

На правах рукописи

Первушин Николай Викторович

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

1.5.4. Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2023

Работа выполнена в Лаборатории исследования механизмов апоптоза Факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Копейна Гелина Сергеевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Филимонова Марина Владимировна

Медицинский радиологический научный центр имени А. Ф. Цыба – филиала – Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией радиационной фармакологии

доктор медицинских наук

Якубовская Марианна Геннадиевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина», заведующий отделом химического канцерогенеза

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биологии гена Российской академии наук»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2024 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.058.07 на базе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1; и на сайте: <http://rsmu.ru>

Автореферат диссертации разослан «___» _____ 2024 года

Ученый секретарь диссертационного совета:

доктор медицинских наук, профессор

Кягова Алла Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность

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]. Раковые 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 противоопухолевой 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 представителей данного семейства, в частности, повышенное содержание антиапоптотических белков, является распространенным механизмом устойчивости раковых 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, а 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 работы является изучение механизмов приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1 и MDM2 и поиск возможных стратегий ее преодоления.

Задачи работы:

1. Определение прогностических факторов, определяющих чувствительность опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1.
2. Выведение устойчивых к действию антагонистов Mcl-1 опухолевых клеток и изучение потенциальных механизмов, лежащих в основе этой устойчивости.
3. Анализ эффективности использования антагонистов Bcl-2 и Bcl-xL для преодоления устойчивости опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1.
4. Определение значимости белков семейства Bcl-2 в качестве потенциальных прогностических маркеров аденокарциномы легкого.
5. Оценка эффективности комбинирования антагонистов Mcl-1 и MDM2.
6. Исследование механизмов устойчивости опухолевых клеток к антагонистам MDM2.
7. Анализ эффективности использования антагонистов Mcl-1 и ДНК-повреждающих агентов Цисплатина и Доксорубина для преодоления устойчивости опухолевых клеток к ингибированию MDM2.
8. Изучение биологической активности новых антагонистов MDM2.

Научная новизна работы

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 Bcl-2 является важным прогностическим маркером, который определяет чувствительность раковых клеток к действию антагонистов Mcl-1. Были получены ранее неизвестные клеточные модели, характеризующиеся повышенной устойчивостью к действию антагонистов Mcl-1. В двух из них развитие устойчивости к ингибированию Mcl-1 сопровождалось повышением уровней других антиапоптотических белков – Bcl-2 или Bcl-xL. Более того, совместное подавление Mcl-1 и Bcl-2 или Mcl-1 и Bcl-xL вело к преодолению устойчивости раковых клеток к действию антагонистов Mcl-1. Также было отмечено, что профиль экспрессии 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 Bcl-2.

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 ни антагонисты Mcl-1, ни ДНК-повреждающие агенты - Цисплатин и Доксорубин - не помогли эффективно преодолеть данный тип устойчивости в *in vitro* экспериментах. Более того, полученные *in vitro* данные для Доксорубина были подтверждены в мышинной ксенографтной модели. 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 исследования

Полученные данные о прогностических маркерах чувствительности раковых 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 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.

Положения, выносимые на защиту

1. Белок Bax является прогностическим фактором, определяющим чувствительность опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1.
2. Повышение уровней антиапоптотических белков Bcl-2 или Bcl-xL лежит в основе развития приобретенной устойчивости раковых клеток к действию антагониста Mcl-1 S63845.
3. Использование антагонистов Bcl-2 или Bcl-xL при совместном применении с S63845 ведет к преодолению устойчивости опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1.
4. Повышенный уровень белка Bax совместно с пониженными уровнями Bcl-xL и Mcl-1 определяет благоприятный прогноз выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого.
5. Совместное использование антагонистов Mcl-1 (S63845) и MDM2 (RG7388) ведет к синергетическому усилению гибели в опухолевой модели нейробластомы.
6. Причина развития приобретенной устойчивости к RG7388 связана с изменением структуры белка p53 вследствие появления замены His193Arg, ведущей к нарушению взаимодействия ДНК и p53 и снижению транскрипционной активности последнего.
7. Сочетания антагониста Mcl-1 S63845 или ДНК-повреждающих агентов Цисплатина и Доксорубина с RG7388 не приводят к полному преодолению устойчивости клеток нейробластомы к действию последнего *in vitro* и *in vivo*.
8. Новые антагонисты MDM2, являющиеся производными препарата Нутлин-3а, обладают биологической активностью и улучшенными физико-химическими свойствами по сравнению с оригинальными нутлинами.

Апробация и внедрение работы

Результаты диссертационного исследования суммированы в 8 статьях, опубликованных в международных и отечественных журналах, 1 патенте и были представлены на 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 и V Национальные конгрессы по регенеративной медицине (ноябрь 2019 и 2022, Москва, 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).

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. Дерипаска 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.

Апробация работы была проведена на совместном заседании кафедры биохимии и молекулярной медицины, НИЛ генных и клеточных технологий, НИЛ постгеномных технологий в медицине, НИЛ трансляционной медицины, НИЛ морфогенеза и репарации тканей, НИЛ исследования механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова 15 декабря 2023 года, протокол № 23-12-3.

Данные, полученные в ходе выполнения настоящего исследования, были внедрены в педагогические программы факультета фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, войдя в курсы лекций «Программируемая гибель клеток в медицине» и «Токсикология», а также в программу Школы молодых ученых ИМБ им. В. А. Энгельгардта РАН «Программируемая клеточная гибель: значение и механизмы» (Москва, 17-18 октября 2023 года).

Личный вклад автора

Все этапы исследования были выполнены диссертантом лично или при его непосредственном участии. Н.В. Первушин определил цель и 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.

Степень достоверности работы

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).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 16 печатных работ, в том числе 8 статей в рецензируемых научных журналах, из них: 2 статьи в журнале, входящем в перечень ВАК, 6 статей в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, и 8 тезисов докладов научных конференций.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 170 страницах машинописного текста, иллюстрирована 46 рисунками и 1 таблицей. Работа включает в себя введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы, содержащий 270 источников, из которых 266 зарубежных и 4 отечественных.

Список используемых сокращений

миРНК – малые интерферирующие РНК
ОМЛ – острый миелобластный лейкоз
ПКГ – программируемая клеточная гибель
ПЦР – полимеразная цепная реакция

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты

В ходе работы для изучения механизмов приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагонистов Mcl-1 и MDM2 и способов ее преодоления, для оценки значимости белков семейства Bcl-2 в качестве потенциальных прогностических маркеров аденокарциномы легкого и для анализа биологической активности новых антагонистов MDM2 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 (Саov-4), колоректального рака (RKO и HCT116).

Для определения прогностической значимости белков семейства Bcl-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 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).

Методы

Экспериментальные процедуры

В ходе экспериментов использовали клетки с конfluenceностью 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 Bax, Bcl-2, Bim 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) и 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 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 экспрессии мРНК получена с 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.) и проанализирована с помощью программного обеспечения R3.6.1. Экспрессия 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. «Высокая» и «низкая» экспрессия генов была основана на медиане экспрессии 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 (ксенографта) у мышей

Клетки SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к действию RG7388, (около 3 млн.) были введены мышам подкожно в бессывороточной среде с 30% Matrigel (Corning) в правый бок для создания ксенографтной 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 («Доксорубин»), SH-SY5Y, уст. к RG7388, («контроль») и SH-SY5Y, уст. к RG7388, («Доксорубин»). Мышам из групп «Доксорубин» в/в вводили препарат (1 инъекция - 70 мкг 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 $V = \text{ширина} \times \text{длина} / 2$. 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.

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.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

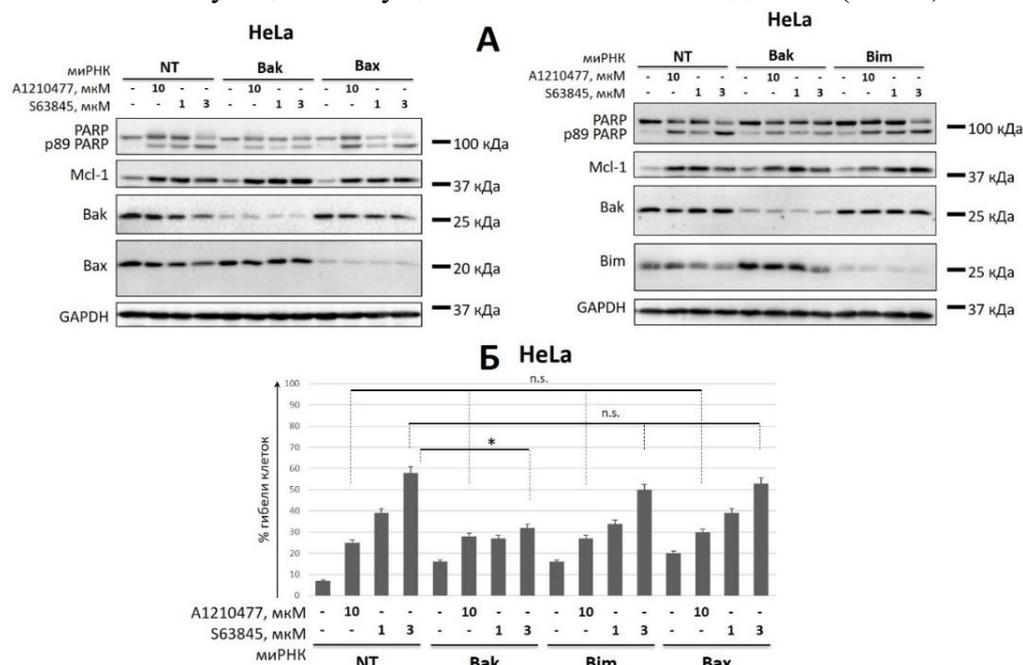
Наиболее перспективным способом нейтрализации действия антиапоптотического белка Mcl-1 является применение его низкомолекулярных селективных антагонистов, относящихся к классу ВНЗ-миметиков. В ходе предварительных экспериментов были выбраны опухолевые клеточные линии человека (аденокарцинома шейки матки HeLa и аденокарцинома легкого H23), которые отличаются повышенной чувствительностью к подавлению Mcl-1. Кроме того, для этих опухолей характерна повышенная экспрессия белка Mcl-1 [Uhlen et al., 2017; Lestini et al., 2009].

В ходе предварительных экспериментов было обнаружено, что оба исследуемых ВНЗ-миметика к 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). 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 Vim, 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, нокдаун проапоптотических белков Bak, Bax и Vim не приводил к значительному изменению степени расщепления апоптотического маркера, белка PARP, в случае обработки клеток A1210477 (10 мкМ), что подтверждается результатами проточной цитометрии с окрашиванием Аннексин/ЙП, где не наблюдалось статистически значимого уменьшения популяции погибших клеток. Аналогичные результаты были получены при нокдауне белков Bax и Vim для S63845 (1 и 3 мкМ). Однако нокдаун Bak влиял на степень индукции апоптоза при использовании S63845, причем эффект был дозозависимым: при меньшей дозе 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).



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).

Следовательно, разрушение комплексов Mcl-1/Bak является ключевым условием для эффективной индукции апоптоза при использовании ВНЗ-миметиков к 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

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, обладающих повышенной устойчивостью к S63845, были использованы клетки HeLa, H23 и нейробластомы SK-N-Be(2)c, которые также обладают повышенной чувствительностью к подавлению Mcl-1, что было подтверждено при помощи Вестерн-блот анализа по степени расщепления белка PARP (Рис. 2А) и проточной цитофлуориметрии методом subG1. Добавление S63845 в концентрации 1 мкМ и 3 мкМ вело к повышению фракции клеток в фазе subG1 до 19% и 31%, соответственно (Рис. 2Б).

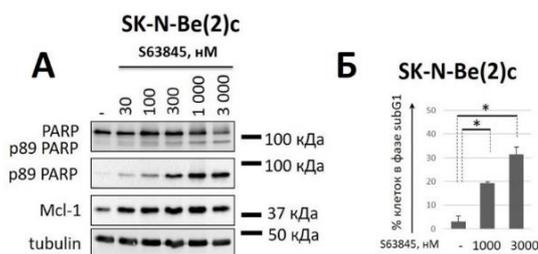
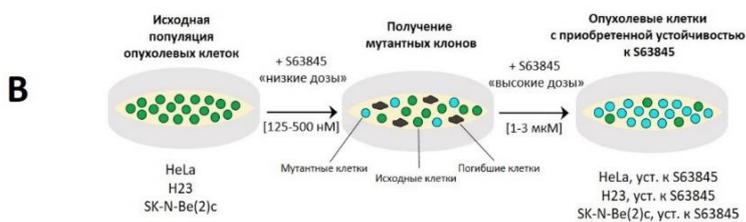


Рис. 2. Оценка клеточной гибели при действии антагониста Mcl-1 S63845 (А, Б) и схема выведения линий HeLa, H23 и SK-N-Be(2)c, характеризующихся повышенной

Получение опухолевых клеток с повышенной устойчивостью к действию S63845



устойчивостью к действию S63845 (В). Результаты Вестерн-блот анализа (А) и данные цитометрического анализа методом subG1 (Б) в клетках SK-N-Be(2)c. Время инкубации клеток после добавления

S63845 составляет 24 часа. Данные на гистограмме представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n=4$; * $p<0,05$ (U-тест).

Для получения резистентности к действию S63845 исходные клеточные линии культивировали с постепенно возрастающими концентрациями ингибитора Mcl-1, начиная с относительно низких доз (до 500 нМ) и заканчивая высокими дозами (до 3 мкМ – HeLa, до 1 мкМ – H23). Для предотвращения обратного выброса препарата за счет действия Р-гликопротеина, повышенный уровень которого часто встречается в опухолевых клетках, при выведении устойчивых клеток использовали Верапамил (50 мкМ), ингибитор Р-гликопротеина (Рис. 2В).

В результате были выведены клетки HeLa, устойчивые к ингибированию Mcl-1 (HeLa, уст. к S63845), по сравнению с исходными. Данный эффект был особенно выражен при использовании микромолярных доз 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).

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 приобретенная устойчивость 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 экспрессии 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 прогностическим фактором, определяющим чувствительность опухолевых клеток к действию ВНЗ-миметиков к Mcl-1, и отвечать за развитие их устойчивости к данным препаратам.

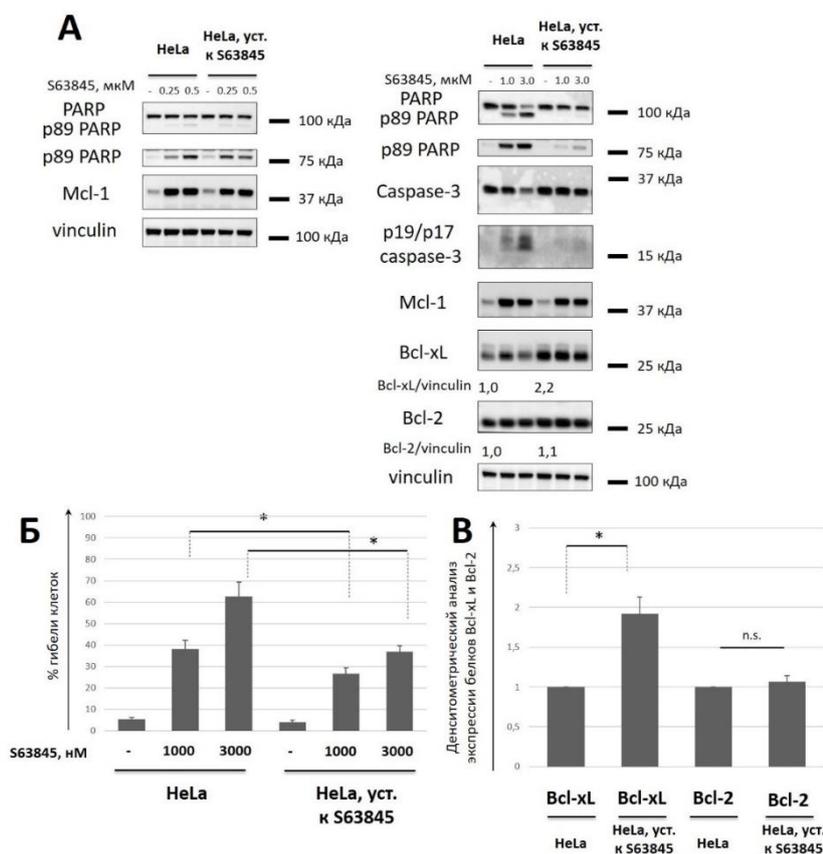


Рис. 3. Сравнительный анализ клеточной гибели при действии ВНЗ-миметика S63845 и экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 семейства в клетках HeLa и HeLa, уст. к S63845. Результаты Вестерн-блот анализа (А), проточной цитометрии с окрашиванием Аннексин/ЙП (Б) и денситометрического анализа (В) в клетках HeLa и HeLa, уст. к S63845. Bcl-xL/vinculin и Bcl-2/vinculin – денситометрический анализ экспрессии 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).

Аналогичные результаты были получены в клетках нейробластомы SK-N-Be(2)c (Рис. 4). Однако в отличие от линии HeLa, устойчивые клетки SK-N-Be(2)c характеризовались повышенным уровнем белка Bcl-2, при этом уровень Bcl-xL не менялся (Рис. 4В). Также были получены клетки H23, уст. к S63845, однако на этой линии не наблюдалось изменений в уровнях белков Bcl-2 и Bcl-xL.

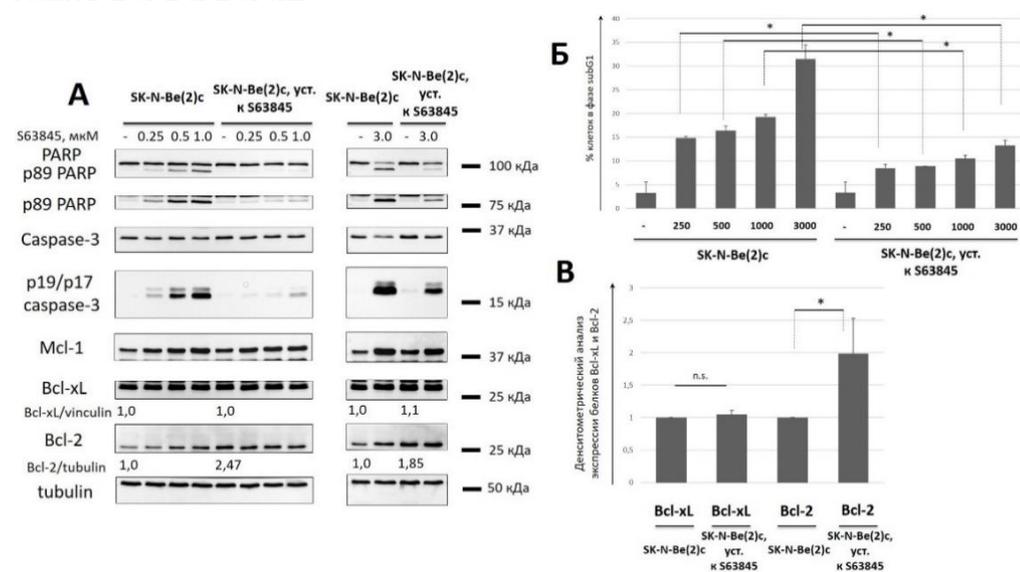


Рис. 4. Сравнительный анализ клеточной гибели при действии ВНЗ-миметика S63845 и уровня антиапоптотических белков Bcl-2 семейства в клетках SK-N-Be(2)c и SK-N-Be(2)c, уст. к S63845. Результаты Вестерн-блот анализа (А), проточной цитометрии (subG1) (Б) и денситометрического анализа (В) в клетках SK-N-Be(2)c и SK-N-

Be(2)c, уст. к S63845. Bcl-xL/tubulin и Bcl-2/tubulin – денситометрический анализ экспрессии 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).

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. 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 (Bak и Bax), 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 рака, 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 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).

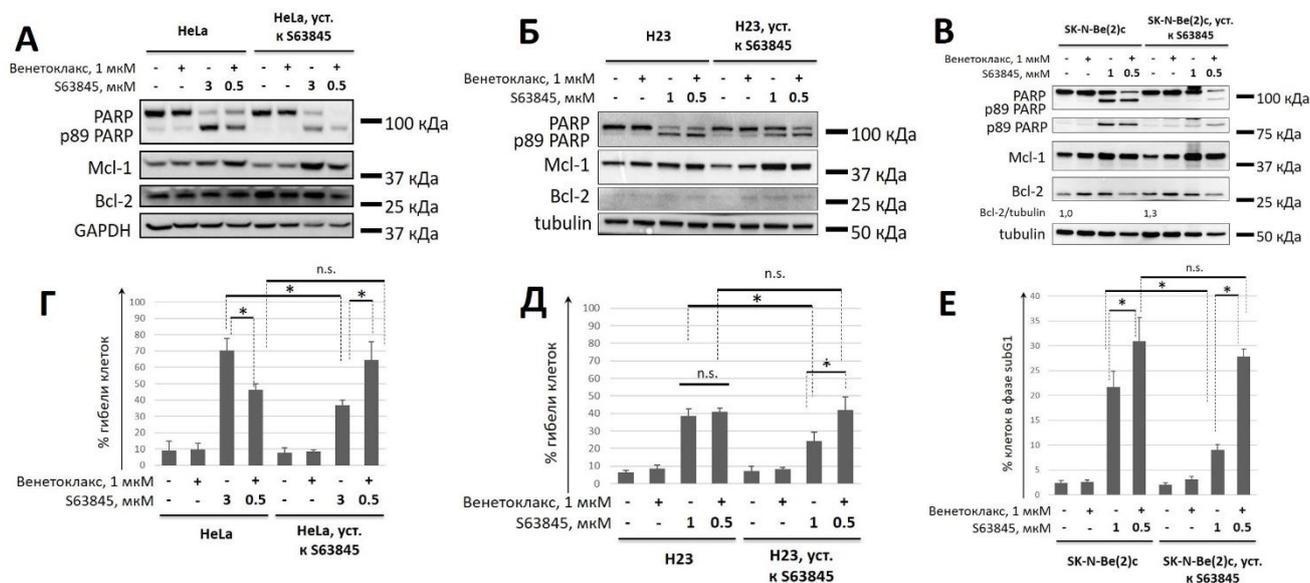


Рис. 5. Оценка эффективности применения Венетоклакса для преодоления устойчивости клеток к S63845. А-В. Результаты Вестерн-блот анализа в материнских и устойчивых к действию S63845 клетках HeLa (А), H23 (Б) и SK-N-Be(2)c (В). Г-Д. Данные цитометрического анализа с окрашиванием Аннексин/ЙП в клетках HeLa/HeLa, 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 \pm 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.

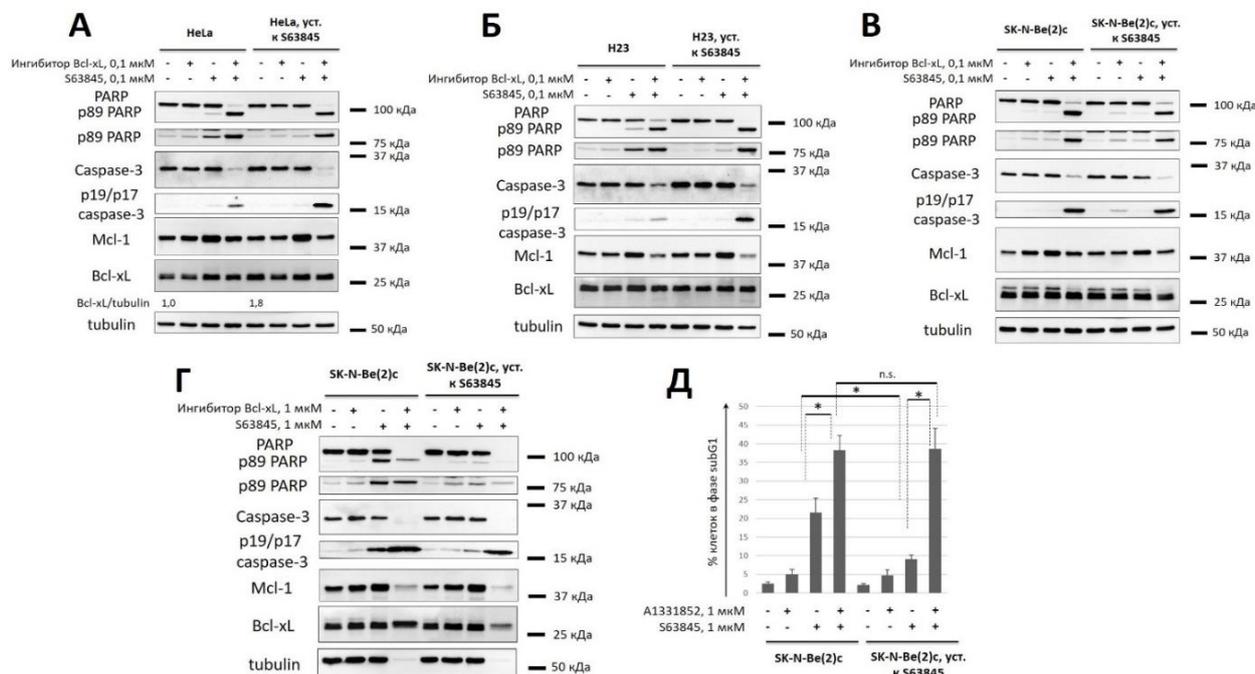


Рис. 6. Оценка эффективности применения ингибитора Bcl-xL (A1331852) для преодоления устойчивости клеток к S63845. А-В. Результаты Вестерн-блот анализа в исходных и устойчивых к действию S63845 клетках HeLa (А), H23 (Б) и SK-N-Be(2)c (В). Г-Д. Данные Вестерн-блот анализа (Г) и цитометрического анализа (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).

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 доз 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).

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 Венетоклакса с S63845, поскольку комбинация последнего с ингибитором Bcl-xL ведет к выраженной цитотоксичности, что в ходе клинического применения может вызвать опасные побочные эффекты.

4. Оценка значимости 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 экспрессии мРНК и уровней белков семейства Bcl-2 в тканях аденокарциномы легкого. Первоначально 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).

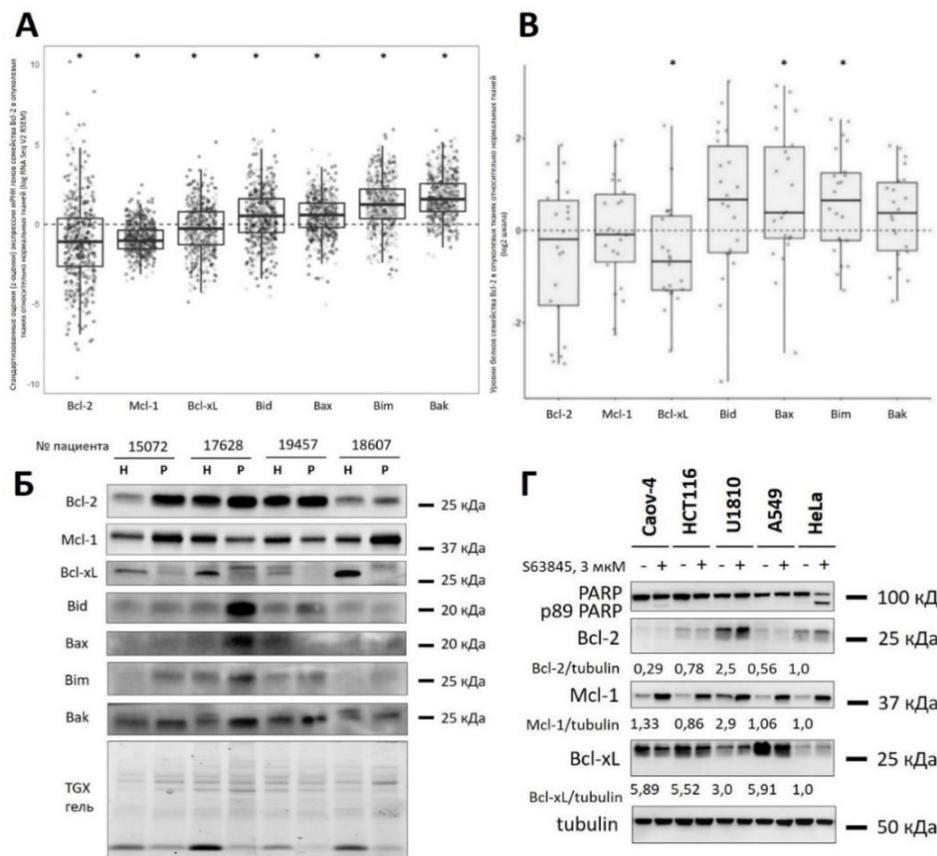


Рис. 7. Оценка уровней экспрессии белков семейства Bcl-2 в качестве потенциальных прогностических маркеров аденокарциномы легкого. А. Стандартизованные оценки (z-оценки) экспрессии мРНК генов семейства Bcl-2 в опухолевых тканях относительно нормальных тканей (log RNA Seq V2 RSEM).

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 раковых клеточных линиях. Время инкубации клеток после добавления S63845 – 24 часа. * p<0,05.

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 Bax, Bax, Bim и Bid наблюдалась обратная картина (Рис. 7А). 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 проапоптотических белков (Bax, Bax, Bim и Bid), 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 такой белковый профиль антиапоптотических членов семейства Bcl-2 наблюдается у опухолевых клеток, обладающих чувствительностью к действию S63845, что представлено на примере клеток HeLa и четырех раковых 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.

Кроме того, был проведен анализ выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого по данным базы LUAD TCGA (Рис. 8). Были сформированы четыре подгруппы пациентов в зависимости от уровня антиапоптотического белка Bax и антиапоптотических белков Mcl-1 и Bcl-xL (Рис. 8А, Б). Следует отметить, что выживаемость пациентов с пониженным уровнем Bcl-xL и

повышенным уровнем Ваk 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 демонстрировала наиболее благоприятный прогноз по сравнению со всеми остальными подгруппами пациентов (Рис. 8B). Поскольку белок Ваk является прогностическим фактором, определяющим чувствительность раковых клеток к действию ингибиторов Mcl-1, применение последних может иметь высокий терапевтический потенциал для пациентов с повышенным уровнем Ваk и пониженными уровнями Mcl-1 и Bcl-xL.

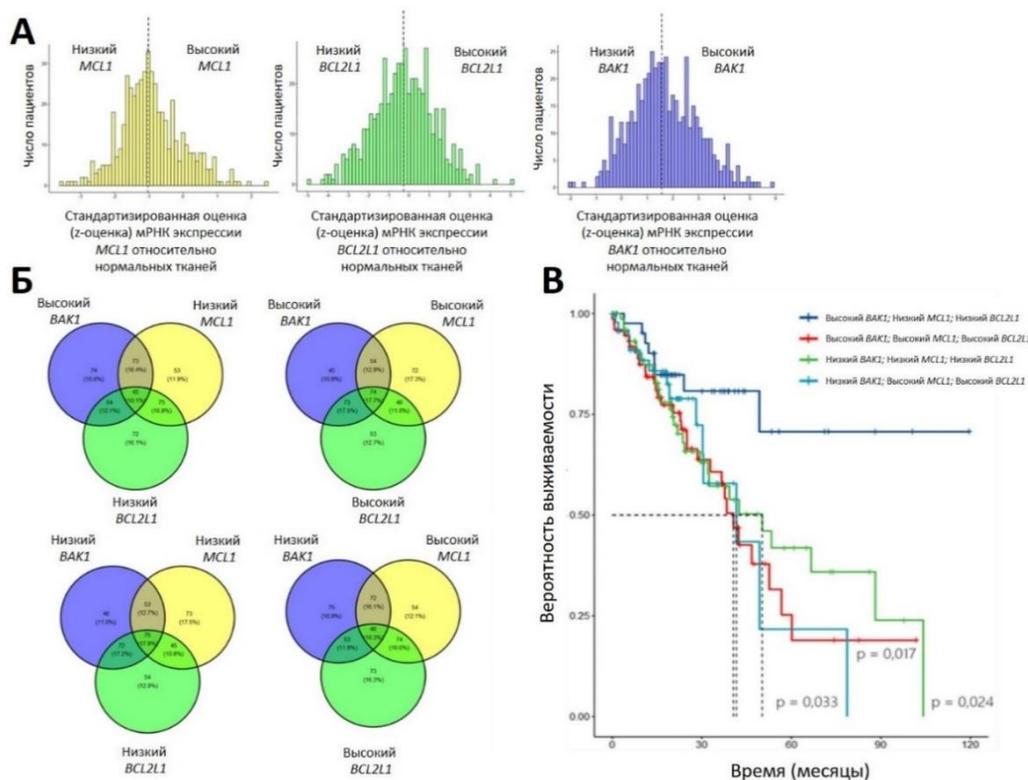


Рис. 8. Оценка роли семейства Bcl-2 в выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого. А. Гистограммы стандартизованных оценок (z-оценок) экспрессии мРНК генов семейства Bcl-2 (*MCL1*, *BCL2L1*, *BAK1*) в опухолевых тканях относительно нормальных тканей (log RNA Seq V2 RSEM). Б. Диаграммы Венна показывают формирование четырех подгрупп пациентов для анализа

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 Bcl-2. Тест логарифмического ранга с поправкой Холма-Бонферрони был использован для сравнения группы пациентов, характеризующихся Высокий *BAK1*, Низкий *MCL1*, Низкий *BCL2L1* с другими подгруппами.

Таким образом, профиль экспрессии белков семейства Bcl-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 Bcl-2 (ABT199 - Венетоклак) и MDM2 (RG7388 – Идасанутлин) 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 - Идасанутлин) 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 $0,26 \pm 0,08$ мкМ и $2,12 \pm 0,62$ мкМ, соответственно, 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. Маркером действия препаратов S63845 и RG7388 является накопление белков Mcl-1 и p53, соответственно.

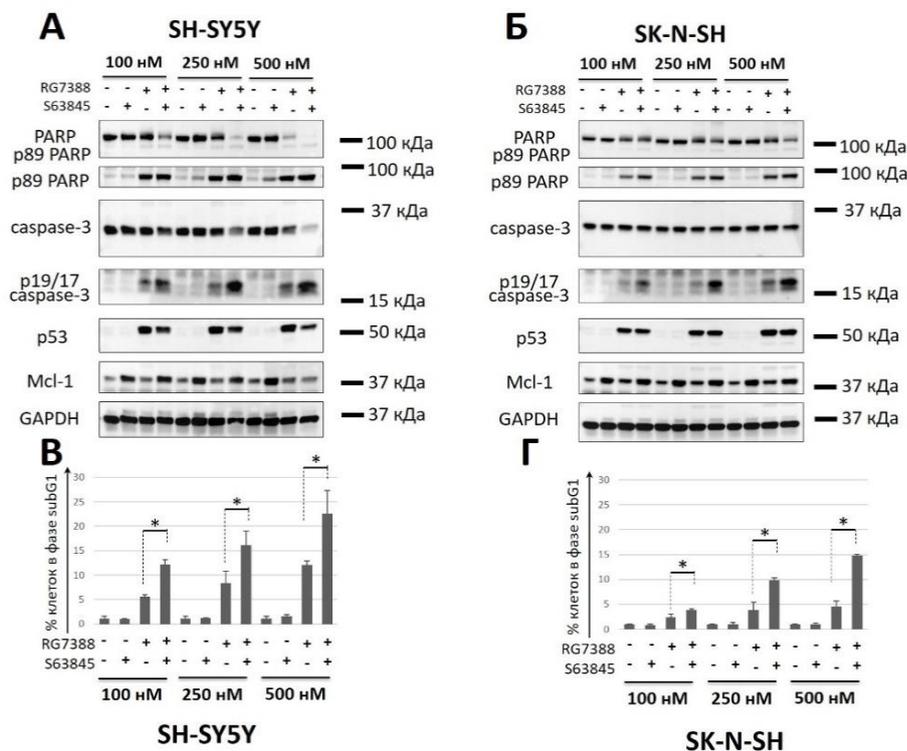


Рис. 9. Оценка эффективности применения антагонистов Mcl-1 (S63845) и MDM2 (RG7388) в наномолярном диапазоне концентраций (100-500 нМ) в модели нейробластомы. А-Б. Результаты Вестерн-блот анализа в клетках SH-SY5Y (А) и SK-N-SH (Б). Г-Д. Данные цитометрического анализа методом subG1 в клетках SH-SY5Y (В) и SK-N-SH (Г). Время инкубации клеток после добавления ингибиторов составляет 24 часа. Данные на гистограммах представлены как среднее \pm стандартное отклонение, $n=4$; * $p<0,05$ (U-тест).

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 полной формы каспазы-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 RG7388 (Идасанутлина) в широком диапазоне концентраций в клетках нейробластомы SH-SY5Y и SK-N-SH, которые исходно были не чувствительны к ингибированию Mcl-1. Эти данные подтверждают целесообразность использования данной комбинации в выбранной модели опухоли. Потенциальный механизм усиления гибели клеток при одновременном блокировании белков Mcl-1 и MDM2 представляется следующим: 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.

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. Однако в отличие от ингибитора Mcl-1, к клеткам не добавлялся Верапамил, так как было ранее показано, что нутлины сами по себе подавляют активность Р-гликопротеинов [Michaelis et al., 2009]. 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 10 раз относительно исходных клеток SH-SY5Y: $2,72 \pm 1,93$ мкМ и $0,25 \pm 0,08$ 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. 10А, Б).

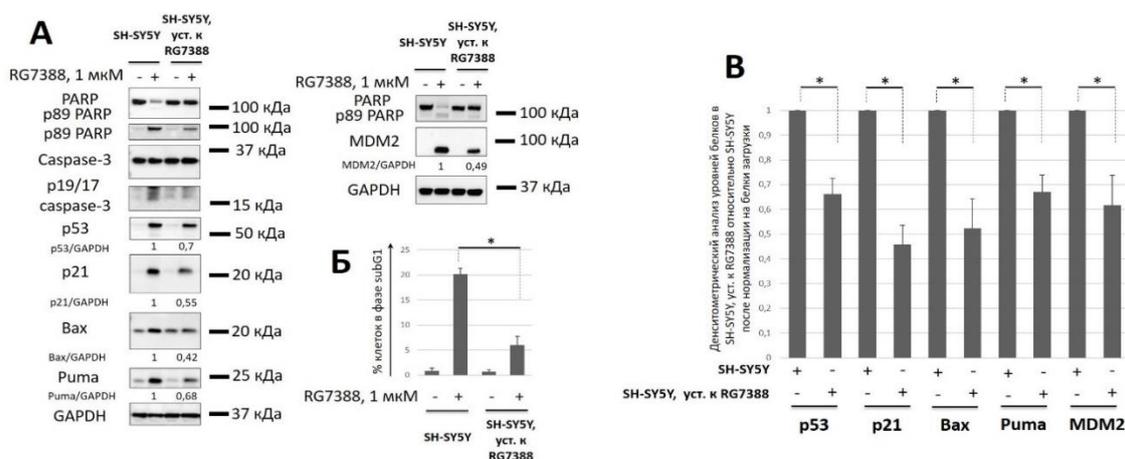


Рис. 10. Сравнительный анализ клеточной гибели при действии Идасанутлина и экспрессии MDM2, p53 и p53-активируемых белков (p21, Bax, Puma) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. Результаты

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, Bax/GAPDH, Puma/GAPDH и MDM2/GAPDH – денситометрический анализ экспрессии 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 ± стандартное отклонение, n=4; * p<0,05 (U-тест).

Также было обнаружено, что в устойчивых клетках при добавлении Идасанутлина в 1,5-2 раза уменьшается накопление MDM2, p53 и p53-активируемых белков, таких как p21, Bax, Puma (Рис. 10А, В). Это указывало на возможное нарушение транскрипционной активности белка p53.

Для проверки этого предположения был проведен анализ экспрессии мРНК генов соответствующих белков методом ПЦР в реальном времени, ибо p53 является активатором транскрипции различных генов, в том числе *CDKN1A* (кодирует p21), *BAX* (Bax), *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 Идасанутлина (1 мкМ) (Рис. 11).

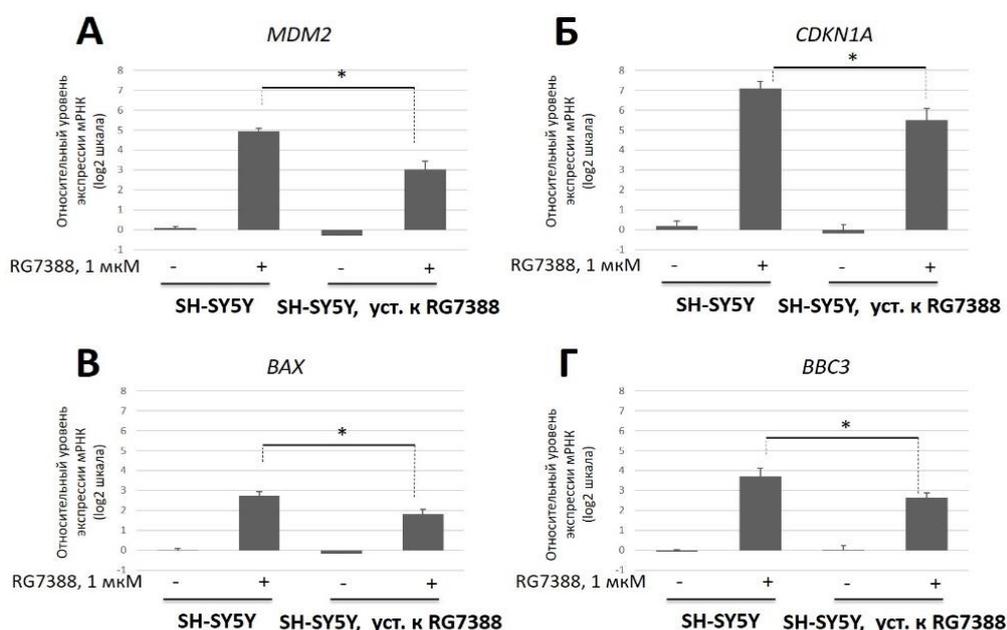


Рис. 11. Оценка уровня мРНК экспрессии генов *MDM2*, *CDKN1A*, *BAX*, *BBC3* при действии Идасанутлина (1 мкМ) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. Данные на гистограммах представлены как среднее ± стандартное отклонение после логарифмирования по основанию 2, n=4; * p<0,05 (U-тест).

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 Идасанутлину и их биоинформатический анализ

Возможной причиной развития приобретенной устойчивости к антагонисту MDM2 RG7388 в раковых клетках является появление мутаций в структуре гена *TP53*, кодирующего белок p53 [Haronikova et al., 2021; Michaelis et al., 2011]. Для обнаружения возможных мутаций гена *TP53* в клетках SH-SY5Y, уст. к RG7388 был применен метод секвенирования нового поколения (NGS). По его итогам 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 (исследование было выполнено совместно с к.х.н., в.н.с. НИИ ФХБ им. А. Н. Белозерского МГУ им. М. В. Ломоносова Ниловым Д.К.) (Рис. 12).

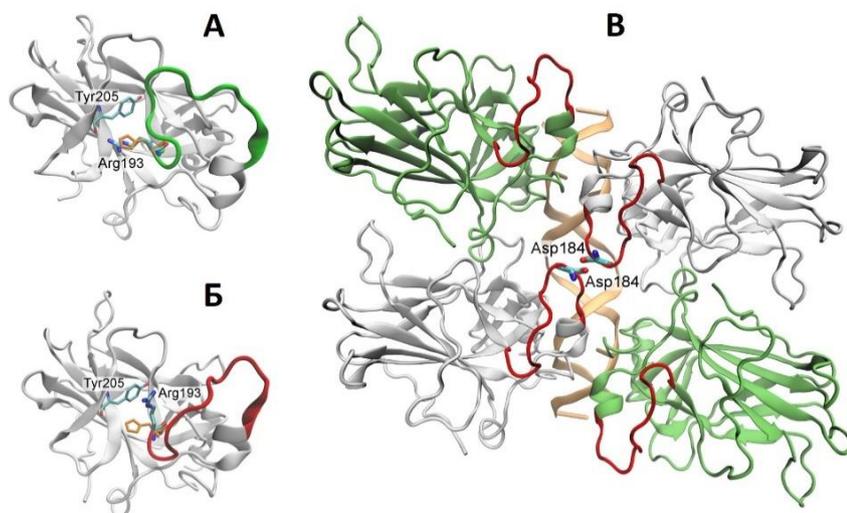


Рис. 12. Молекулярное моделирование структурной организации белка p53 с мутацией His193Arg. А. Исходная структура мутантного белка. Петля, состоящая из 182–194 а.о., показана зеленым цветом. Б. Структура белка после конформационного изменения. Петля, состоящая из 182–194 а.о., показана красным. Координаты 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 субъединицы 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. 12А), что вело к перестройке структурной организации мутантного белка p53 по сравнению с белком дикого типа (Рис. 12Б).

Важно отметить, что белок p53 дикого типа связывает ДНК в виде тетрамера с высокой степенью взаимодействия. 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. 12В). 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 видах рака. Данные были взяты из открытого ресурса TP53 Database версия R20 (tp53.isb-cgc.org) [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 стандартных 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 ВНЗ-миметика к Mcl-1 S63845, а также традиционных химиотерапевтических средств (ДНК-повреждающих агентов – Цисплатина и Доксорубицина) в сочетании с RG7388 для преодоления устойчивости клеток нейробластомы SH-SY5Y к Идасанутлину.

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 к Идасанутлину клетках SH-SY5Y (Рис. 13). 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. 13А). Схожая картина наблюдалась по итогам проведения subG1-теста: размер популяции subG1 увеличивался с 4,3% при действии Идасанутлина (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. 13Б).

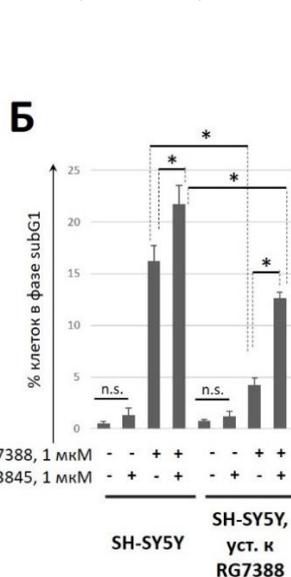
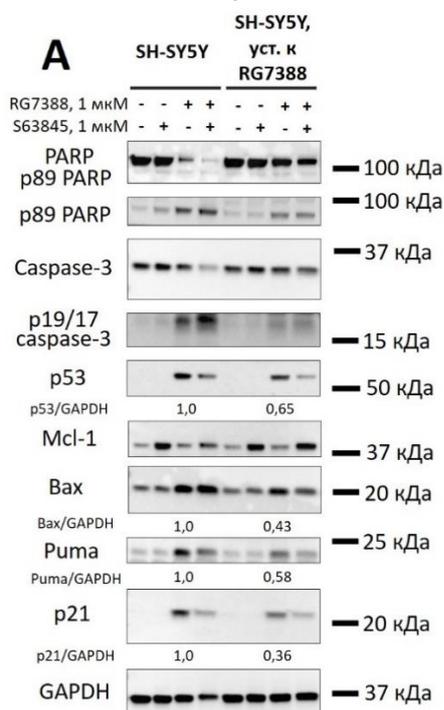


Рис. 13. Оценка эффективности применения ингибитора Mcl-1 (S63845) для преодоления устойчивости клеток к RG7388. Результаты Вестерн-блот анализа (А) и данные цитометрического анализа методом subG1 (Б) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. p53/GAPDH и p21/GAPDH – денситометрический анализ экспрессии 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).

отклонение, n=4; n.s. – статистически не значимо, * p<0,05 (U-тест).

В качестве другого способа преодоления устойчивости к RG7388 была проведена оценка целесообразности применения Цисплатина и Доксорубицина – 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 Доксорубицину в качестве индивидуального вещества: значение IC50 увеличилось в несколько

раз по сравнению с исходными клетками SH-SY5Y – 0,23 и 0,78 мкМ, соответственно (Рис. 14А). Вестерн-блот анализом показано, что Доксорубин (1 мкМ) усиливал гибель клеток, запускаемую при действии Идасанутлина (1 мкМ) как в исходных, так и в устойчивых к RG7388 клетках SH-SY5Y. Однако в случае последних комбинация Доксорубина и Идасанутлина обеспечивала менее эффективный запуск апоптотической гибели, что демонстрирует степень расщепления белка PARP (Рис. 14Б). Эти закономерности подтверждаются результатами цитометрического анализа. Так, при действии Доксорубина в качестве индивидуального агента число клеток в фазе subG1 составляло 19,9% и 7,2%, в то время как в комбинации с RG7388 – 28,9% и 14,6% в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388, соответственно (Рис. 14В). Аналогичные результаты наблюдались в случае использования Цисплатина.

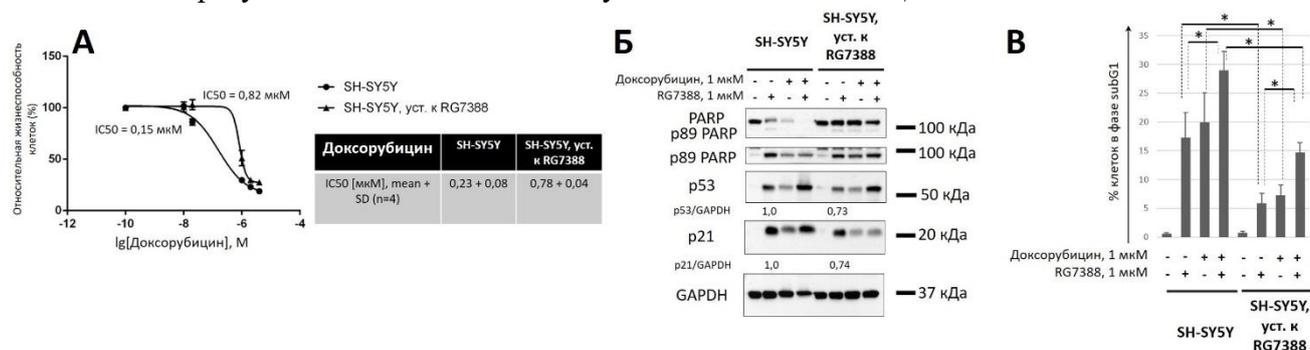


Рис. 14. Оценка эффективности применения химиопрепарата Доксорубина для преодоления устойчивости клеток к RG7388. Результаты MTS-теста (А), Вестерн-блот анализа (Б) и данные цитометрического анализа методом subG1 (В) в клетках SH-SY5Y и SH-SY5Y, уст. к RG7388. Для MTS-теста представлен репрезентативный эксперимент и статистический анализ биологических повторов (n=4) в виде среднего (mean) и стандартного отклонения (SD). p53/GAPDH и p21/GAPDH – денситометрический анализ экспрессии 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; * p<0,05 (U-тест).

Таким образом, оба химиопрепарата, как и в случае антагониста Mcl-1, в сочетании с Идасанутлином усиливали противоопухолевую активность последнего, однако не приводили к полному преодолению устойчивости клеток SH-SY5Y к действию RG7388. Кроме того, клетки SH-SY5Y, уст. к RG7388, проявляли меньшую чувствительность к действию Доксорубина и Цисплатина 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 мутаций в белке p53. Кроме того, их пониженная чувствительность к стандартным химиопрепаратам может вести к уменьшению эффективности противоопухолевой терапии и ухудшить выживаемость пациентов. Поэтому рациональнее использовать нутлины в низких дозах и в комбинации с другими противоопухолевыми препаратами для избежания развития неблагоприятной клинической картины.

9. Оценка эффективности применения Доксорубина 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-цитостатикам (на примере Доксорубина) была использована ксенографтная модель нейробластомы с участием иммунодефицитных мышей NSG (исследование было выполнено совместно с к.б.н., с.н.с. ИБХ РАН Шипуновой В. О.). Дозировка и продолжительность введения Доксорубина были выбраны с учетом его побочных свойств, в частности, выраженной кардиотоксичности у иммунодефицитных мышей [Favreau-Lessard et al., 2019].

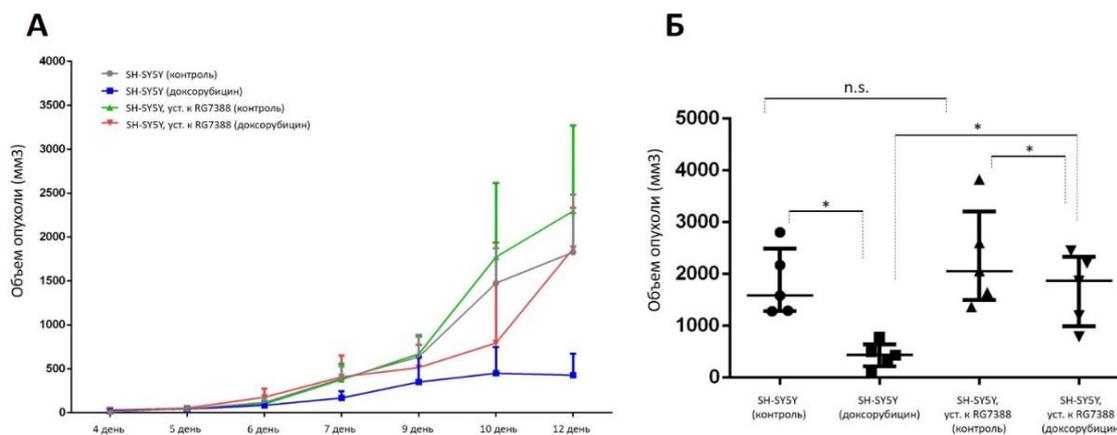


Рис. 15. Анализ эффективности использования Доксорубина для преодоления устойчивости клеток SH-SY5Y к RG7388 в *in vivo* модели. А. Динамика опухолевого роста (мм³) в мышинной ксенографтной модели нейробластомы в интервале 4-12 дней. Данные на графике представлены как среднее \pm стандартное отклонение, 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).

Обнаружено, что клетки SH-SY5Y, уст. к RG7388, в ксенографтной мышинной модели обладали пониженной чувствительностью к Доксорубину по сравнению с клетками SH-SY5Y, о чем свидетельствует скорость опухолевого роста (Рис. 15А). Введение Доксорубина приводило к уменьшению 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, уст. к RG7388 и SH-SY5Y. Статистических различий между двумя контрольными группами не было выявлено (Рис. 15Б).

Суммарно, полученные различия в ответе на Доксорубин в *in vivo* модели подтверждают ранее представленные в настоящем исследовании результаты *in vitro* экспериментов, свидетельствуя о том, что 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 биологической активности новых производных имидазолина как новых антагонистов MDM2

Другая важная 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 препаратов, относящихся к антагонистам MDM2. Кроме того, проводился цитометрический анализ для выяснения возможной цитотоксичности

полученных имидазолиновых производных. Стоит отметить, что нутлины во многих раковых клеточных линиях, содержащих p53 дикого типа, не вызывают гибель клеток в широком диапазоне концентраций при использовании в качестве индивидуальных агентов. Однако в некоторых линиях (например, в моделях нейробластомы) нутлины сами по себе способны запустить клеточную гибель, что в том числе было показано в настоящем исследовании.

Вестерн-блот анализ установил, что новые сульфопроизводные имидазолина (соединения-лидеры, определенные в ходе предварительных испытаний) в микромолярных концентрациях (10-20 мкМ) вели к эффективной стабилизации p53 и аккумуляции p21 по сравнению с контрольными клетками (Рис. 16А), однако в эффективности действия существенно уступали Нутлину-3а в клетках колоректального рака RKO (Рис. 16Б). Кроме того, по результатам Вестерн-блота (расщепление белка PARP) и данным цитометрического анализа (окрашивание Аннексин/ЙП) было выявлено, что данные антагонисты MDM2 являются нетоксичными в указанных концентрациях (Рис. 16А, В). При использовании наномолярных концентраций (до 500 нМ) было обнаружено, что соединения МА-С1 и МА-С2 уступают в эффективности действия RG7112, однако сопоставимы с Нутлином-3а (Рис. 16Г-Е). Важно отметить, что исследуемые сульфозамещенные модификации имидазолинов обладали значительно большей растворимостью в воде в отличие от оригинальных нутлинов [Bazanov et al., 2021]. Аналогичные закономерности были обнаружены для карбамидных производных имидазолина [Bazanov et al., 2019; Bazanov et al., 2022]. Полученные результаты могут быть значимыми для модификации современных подходов получения новых противоопухолевых препаратов.

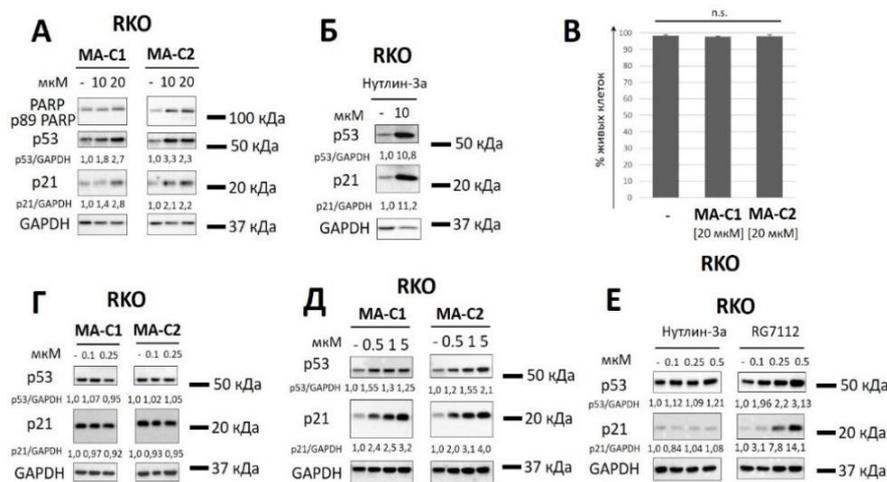


Рис. 16. Оценка эффективности сульфопроизводных имидазолина (МА-С1 и МА-С2) в сравнении с Нутлином-3а и RG7112 в клетках RKO. Результаты Вестерн-блот анализа (А, Б, Г-Е) и данные цитометрического анализа (Аннексин/ЙП) (В) в клетках RKO. p53/GAPDH и p21/GAPDH – денситометрический анализ экспрессии соответствующих белков после добавления ингибитора MDM2 в пересчете на GAPDH. Время инкубации

клеток после добавления препаратов составляет 24 часа. Данные на гистограмме представлены как среднее \pm стандартное отклонение, n=4; n.s. – статистически не значимо (U-тест).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе настоящей работы были изучены механизмы приобретенной устойчивости к антагонистам Mcl-1 и MDM2, а также оценены возможные стратегии ее преодоления. Было обнаружено, что эффекторный белок Bax является важным прогностическим маркером, определяющим чувствительность раковых клеток к ингибиторам Mcl-1. Повышение экспрессии других антиапоптотических белков, в частности Bcl-2 и Bcl-xL, является одной из причин развития резистентности и исходной низкой чувствительности опухолевых клеток к действию антагониста Mcl-1 S63845. Комбинирование антагонистов этих белков с S63845 позволяет преодолеть устойчивость злокачественных клеток к действию последнего. Была выявлена прогностическая роль белков 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 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 аккумуляции p53 и p53-зависимых белков под действием Идасанутлина. Однако S63845 был не способен преодолеть устойчивость раковых клеток к RG7388. Аналогичные результаты наблюдались для химиопрепаратов Цисплатина и Доксорубицина, причем для последнего это было также показано в *in vivo* модели нейробластомы. 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. Наличие проапоптотического белка Bax является прогностическим фактором, определяющим чувствительность раковых клеток к действию антагонистов Mcl-1.
2. Повышение уровней экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 или Bcl-xL лежит в основе развития приобретенной устойчивости опухолевых клеток к действию антагониста Mcl-1 S63845.
3. Комбинирование антагонистов Bcl-2 или Bcl-xL с антагонистом Mcl-1 S63845 ведет к преодолению устойчивости опухолевых клеток к действию последнего.
4. Пониженные уровни белков Bcl-xL и Mcl-1 и повышенный уровень белка Bax по сравнению с другим профилем экспрессии этих белков определяют благоприятный прогноз выживаемости пациентов с аденокарциномой легкого.
5. Сочетание S63845 и антагониста MDM2 RG7388 (Идасанутлина) ведет к синергетическому усилению гибели клеток нейробластомы.
6. Причина развития приобретенной устойчивости к RG7388 связана с нарушением 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.
7. S63845 и ДНК-повреждающие агенты Цисплатин и Доксорубин приводят к частичному преодолению устойчивости клеток нейробластомы к действию RG7388 в *in vitro* и *in vivo* экспериментах.
8. 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

Публикации в научных рецензируемых журналах:

1. **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. РИНЦ, ВАК, ИФ=2.8
2. 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. РИНЦ, ВАК, ИФ=2.8
3. **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. // Int. Rev. Cell Mol. Biol. – 2020. – Vol. 351. – P. 23–55. WoS, Scopus, ИФ=6.8

4. **Pervushin N.V.** Bcl-B: an “unknown” protein of the Bcl-2 family / Pervushin, N.V., Kopeina G.S., Zhivotovsky B. // *Biol. Direct.* – 2023. – Vol. 18, № 1. – P. 69. WoS, Scopus, ИФ=5.5
5. Senichkin V.V. Bak and Bcl-xL Participate in Regulating Sensitivity of Solid Tumor Derived Cell Lines to Mcl-1 Inhibitors / Senichkin, V.V., **Pervushin, N.V.**, Zamaraev, A.V., Sazonova, E.V., Zuev, A.P., Streletskaia, A.Y., Prikazchikova, T.A., Zatsepin, T.S., Kovaleva, O.V., Tchevkina, E.M., Zhivotovsky, B., Kopeina, G.S. // *Cancers.* – 2021. – Vol. 14, № 1. – P. 181. WoS, Scopus, ИФ=5.2
6. Bazanov D.R. Synthetic Design and Biological Evaluation of New p53-MDM2 Interaction Inhibitors Based on Imidazoline Core / Bazanov, D.R., **Pervushin, N.V.**, 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, Scopus, ИФ=4.6
7. Bazanov D.R. Sulfonamide derivatives of cis-imidazolines as potent p53-MDM2/MDMX protein-protein interaction inhibitors / Bazanov, D.R., **Pervushin, N.V.**, Savin, E.V., Tsymliakov, M.D., Maksutova, A.I., Sosonyuk, S.E., Kopeina, G.S., Lozinskaya, N.A. // *Med. Chem. Res.* – 2021. – Vol. 30, № 12. – P. 2216–2227. WoS, Scopus, ИФ=2.3
8. 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. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* – 2019. – Vol. 29, № 16. – P. 2364–2368. WoS, Scopus, ИФ=2.7

Тезисы докладов на конференциях:

9. **Первушин Н.В.** Преодоление устойчивости опухолевых клеток к апоптозу с помощью селективных антагонистов антиапоптотического белка Mcl-1. / Первушин Н.В., Сеничкин В.В., Копейна Г.С., Животовский Б.Д., Стрелецкая А.Ю. // "Биология - наука XXI века": 23-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Пущино, 15-19 апреля 2019 г.). Сборник тезисов. – 2019. – Т. 1. – С. 366-367.
10. **Первушин Н.В.** Изучение биологической активности алкоксиарилпроизводных имидазолина как потенциальных ингибиторов белок-белкового взаимодействия p53-MDM2. / Первушин Н.В., Базанов Д.Р., Копейна Г.С. // *Материалы международного научного форума Ломоносов-2019*», г. Москва. – 2019.
11. Senichkin V.V. Bcl-xL and Bak serve as predictors of sensitivity of cancer cells to BH3-mimetic S63845. / Senichkin, V.V., Kopeina, G.S., **Pervushin, N.V.**, Streletskaia, A.Y., Zhivotovsky, B. // *Abstract Book (27th Euroconference on Apoptosis "Cell Death and Regeneration")*. – 2019. – P. 155-155.
12. Сеничкин В.В. Белки Bcl-xL и Bak как биомаркеры чувствительности опухолевых клеток к ингибированию Mcl-1. / Сеничкин В.В., Копейна Г.С., Стрелецкая А.Ю., **Первушин Н.В.**, Животовский Б.Д. // *Успехи молекулярной онкологии.* – 2019. – Т. 6. – С. 137-138. РИНЦ, ВАК, ИФ=0.7
13. **Первушин Н.В.** Исследование эффективности действия алкоксиарилпроизводных имидазолина в качестве потенциальных ингибиторов белок - белкового взаимодействия p53-MDM2. / Первушин Н.В., Базанов Д.Р., Савицкая В.Ю., Аникина Л.В., Прокурнина М.В., Лозинская Н.А., Копейна Г.С. // *Гены и клетки.* – 2019. – Т. 4. – С. 179-179. РИНЦ, ВАК, ИФ=0.9
14. **Первушин Н.В.** Поиск и изучение прогностических факторов, определяющих чувствительность опухолевых клеток к селективным антагонистам антиапоптотического белка Mcl-1. // *Материалы V Всероссийского молодежного научного форума «Наука будущего – наука молодых»*, г. Москва. – 2020.
15. **Первушин Н.В.** Оценка биологической активности производных имидазолина в качестве ингибиторов MDM2. / Первушин Н.В., Базанов Д.Р., Савицкая В.Ю., Савин Е.В., Лозинская Н.А., Копейна Г.С. // *Гены и клетки.* – 2022. – Т. 17. – С. 175-175. РИНЦ, ВАК, ИФ=0.9
16. Bazanov D.R. Methoxyphenylimidazolines as potential activators of p53. / Bazanov D.R., **Pervushin N.V.**, Lozinskaya N.A., Kopeina G.S. // *Med. Sci. Forum.* – Vol. 14, № 1. – P. 100-100.