

УДК 616-006.04

**ИССЛЕДОВАНИЕ ОСНОВНЫХ МОЛЕКУЛЯРНЫХ
МЕХАНИЗМОВ, ВОЗНИКАЮЩИХ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ
РЕЗИСТЕНТНОСТИ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ
MCF-7 К МЕТФОРМИНУ**

Семутников Кирилл Сергеевич

Государственное бюджетное общеобразовательное учреждение Московская
школа на Юго-Западе № 1543, Москва, kirillsemutnikov@yandex.ru

Аннотация: Благополучие в любом возрасте напрямую зависит от состояния здоровья. Здоровье связано с двумя факторами: развитие прикладной медицины и персонального отношения к собственному состоянию. А развитие прикладной медицины, в свою очередь, зависит от успехов фундаментальной науки, ведь только зная механизмы возникновения и развития заболевания есть шанс его вылечить. Именно поэтому в данной работе исследуются внутриклеточные механизмы, возникающие при формировании резистентности рака молочной железы к метформину. Это отвечает формулировке ЦУР-3¹.

Ключевые слова: онкология; здоровье; резистентность; сигналинг; метформин; рак молочной железы

**K. Semutnikov (Russia). INVESTIGATION OF THE MAIN
MOLECULAR MECHANISMS THAT ARISE DURING THE
FORMATION OF RESISTANCE OF MCF-7 BREAST CANCER
CELLS TO METFORMIN**

Abstract: Well-being at any age directly depends on the state of health. Health is associated with two factors: the development of applied medicine and personal attitude to one's own condition. And the development of applied medicine, in turn, depends on the success of fundamental science, because only knowing the mechanisms of the onset and development of the disease is there a chance to cure it. That is why this work

investigates the intracellular mechanisms that arise during the formation of resistance of breast cancer to metformin. This is in line with the wording of SDG-3¹.

Keywords: oncology; health; resistance; signaling; metformin; mammary cancer

Введение

Сайт Всемирной организации здравоохранения выделяет в качестве наиболее актуальных болезней 21 века диабет и рак (заболевание, возникающее из-за накопления спонтанных мутаций в геноме)².

В античные времена при лечении диабета врачи использовали козлятник аптечный (*Galega officinalis* L)³. А уже в 20 веке из этого растения был выделен или самостоятельно синтезирован метформин, вещество, которое успешно применяется и в наше время больными сахарным диабетом. Но это оказалось не единственным полезным качеством козлятника. В статье «Metformin Associated With Lower Cancer Mortality»⁴ коллектив авторов показал, что группа пациентов с сахарным диабетом и прием метформина была связана с более низкой заболеваемостью раком, а если у пациентов изначально был рак, то эта группа уже была менее предрасположена к смертности от рака или смерть наступила намного позже. Однако не все так оптимистично.

Ученые из Онкологического центра имени Блохина (Россия) в своей работе «Экзосомы и развитие резистентности опухолевых клеток к метформину: пилотное исследование»⁵ показали, что противоопухолевые препараты со временем могут терять свою эффективность в подавлении развития опухоли из-за резистентности, вырабатываемой опухолью.

В данной работе представлен опыт получения резистентной сублинии рака молочной железы MCF-7 *in vivo* к метформину. Этого удалось добиться за счет

длительного культивирования на питательной среде с присутствием метформина. Лекарственная устойчивость сохранялась даже после отмены метформина.

Также путем сравнительного анализа активности ключевых белков, участвующих в клеточном метаболизме, пролиферации и миграции, были исследованы основные молекулярные механизмы, возникающие при формировании резистентности клеток рака молочной железы MCF-7 к метформину (противоопухолевый препарат). Такие белки как AMPK, GLUT, SNAI1 и др.

Также в работе описан опыт по возвращению чувствительности к сублинии рака молочной железы резистентной к метформину за счет снижения концентрации сахара в питательной среде. Это может быть использовано при профилактике рака в виде низкоуглеводной диеты. А само явление можно объяснить гиперактивацией глюкозного насоса, который был также исследован в данной работе.

Цель

Исследовать изменения внутриклеточного сигналинга устойчивых клеток к метформину, которые вызывают резистентность к противоопухолевому препарату, и выбрать возможные условия культивирования для восстановления чувствительности.

Задачи

1. Получить устойчивую сублинию опухолевых клеток MCF-7 путем длительного культивирования на фоне присутствия метформина в питательной среде;
2. Провести сравнительный анализ сигнальных путей линии рака молочной железы MCF-7 и MCF-7/m (новая сублиния), которые могли бы вызывать резистентность к метформину;

3. Подобрать условия для восстановления чувствительности MCF-7/m к метформину.

Этапы исследования

1. Выведение сублинии, устойчивой к метформину;
2. Фрагментарный сравнительный анализ внутриклеточных сигналинга клеток MCF-7/m и клеток MCF-7 (ключевых белков);
3. Восстановление чувствительности сублинии к метформину.

Методы исследования, оборудование и эксперименты

1. Анализ литературы;
2. МТТ- тест. Для оценки метаболической и пролиферативной активности клеток. Он основан на исключительной способности именно живых клеток изменять цвет красителя - от желтого тетразола до фиолетового формазана, видимого человеческим глазом. Чем больше живых клеток, тем интенсивнее меняется цвет красителя. То, что было измерено на спектрофотометре.
3. Белковый электрофорез. Клетка содержит сотни тысяч различных белков, и как мы можем оценить количественное изменение именно тех, которые мы изучаем? Из литературы мы знаем только массу белков. Она измеряется в дальтонах (Да). Разделить белки по весу позволяет полиакриламидный гель. В нем направленное движение белков происходит под воздействием электрического поля. Скорость перемещения зависит от массы белков (Да). Белок преодолевает большее расстояние, когда он легче. А белки с большой массой, наоборот, проходят меньшее расстояние в ПААГ. Процесс разделения в геле визуально не идентифицируется (но он есть).
4. Вестерн-блоттинг. Для визуализации продуктов разделения содержимое геля переносят на нитроцеллюлозную мембрану, на которой количество специфических белков уже определено путем гибридизации с антителами.
5. Трансфекция. Активность гена изучается методом трансфекции. В данном случае мы трансфецировали генную конструкцию, где изучаемый ген был представлен лишь промотором. В промоторе не было никаких изменений.

Однако, смысловая часть (кодирующая белок) была заменена на флуоресцирующий ген светлячка. Благодаря флуоресценции во время синтеза белка клетками мы смогли оценить его количество, поскольку синтез белка РНК-полимеразой инициируется только промотором.

В качестве основного оборудования использовались: спектрофотометр, ламинарный бокс, весы, центрифуга, счетчик клеток, инкубатор, камера для электрофореза и вестерн-блоттинга, пипетки, клеточные среды, термостат. Работа была проведена на клеточной линии рака молочной железы MCF-7.

Результаты

На первом этапе была подобрана рабочая концентрация метформина. Далее, путем длительного поддержания культуры клеток *in vitro* MCF-7 в присутствии метформина была получена резистентная сублиния (Приложение 1). Новая резистентная сублиния рака молочной железы MCF-7 была более устойчива к метформину, а после прекращения воздействия метформина сохраняла резистентные свойства.

Какими преобразованиями клетками была достигнута данная резистентность. Если метформин перестал действовать в качестве супрессора роста, то мы решили посмотреть, изменилась ли активность рибосом. Т.к. без этой важнейшей органеллы, служащей для биосинтеза белка, рост и развитие невозможны. Принцип и схема работы рибосомы следующие – это синтез необходимых для клетки белков за счет трансляции мРНК, используя тРНК в качестве курьерской службы по доставке аминокислот в строгой последовательности (Приложение 2). Рибосома состоит из большой и малой субъединицы. Субъединицы состоят из рибосомных РНК и рибосомных белков. Например белок S6 является компонентом малой субъединицы. За его фосфорилирование (активность в составе рибосомы) отвечает рибосомная S6 протеинкиназа. Методом вестерн-блоттинга мы обнаружили, что в резистентной сублинии снижающего эффекта метформином уровня активной формы S6 – киназы нет (Приложение 3). Т.е. резистентные клетки продолжают успешно делиться и в том числе за счет вывода из-под удара метформином активной

формы S6 – киназы и она продолжает поддерживать работоспособность рибосом. В качестве контроля использовался белок хозяйственного типа – тубулин, входящий в состав микротрубочек (цитоскелет клетки).

Одной из главных характеристик клеток линии рака молочной железы MCF-7 является ее эстроген-рецептор положительный статус (ER положительный). Такие опухоли сохраняют способность к реагированию на гормональную терапию за счет зависимости от активности эстрогенового рецептора, блокировка которого приводит к подавлению клеточного деления. Мы решили выяснить, как MCF-7/m будет отвечать на стимуляцию эстрадиолом по сравнению с MCF-7. Мы столкнулись с гипертрофированным ответом ERE (эстроген чувствительного элемента участка промотора эстрогенового рецептора) на воздействие эстрадиола в сублинии MCF-7/m относительно реакции на эстрадиол MCF-7 (в 2,5 раза). В то время как применение метформина не приводило к подавлению его активности (ERE/ER) (Приложение 4).

Т. к. линией MCF-7/m была приобретена способность избегать подавления синтеза эстрогенового рецептора метформинном, а развитие резистентности клеток рака молочной железы к эстрогенам часто связано с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП), то мы решили оценить возможную роль белков, связанных с ЭМП, в развитии резистентности к метформину. Был проведен анализ Snail1 — ключевого регулятора ЭМП в устойчивых к метформину и чувствительных клетках. В клетках MCF-7 метформин приводил к снижению уровня Snail1, т.е. колонии клеток как бы замирали, в то время как наличие метформина в среде резистентной линии не сопровождалось снижением Snail1, а даже напротив, наблюдалось его увеличение. Что свидетельствовало об увеличении подвижности клеток за счет ингибирования SNAI1om1 синтеза кадгериновых белков - основной класс белков клеточной адгезии (Приложение 5).

Как говорилось выше, метформин в основном используется для лечения диабета – заболевания, связанного с нарушением метаболизма глюкозы. Было решено посмотреть на уровень активированной протеинкиназы – AMPK, которая

отвечает за энергетический обмен в клетке. Как видно из результатов эксперимента (Приложение 6), в сублинии, устойчивой к метформину, уровень активированной протеинкиназы был значительно выше, чем в резистентной линии. По-видимому, устойчивость к метформину MCF-7/m обеспечивается конститутивной активностью АМРК (протеинкиназа, которая контролирует энергетический баланс клетки).

Было решено установить, будет ли воспроизводиться устойчивость к метформину у MCF-7/m в питательной среде с пониженным содержанием глюкозы (Приложение 7). Оказалось, что при культивировании клеток в среде с пониженной глюкозой (концентрации глюкозы в питательной среде до 1 г/), демонстрируется возможность восстановления чувствительности MCF-7/m к метформину.

Было решено поставить сравнительный эксперимент по оценке скорости клеточного деления двух вышеупомянутых линий. При посеве одинакового количества клеток на чашку Петри, по завершению эксперимента оказалось, что клеток MCF-7/m на 10% больше (Приложение 8).

Исходя из этих результатов было предположено, что скорость роста клеток обусловлена активностью глюкозного метаболизма. Проведение сравнительного анализа активности транспортера глюкозы показало значительное количественное повышение и активность в резистентной сублинии. Что может дать объяснение более активному клеточному делению (Приложение 9). Предположительно это связано с повышенной активностью АМРК что обсуждалось выше. Также мы отмечаем повышение уровня инсулинового рецептора ($\text{InsR-}\beta$), который является альтернативным активатором транспортера глюкозы (GLUT4).

Для того, чтобы установить с чем связано восстановление чувствительности к метформину при культивировании при низкой концентрации глюкозе у резистентной сублинии, мы посмотрели уровень активации глюкозного транспортера по сравнению с MCF-7 (Приложение 10). Оказалось,

что их уровень сравнялся, что может объяснить возврат к чувствительности к метформину.

Выводы и обсуждение

1. Метформин успешно подавляет развитие клеток рака молочной железы, а при длительном применении метформина они вырабатывают резистентность и перестают реагировать на его ингибирующее действие;
2. Обнаружены следующие различия между родительской и резистентной к метформину линией рака молочной железы:
 - 2.1. У MCF-7/m выявлена конститутивная активность протеинкиназы AMPK, ответственной за контроль энергетического баланса;
 - 2.2. MCF-7/m утрачивает способность к подавлению активности SNAIL1 метформином, что свидетельствует о развитии фенотипа клеток склонного к эпителиально-мезенхимальному переходу;
 - 2.3. MCF-7/m после обработки метформином не демонстрирует снижения уровня S6-киназы, отвечающей за поддержание интенсивности трансляции белка, пролиферации клеток, что напротив наблюдается в MCF-7;
 - 2.4. Транскрипционная активность ERE (участок промотора гена эстрогенового рецептора) в MCF-7/m не подавляется метформином, в то время как ответ на стимуляцию эстрадиолом значительно превосходит ответ на стимуляцию эстрадиолом в MCF-7;
 - 2.5. GLUT4 и InsR- β гиперактивированы в MCF-7/m по сравнению с в MCF-7;
3. Частичное восстановление чувствительности MCF-7/m возможно в обедненной глюкозой питательной среде. Предположительно, конститутивная активность AMPK в MCF-7 влечет за собой повышение активности транспортера глюкозы GLUT4 и, как следствие, изменение активности глюкозного метаболизма. Зная механизм воздействия метформина на клетки рака молочной железы, мы предполагаем следующее объяснение механизма восстановления

чувствительности: в среде с низким содержанием глюкозы клетки резистентной сублинии лишены глюконеогенеза, а компенсировать недостаток глюкозы посредством более активного транспорта не представляется возможным в силу низкого содержания глюкозы в среде, клетки попадают в равную с не резистентными клетками ситуацию, ведь самое большое качественное различие достигалось гиперактивацией АМРК и, следовательно, переносчика глюкозы, оказалось бессмысленным там, где этой самой глюкозы почти нет.

Перспективы дальнейших исследований

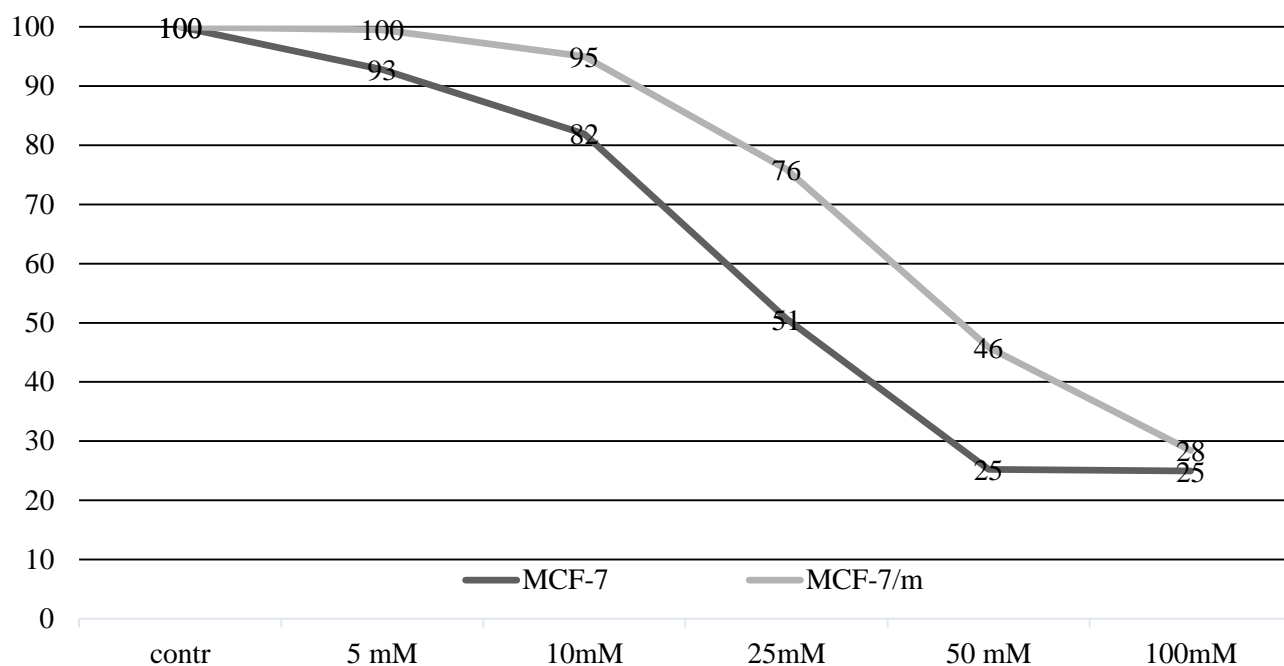
1. Исследование функции рецептора инсулина в MCF7/m в присутствии метформина;
2. Проверка работы препаратов класса гормональной терапии в сочетании с инсулином;
3. Выявление молекулярных механизмов возвращения чувствительности к метформину у резистентных сублиний с повышенным уровнем сахара в питательной среде;
4. Важнейшей и, к сожалению, не осуществленной пока идеей, является проверка уровня АМРК в низкой глюкозе под воздействием метформина;
5. Проверка уровня активных форм кислорода (АФК) обеих линий для полной оценки воздействия метформина на метаболизм, т.к. они характеризуют работу комплекса I дыхательной цепи, который ингибируется метформином. Это может стать ключом для объяснения возникновения резистентности. А
5. Проверка уровня белка Р13К, поскольку он играет роль связующего звена между инсулиновым рецептором и вышеупомянутого переносчика глюкозы. Данный эксперимент дополнит картину изменений, как последствий резистентности.
6. Изучение влияния тамоксифена (супрессор эстрогенового рецептора) на резистентную сублинию MCF-7/m при наличии гиперактивации эстроген чувствительного элемента, которая была выявлена в ходе проведения работы.

Благодарность

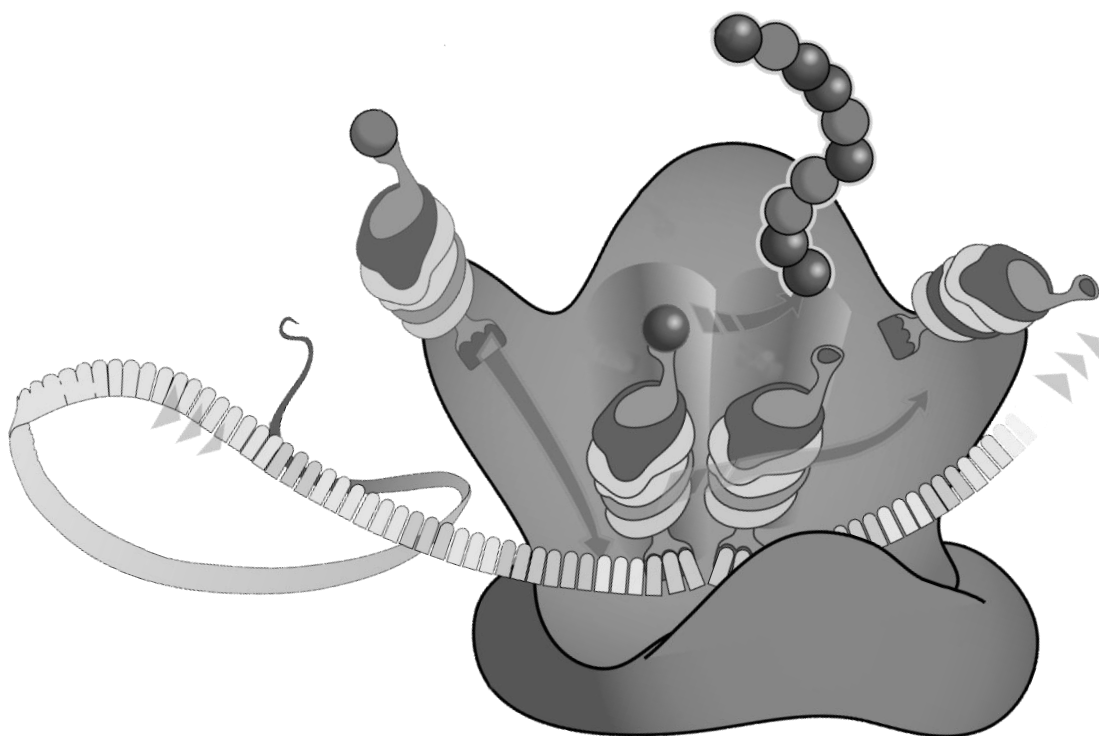
Эта работа была проведена на базе научно-исследовательского института канцерогенеза онкологического научного центра им. Н.Н. Блохина и была бы невозможна без поддержки профессора, доктора биологических наук, директора научно-исследовательского института канцерогенеза Михаила Александровича Красильникова.

Литература

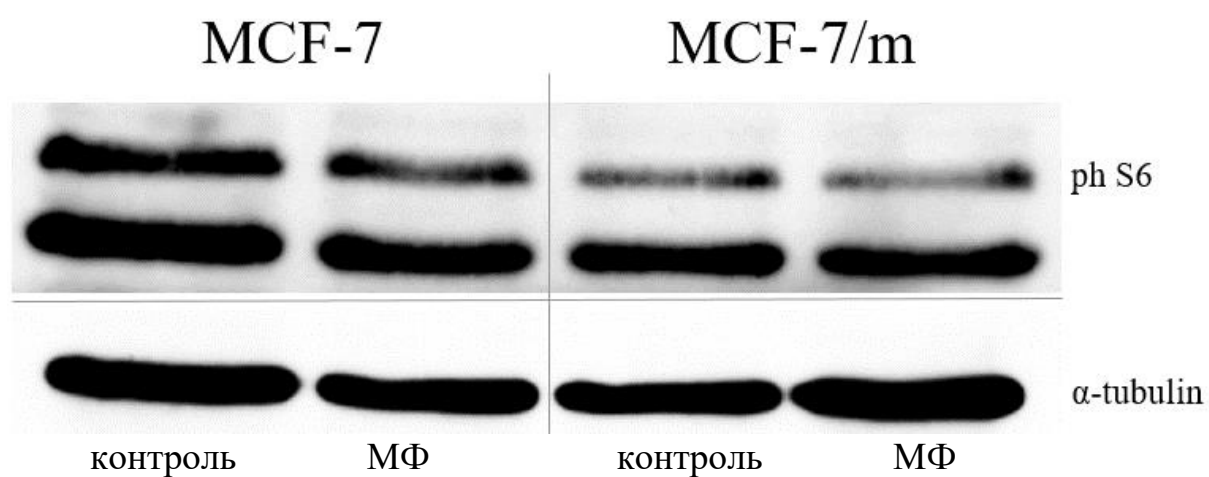
1. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/ru/health/>
2. <https://www.who.int/ru>
3. Анализ механизма действия галеги лекарственной (*Galega officinalis* L.), (Мартынчик И.А., Трумпе Т.Е., Ферубко Е.В), Фармацевтическая химия, 2019
4. Metformin associated with lower cancer mortality in type 2 diabetes (Landman, Nanne Kleefstra, Kornelis, Van Hateren, Groenier), Epidemiology health services research, 2009
5. Экзосомы и развитие резистентности опухолевых клеток к метформину: пилотное исследование (С. Е. Семина, Е.А. Руденская, А.Г. Миттенберг, С.В. Шабельников, М.А. Красильников), Успехи молекулярной онкологии, 2017.
6. The relationships between snail1 and estrogen receptor signaling in breast cancer cells (Alexander M Scherbakov, Olga E Andreeva, Valentina A Shatskaya, Mikhail A Krasil'nikov), Cell Biochem, 2012.



При длительном применении метформина в качестве супрессора роста опухолевых клеток его тормозящий эффект снижается, опухолевые клетки приобретают устойчивость

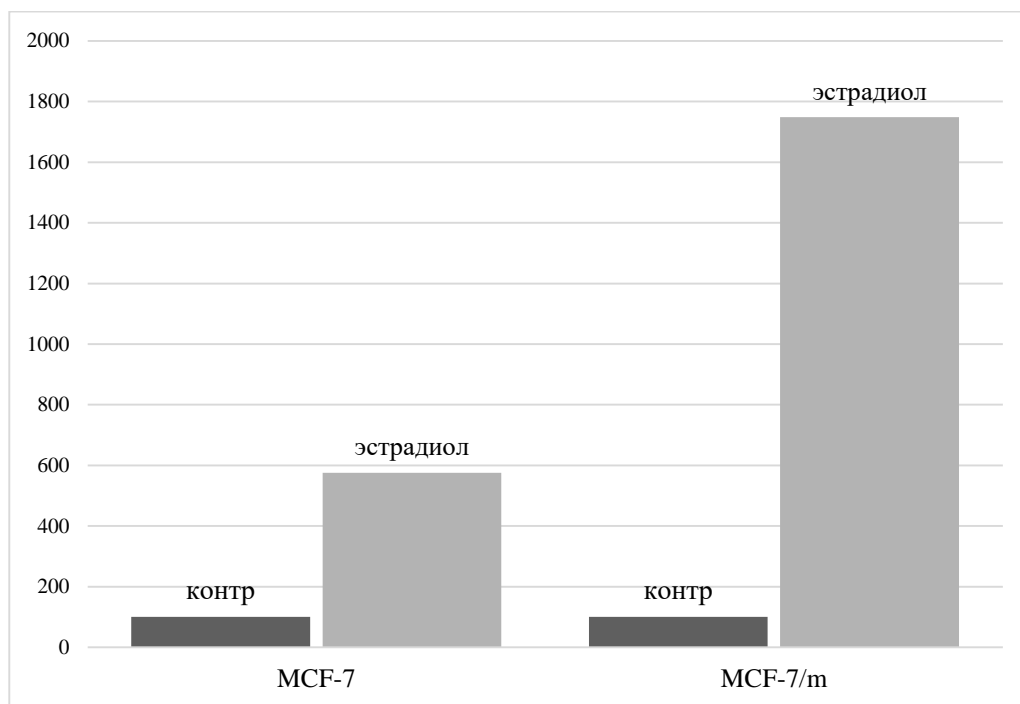


Рибосома. Принцип работы, которая производит сборку белка из аминокислот

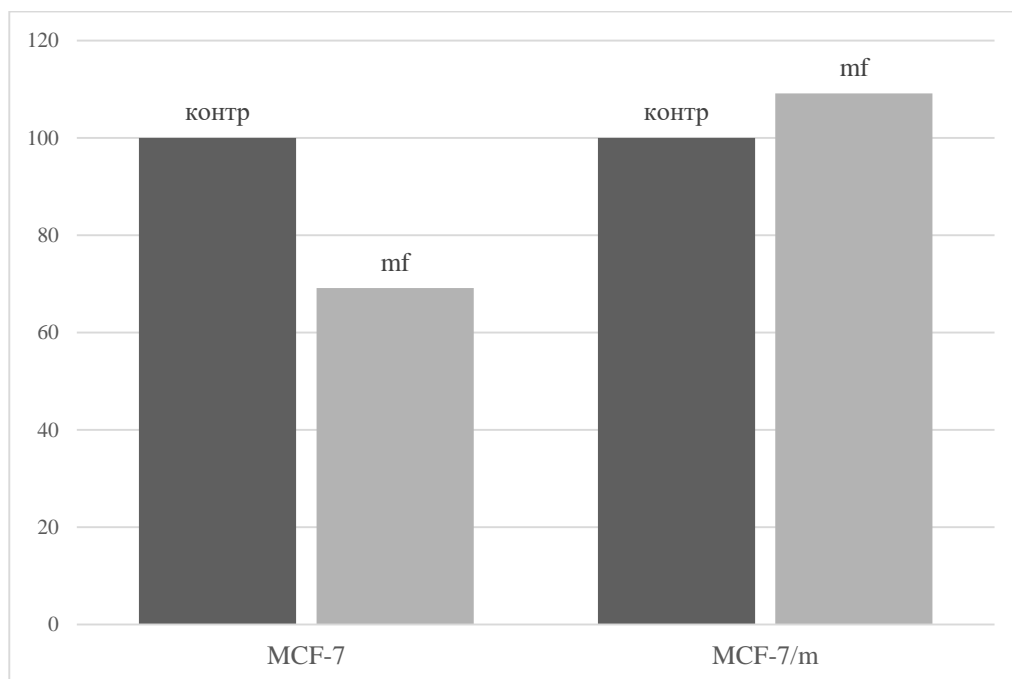


В резистентных клетках уровень активной S6 не снижается, а в родительской линии метформин вызывает снижение S6, что объясняет торможение роста

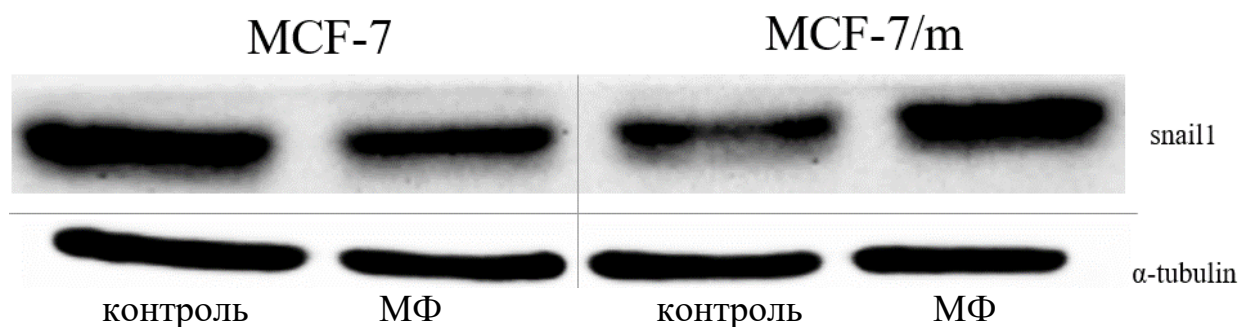
условные единицы (активность
эстрогенового рецептора)



условные единицы (активность
эстрогенового рецептора)



Ответ ERE на воздействие эстрадиола и метформина. Эстрадиол сильнее вызывает ответ эстрогенового рецептора в резистентной сублинии, однако его подавление не происходит при воздействии метформина



Влияние метформина на SNAIL1 в MCF-7 и MCF-7/m. SNAIL1 снижается в MCF-7, а в MCF-7/m даже увеличивается. Что может свидетельствовать о более злокачественных свойствах сублинии.

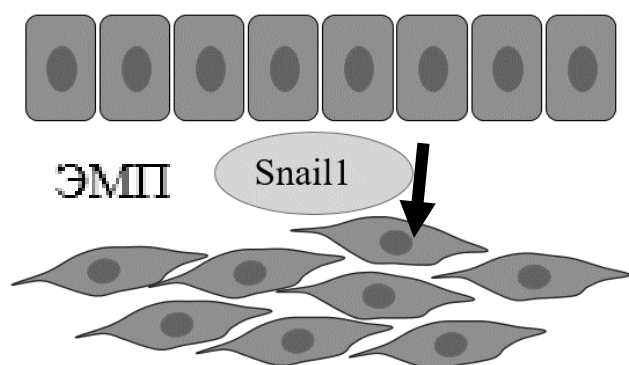
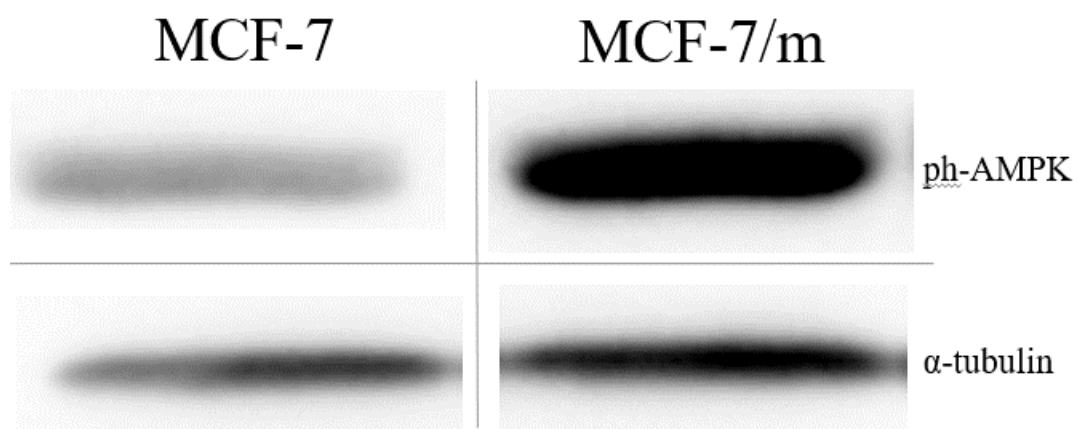
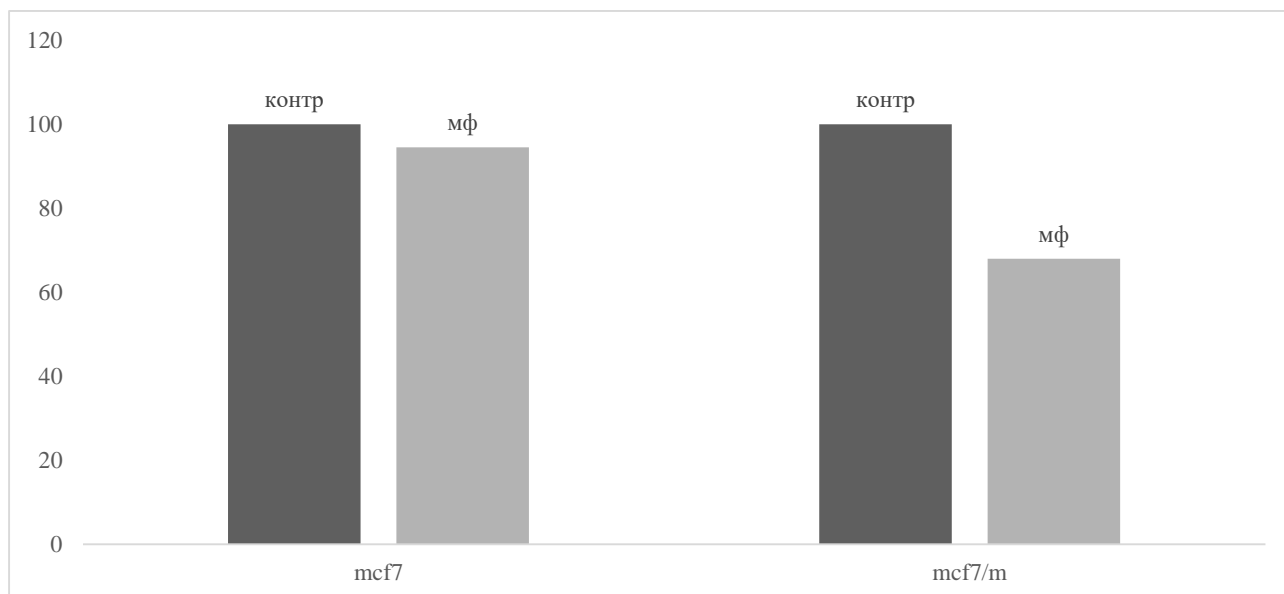


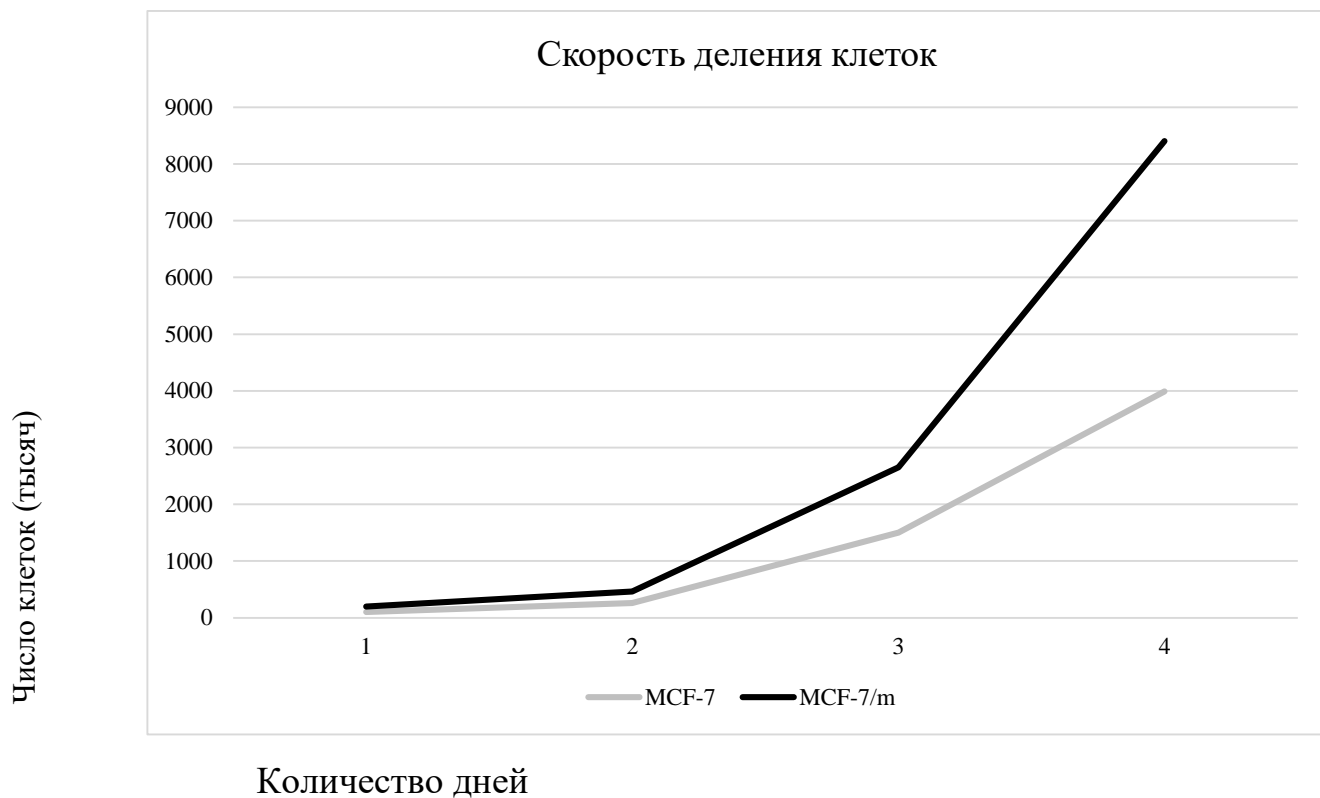
Схема влияния SNAIL1 на наличие межклеточных контактов – клетки перестают держаться друг за друга



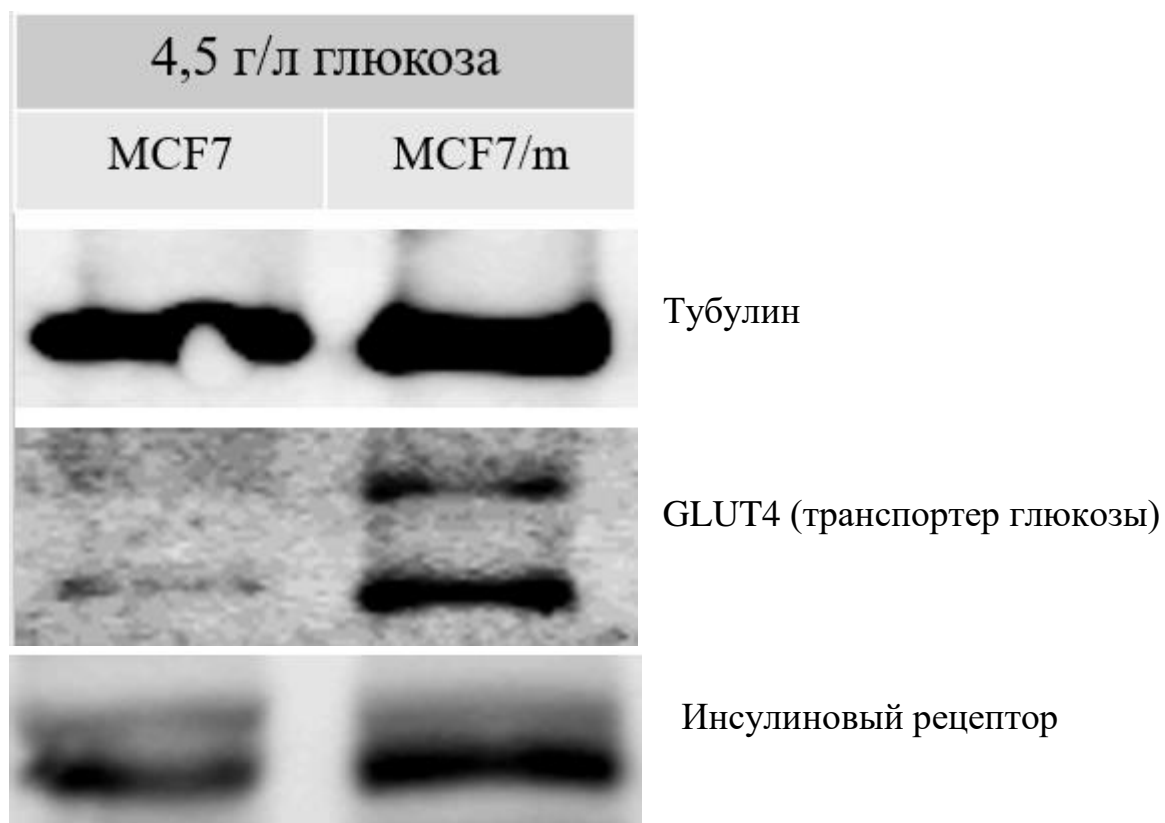
Постоянная гиперактивация активной формы АМПК в резистентной сублинии отличает ее от родительской линии



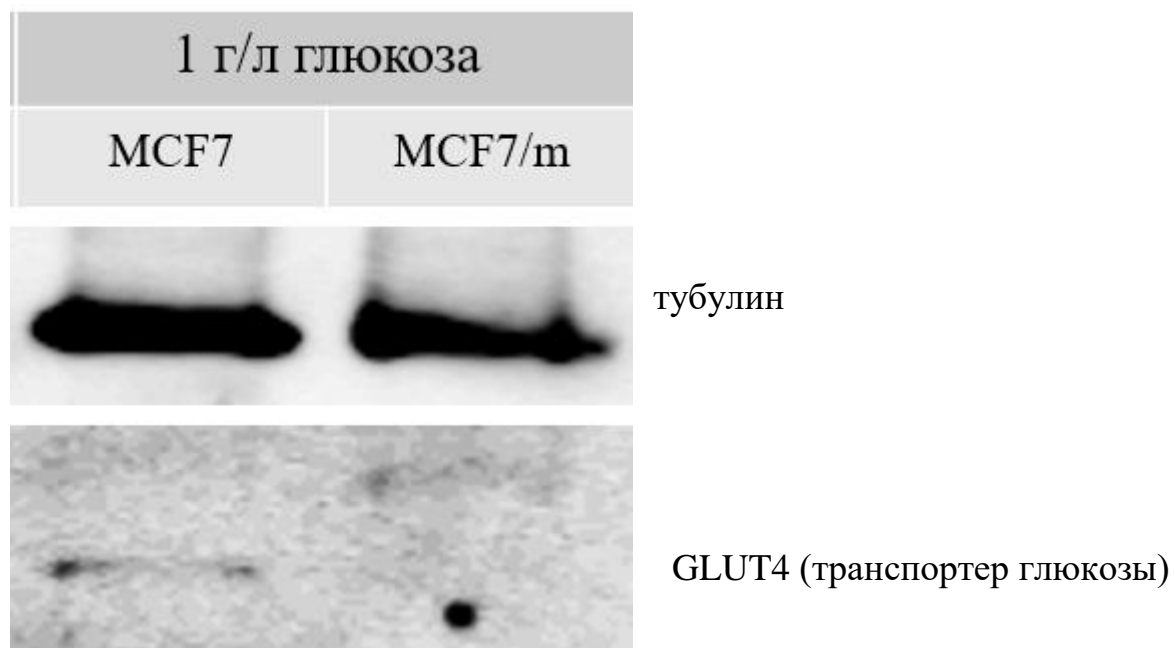
Влияние метформина на МСF-7/т в среде с пониженным содержанием глюкозы. Как видно из графика, на метформин активной отвечает подавлением роста резистентная сублиния



Клетки резистентной сублинии активнее делятся



Транспортера глюкозы больше в резистентной сублинии, больше и инсулинового рецептора



Транспортера глюкозы в резистентной сублинии становится меньше. Его количество равно количеству транспортера в родительской линии. Этим можно объяснить возвращение чувствительности к метформину резистентной линии в среде с низкой глюкозой