкриває можливості для використання позапухлинних маркерів резистентності, вкрай необхідних у пошуку нових шляхів прогнозування ефективності МТ і перебігу хвороби. Найбільш привабливим об'єктом для пошуку позапухлинних маркерів є сироватка та формені елементи крові.

Отже, коротка характеристика однієї з проблем сучасної онкології свідчить про існування численних механізмів РМЗ у пухлинній клітині. Концентрація зусиль науковців дозволила відкрити нові гени та білки, що обумовлюють захист клітин від МТ. Численність і різноманіття механізмів РМЗ значно ускладнює як її своєчасну діагностику,

так і розробку адекватних протоколів щодо подолання агресивного явища в сучасній МТ. Тому подальше з'ясування механізмів формування та шляхів подолання РМЗ останнім часом розглядається як одна із центральних проблем сучасної онкології.

#### Сучасні підходи, проблеми та перспективи подолання РМЗ

Останнім часом проводиться активний пошук модифікаторів та інгібіторів білків-транспортів, а також засобів регуляції генів, домінують у зміні системи сигнальних каскадів у злоякісних клітинах із РМЗ. Сьогодні найбільш досліджені блокатори кальцієвих каналів та інгібітори кальмодуліну спрямовані на підвищення накопичення протипухлинних препаратів (ПП) у злоякісній клітині. Застосування різноманітних модифікаторів РМЗ дозволяло досягати високого результату в умовах *in vitro*, тоді як в умовах *in vivo* отримати бажаний ефект не вдалося. Одночасно в деяких дослідках було виявлено розвиток резистентності не лише до ПП, а й до модифікаторів. Спроба широкого застосування в клінічній практиці виявила негативний вплив на функцію серцево-судинної системи. Активні дослідження щодо блокування АТФ-азної активності Р-gp, зниження внутрішньоклітинного рівня системи глутатіону, пошуку інгібіторів ДНК топоізомерази I, II, генноінженерних регуляторів системи сигнальних каскадів апоптотичної програми злоякісної клітини, резистентної до ПП, на жаль, також не наблизили вирішення клінічної проблеми РМЗ.

Сьогодні певні надії покладаються на модифікацію або екранування відомих ПП ліпосомами, моноклональними антитілами, радіоізотопами або шляхом застосування сучасних нанотехнологій. Однак лише експериментальні й клінічні дослідження та перевірки часом дозволять підтвердити чи спростувати такі підходи. Дослідники в майбутньому можуть стикатися з тими проблемами, що і їх попередники: ускладненням доставки ПП у центральну зону пухлини, неможливістю виявлення та видалення стовбурової клітини з патологічного вогнища, появою нових механізмів РМЗ, локалізацією та знешкодженням метастатичних клітин та ін.

Звичайно, відбувається активний пошук нових підходів до подолання РМЗ. Один із них почав формуватися на початку 1990-х рр. і пов'язаний із вивченням ролі імунологічних механізмів у подоланні РМЗ. Розширюються уявлення про лізис резистентних пухлин різними кілерними клітинами, ролі ЛАК у цьому процесі, можливість участі інтерлейкінів у регуляції експресії гена *mdg* та його основного продукту Р-gp та ін.

Поступове накопичення фактичного матеріалу дозволяє стверджувати, що нова методологія імунотерапії дозволить ефективно мобілізувати відповідні механізми в лікуванні онкологічних хворих із фенотипом злоякісних пухлин, резистентних до МТ.

Ще один перспективний шлях подолання РМЗ базується на розробці нових терапевтичних підходів, спрямованих на регуляцію рівня та функції мікро-РНК. Відкриття мікро-РНК створило революцію в дослідженнях їх ролі в експресії генів, функціональної геноміки, протеоміки і метаболоміки. Численні дані літератури свідчать, що в пухлинних клітинах експресія мікро-РНК розбалансована. Хоча причини і початок процесу дерегуляції ще не з'ясовані, результати інтенсивних досліджень у цьому напрямі розкривають важливу роль ендегенних некодованих РНК розміром 20-30 нуклеотидів, що регулюють функцію немурованих генів на посттранскрипційному рівні. Останнім

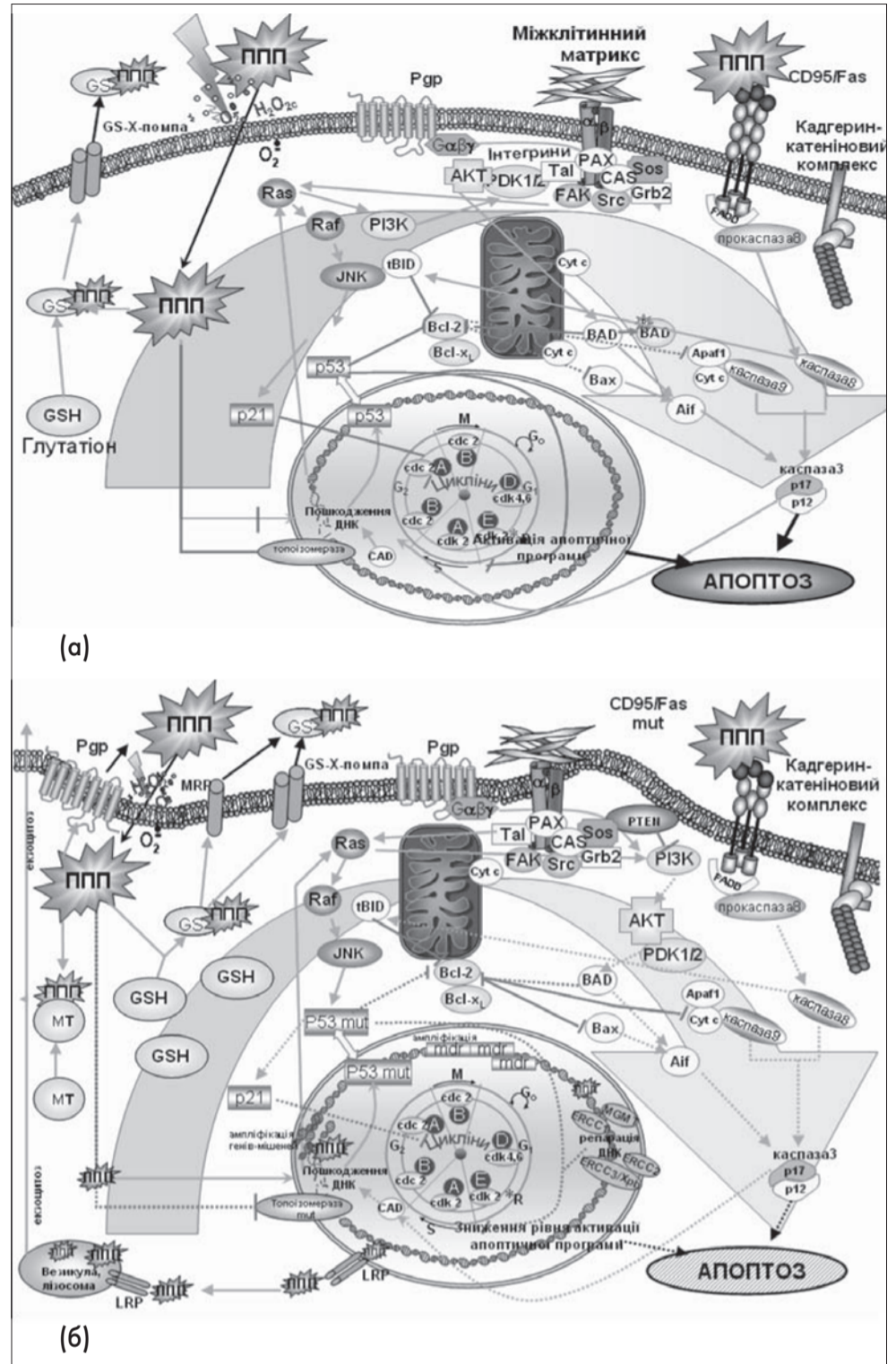


Рис. 2. Індукція мережі сигнальних каскадів клітин, чутливих (а) або резистентних (б) до МТ

ППП – протипухлинний препарат; АІФ – фактор, що індукуює апоптоз, переміщується з мітохондрій до ядра, де здійснює фрагментацію ДНК; АКТ – протеїнкіназа В – серин-треонінкіназа, регулює виживання клітин; Араф-1 – апоптотичний фактор-1, що активує каспазу-9; BAD – проапоптотичний білок родини Bcl-2; Bcl-2 – антиапоптотичний білок родини Bcl-2; Bcl-xL – проапоптотичний білок; CAD – ДНК-аза, асоційована з каспазами; здійснює фрагментацію ДНК; CAS – p130<sup>CAS</sup>, білок, що бере участь у процесах адгезії; cdk – циклінзалежні кінази, серин-треонінові протеїнкінази, що контролюють проходження клітинного циклу; Cyt c – цитохром С, компонент апоптотичного шляху, що запускається в результаті пошкодження ДНК та інших стресових факторів; ERK – серин-треонін кінази, які регулюються зовнішньоклітинними сигналами; FADD – асоційований з Fas-рецептором домен смерті, адапторний білок; FAK – кіназа фокальної адгезії (pp125<sup>FAK</sup>); Gaγ – родина GDP/GTP-зв'язувальних білків; GSH – глутатіон; JNK – c-Jun NH<sub>2</sub>-термінальні кінази, активуються у відповідь на стресові сигнали, фактори росту, цитокіни, регулюють ембріональний морфогенез, проліферацію, апоптоз; M, G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub> – фази клітинного циклу; MT – металоїоніни; p21 – білок-регулятор клітинного циклу; p53 – білок-супресор пухлин, контролює проходження клітинного циклу; PAX – паксилін, білок цитоскелета; PDGF – тромбоцитарний фактор росту; PDK1/2 – фосфоінозитолзалежні протеїнкінази 1 та 2; Pgp – Р-глікопротеїн; PI3K – фосфоінозитол-3-кіназа; РТЕН – інозитолфосфатаза, дефосфорилює ліпіди, ген-супресор пухлин; Raf – родина серин-треонінкіназ, активність яких регулюється Ras-GTP та фосфорильванням; Ras – фосфогідролізуючий білок, активує Raf-МЕК-МАРК сигнальний шлях; She – адапторний білок, який пов'язує рецепторні тирозинкінази з Ras-сигнальним шляхом; SOS – Son of Sevenless, низькомолекулярна GTPаза; Src – нерезцепторна тирозинкіназа, яка відіграє важливу роль у передачі сигналів та регуляції проліферації, виживання, адгезії, міграції клітин; Tal – талін, якірний білок цитоскелета.

часом переконливо показано, що мікро-РНК активно включаються у формування фенотипу РМЗ і відповідь пухлинних клітин у разі дії МТ. Сьогодні наше розуміння основних функцій мікро-РНК у випадку формування РМЗ знаходиться все ще на ранніх стадіях. Подальші дослідження профілювання мікро-РНК допоможуть розкрити нові механізми формування РМЗ та окреслити спектр мішеней, що регулюються засобами МТ.

Мало відомо про фармакокінетику мікро-РНК. Як тільки буде досягнуто глибоке розуміння ролі та механізмів дії мікро-РНК у формуванні РМЗ, з'являться нові технології, що дозволять використати їх як важливих партнерів у вирішенні медико-біологічних проблем XXI ст.

Сьогодні найбільш обґрунтованим з усіх наявних методів, що наближать вирішення проблеми РМЗ, залишаються молекулярно-біологічна діагностика індивідуалізації чутливості пухлин та розробка протоколів таргетної терапії в комплексі з реабілітацією специфічної та неспецифічної системи захисту організму.

Аналіз даних літератури та результати наших досліджень проблеми РМЗ свідчить, що такий підхід є не лише тактичною, а може розглядатися як стратегічний напрям МТ у майбутньому. Експериментатори і клініцисти усвідомлюють, що зусилля, спрямовані на попередження РМЗ, незабаром стануть золотим стандартом у терапії онкологічних хворих.

Список літератури знаходиться в редакції.