

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Первушин Николай Викторович

**МЕХАНИЗМЫ ПРИОБРЕТЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ
КЛЕТОК К АНТАГОНИСТАМ MCL-1 И MDM2 И СПОСОБЫ ЕЕ
ПРЕОДОЛЕНИЯ**

1.5.22 Клеточная биология

1.5.4 Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2025

Диссертация подготовлена в Лаборатории исследования механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины Медицинского научно-образовательного института МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный руководитель – *Копеева Гелина Сергеевна, доктор биологических наук*

Официальные оппоненты – *Филимонова Марина Владимировна, доктор биологических наук, заведующий лабораторией радиационной фармакологии Медицинского радиологического научного центра имени А. Ф. Цыба – филиала Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации*

Якубовская Марианна Геннадиевна, доктор медицинских наук, заведующий отделом химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Татарский Виктор Вячеславович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, заведующий лабораторией молекулярной онкобиологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биологии гена Российской академии наук

Защита диссертации состоится «18» февраля 2025 года в 15 часов 30 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.9 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М-1

E-mail: tlipina@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3322>

Автореферат диссертации разослан « ____ » _____ 2025 года

Ученый секретарь
диссертационного совета
кандидат биологических наук



Т.В. Липина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности. По данным Всемирной организации здравоохранения, онкологические заболевания занимают второе место среди основных причин смертности в мире. В 2020 году рак унес жизни около 10 млн человек [Patil et al., 2022; Sung et al., 2021]. Опухоли возникают в результате неконтролируемого процесса перерождения нормальных клеток в злокачественные клоны вследствие накопления мутаций в их генетическом материале [Patil et al., 2022]. В ходе канцерогенеза опухолевые клетки приобретают ряд отличительных черт, которые позволяют им ускользать от механизмов защиты организма и метастазировать, то есть проникать в окружающие ткани и соседние органы и там размножаться, что приводит к прогрессированию заболевания. Одной из таких особенностей является избегание активации программируемой клеточной гибели (ПКГ) [Hanahan et al., 2000; Hanahan et al., 2011; Hanahan, 2022]. Важнейшую роль в предотвращении опухолевой трансформации играет апоптоз, являющийся одним из наиболее изученных видов ПКГ. Нарушения механизмов запуска апоптотической гибели лежат в основе прогрессии многих типов рака, поэтому ее активация представляет собой перспективную стратегию противоопухолевой терапии [Elmore, 2007].

Регуляция апоптоза осуществляется различными генами и их продуктами, среди которых особое значение имеют белки семейства Bcl-2 [Сеничкин с соавт., 2020] и транскрипционный фактор p53 [Hassin et al., 2023]. Первые представлены как анти-, так и проапоптотическими членами. Дисбаланс в уровнях экспрессии генов представителей данного семейства, в частности, повышенное содержание антиапоптотических белков, является распространенным механизмом устойчивости опухолевых клеток к индукции апоптоза [Сеничкин с соавт., 2020]. Белок p53 поддерживает стабильность генома и тем самым препятствует образованию опухолей. Так, p53 предотвращает деление клеток с повреждениями ДНК и участвует в запуске различных видов ПКГ, включая апоптоз [Levine, 1997]. Мутации гена *TP53* обнаруживаются примерно в половине случаев развития онкологических заболеваний и в большинстве своем приводят к потере функциональной активности p53. Опухоли, содержащие такой белок, характеризуются повышенной пролиферацией клеток и неблагоприятным прогнозом эффективности лечения [Ozaki et al., 2011, Zhou et al., 2019]. Активация транскрипционного фактора p53 способствует усилению транскрипции и соответствующему увеличению уровней p53-зависимых проапоптотических белков (Bax, Puma, Noxa), что, в свою очередь, ведет к нейтрализации их антиапоптотических партнеров и запуску апоптоза в опухолевых клетках. Таким образом, подавление антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и активация p53 являются привлекательными подходами в терапии онкологических заболеваний.

К настоящему моменту большие успехи были достигнуты по обоим направлениям. Несколько лет назад был разрешен для клинического применения селективный антагонист антиапоптотического белка Bcl-2 (Венетоклакс) [Сеничкин с соавт., 2020]. Попытки создания эффективных ингибиторов Mcl-1 в течение многих лет были безуспешными. Настоящим прорывом стала разработка высокоселективного антагониста S63845. Сейчас его производное и ряд других антагонистов Mcl-1 проходят клинические испытания [Pervushin et al., 2020]. Также на пациентах исследуют большое количество соединений, ведущих к активации p53, в частности, за счет ингибирования его негативного регулятора MDM2, который обеспечивает низкий внутриклеточный уровень p53. Так, например, активно изучается препарат RG7388 (Идасанутлин), антагонист MDM2 [Hassin et al., 2023; Fallatah et al., 2023].

Существенной проблемой при использовании подавляющего большинства лекарственных препаратов, особенно противоопухолевых соединений целевого действия, становится развитие приобретенной лекарственной устойчивости к ним с последующей потерей эффективности [Aleksakhina et al., 2021]. Не являются исключением антагонисты Mcl-1 и MDM2, для которых также был отмечен подобный эффект [Tantawy et al., 2023; Haronikova et al., 2021]. Однако механизмы приобретенной устойчивости к ингибированию Mcl-1 и MDM2 остаются малоизученными. Понимание особенностей этих процессов, а также исследование возможных способов преодоления данного типа резистентности может способствовать усовершенствованию

современных тактик лечения онкологических заболеваний и приблизить их клиническое применение в будущем.

Целью исследования является установление причин приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1 и MDM2 и поиск возможных стратегий ее преодоления.

Задачи исследования:

1. Установление предикторных факторов, определяющих чувствительность опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1.
2. Выявление потенциальных механизмов, лежащих в основе устойчивости опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1, и анализ эффективности использования антагонистов Vcl-2 и Vcl-xL для преодоления данного типа устойчивости.
3. Определение прогностической значимости белков семейства Vcl-2 в качестве потенциальных маркеров аденокарциномы легкого.
4. Выявление потенциальных механизмов устойчивости опухолевых клеток к антагонистам MDM2.
5. Оценка эффективности использования антагониста Mcl-1 S63845 или ДНК-повреждающих агентов Цисплатина и Доксорубицина в комбинации с антагонистом MDM2 RG7388 для преодоления устойчивости опухолевых клеток к ингибированию MDM2.
6. Изучение биологической активности новых антагонистов MDM2.

Объект и предмет исследования. Для определения потенциальных механизмов приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1 и MDM2 и способов ее преодоления, для оценки значимости белков семейства Vcl-2 в качестве потенциальных прогностических маркеров аденокарциномы легкого и для анализа биологической активности новых антагонистов MDM2 в ходе работы были использованы клеточные линии нейробластомы (SH-SY5Y, SK-N-SH и SK-N-Be(2)c), аденокарциномы шейки матки (HeLa), аденокарциномы легкого (H23, U1810 и A549), аденокарциномы яичника (Caov-4), колоректального рака (RKO и HCT116).

Для определения прогностической значимости белков семейства Vcl-2 был использован клинический материал пациентов с аденокарциномой легкого, полученный в Национальном медицинском исследовательском центре (НМИЦ) онкологии им. Н.Н. Блохина. Соответствующие неопухолевые ткани, которые располагались вдали от участка опухоли, были охарактеризованы как нормальные эпителиальные клетки в ходе гистологического анализа. Образцы были получены в соответствии с принципами Комитета по этике НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (разрешение № 04-04-08097).

Для оценки эффективности применения химиопрепарата Доксорубицина с целью преодоления устойчивости клеток SH-SY5Y к антагонисту MDM2 RG7388 в *in vivo* модели были использованы самки мышей NSG (NOD/SCID/IL2 γ null) массой 20–25 г, полученные из питомника лабораторных животных «Пушино» Института биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН (ИБХ РАН). Все процедуры были одобрены Институциональным комитетом по уходу и использованию животных ИБХ РАН (протокол №375/2023).

Научная новизна исследования. Применение ингибиторов Mcl-1 и MDM2 является новым и перспективным направлением в таргетной терапии онкологических заболеваний. Изучаемые в рамках данного проекта препараты были разработаны несколько лет назад и сейчас активно исследуются на различных стадиях клинических испытаний. В ходе исследований установлено, что белок Vak является важным предикторным маркером, который определяет чувствительность опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1. Были получены новые клеточные модели, характеризующиеся повышенной устойчивостью к действию антагонистов Mcl-1. В двух из них развитие резистентности к ингибированию Mcl-1 сопровождалось повышением уровней других антиапоптотических белков – Vcl-2 или Vcl-xL. Более того, совместное подавление Mcl-1 и Vcl-2 или Mcl-1 и Vcl-xL вело к преодолению устойчивости

опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1. Также было отмечено, что профиль экспрессии генов белков семейства Bcl-2 имеет важное прогностическое значение у пациентов с аденокарциномой легкого. В частности, наибольшая выживаемость наблюдалась у пациентов с пониженными уровнями Bcl-xL и Mcl-1 и повышенным уровнем Bax.

Впервые был показан синергетический эффект при совместном применении антагонистов Mcl-1 и MDM2 в опухолевой модели нейробластомы. Кроме того, была получена новая клеточная модель нейробластомы, характеризующаяся повышенной устойчивостью к действию антагонистов MDM2. Различными методами *in vitro* и *in silico* было определено, что причина резистентности клеток к ингибированию MDM2 заключается в появлении мутаций в структуре p53. Выявлено, что химиопрепараты Цисплатин и Доксорубин были менее эффективны в качестве индивидуальных соединений в клетках нейробластомы с приобретенной устойчивостью к RG7388 в *in vitro* и *in vivo* моделях. Однако Цисплатин или S63845 в комбинации с антагонистом MDM2 вели к частичному преодолению устойчивости к действию последнего. Наконец, было продемонстрировано наличие биологической активности у новых ингибиторов MDM2, являющихся модификациями препарата Нутлин-3а и обладающих улучшенными физико-химическими свойствами.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные о предикторных маркерах, определяющих чувствительность опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1, а также *in vitro*, *in silico* и *in vivo* результаты, касающиеся механизмов приобретенной устойчивости к действию антагонистов Mcl-1 и MDM2, могут внести существенный вклад в развитие современных подходов к лечению онкологических заболеваний. В частности, эти сведения позволяют оценить потенциальные преимущества и риски применения селективных ингибиторов Mcl-1 и MDM2. Кроме того, полученная информация может способствовать одобрению и рациональному использованию данных агентов в клинической практике в будущем. Прогностическое значение профиля экспрессии генов белков семейства Bcl-2 у пациентов с аденокарциномой легкого имеет большое значение в контексте развития подходов персонализированной медицины. Наличие биологической активности у новых производных Нутлина-3а, ингибиторов MDM2, обладающих повышенной растворимостью по сравнению с оригинальными соединениями из семейства нутлинов, значимо для усовершенствования стратегий получения водорастворимых лекарственных препаратов.

Методология исследования. В основе данной диссертационной работы лежат современные методы клеточной и молекулярной биологии и биохимии. Для выполнения поставленных целей и задач были использованы различные методологические подходы *in vitro*, *in vivo* и *in silico* при помощи релевантных методов статистической обработки данных.

Степень достоверности исследования. Работа выполнена на высоком научно-методическом уровне. Достоверность полученных данных подтверждена различными методами с проведением статистического анализа при помощи программного обеспечения (Microsoft Excel, GraphPad Prism 6, R3.6.1).

Апробация результатов исследования. Результаты диссертационного исследования были представлены на 10 различных конференциях: 23-я международная Пушкинская школа-конференция молодых ученых «Биология-наука 21 века» (апрель 2019, Россия), XXVI Международная научная конференция «Ломоносов» (апрель 2019, Москва, Россия), 27th Euroconference on Apoptosis «Cell Death and Regeneration» (сентябрь 2019, Дрезден, Германия), IV, V и VI Национальные конгрессы по регенеративной медицине (ноябрь 2019, 2022 (оба – Москва) и 2024 (Санкт-Петербург, Россия)), V Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (декабрь 2019, Москва, Россия), V Всероссийский молодежный научный форум «Наука будущего – наука молодых» (декабрь 2020, Москва, Россия), 8th International Electronic Conference on Medicinal Chemistry (онлайн, ноябрь 2022, Швейцария), I Всероссийская научно-практическая конференция «Достижения и перспективы экспериментальной фармакологии в онкологии и радиационной медицине» (март 2024, Обнинск, Россия).

Работа диссертанта была отмечена следующими наградами: медаль Российской академии наук с премией для студентов высших учебных заведений России в области медицины в 2021 г., премия в конкурсе работ талантливых студентов, аспирантов и молодых учёных МГУ имени М.В. Ломоносова, учреждённого О.В. Дерипаской, в 2020 г., 2 место на конкурсе НИР студентов и аспирантов секции "Медицина и фармакология" V Всероссийского молодежного научного форума «Наука будущего – наука молодых» в 2020 г.

Публикации по теме диссертации. Результаты диссертационного исследования опубликованы в 11 статьях в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М. В. Ломоносова по специальностям и отраслям наук.

Кроме того, результаты диссертационной работы были отражены в двух патентах: 1) Патент № 2730497 от 24.08.2020 «2,4,5-три(метоксифенил) цис-имидазолины и способ их получения» (Базанов Д.Р., Лозинская Н.А., Первушин Н.В., Копейна Г.С., Аникина Л.В., Савицкая В.Ю., МаксUTOва А.И.); 2) Патент № 2809688 от 14.12.2023 «Новые азотзамещенные 2,4,5-три(метоксифенил) цис-имидазолины, способ их получения и применения» (Базанов Д.Р., Лозинская Н.А., Первушин Н.В., Копейна Г.С., Савин Е.В.).

Личный вклад автора. Все этапы исследования были выполнены диссертантом лично или при его непосредственном участии. Диссертант сформулировал задачи исследования, провел анализ литературных данных, осуществил планирование экспериментов, подобрал методы, подходящие для выполнения поставленных задач, произвел статистическую обработку и интерпретацию полученных результатов, сформулировал выводы, написал текст диссертации.

Положения, выносимые на защиту:

1. Белки Vak, Vcl-xL и Vcl-2 являются предикторными факторами, определяющими чувствительность опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1.
2. Повышение уровней антиапоптотических белков Vcl-2 или Vcl-xL лежит в основе развития приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагониста Mcl-1 S63845, а использование антагонистов белков Vcl-2 или Vcl-xL при совместном применении с S63845 ведет к преодолению устойчивости опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1.
3. Повышенный уровень белка Vak совместно с пониженными уровнями Vcl-xL и Mcl-1 определяют благоприятный прогноз выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого.
4. Развитие приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагониста MDM2 RG7388 связано с изменением структуры белка p53 вследствие появления замены His193Arg, ведущей к нарушению взаимодействия ДНК и p53 и снижению транскрипционной активности последнего.
5. ДНК-повреждающие агенты Цисплатин и Доксорубин обладают меньшей эффективностью в качестве индивидуальных соединений в клетках нейробластомы с приобретенной устойчивостью к действию антагониста MDM2 RG7388 *in vitro* и *in vivo*, а антагонист Mcl-1 S63845 или Цисплатин в комбинации с RG7388 обеспечивают частичное преодоление устойчивости клеток нейробластомы к действию последнего.
6. Новые антагонисты MDM2, являющиеся производными соединения Нутлин-3а, обладают биологической активностью и улучшенными физико-химическими свойствами по сравнению с Нутлином-3а.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Экспериментальные процедуры. В ходе экспериментов использовали клетки с конфлюентностью 70-80%, в которых кондиционированную среду заменяли на свежую среду, а также необходимые реагенты в рабочих концентрациях. К контрольным клеткам добавляли соответствующий используемому реагенту растворитель.

Трансфекция клеток. Для получения клеточных линий с нокдауном по Vak, Vax, Vim клетки HeLa, H23 и SK-N-BE(2)c трансфицировали целевыми малыми интерферирующими РНК (миРНК) к мРНК данных белков при помощи липофектамина RNAiMAX.

Вестерн-блот анализ. Клетки отделяли скребком от поверхностей чашек Петри, промывали холодным раствором PBS (ПанЭко) и лизировали в RIPA-буфере. Клинические образцы гомогенизировали с использованием пробирок для лизиса BashingBead (Zymo Research) и гомогенизатора тканей Precellys 24 (Bertin Technologies). После измерения концентрации белка в лизатах клеток и тканей набором Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific) готовили пробы для проведения Вестерн-блот анализа. Полученные образцы разделяли в полиакриламидном геле или TGX геле (Bio-Rad) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad). Мембраны блокировали в 5% растворе обезжиренного молока, разведенного в TBS, последовательно инкубировали с растворами первичных и вторичных антител и проявляли при помощи реагента ECL (Promega) на приборе Molecular Imager ChemiDoc (Bio-Rad).

Уровень белков определялся денситометрическим анализом. Для нормализации использовали белки контроля загрузки (tubulin, vinculin, GAPDH). Для клинических образцов количественная оценка уровней белков проводилась в виде отношения нормализованного уровня белка в опухолевой ткани к нормализованному уровню белка в соответствующей нормальной ткани, то есть было представлено соотношение «опухоль/норма» после логарифмирования по основанию два. Такое представление необходимо для корректной оценки изменений белков в патологических тканях. Для нормализации определяли общий пул белка в ходе денситометрии TGX-гелей (Bio-Rad).

Проточная цитофлуориметрия. А. Цитофлуориметрический анализ с окраской Аннексином V-FITC (Аннексин) и йодидом пропидия (ЙП). Клетки отделяли от поверхности чашек Петри при помощи раствора трипсина, промывали холодным раствором PBS (ПанЭко), добавляли аннексин V-FITC (Invitrogen) в количестве 2 мкл и йодид пропидия до конечной концентрации 0,5 мкг/мл.

Б. Цитофлуориметрический анализ subG1. К собранному осадку клеток добавляли 70% ледяной спирт в растворе PBS для фиксации. После удаления спирта добавляли йодид пропидия (50 мкг/мл) и РНКазу А (100 мкг/мл).

Анализ популяций клеток проводили на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (BD Biosciences) при помощи программного обеспечения BD FACSDiva (BD Biosciences).

ПЦР в реальном времени. Для выделения суммарной РНК к клеткам добавляли реагент Trizol (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя. Полученную РНК растворяли в воде, свободной от РНКаз, измеряли ее концентрацию с помощью прибора NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Затем проводили обратную транскрипцию с использованием праймеров Random(dN)₁₀ и Oligo(dT)₁₅ (Евроген). Далее в раствор, содержащий кДНК, вносили смесь прямого и обратного праймеров с добавлением qPCRmix-HS SYBR (Евроген) для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени при помощи амплификатора CFX96 (Bio-Rad). Значение концентрации мРНК исследуемых белков вычисляли по отношению к мРНК транскрипционного фактора ТАТА-связывающего белка. Расчеты производили с учетом эффективности амплификации, которую определяли при помощи построения калибровочной прямой.

Оценка жизнеспособности клеток (MTS-тест). Анализ основан на превращении желтой соли тетразолия MTS в водорастворимый формазановый продукт оранжевого цвета. После инкубации клеток с реагентом MTS проводили спектрофотометрический анализ при длине волны 480 нм на приборе Varioskan Flash (Thermo Scientific). Результаты обрабатывали при помощи программы GraphPad Prism 6 (GraphPad Software).

Секвенирование нового поколения (NGS). При помощи набора NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep Kit for Illumina (NEB) была приготовлена библиотека из геномной ДНК согласно методическим рекомендациям к набору, которую использовали для гибридизации с зондами из набора SureSelect Focused Exome (Agilent), содержащего зонды для отбора кодирующих частей генов *TP53* и *MDM2*. Секвенирование проводили на приборе HiSeq1500 (Illumina) для достижения среднего покрытия 100х. Последовательности выравнивали на человеческий геном версии Hg18 и проводили поиск мутаций вручную. Исследование было выполнено совместно с ООО «Геноаналитика».

Анализ данных TCGA. Информация об уровне транскрипции мРНК получена с ресурса cBioPortal (biportal.org) в виде стандартизированной оценки (z-оценки) значений на основе базы данных Атласа генома аденокарциномы легких (LUAD TCGA; <https://portal.gdc.cancer.gov/>, по состоянию на 1 сентября 2021 г.) и проанализирована с помощью программного обеспечения R3.6.1. Транскрипция мРНК в виде z-оценки относительно нормальных образцов показывает количество стандартных отклонений от среднего значения экспрессии того же гена в нормальных образцах. Данные об общей выживаемости пациентов с LUAD были получены с ресурса cBioPortal, и было произведено сравнение между несколькими подгруппами пациентов с высокой и низкой экспрессией выбранных генов. Определение категорий «высокая» и «низкая» экспрессия генов было основано на медиане уровня мРНК z-оценки относительно нормальных образцов. Для анализа выживаемости использовался 10-летний диапазон наблюдения. Статистический анализ был выполнен с использованием теста логарифмического ранга с помощью программного обеспечения R3.6.1 с визуализацией при помощи графика Каплана-Мейера. Для учета множественных сравнений использовали поправку Холма-Бонферрони.

Биоинформатический анализ аминокислотных замен. Имеющиеся мутации в структуре p53 были исследованы методами молекулярного моделирования при помощи программного пакета AMBER20 и суперкомпьютерных мощностей. Исследование было проведено совместно с Ниловым Д. К., к.х.н, в.н.с. НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского.

Моделирование опухоли у мышей. Клетки SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к действию RG7388, (~3 млн.) были введены мышам подкожно в бессывороточной среде с 30% Matrigel (Corning) в правый бок для создания ксенотрасплантантной модели нейробластомы. После достижения объема опухоли ~50 мм³ (на 5 день после подсадки клеток) 20 мышей были случайным образом поделены на 4 группы (n=5): SH-SY5Y («Контроль»), SH-SY5Y («Доксорубицин»), SH-SY5Y, уст. к RG7388, («Контроль») и SH-SY5Y, уст. к RG7388, («Доксорубицин»). Мышам из групп «Доксорубицин» в/в вводили препарат (3 мг/кг/день после растворения в буфере PBS) три дня подряд (5-7 дни), в то время как контрольным животным вводился 0,9% раствор хлорида натрия. Динамику роста опухоли контролировали с помощью штангенциркуля путем измерения продольных и поперечных размеров. Объем опухоли рассчитывали как $V = \text{ширина}^2 \times \text{длина} / 2$. На 12 день животные были подвергнуты эвтаназии при помощи углекислого газа. Исследование было проведено совместно с Шипуновой В. О., к.б.н, с.н.с. ИБХ РАН.

Гистологический анализ тканей. Для проведения гистологического анализа опухолевых тканей ксенотрасплантантов были сформированы две дополнительные экспериментальные группы животных: SH-SY5Y («Контроль», N=4) и SH-SY5Y, уст. к RG7388, («Контроль», N=6). После эвтаназии мышей ксенотрансплантаты опухолей были подвергнуты резекции и хранились в 10% нейтральном буферном растворе формалина. Образцы тканей (фиксированные формалином и залитые парафином) окрашивали гематоксилином и эозином. Уровень клеточного обновления (отношение митотического индекса (МИ) к апоптотическому индексу (АИ)) был определен как отношение числа митозов к числу апоптотических клеток и оценен в 10 случайных полях высокого разрешения (10 HPF, $\times 400$) препаратов опухолей.

Иммуногистохимическое окрашивание было проведено на приборе Ventana BenchMark XT (Ventana Medical-Systems) с использованием первичного антитела Ki-67 (Abcam, ab15580; +37 °C, 16 мин.) и DAB Universal ultraView (Ventana Medical-Systems). Уровень окраски маркера Ki-67 был определен путем подсчета числа Ki-67-положительных клеток/500 или более опухолевых клеток в поле зрения микроскопа. Исследование было выполнено совместно с к.б.н., врачом-патологоанатомом НМИЦ акушерства, гинекологии и перинатологии имени академика В.И. Кулакова МЗ РФ Бадлаевой А.С.

Обработка данных. Обработка результатов измерений, а также статистический анализ данных проводились с помощью программного обеспечения Microsoft Excel и GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). На основании полученных данных были построены соответствующие таблицы и графики. Статистический анализ проводился с помощью U-критерия Манна-Уитни, если не указано иное в подписи к рисунку.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Оценка роли проапоптотических белков семейства Bcl-2 в различной эффективности действия антагонистов Mcl-1 S63845 и A1210477

Наиболее перспективным способом нейтрализации действия антиапоптотического белка Mcl-1 является применение его низкомолекулярных селективных антагонистов, относящихся к классу ВНЗ-миметиков. Препараты данного класса имитируют действие ВНЗ-only белков и блокируют функциональную активность антиапоптотических белков семейства Bcl-2. В ходе предварительных экспериментов были выбраны опухолевые клеточные линии человека (аденокарцинома шейки матки HeLa и аденокарцинома легкого H23), которые отличаются повышенной чувствительностью к подавлению Mcl-1. Кроме того, они относятся к тканям, для которых характерно повышение уровня белка Mcl-1 в процессе канцерогенеза [Uhlen et al., 2017; Lestini et al., 2009].

В ходе предварительных экспериментов было обнаружено, что оба исследуемых антагониста Mcl-1 S63845 и A1210477 вели к дозозависимому накоплению Mcl-1, что является характерным маркером взаимодействия ВНЗ-миметиков с данным белком, однако S63845 более эффективно запускал клеточную гибель по сравнению с A1210477 в клетках HeLa. Было предположено, что причиной низкой эффективности A1210477 может быть ограниченность его действия. Оба низкомолекулярных ингибитора разрушают комплексы Mcl-1 с его проапоптотическими партнерами, что ведет к увеличению количества несвязанных ВНЗ-only белков и эффекторных белков семейства Bcl-2 и, в конечном итоге, к запуску апоптоза. Mcl-1 образует комплексы с различными проапоптотическими белками семейства Bcl-2, среди которых наибольшим сродством к Mcl-1 обладает Bak [Kale et al., 2018, Ku et al., 2011]. Поэтому разница в эффективности действия двух исследуемых ВНЗ-миметиков может определяться степенью влияния соединений на разрушение комплексов Mcl-1/Bak. Для проверки этой гипотезы был осуществлен нокдаун Bak с помощью метода РНК-интерференции с последующей оценкой гибели клеток HeLa при действии S63845 (1 и 3 мкМ) и A1210477 (10 мкМ) (Рис. 1).

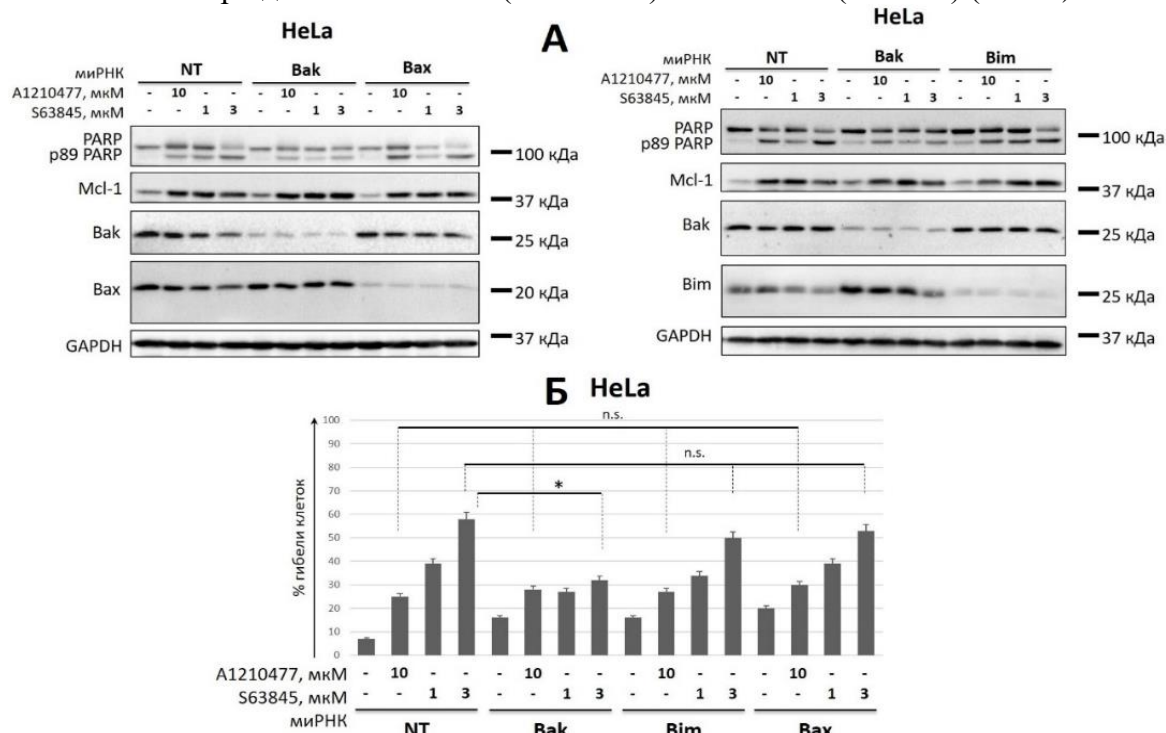


Рис. 1. Оценка влияния нокдауна белков Bak, Bax и Bim на эффективность антагонистов Mcl-1 A1210477 и S63845 в клетках HeLa. Результаты Вестерн-блот анализа (А) и проточной цитометрии (Аннексин/ЙП) (Б) в клетках HeLa. Белок GAPDH – контроль загрузки геля; PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу), маркер апоптоза; миРНК к Bak, Bax, Bim, NT – нецелевая миРНК. Время трансфекции – 24 часа; время инкубации клеток после добавления

антагонистов – 24 часа; % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Данные на гистограмме представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n=4$; * $p<0,05$, n.s. – статистически не значимо (U-тест).

Кроме того, был осуществлен нокдаун двух других проапоптотических членов семейства Bcl-2: белка Bax, который, наряду с Bak, является одним из двух основных эффекторных белков, и белка Bim, что взаимодействует с широким спектром антиапоптотических белков семейства Bcl-2 и, в отличие от Noxa и Puma, не индуцируется транскрипцией p53 в ответ на стрессовые условия [Czabotar et al., 2015].

По данным Вестерн-блот анализа и проточной цитометрии с окрашиванием Аннексин/ЙП, только нокдаун белка Bak влиял на степень индукции апоптоза при использовании S63845. При этом эффект был дозозависимым: при меньшей концентрации S63845 (1 мкМ) это влияние было менее выражено (по результатам цитометрического анализа доля погибших клеток уменьшалась на 11%), а при повышении концентрации S63845 до 3 мкМ нокдаун белка Bak вел к выраженному уменьшению расщепления белка PARP, а также к снижению популяции гибнущих клеток HeLa с 58% до 32% (Рис. 1).

Следовательно, разрушение комплексов Mcl-1/Bak является ключевым условием для эффективной индукции апоптоза при использовании антагонистов Mcl-1. Обнаружено, что в основе увеличения эффективности запуска апоптоза для соединения S63845 при повышении его концентрации лежит Bak-зависимый механизм, в то время как для A1210477 нокдаун белка Bak не влияет на его проапоптотическую активность. При этом дальнейшее увеличение концентраций для A1210477 является нецелесообразным ввиду его низкой селективности в высоких дозах [Mallik et al., 2019]. Аналогичные результаты по Bak-зависимому механизму действия S63845 были получены также на линии H23. Поэтому дальнейшие эксперименты по ингибированию Mcl-1 в рамках настоящей работы проводились только с использованием S63845.

2. Изучение механизмов устойчивости опухолевых клеток к действию антагониста Mcl-1 S63845

Злокачественные клетки часто приобретают устойчивость к противораковым препаратам. Поэтому понимание механизмов, лежащих в основе развития такой устойчивости, и поиск возможных способов ее преодоления являются одними из ключевых проблем современной медицины. Для получения клеток, устойчивых к действию S63845, был использован «пульсовый» подход: исходные клеточные линии культивировали с постепенно возрастающими концентрациями данного антагониста Mcl-1 (Рис. 2).



Рис. 2. Схема выведения и изображения клеточных линий HeLa, H23 и SK-N-Be(2)c, характеризующихся повышенной устойчивостью к действию S63845. А. Схема получения устойчивых к ингибированию Mcl-1

1 клеточных популяций. Б. Репрезентативные изображения исходных и устойчивых клеточных линий HeLa, H23 и SK-N-Be(2)c, полученные при использовании фазово-контрастного светового микроскопа (Leica AF6000 LX). Шкала – 250 мкм.

Для предотвращения обратного выброса препарата за счет действия Р-гликопротеина (белка множественной лекарственной устойчивости), повышенный уровень которого часто встречается в опухолевых клетках, при выведении устойчивых линий клеток использовали ингибитор этого белка - Верапамил (50 мкМ).

В результате были выведены клетки HeLa, резистентные к ингибированию Mcl-1 (HeLa, уст. к S63845), по сравнению с исходными. Данный эффект был особенно выражен при использовании микромолярных концентраций ВНЗ-миметика, о чем наглядно свидетельствуют уровни расщепления белков каспазы-3 и PARP (Рис. 3А) и результаты проточной цитометрии (Аннексин/ЙП): размер популяции погибших клеток для линии HeLa, уст. уменьшался с 39% до 27% и с 63% до 37% при 1 и 3 мкМ S63845, соответственно (Рис. 3Б).

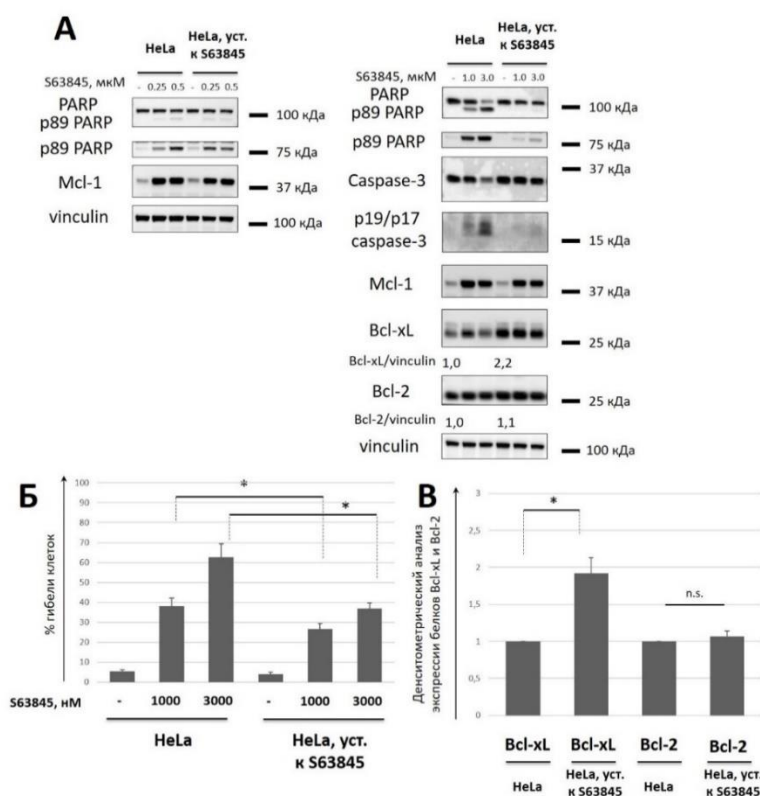


Рис. 3. Сравнительный анализ клеточной гибели при действии ВНЗ-миметика S63845 и уровня антиапоптотических белков Bcl-2 семейства в клетках HeLa и HeLa, уст. к S63845. Результаты Вестерн-блот анализа (А), проточной цитометрии с окрашиванием Аннексин/ЙП (Б) и денситометрического анализа (В) в клетках HeLa и HeLa, уст. к S63845. Bcl-xL/vinculin и Bcl-2/vinculin – денситометрический анализ уровней соответствующих белков в пересчете на vinculin; время инкубации клеток после добавления S63845 (0.25 – 3 мкМ) – 24 часа; % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Данные на гистограммах представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; * p<0,05, n.s. – статистически не значимо (U-тест).

Было предположено, что в устойчивых клетках может изменяться уровень экспрессии генов антиапоптотических белков семейства Bcl-2. Ранее для селективного антагониста Bcl-2 Венетоклакса было установлено, что снижение чувствительности к ингибированию одного антиапоптотического белка может быть связана с повышением экспрессии генов других антиапоптотических белков [Tahir et al., 2017]. В ходе Вестерн-блот анализа было выявлено повышение уровня белка Bcl-xL в резистентных клетках по сравнению с исходной популяцией, при этом уровень другого антиапоптотического белка Bcl-2 не изменился (Рис. 3В).

Следовательно, белок Bcl-xL может являться еще одним предикторным фактором, определяющим чувствительность опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1, и отвечать за развитие их устойчивости к данным препаратам.

Схожие результаты были получены в клетках нейробластомы SK-N-Be(2)c (Рис. 4). Однако в отличие от линии HeLa, в устойчивых клетках SK-N-Be(2)c уровень Bcl-xL не менялся, при этом наблюдалось повышение уровня белка Bcl-2, что также свидетельствует о его предикторной роли в ответе опухолевых клеток на действие антагонистов Mcl-1 и вкладе в развитие устойчивости к этой группе препаратов (Рис. 4B).

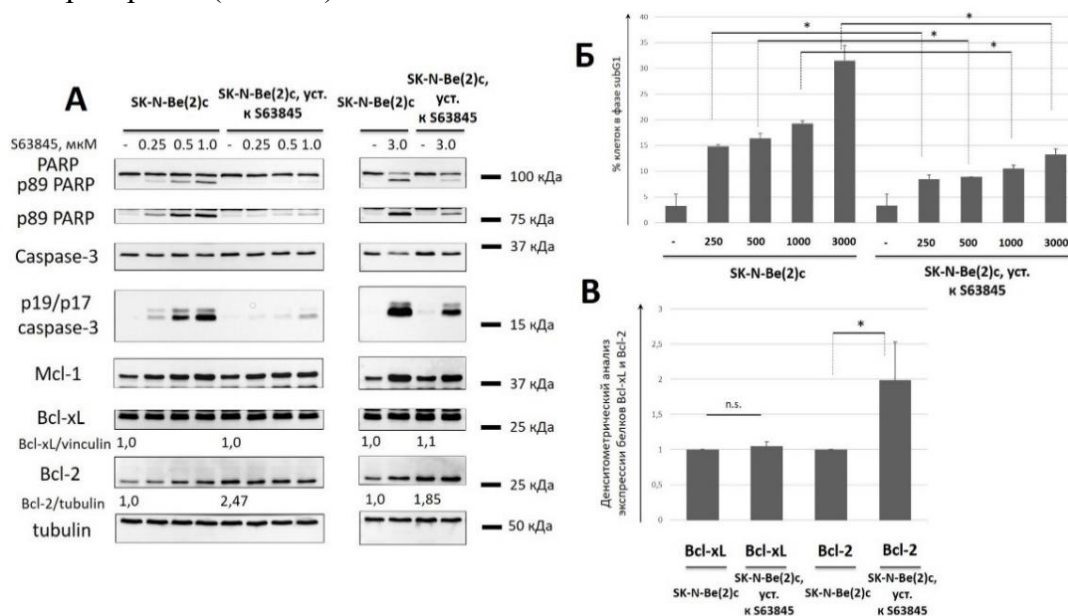


Рис. 4. Сравнительный анализ клеточной гибели при действии ВНЗ-миметика S63845 и уровня антиапоптотических белков Bcl-2 семейства в клетках SK-N-Be(2)c и SK-N-Be(2)c, уст. к S63845. Результаты Вестерн-блот анализа (А), проточной цитометрии (subG1) (Б) и денситометрического анализа (В) в клетках SK-N-Be(2)c и SK-N-Be(2)c, уст. к S63845. Bcl-xL/tubulin и Bcl-2/tubulin – денситометрический анализ уровней соответствующих белков в пересчете на tubulin. Время инкубации клеток после добавления S63845 (0.25 – 3 мкМ) – 24 часа; % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Данные на гистограммах представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; * p<0,05, n.s. – статистически не значимо (U-тест).

Наконец, были также получены клетки H23, уст. к S63845, однако на этой линии не наблюдалось изменений в уровнях белков Bcl-2 и Bcl-xL.

Таким образом, были выведены три клеточные линии различного происхождения, которые обладали повышенной устойчивостью к ингибированию Mcl-1 при действии ВНЗ-миметика S63845. В двух из них наблюдалось повышение уровня других антиапоптотических белков: в случае HeLa – Bcl-xL, а в клетках SK-N-Be(2)c – Bcl-2, что подтверждает ранее выявленные закономерности, согласно которым ингибирование одного антиапоптотического белка может приводить к увеличению уровня другого. Кроме того, белки Bcl-xL и Bcl-2, наряду с Bax, являются потенциальными предикторами, определяющими ответ опухолевых клеток на действие антагонистов Mcl-1.

Однако пример клеток H23 показывает, что изменение уровней антиапоптотических белков является не единственной причиной приобретенной устойчивости опухолевых клеток к S63845-опосредованному блокированию Mcl-1. Вероятным объяснением такого типа резистентности может быть появление мутаций в гене целевого белка (Mcl-1) или в генах эффекторных белков (Bax и Bcl-2), ведущих к нарушению их функциональной активности.

3. Оценка эффективности применения антагонистов Bcl-2 и Bcl-xL для преодоления устойчивости опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1

Совместное использование различных ВНЗ-миметиков является перспективным направлением в терапии онкологических заболеваний, так как одновременное ингибирование двух антиапоптотических белков ведет к синергетическому эффекту и позволяет преодолеть устойчивость клеток к отдельным ВНЗ-миметикам [Сеничкин с соавт., 2020]. В данной работе изучена целесообразность применения антагонистов Bcl-2 и Bcl-xL для преодоления резистентности опухолевых клеток HeLa, H23 и SK-N-Be(2)c к S63845.

Первоначально была оценена комбинация S63845 и ингибитора Bcl-2 (Венетоклакса) (Рис. 5). Установлено, что в клетках HeLa комбинация Венетоклакса (1 мкМ) и S63845 (500 нМ) вела к меньшему запуску апоптоза по сравнению с 3 мкМ S63845 по данным Вестерн-блота (степень расщепления PARP) и результатам цитометрии (размер популяции погибших клеток составлял 70% и 47%, соответственно). В то же время в клетках H23 и SK-N-Be(2)c, где максимальная доза S63845 составляла 1 мкМ, наблюдалась иная картина: доля гибнущих клеток не менялась (H23) или увеличивалась (SK-N-Be(2)c). Однако во всех трех линиях комбинация Венетоклакса (1 мкМ) и S63845 (500 нМ) приводила к преодолению резистентности опухолевых клеток к действию S63845 и позволяла снизить дозу антагониста Mcl-1 до 500 нМ (Рис. 5).

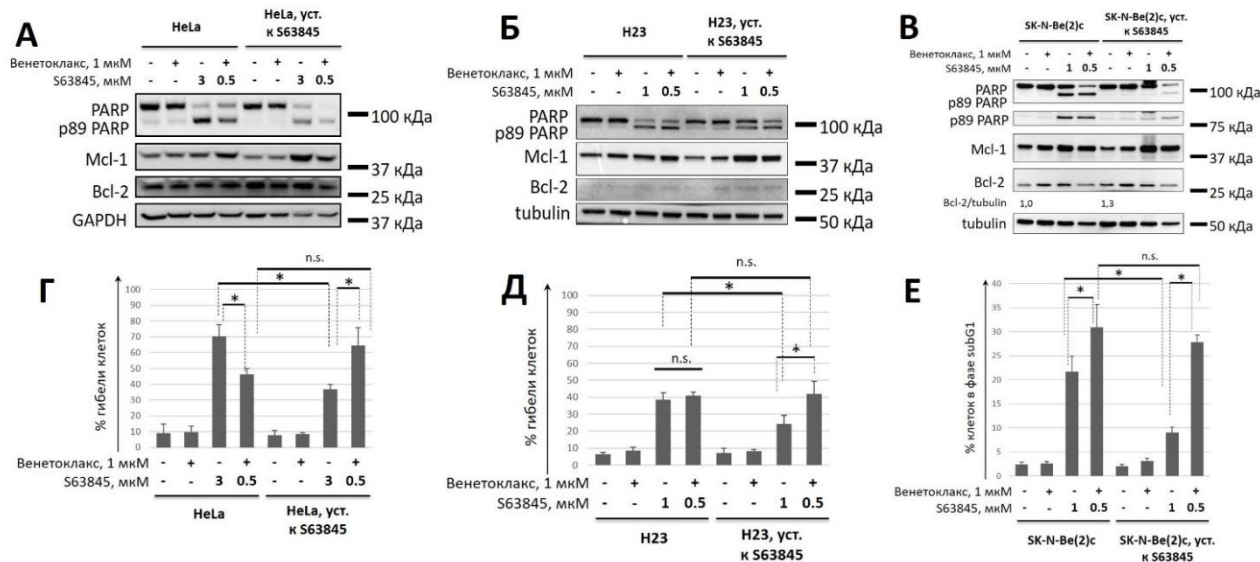


Рис. 5. Оценка эффективности применения Венетоклакса для преодоления устойчивости клеток к S63845. А-В. Результаты Вестерн-блот анализа в материнских и устойчивых к действию S63845 клетках HeLa (А), H23 (Б) и SK-N-Be(2)c (В). Г-Д. Данные цитометрического анализа с окрашиванием Annexin/PI в клетках HeLa/HeLa, уст. к S63845 (Г) и H23/H23, уст. к S63845 (Д). Е. Данные цитометрического анализа методом subG1 в клетках SK-N-Be(2)c/SK-N-Be(2)c, уст. к S63845. % гибели клеток – суммарный процент апоптотических и некротических клеток. Время инкубации клеток после добавления ингибиторов составляет 24 часа. Данные на гистограммах представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; n.s. – статистически не значимо, * p<0,05 (U-тест).

Далее была проанализирована комбинация антагониста Bcl-xL (A1331852) и Mcl-1 (S63845) (Рис. 6). В ходе предварительных экспериментов была обнаружена высокая чувствительность опухолевых клеток к совместному ингибированию Bcl-xL и Mcl-1, поэтому были выбраны низкие дозы ВНЗ-миметиков (оба – 100 нМ), а время инкубации клеток после их добавления составило 6 часов.

Данная комбинация препаратов вела к существенному запуску гибели всех исследуемых клеточных линий (как исходных, так и устойчивых к S63845) (Рис. 6А-В). В случае увеличения концентраций ВНЗ-миметиков до 1 мкМ и времени инкубации клеток до 24 часов (Рис. 6Г-Д) наблюдалась практически полная гибель клеток SK-N-Be(2)c, о чем свидетельствует деградация большинства белков, в том числе и тубулина (Рис. 6Г).

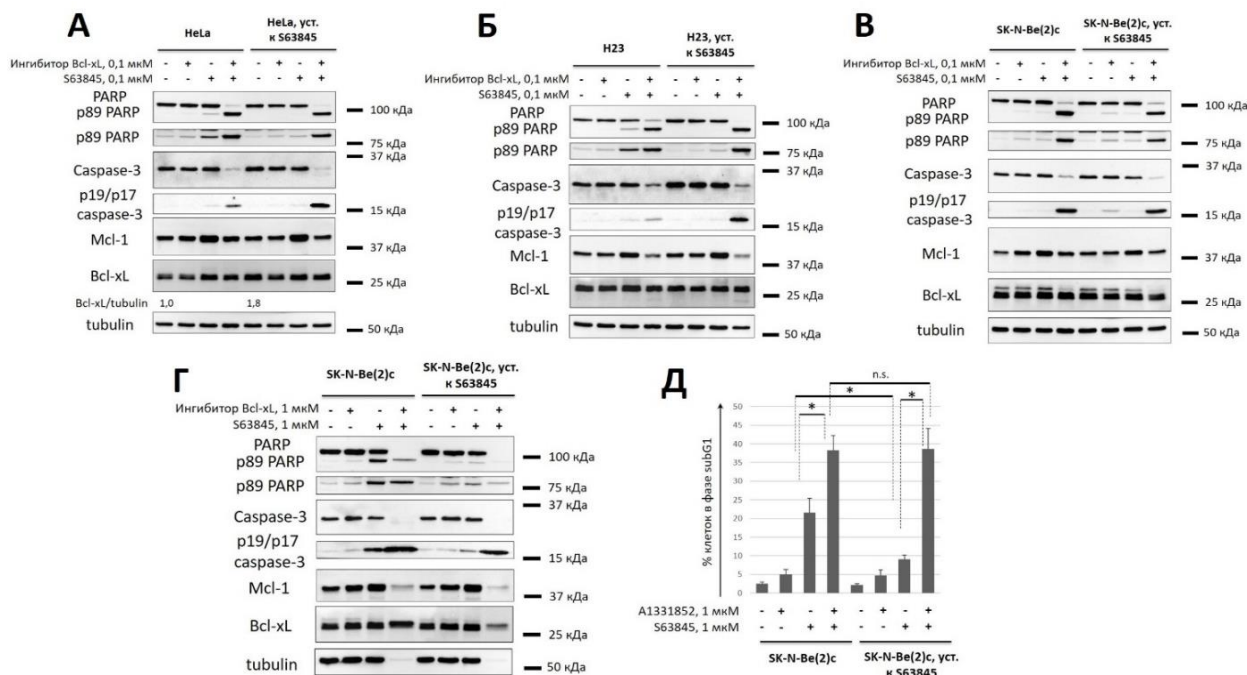


Рис. 6. Оценка эффективности применения ингибитора Bcl-xL (A13311852) для преодоления устойчивости клеток к S63845. А-В. Результаты Вестерн-блот анализа в исходных и устойчивых к действию S63845 клетках HeLa (А), H23 (Б) и SK-N-Be(2)c (В). Г-Д. Данные Вестерн-блот анализа (Г) и цитометрического анализа (subG1) (Д) в клетках SK-N-Be(2)c/SK-N-Be(2)c, уст. к S63845. Время инкубации клеток после добавления ингибиторов составляет 6 часов (А-В) и 24 часа (Г-Д). Данные на гистограмме представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n=4$; n.s. – статистически не значимо, * $p<0,05$ (U-тест).

Таким образом, установлено, что антагонисты других антиапоптотических белков (Bcl-2 и Bcl-xL) в комбинации с S63845 способны преодолевать приобретенную устойчивость опухолевых клеток к действию последнего. Однако наиболее рациональной стратегией лечения является сочетание ингибитора Bcl-2 с S63845, поскольку комбинация последнего с блокатором Bcl-xL ведет к выраженной цитотоксичности, что в ходе клинического применения может вызвать опасные побочные эффекты.

4. Оценка белков семейства Bcl-2 в качестве потенциальных прогностических маркеров аденокарциномы легкого

Для изучения потенциальной практической значимости ВНЗ-миметиков в лечении солидных опухолей в рамках данной работы был проведен анализ уровней мРНК и белков семейства Bcl-2 в тканях аденокарциномы легкого. Так, была получена информация об уровне транскрипции мРНК при помощи ресурса cBioPortal (bioportal.org) в виде стандартизированной оценки (z-оценки) значений на основе базы данных Атласа генома аденокарциномы легких (LUAD TCGA; <https://portal.gdc.cancer.gov/>, по состоянию на 1 сентября 2021 г.) (Рис. 7А). Согласно этим данным, уровень мРНК антиапоптотических членов семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL и Mcl-1) был ниже в опухолевых тканях по сравнению с нормальными. В то же самое время для белков Vak, Vax, Vim и Vid наблюдалась обратная картина. Эти закономерности были подтверждены в ходе Вестерн-блот анализа клинических образцов опухолевой легочной ткани и прилегающих неопухолевых участков у пациентов с диагностированной аденокарциномой легкого в НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (Рис. 7Б, В). Обнаружено, что в патологических тканях повышается экспрессия генов проапоптотических белков (Vak, Vax, Vim и Vid), при этом уровни антиапоптотических белков (Bcl-2, Mcl-1 и, в особенности, Bcl-xL) снижаются, что полностью согласуется с результатами анализа мРНК, полученными из открытой базы данных. Важно отметить, что подобный белковый профиль антиапоптотических членов семейства Bcl-2 наблюдается у опухолевых клеток, обладающих чувствительностью к действию S63845, что

представлено на примере клеток HeLa и четырех опухолевых клеточных линий различного происхождения, не обладающих чувствительностью к ингибированию Mcl-1 (Рис. 7Г). Эти линии характеризуются высоким уровнем Bcl-xL (Caov-4, HCT116, U1810 и A549) или Bcl-2 (U1810) по сравнению с клетками HeLa.

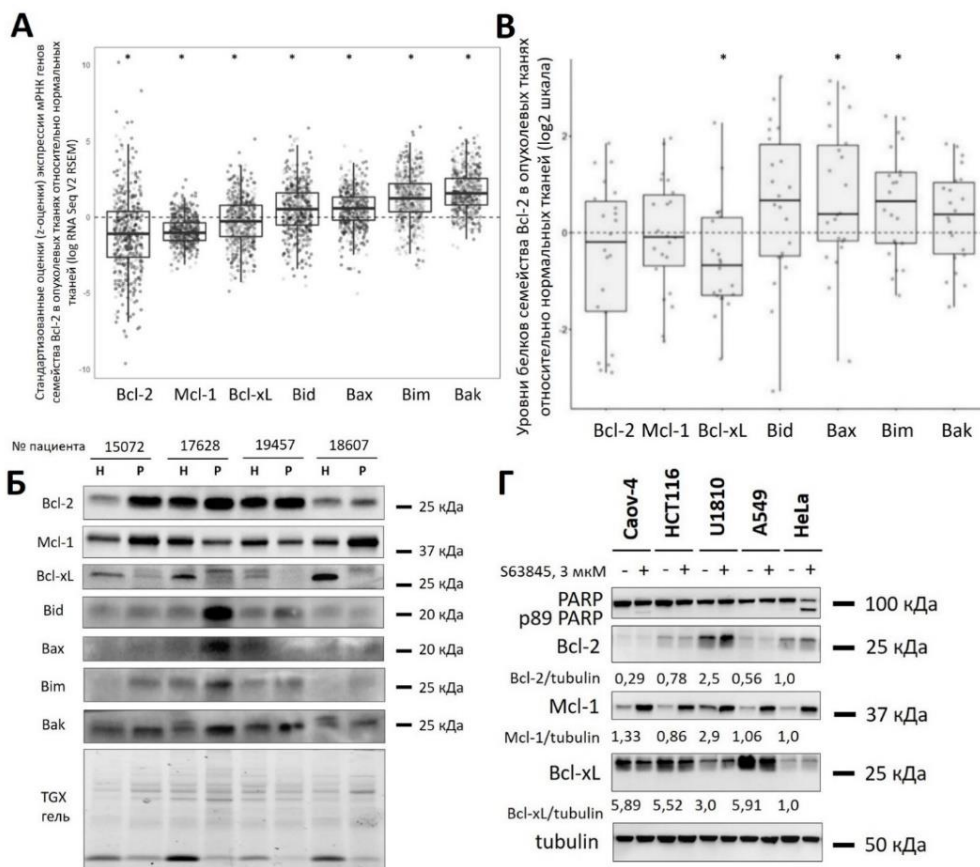


Рис. 7. Оценка уровней экспрессии генов белков семейства Bcl-2 в качестве потенциальных прогностических маркеров аденокарциномы легкого. А. Стандартизованные оценки (z-оценки) уровней мРНК генов семейства Bcl-2 в опухолевых тканях относительно нормальных тканей (log RNA Seq V2 RSEM). Б. Репрезентативный Вестерн-блот клинических образцов пациентов (n=4) с аденокарциномой легкого. В. Данные денситометрического анализа всего пула клинических образцов (n=22) по уровню белков семейства Bcl-2 в виде соотношения «опухоль/норма» после нормализации на TGX гели и логарифмирования по основанию 2. Г. Результаты Вестерн-блот анализа по уровням антиапоптотических белков Bcl-2 семейства в опухолевых клеточных линиях. Время инкубации клеток после добавления S63845 – 24 часа. * p<0,05.

Кроме того, был проведен анализ выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого по данным базы LUAD TCGA (N=510) (Рис. 8). Были сформированы четыре подгруппы пациентов в зависимости от уровня антиапоптотического белка Bak и антиапоптотических белков Mcl-1 и Bcl-xL (Рис. 8А, Б). Следует отметить, что выживаемость пациентов с пониженным уровнем Bcl-xL и повышенным уровнем Bak значительным образом зависела от уровня Mcl-1. Так, сопутствующая повышенная экспрессия гена Mcl-1 была связана с плохим прогнозом, в то время как пониженная экспрессия гена Mcl-1 коррелировала с наиболее благоприятным прогнозом по сравнению со всеми остальными подгруппами пациентов (Рис. 8В). Поскольку белок Bak является предикторным фактором, определяющим чувствительность опухолевых клеток к действию ингибиторов Mcl-1, применение последних может иметь высокий терапевтический потенциал для пациентов с повышенным уровнем Bak и пониженными уровнями Mcl-1 и Bcl-xL.

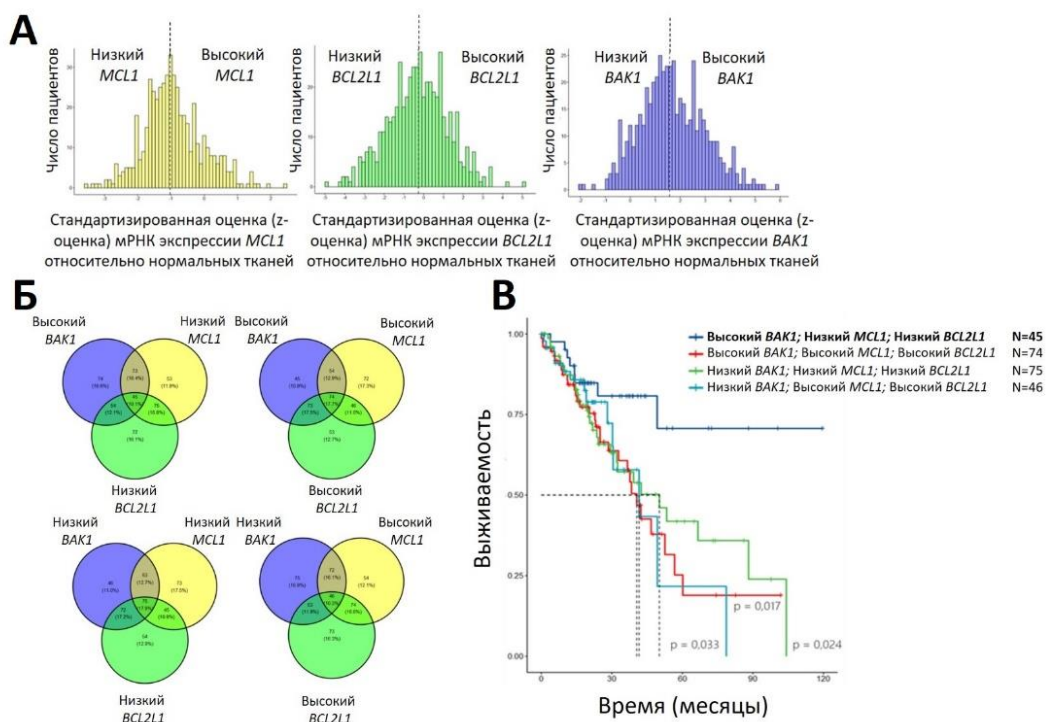


Рис. 8. Оценка роли семейства Vcl-2 в выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого. А. Гистограммы стандартизованных оценок (z-оценок) уровней мРНК генов семейства Vcl-2 (*MCL1*, *BCL2L1*, *BAK1*) в опухолевых тканях относительно нормальных тканей (log RNA Seq V2 RSEM). Б. Диаграммы Венна показывают формирование четырех подгрупп пациентов для анализа выживаемости: Высокий *BAK1*, Низкий *MCL1*, Низкий *BCL2L1*; Высокий *BAK1*, Высокий *MCL1*, Высокий *BCL2L1*; Низкий *BAK1*, Низкий *MCL1*, Низкий *BCL2L1*; Низкий *BAK1*, Высокий *MCL1*, Высокий *BCL2L1*. В. Кривые Каплана-Мейера выживаемости пациентов в четырех подгруппах с различной экспрессией белков семейства Vcl-2. Тест логарифмического ранга с поправкой Холма-Бонферрони был использован для сравнения группы пациентов «Высокий *BAK1*, Низкий *MCL1*, Низкий *BCL2L1*» с другими подгруппами.

Таким образом, профиль экспрессии генов белков семейства Vcl-2 является значимым прогностическим маркером у пациентов с аденокарциномой легкого и может играть важную роль в прогнозировании эффективности противоопухолевой терапии данного вида рака.

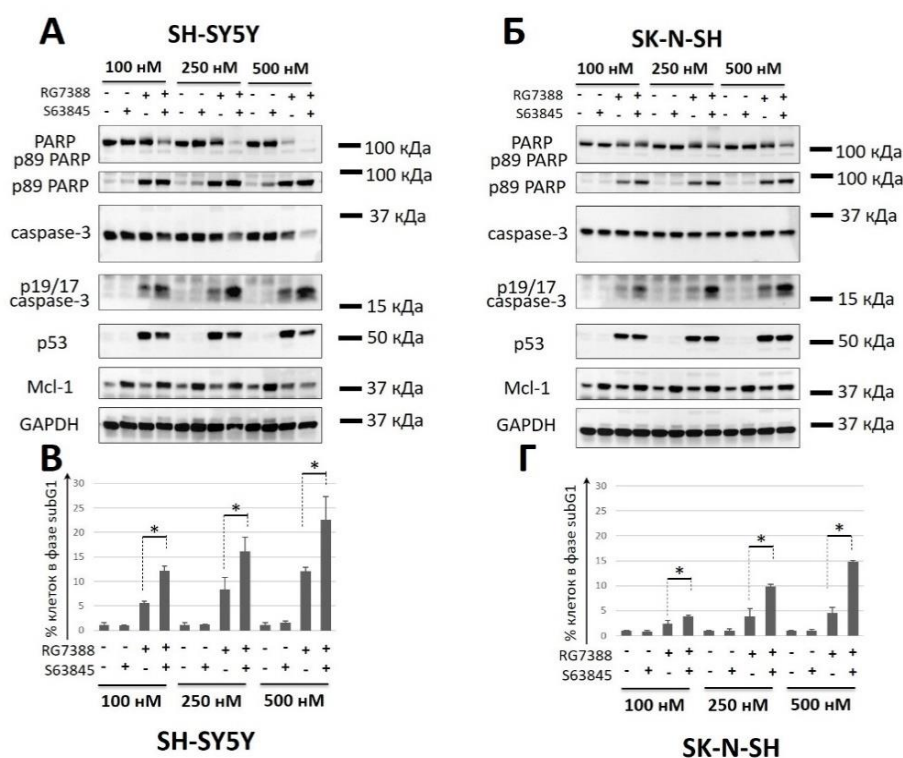
5. Оценка эффективности совместного использования антагонистов Mcl-1 и ингибиторов MDM2

В настоящее время активно изучается противоопухолевая активность ВНЗ-миметиков в различных гематологических и солидных злокачественных образованиях. Ряд соединений проходит клинические испытания, а Венетоклак в комбинации с химиопрепаратами уже одобрен для лечения острого миелобластного лейкоза (ОМЛ) [Pervushin et al., 2020]. Однако в качестве индивидуальных соединений применение ВНЗ-миметиков малоэффективно, что связано с развитием приобретенной устойчивости к их действию, показанной в ходе данной работы для антагониста S63845. Для расширения спектра использования и увеличения противоопухолевой активности целесообразно комбинировать препараты этого класса между собой или с другими противораковыми агентами. С этой целью было предложено оценить эффективность сочетания ВНЗ-миметиков с нутлинами, которые относятся к группе низкомолекулярных селективных антагонистов белка MDM2. Механизм действия нутлинов заключается в ингибировании MDM2, что ведет к накоплению и повышению транскрипционной активности белка p53 в раковых клетках. Было обнаружено, что комбинирование антагонистов Vcl-2 (Венетоклак) и MDM2 (RG7388) приводит к синергетическому эффекту в опухолевой модели нейробластомы *in vitro* и *in vivo* [Van Goethem et al., 2017]. В настоящее время данное сочетание препаратов исследуется в

клинических испытаниях [Hassin et al., 2023; Fallatah et al., 2023]. Однако целесообразность совместного ингибирования Mcl-1 и MDM2 в солидных моделях опухолей не была изучена. Был проведен анализ эффективности комбинации антагонистов Mcl-1 (S63845) и MDM2 (RG7388) на клетках нейробластомы SH-SY5Y и SK-N-SH. Эти клетки содержат белок p53 дикого типа [Tweddle et al., 2001], что является необходимым условием для действия нутлинов [Hassin et al., 2023]. Кроме того, было показано, что нутлины проявляют высокую противоопухолевую активность в нейробластоме [Van Maerken et al., 2014].

По итогам предварительных экспериментов при помощи MTS-теста было определено, что клеточные линии SH-SY5Y и SK-N-SH обладают низкой чувствительностью к действию S63845: значения ингибирующих концентраций (IC₅₀) составили $18,01 \pm 5,21$ мкМ и $14,97 \pm 4,54$ мкМ соответственно. Однако эти клетки обладают высокой чувствительностью к действию RG7388: значения ингибирующих концентраций (IC₅₀) составили $0,27 \pm 0,08$ мкМ и $2,12 \pm 0,62$ мкМ, что полностью согласуется с ранее полученными данными по ответам этих клеточных линий на ингибирование Mcl-1 и MDM2 [Ajay et al., 2021; Van Goethem et al., 2017; Bierbrauer et al., 2020; Van Goethem et al., 2022].

Далее была произведена оценка эффективности совместного применения S63845 и RG7388 в наномолярных концентрациях в клетках SH-SY5Y и SK-N-SH (Рис. 9). Маркером действия препаратов S63845 и RG7388 является накопление белков Mcl-1 и p53 соответственно.



По данным Вестерн-блота, в двух клеточных линиях наблюдалось значимое усиление гибели при совместном использовании S63845 и RG7388 по сравнению с действием последнего в качестве индивидуального вещества, уже начиная с 100 нМ, о чем свидетельствует расщепление прокаспазы-3 и PARP, а также накопление каталитически активных фрагментов эффекторной каспазы-3 p19/17 и фрагмента p89 PARP (Рис. 9А, Б). Результаты Вестерн-блота подтверждаются данными цитометрического анализа. Так, в линии клеток SH-SY5Y происходило увеличение количества клеток в фазе subG1 с 5,6% до 12,2%, с 8,4% до 16,1% и с 12,1% до 22,5% в концентрациях 100 нМ, 250 нМ и 500 нМ S63845 + RG7388 по сравнению с аналогичной дозой RG7388. Схожие результаты наблюдались в клетках SK-N-SH (Рис. 9В, Г).

Полученные данные наглядно свидетельствуют о синергетическом эффекте при комбинировании ВНЗ-миметика S63845 и антагониста MDM2 в широком диапазоне концентраций в клетках нейробластомы SH-SY5Y и SK-N-SH, которые исходно были не чувствительны к ингибированию Mcl-1, и подтверждают целесообразность использования этой комбинации в выбранной модели опухоли. Потенциальный механизм усиления гибели клеток при одновременном блокировании белков Mcl-1 и MDM2 представляется следующим (Рис. 10): добавление S63845 приводит к разрушению комплексов между Mcl-1 и проапоптотическими белками Bcl-2 семейства, и, главным образом, к повышению уровня несвязанного эффекторного белка Bax. В то время как RG7388 нейтрализует действие негативного регулятора p53 MDM2 и ведет к увеличению экспрессии p53-активируемых генов, в том числе, эффекторного белка Bax и других проапоптотических белков Bcl-2 семейства. Накопление белков Bax и Bax ведет к более активному процессу пермеабилзации внешней мембраны митохондрий и запуску гибели по внутреннему пути апоптоза [Pervushin et al., 2024].

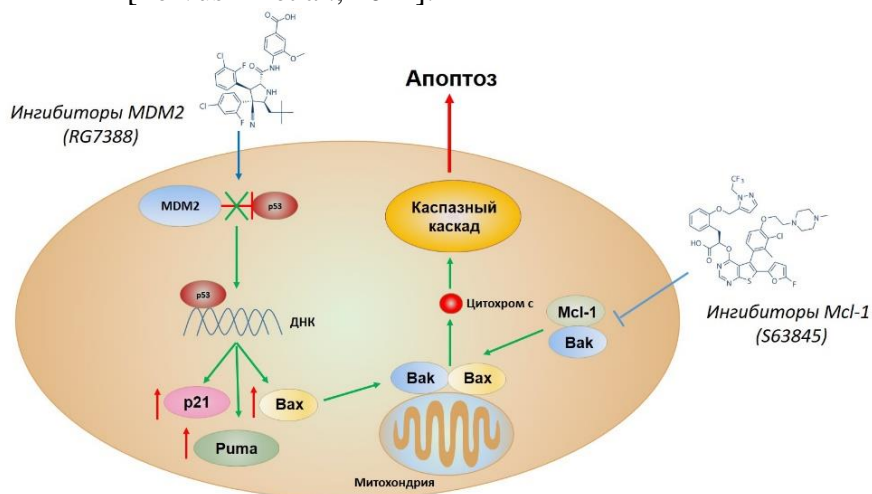


Рис. 10. Механизм активации апоптотической гибели при совместном использовании антагонистов белков Mcl-1 (S63845) и MDM2 (RG7388).

6. Изучение механизмов устойчивости опухолевых клеток к действию ингибитора MDM2 RG7388

Проблема развития приобретенной устойчивости также крайне актуальна для препаратов группы нутлинов, поскольку уже был представлен ряд работ, содержащих сведения о появлении резистентности опухолевых клеток к действию Нутлина-3а и его аналогов [Haronikova et al., 2021; Van Goethem et al., 2011]. В рамках данного исследования были получены опухолевые клетки, характеризующиеся повышенной устойчивостью к действию RG7388. Для этой цели были выбраны клетки нейробластомы SH-SY5Y ввиду их большей чувствительности к ингибированию MDM2 в сравнении с клетками SK-N-SH. Схема выведения SH-SY5Y, уст. к RG7388, была схожа с аналогичной по получению опухолевых клеток с устойчивостью к антагонисту Mcl-1 (Рис. 11).

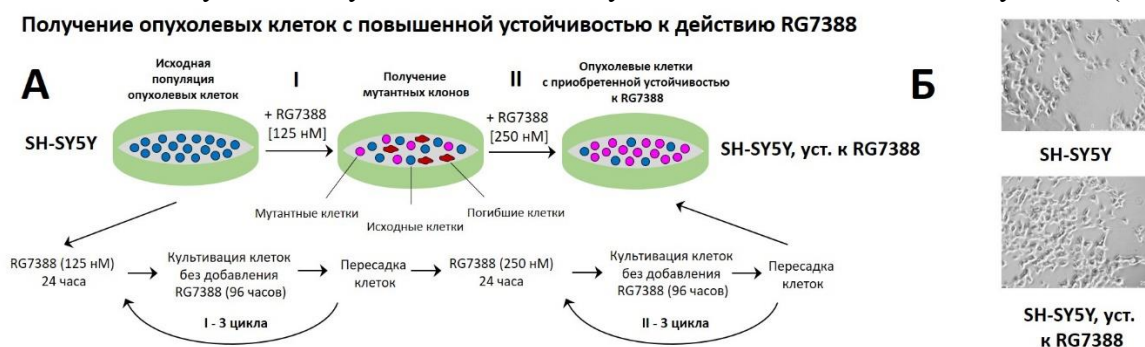


Рис. 11. Схема выведения и изображение клеточной линии SH-SY5Y, обладающей повышенной устойчивостью к действию RG7388. А. Схема получения устойчивых клеток SH-SY5Y к ингибированию

MDM2. Б. Репрезентативные изображения исходных и устойчивых клеточных линий SH-SY5Y, полученные при использовании фазово-контрастного светового микроскопа (Leica AF6000 LX). Шкала – 250 мкм.

Далее был проведен анализ на наличие устойчивости клеточной линии SH-SY5Y к RG7388 с помощью MTS-теста. Обнаружено, что в клетках SH-SY5Y, уст. к RG7388, значение IC50 выросло более чем в 5 раз относительно исходных клеток SH-SY5Y: $1,59 \pm 0,68$ мкМ и $0,27 \pm 0,08$ мкМ соответственно. Полученная устойчивость клеток SH-SY5Y к действию RG7388 была также подтверждена результатами Вестерн-блот анализа и данными цитометрии (subG1): число клеток в стадии subG1 уменьшалось с 20,1% в SH-SY5Y до 6% в SH-SY5Y, уст. к RG7388 (Рис. 12А, Б).

Также было обнаружено, что в устойчивых клетках при добавлении RG7388 в 1,5-2 раза уменьшается накопление MDM2, p53 и p53-активируемых белков, таких как p21, Вах, Puma (Рис. 12А, В). Это указывало на возможное нарушение транскрипционной активности белка p53.

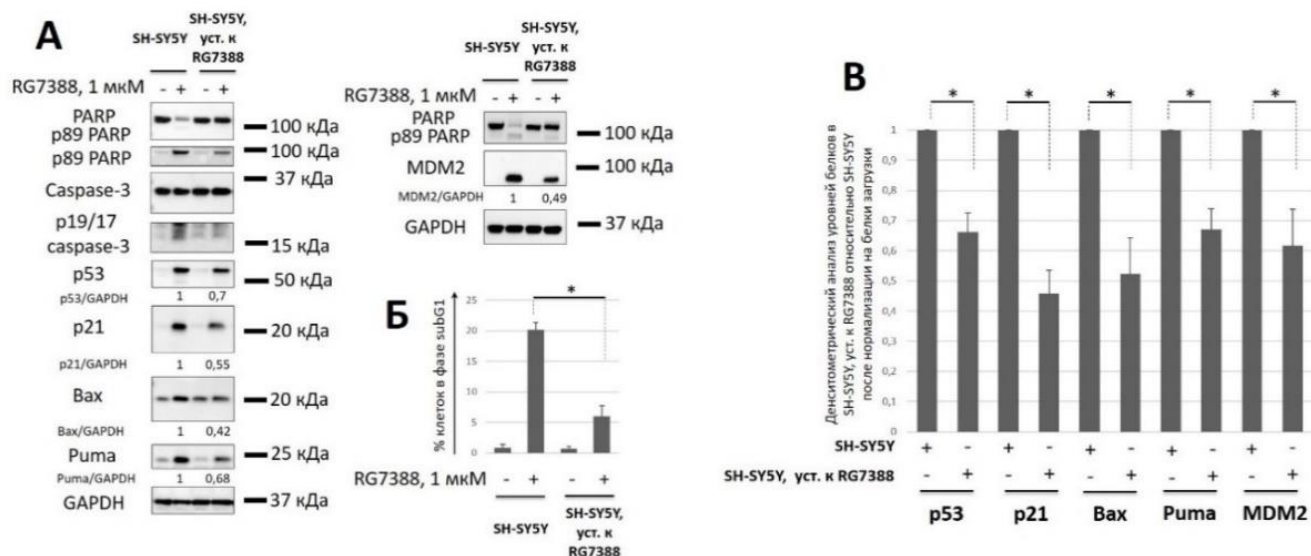


Рис. 12. Сравнительный анализ клеточной гибели при действии RG7388 и уровнях MDM2, p53 и p53-активируемых белков (p21, Вах, Puma) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. Результаты Вестерн-блот анализа (А), проточной цитометрии (subG1) (Б) и денситометрического анализа (В) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. p53/GAPDH, p21/GAPDH, Вах/GAPDH, Puma/GAPDH и MDM2/GAPDH – денситометрический анализ уровней соответствующих белков после добавления RG7388 в пересчете на GAPDH; время инкубации клеток после добавления RG7388 (1 мкМ) – 24 часа. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * p<0,05 (U-тест).

Для проверки этого предположения был проведен анализ транскрипции мРНК генов соответствующих белков методом ПЦР в реальном времени, ибо p53 является активатором транскрипции различных генов, в том числе *CDKN1A* (кодирует p21), *BAX* (Вах), *BBC3* (Puma) и *MDM2* (MDM2). Установлено, что для всех 4 генов наблюдалось уменьшение уровня мРНК в клетках SH-SY5Y, уст. к RG7388, по сравнению с клетками SH-SY5Y после добавления ингибитора (1 мкМ) (Рис. 13).

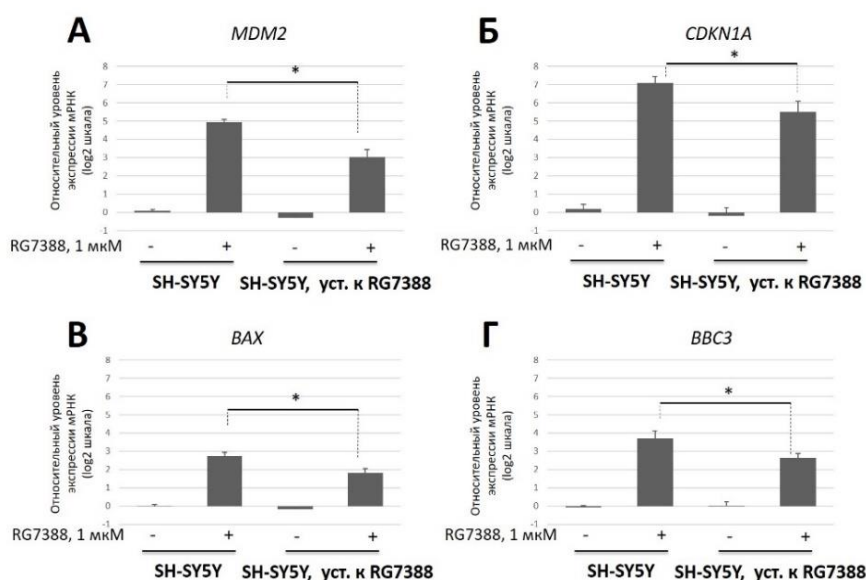


Рис. 13. Оценка уровня мРНК экспрессии генов *MDM2*, *CDKN1A*, *BAX*, *BBC3* при действии RG7388 (1 мкМ) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение после логарифмирования по основанию 2, $n=3$; двусторонний t-критерий Стьюдента с поправкой Уэлча; * $p < 0,05$ (U-тест).

Полученные данные свидетельствовали об уменьшении активации транскрипции генов p53-зависимых белков в устойчивых к RG7388 клетках SH-SY5Y при индукции этим агентом по сравнению с исходной популяцией. Эти результаты подтверждают возможное появление мутаций в последовательности его гена, которые приводят к низкой функциональной активности p53 в клетках SH-SY5Y, уст. к RG7388.

7. Обнаружение мутаций в гене *TP53* в опухолевых клетках с повышенной устойчивостью к RG7388 и их биоинформатический анализ

Потенциальной причиной развития приобретенной устойчивости к антагонисту MDM2 в опухолевых клетках является появление мутаций в структуре гена *TP53* [Haronikova et al., 2021; Michaelis et al., 2011]. Согласно NGS анализу, были обнаружены 3 точковые мутации, приведшие к заменам аминокислотных остатков в различных доменах белка p53. Две мутации располагались в богатом пролином домене: Ala63Val и Pro72Arg. Третья, His193Arg, находилась в ДНК-связывающем домене. Для прогнозирования влияния обнаруженных мутаций на структурную организацию и функциональную активность белка p53 был осуществлен биоинформатический анализ (Рис. 14).

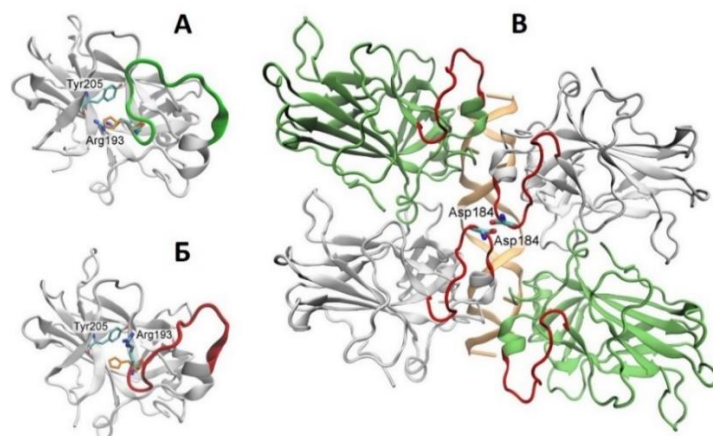


Рис. 14. Молекулярное моделирование структурной организации белка p53 с мутацией His193Arg. А. Исходная структура мутантного белка. Петля, состоящая из 182–194 а.о., показана зеленым цветом. Б.

Структура белка после конформационного изменения. Петля, состоящая из 182–194 а.о., показана красным. Координаты His193 в белке дикого типа показаны оранжевым цветом. Атомы водорода опущены для ясности. В. Структура мутанта His193Arg, показанная белым или салатным цветом, была наложена на субъединицу p53 дикого типа тетрамерного комплекса p53-ДНК (PDB ID 5mg7; ДНК из структуры 5mg7 показана оранжевым цветом). Остатки петли, состоящей из 182–194 а.о., показаны красным.

Было выявлено, что мутации в богатом пролином домене не оказывают влияния на структуру p53 и его активность в качестве транскрипционного фактора. Однако замена гистидина на аргинин в 193 положении приводила к конформационному изменению петли, образованной 182-194 а.о. (Рис. 14А), что вело к перестройке структурной организации мутантного белка p53 по сравнению с белком дикого типа (Рис. 14Б).

Важно отметить, что белок p53 дикого типа связывает ДНК в виде тетрамера. Положительная кооперативность основана на стабилизации сборки p53 за счет взаимодействий между мономерами, в то время как Glu180 и Arg181 являются ключевыми остатками аминокислот, которые опосредуют взаимное электростатическое взаимодействие между основными доменами p53 [Timofeev et al., 2021]. При этом петля, содержащая мутацию His193Arg, несмотря на нахождение в ДНК-связывающем домене, напрямую не участвует в связывании тетрамерного комплекса p53 с ДНК. Однако из-за изменения конформации петли два соседних белка p53 могут образовывать неблагоприятные межмолекулярные контакты (в частности, между двумя отрицательно заряженными остатками аспартата), препятствуя тем самым эффективной тетрамеризации (Рис. 14В). По данным молекулярного моделирования выявлено, что замена His193Arg, вероятно, является «кооперативной» и дестабилизирует тетрамерный комплекс p53-ДНК из-за необычного конформационного состояния петли, образованной 182–194 а.о, влияя тем самым на транскрипционную активность p53.

Наконец, был проведен анализ встречаемости мутации His193Arg в различных типах опухолей. Данные были взяты из открытого ресурса TP53 Database версия R20 (<https://tp53.cancer.gov>) [de Andrade et al., 2022]. Согласно полученным результатам, был обнаружен 101 случай появления мутации His193Arg в структуре белка p53 у онкологических пациентов. Наиболее часто она встречалась в опухолевых тканях яичников (n=18), молочной железы (n=13), легкого (n=12), пищевода (n=11), головы и шеи (n=11).

Таким образом, появление мутации His193Arg в структуре белка p53, детектируемой в различных типах опухолей, является наиболее вероятной причиной развития приобретенной устойчивости раковых клеток SH-SY5Y к действию антагониста MDM2 RG7388.

8. Оценка эффективности применения антагониста Mcl-1 S63845 и химиопрепаратов (Цисплатина и Доксорубицина) для преодоления устойчивости опухолевых клеток к действию RG7388

Рациональной стратегией преодоления приобретенной устойчивости опухолевых клеток к различным препаратам является комбинирование последних с другими противораковыми агентами. В настоящей работе была оценена целесообразность использования антагониста Mcl-1 S63845, а также химиотерапевтических средств (ДНК-повреждающих агентов – Цисплатина и Доксорубицина) в сочетании с RG7388 для преодоления устойчивости клеток нейробластомы SH-SY5Y к ингибированию MDM2.

В ходе выполнения данного исследования был показан выраженный синергетический эффект при совместном применении ингибиторов S63845 и RG7388 в клетках SH-SY5Y. Было предположено, что в случае нарушенной функциональной активности белка p53, наблюдаемой в устойчивых клетках, запуск внутреннего пути апоптоза за счет ингибирования антиапоптотического белка Mcl-1 позволит преодолеть данный тип резистентности. Поэтому сначала была оценена гибель клеток, запускаемая при добавлении S63845 (1 мкМ) и RG7388 (1 мкМ), в исходных и устойчивых клетках SH-SY5Y (Рис. 15).

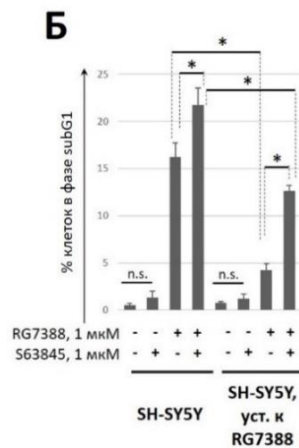
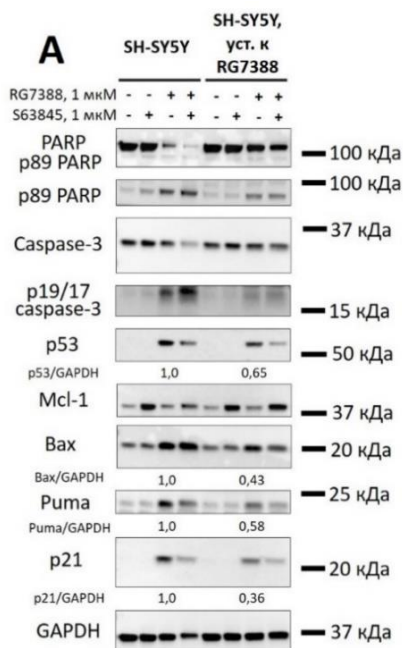


Рис. 15. Оценка эффективности применения ингибитора Mcl-1 (S63845) для преодоления устойчивости клеток к RG7388. Результаты Вестерн-блот анализа (А) и данные цитометрического анализа методом subG1 (Б) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. p53/GAPDH и p21/GAPDH – денситометрический анализ уровней соответствующих белков после добавления ингибитора MDM2 в пересчете на GAPDH. Время инкубации клеток после добавления ингибиторов составляет 24 часа. Данные на гистограмме представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n=4$; n.s. – статистически не значимо, * $p<0,05$ (U-тест).

Согласно данным Вестерн-блота, S63845 усиливал RG7388-опосредованную гибель клеток, о чем свидетельствует степень расщепления белков каспазы-3 и PARP в клетках SH-SY5Y, уст. к RG7388. Однако комбинация двух ингибиторов вела к существенно менее выраженному запуску апоптоза в устойчивых клетках по сравнению с исходной популяцией SH-SY5Y (Рис. 15А). Схожая картина наблюдалась по итогам проведения subG1-теста: размер популяции subG1 увеличивался с 4,3% при действии ингибитора MDM2 (1 мкМ) до 12,6% S63845+RG7388 (оба – 1 мкМ) в клетках SH-SY5Y, уст. к RG7388. При этом в исходных клетках SH-SY5Y размер фракции subG1 при S63845+RG7388 был существенно выше – 21,7% (Рис. 15Б).

В качестве другого способа преодоления устойчивости к RG7388 была проведена оценка целесообразности применения Цисплатина и Доксорубина (Рис. 16) – химиотерапевтических препаратов, используемых при лечении нейробластомы [Tran et al., 2015]. По данным MTS-теста обнаружено, что клетки SH-SY5Y, уст. к RG7388, обладают меньшей чувствительностью к Цисплатину и Доксорубину в качестве индивидуальных веществ: значения IC50 увеличились в ~ 1,5 и 3 раза по сравнению с исходными клетками SH-SY5Y (Цисплатин = $7,95 \pm 0,96$ мкМ и $13,0 \pm 4,19$; Доксорубин = $0,23 \pm 0,08$ и $0,78 \pm 0,05$).

По данным Вестерн-блот анализа, Цисплатин (25 мкМ) усиливал клеточную гибель, запускаемую при действии RG7388 (1 мкМ) как в исходных, так и в устойчивых клетках SH-SY5Y. Однако в последних комбинация Цисплатина и RG7388 приводила к менее эффективному запуску апоптоза (Рис. 16А). В то же самое время Доксорубин (1 мкМ) усиливал клеточную гибель, запускаемую при действии RG7388 (1 мкМ) в исходных клетках SH-SY5Y, но лишь незначительно увеличивал гибель устойчивых клеток, что наглядно показывает степень расщепления белков каспазы-3 и PARP (Рис. 16Б). Данные цитометрического анализа подтверждают результаты Вестерн-блота. Так, при действии Цисплатина или Доксорубина в качестве индивидуальных агентов размер популяции клеток в фазе subG1 составлял 15,4% или 21,2% и 6,9% или 7,2%, в то время как в комбинациях с RG7388 – 26,2% или 28,9% и 20,8% или 11,6% (Рис. 16Б, Г).

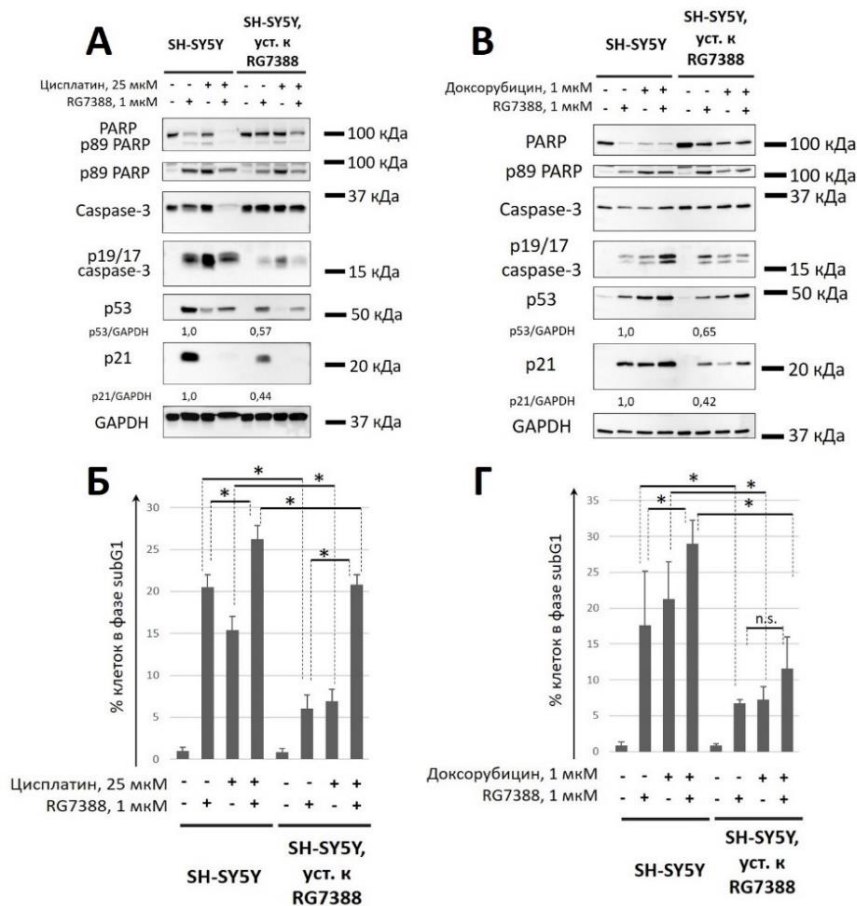


Рис. 16. Оценка эффективности применения химиопрепаратов Цисплатина и Доксорубицина для преодоления устойчивости клеток к RG7388. Результаты Вестерн-блот анализа (А, В) и данные цитометрического анализа методом subG1 (Б, Г) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. PARP – полноразмерная форма белка (116 кДа, сверху) и p89 – фрагмент белка PARP (89 кДа, снизу); p19/17 caspase-3 – каталитически активные фрагменты эффекторной каспазы-3; p53/GAPDH и p21/GAPDH – денситометрический анализ уровней соответствующих белков после добавления ингибитора MDM2 в пересчете на GAPDH, который был использован в качестве контроля загрузки геля. Время инкубации клеток после добавления препаратов составляет 24 часа. Данные на гистограмме представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * p<0,05 (U-тест).

Таким образом, только Цисплатин и антагонист Mcl-1 S63845 в сочетании с ингибитором MDM2 приводили к частичному преодолению устойчивости клеток SH-SY5Y к действию RG7388. Кроме того, клетки SH-SY5Y, уст. к RG7388, проявляли меньшую чувствительность к действию Цисплатина и Доксорубицина в качестве индивидуальных веществ.

Полученные результаты имеют большую значимость для потенциального практического применения нутлинов. Несмотря на их высокую противоопухолевую активность использование нутлинов в клинике может быть ограниченным ввиду быстрого развития приобретенной устойчивости, которая будет опосредована появлением в опухолевых клетках мутаций в p53. Кроме того, пониженная чувствительность таких клеток к химиопрепаратам может вести к уменьшению эффективности противоопухолевой терапии и ухудшить выживаемость пациентов. Поэтому рациональнее использовать нутлины в низких дозах и в комбинации с другими агентами для избежания развития неблагоприятной клинической картины.

9. Оценка эффективности применения Доксорубицина для преодоления устойчивости клеток SH-SY5Y к RG7388 в *in vivo* модели

Для подтверждения данных по снижению чувствительности клеток SH-SY5Y, уст. к RG7388, к химиопрепаратам (на примере Доксорубицина) была использована ксенотрансплантантная модель нейробластомы с участием иммунодефицитных мышей NSG. Дозировка и продолжительность введения Доксорубицина были выбраны с учетом его побочных свойств, в частности, выраженной кардиотоксичности у иммунодефицитных мышей [Favreau-Lessard et al., 2019].

Обнаружено, что клетки SH-SY5Y, уст. к RG7388, в ксенографтной мышинной модели обладали пониженной чувствительностью к Доксорубицину по сравнению с клетками SH-SY5Y, о чем свидетельствует скорость опухолевого роста (Рис. 17А). Введение Доксорубицина

приводило к снижению скорости опухолевого роста по сравнению с контрольными группами, как для исходных, так и для мутантных клонов, однако наблюдалась существенная разница в объеме опухолевой ткани между группами SH-SY5Y дикого типа и устойчивыми. Статистических различий между двумя контрольными группами не было выявлено (Рис. 17Б).

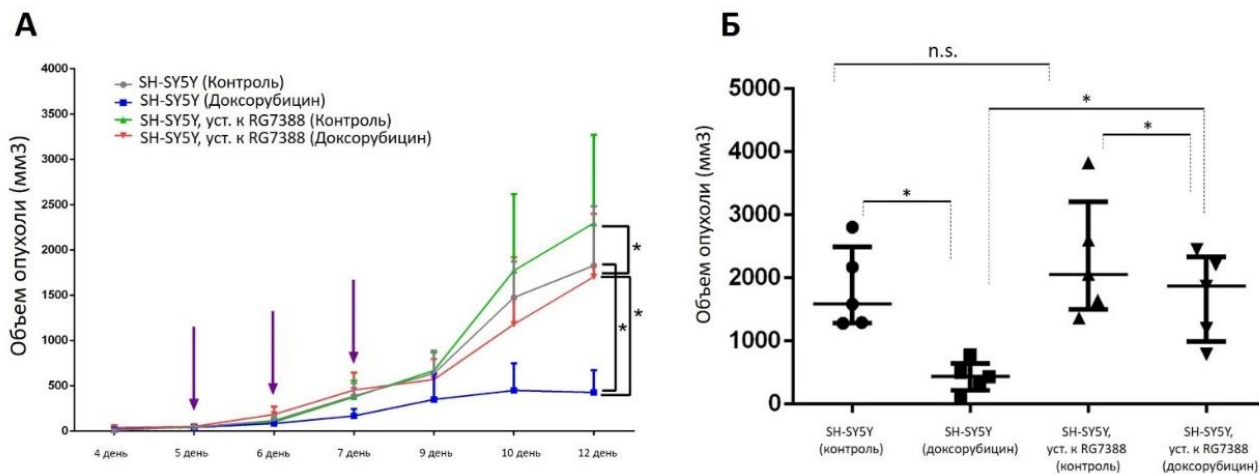


Рис. 17. Анализ эффективности использования Доксорубина для преодоления устойчивости клеток SH-SY5Y к RG7388 в *in vivo* модели. А. Динамика опухолевого роста (мм³) в мышинной ксенографтной модели нейробластомы в интервале 4-12 дней. Данные на графике представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=5. Б. Объем опухоли (мм³) на 12 день. Данные на гистограмме представлены как медиана и квантили (25% и 75%), n=5, n.s. – статистически не значимо, * p<0,05 (U-тест).

Суммарно, полученные различия в ответе на Доксорубин в *in vivo* модели подтверждают ранее представленные в настоящем исследовании результаты *in vitro* экспериментов: развитие приобретенной устойчивости к ингибированию MDM2 сопровождается снижением чувствительности к действию ДНК-повреждающих агентов, что имеет большое значение в контексте возможного применения этих препаратов в противоопухолевой терапии.

10. Оценка метаболизма и пролиферативной активности опухолевых клеток с повышенной устойчивостью к RG7388 в моделях *in vitro* и *in vivo*

Также был проведен сравнительный анализ пролиферативной активности исходных и устойчивых к ингибированию MDM2 клеток нейробластомы в *in vivo* модели (Рис. 18). Оценка пролиферации была осуществлена гистологическими (оценка клеточного обновления) и иммуногистохимическими методами (уровень маркера Ki-67).

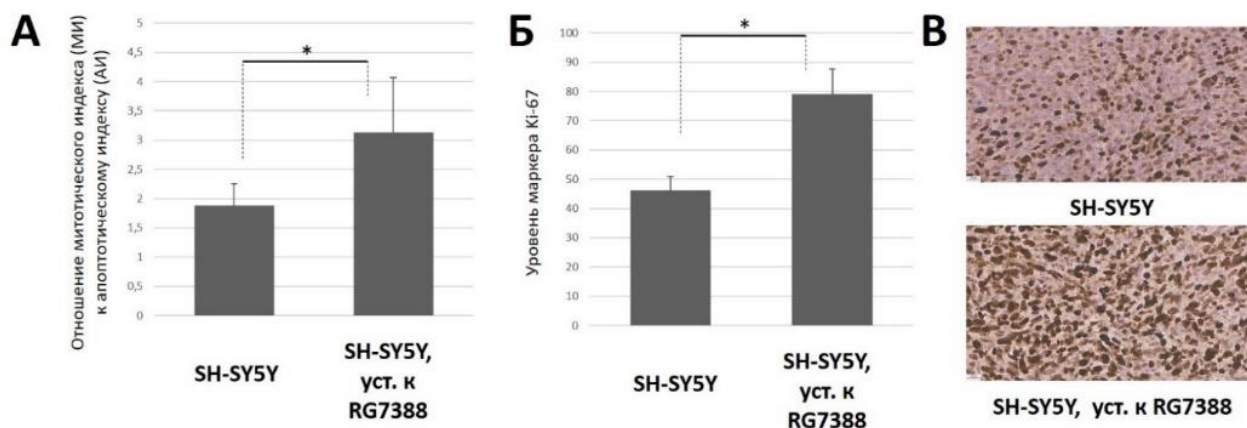


Рис. 18. Анализ пролиферативной активности клеток нейробластомы SH-SY5Y с повышенной устойчивостью к RG7388 в *in vivo* модели. А. Отношение митотического индекса (МИ) к апоптотическому индексу (АИ) в тканях мышинной ксенотрансплантантной модели нейробластомы, окрашенных гематоксилином и эозином. Б. Уровень маркера Ki-67 в тканях мышинной ксенографтной модели

нейробластомы. В. Репрезентативные изображения окраски Ki-67. Шкала – 20 мкм. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4 (SH-SY5Y) и 6 (SH-SY5Y, уст. к RG7388), * p<0,05 (U-тест).

Первоначально был определен уровень клеточного обновления, которая представляет собой отношение митотического индекса (МИ) к апоптотическому индексу (АИ) в тканях, окрашенных гематоксилином и эозином. Было обнаружено, что опухоли из группы SH-SY5Y, уст. к RG7388 обладали более высокой скоростью (~ 1.5 раза) клеточного обновления по сравнению с опухолями из группы SH-SY5Y (Рис. 18А). Далее было выполнено иммуногистохимическое окрашивание маркера пролиферативной активности Ki-67, который отображает число активно делящихся опухолевых клеток. Полученные результаты подтверждали повышенную пролиферацию в клетках нейробластомы с приобретенной устойчивостью к ингибированию MDM2 по сравнению с исходными клетками: в опухолях из группы SH-SY5Y, уст. к RG7388 уровень маркера Ki-67 был примерно в два раза выше по сравнению с опухолями из группы SH-SY5Y (Рис. 18Б, В). Наконец, для изучения возможных изменений биологических свойств в устойчивых к RG7388 клетках нейробластомы был проведен тест на клоногенную активность *in vitro* (Рис. 19).

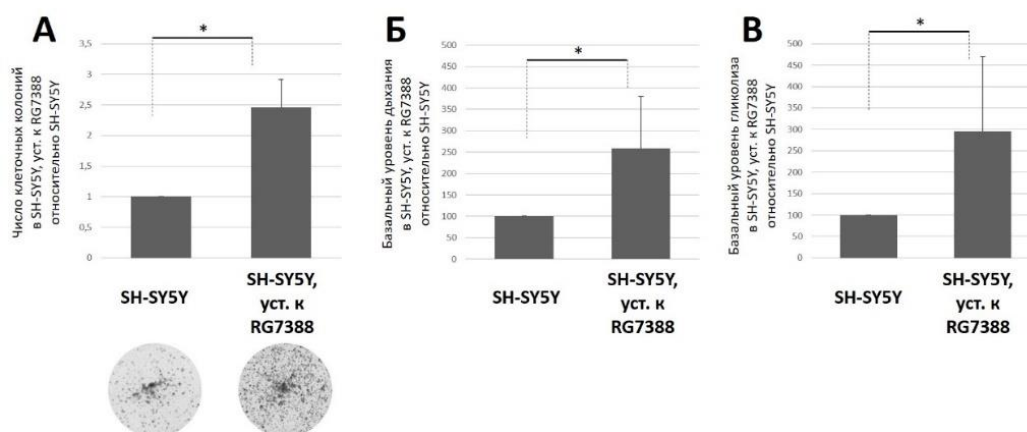


Рис. 19. Оценка клоногенной активности (А), базального уровня дыхания (Б) и гликолиза (В) клеток SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388 в *in vitro* модели. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; * p<0,05 (U-тест).

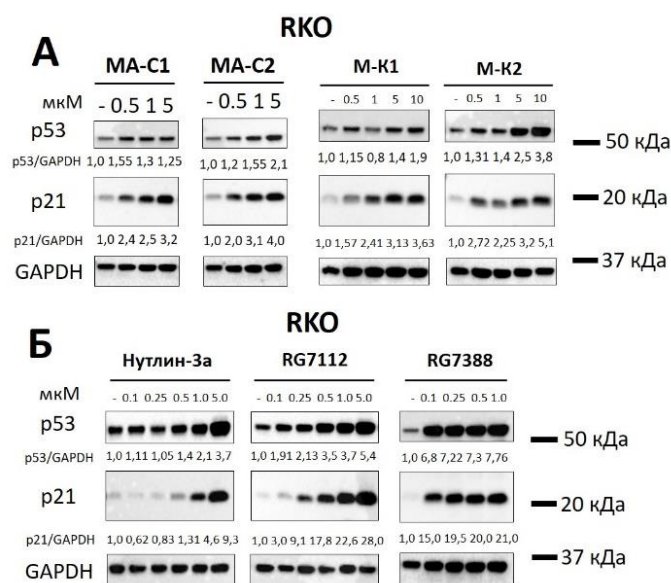
Было выявлено, что резистентные клетки SH-SY5Y обладали значительно большей клоногенной активностью относительно исходных клеток и интенсивнее образовывали колонии (Рис. 19А), что подтверждает ранее представленные *in vivo* данные (Рис. 18). Эти результаты могут быть обусловлены изменениями в метаболической активности устойчивых клеток, которые были обнаружены при помощи прибора Seahorse XF. Так, устойчивые клетки обладали как более высоким базальным уровнем дыхания, так и повышенным базальным уровнем гликолиза по сравнению с исходными клетками (Рис. 19Б, В).

Таким образом, полученные данные демонстрируют, что развитие приобретенной устойчивости опухолевых клеток к ингибированию MDM2 сопровождается значительными изменениями их метаболизма и пролиферации, что может способствовать увеличению объема опухолевой ткани у пациентов и прогрессированию онкологического заболевания.

11. Оценка биологической активности новых производных имидазолина как новых антагонистов MDM2

Другая важнейшая проблема при использовании препаратов целевого действия помимо развития устойчивости обусловлена неблагоприятными фармакологическими свойствами, в частности, их низкой растворимостью в воде. Например, Нутлин-3а и его модификации – RG7112 и RG7388 практически полностью не растворимы в воде [Bazanov et al., 2021], что отчасти

обусловлено присутствием атомов галогенов в их структуре. В рамках данной работы была проанализирована биологическая активность производных имидазолина, содержащих алкильные группы вместо галогенов в качестве заместителей в бензольном кольце. Данные соединения были получены двухступенчатым синтезом из ароматических альдегидов и раствора аммиака с высоким выходом (новые производные Нутлина-3а были получены к.х.н., м.н.с. химического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова Базановым Д.Р.). В ходе молекулярного моделирования было показано, что исследуемые вещества способны располагаться внутри активного сайта связывания MDM2, отвечающего за взаимодействие с p53, при этом геометрия связывания была схожа с геометрией связывания Нутлина-3а [Bazanov et al., 2022; Bazanov et al., 2021; Bazanov et al., 2019]. Оценка биологической активности этих соединений осуществлялась методом Вестерн-блот анализа, который позволял определить потенциальное накопление p53 и p53-зависимых белков (p21), что является маркером действия антагонистов MDM2 (Рис. 20).



сульфо- (МА-С1 и МА-С2) карбамидных производных имидазолина (М-К1 и М-К2) в сравнении с Нутлином-3а, RG7112 и RG7388 в клетках RKO. p53/GAPDH и p21/GAPDH – денситометрический анализ уровней соответствующих белков после добавления ингибитора MDM2 в пересчете на GAPDH. Время инкубации клеток после добавления препаратов составляет 24 часа. Данные на гистограмме представлены как среднее ± стандартное отклонение, n=4; n.s. – статистически не значимо (U-тест).

Вестерн-блот анализ установил, что новые сульфо- (МА-С1 и МА-С2) и карбамидные (М-К1 и М-К2) производные имидазолина (соединения-лидеры, определенные в ходе предварительных испытаний) в концентрациях 0,5 мкМ и выше вели к эффективной стабилизации p53 и аккумуляции p21 по сравнению с контрольными клетками в клетках колоректального рака RKO (Рис. 20А). При этом в наномолярных концентрациях (до 500 нМ) данные соединения были сопоставимы по эффективности действия с Нутлином-3а, но уступали его модификациям (RG7112 и RG7388) (Рис. 20Б). Важно отметить, что исследуемые сульфозамещенные модификации имидазолинов обладали значительно большей растворимостью в воде в отличие от оригинальных нутлинов [Bazanov et al., 2021]. Полученные результаты могут быть значимыми для модификации современных подходов получения новых противоопухолевых препаратов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящей работы были изучены механизмы приобретенной устойчивости к антагонистам Mcl-1 и MDM2, а также оценены возможные стратегии ее преодоления. Так, было обнаружено, что эффекторный белок Вак является важным предикторным маркером, определяющим чувствительность опухолевых клеток к ингибиторам Mcl-1. Повышение экспрессии генов других антиапоптотических белков, в частности Bcl-2 и Bcl-xL, является одной из причин развития приобретенной устойчивости и исходной низкой чувствительности опухолевых клеток к действию антагониста Mcl-1 S63845. Таким образом, уровни белков Bcl-2 и Bcl-xL также являются важными предикторами чувствительности опухолевых клеток к блокированию Mcl-1. Комбинирование антагонистов этих белков с S63845 позволяет преодолеть устойчивость злокачественных клеток к действию последнего. Была выявлено прогностическое

значение семейства Bcl-2 у пациентов с аденокарциномой легкого: повышенный уровень Bax и пониженные уровни Bcl-xL и Mcl-1 определяли наиболее благоприятный исход выживаемости пациентов по сравнению с другим профилем экспрессии генов этих белков.

Установлено, что S63845 ведет к усилению апоптотической гибели, индуцированной антагонистом MDM2 RG7388, что демонстрирует рациональность использования данной комбинации в последующих исследованиях. Показано, что в основе устойчивости клеток нейробластомы к действию RG7388 лежит замена в структуре p53, нарушающая его транскрипционную активность из-за дестабилизации взаимодействия p53 с ДНК. Как итог, происходит уменьшение накопления p53 и p53-зависимых белков под действием RG7388. Химиопрепараты Цисплатин и Доксорубицин были менее эффективны в качестве монотерапии в клетках нейробластомы с приобретенной устойчивостью к RG7388 в *in vitro* и *in vivo* моделях. Однако Цисплатин или S63845 в комбинации с RG7388 вели к частичному преодолению устойчивости к действию последнего. Кроме того, было показано, что новые аналоги нутлинов обладают биологической активностью и улучшенными физико-химическими свойствами. Таким образом, результаты, полученные в ходе настоящего диссертационного исследования, могут внести существенный вклад в развитие новых стратегий противоопухолевой терапии.

ВЫВОДЫ

1. Проапоптотический белок Bax и антиапоптотические белки Bcl-xL и Bcl-2 являются предикторными факторами, определяющими чувствительность опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1, а увеличение уровней белков Bcl-2 или Bcl-xL ведет к развитию приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагониста Mcl-1 S63845.
2. Комбинирование антагонистов Bcl-2 или Bcl-xL с антагонистом Mcl-1 S63845 обеспечивает преодоление устойчивости опухолевых клеток к действию последнего.
3. Пониженные уровни белков Bcl-xL и Mcl-1 и повышенный уровень белка Bax по сравнению с другим профилем экспрессии генов этих белков определяют благоприятный прогноз выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого.
4. В основе развития приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагониста MDM2 RG7388 лежит изменение структуры белка p53 вследствие появления мутаций в гене этого белка. Замена гистидина на аргинин в положении 193 в структуре белка p53 ведет к дестабилизации его взаимодействия с ДНК и, как следствие, снижению транскрипционной активности p53.
5. ДНК-повреждающие агенты Цисплатин и Доксорубицин менее эффективны в качестве монотерапии в клетках нейробластомы с приобретенной устойчивостью к действию антагониста MDM2 RG7388 *in vitro* и *in vivo*, а антагонист Mcl-1 S63845 или Цисплатин в комбинации с RG7388 обеспечивают частичное преодоление данного типа устойчивости.
6. Новые антагонисты MDM2, представляющие собой аналоги Нутлина-3а, обладают способностью стабилизировать уровень p53 и улучшенными физико-химическими свойствами по сравнению с Нутлином-3а.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова

1. Bazanov D.R. 2,4,5-Tris(alkoxyaryl)imidazoline derivatives as potent scaffold for novel p53-MDM2 interaction inhibitors: Design, synthesis, and biological evaluation / Bazanov D.R., **Pervushin N.V.**, Savitskaya V.Y., Anikina L.V., Proskurnina M.V., Lozinskaya N.A., Kopeina G.S. // Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters. – 2019. – Vol. 29, № 16. – P. 2364–2368. WoS (JIF, JCI) = 2.5, 0.75 (0.58;0.19)
2. **Pervushin N.V.** Mcl-1 as a “barrier” in cancer treatment: Can we target it now? / Pervushin N.V., Senichkin V.V., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. // International Review of Cell and Molecular Biology. – 2020. – Vol. 351. – P. 23–55. Scopus (IF, SJR) = 6.8, 2.0 (3.81;3.24)

3. Сеничкин В.В. Таргетирование белков семейства Bcl-2: что, где, когда? / Сеничкин В.В., **Первушин Н.В.**, Зуев А.П., Животовский Б., Копейна Г.С. // Биохимия. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1421–1441. WoS (JIF, JCI) = 2.3, 0.36 (2.43;0.61)
4. **Первушин Н.В.** Деградация Mcl-1 в условиях недостатка питательных веществ происходит независимо от аутофагии / Первушин Н.В., Сеничкин В.В., Капуста А.А., Горбунова А.С., Каминский В.О., Животовский Б., Копейна Г.С. // Биохимия. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1452–1463. WoS (JIF, JCI) = 2.3, 0.36 (1.39;0.51)
5. Bazanov D.R. Sulfonamide derivatives of cis-imidazolines as potent p53-MDM2/MDMX protein-protein interaction inhibitors / Bazanov D.R., **Первушин Н.В.**, Savin E.V., Tsymliakov M.D., Maksutova A.I., Sosonyuk S.E., Kopeina G.S., Lozinskaya N.A. // Medicinal Chemistry Research. – 2021. – Vol. 30, № 12. – P. 2216–2227. WoS (JIF, JCI) = 2.6, 0.6 (1.39;0.63)
6. Senichkin V.V. Bcl-2 and Bcl-xL Participate in Regulating Sensitivity of Solid Tumor Derived Cell Lines to Mcl-1 Inhibitors / Senichkin V.V., **Первушин Н.В.**, Zamaraev A.V., Sazonova E.V., Zuev A.P., Streletskaia A.Y., Prikazchikova T.A., Zatsepin T.S., Kovaleva O.V., Tchekina E.M., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. // Cancers. – 2022. – Vol. 14, № 1. – P. 181. WoS (JIF, JCI) = 4.5, 0.91 (2.2;1.1)
7. Bazanov D.R. Synthetic Design and Biological Evaluation of New p53-MDM2 Interaction Inhibitors Based on Imidazoline Core / Bazanov D.R., **Первушин Н.В.**, Savin E.V., Tsymliakov M.D., Maksutova A.I., Savitskaya V.Yu., Sosonyuk S.E., Gracheva Y.A., Seliverstov M.Yu., Lozinskaya N.A., Kopeina G.S. // Pharmaceuticals. – 2022. – Vol. 15, № 4. – P. 444. WoS (JIF, JCI) = 4.3, 1.08 (2.08;1.07)
8. **Первушин Н.В.** Bcl-B: an “unknown” protein of the Bcl-2 family / **Первушин Н.В.**, Kopeina G.S., Zhivotovsky B. // Biology Direct. – 2023. – Vol. 18, № 1. – P. 69. WoS (JIF, JCI) = 5.7, 1.28 (0.81;0.73)
9. Sazonova E.V. Cancer Drug Resistance: Targeting Proliferation or Programmed Cell Death / Sazonova E.V., Yaprntseva M.A., **Первушин Н.В.**, Tsvetsov R.I., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. // Cells. – 2024. – Vol. 13, № 5. – P. 388. WoS (JIF, JCI) = 5.1, 0.67 (1.85;0.48)
10. **Первушин Н.В.** BH3-mimetics or DNA-damaging agents in combination with RG7388 overcome p53 mutation-induced resistance to MDM2 inhibition / **Первушин Н.В.**, Nilov D.K., Pushkarev S.V., Shipunova V.O., Badlaeva A.S., Yaprntseva M.A., Kopytova D.V., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. // Apoptosis. – 2024. – Vol. 29, № 11-12. – P. 2197–2213. WoS (JIF, JCI) = 6.1, 0.85 (1.96;1.47)
11. **Первушин Н.В.** Cisplatin Resistance and Metabolism: Simplification of Complexity / **Первушин Н.В.**, Yaprntseva M.A., Panteleev M.A., Zhivotovsky B., Kopeina G.S. // Cancers. – 2024. – Vol. 16, № 17. – P. 3082. WoS (JIF, JCI) = 4.5, 0.91 (1.5;0.75)*

*В скобках приведен объем публикации в условных печатных листах и вклад автора в условных печатных листах.