

УДК 577.113.7+616-006.6

**РОЛЬ ГЕНА MDR1 ПРИ ФОРМИРОВАНИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ  
ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ  
ЖЕЛЕЗЫ**

**Д.А.Кадырова**Институт биофизики и  
биохимии при Национальном Университете РУз**Р.Мирхамидова**Ташкентский государственный  
педагогический университет им. Низами**Г.А.Шахмурова**Ташкентский государственный  
педагогический университет им. Низами**Р.А.Алимова**Ташкентский государственный  
аграрный университет

Рак молочной железы – одно из самых распространенных онкологических заболеваний у женщин. Статистические данные последних лет свидетельствуют о неуклонном, интенсивном росте заболеваемости и смертности от РМЖ, несмотря на значительный прогресс в лечении заболевания, достигнутый в результате совершенствования хирургических и лекарственных методов. Лечение данной категории больных остается одной из наиболее сложных задач современной онкологии. На сегодняшний день множественная лекарственная устойчивость (МЛУ) опухолевых клеток к химиотерапевтическим препаратам является одной из наиболее важных причин неэффективности терапии РМЖ. Развитие МЛУ, связывают и с плохим ответом на химиотерапию и с плохим

прогнозом. Резистентность опухолевых клеток к химиотерапии может быть следствием разнообразных процессов: от снижения внутриклеточной концентрации противоопухолевого препарата, обусловленного активным выведением вещества в межклеточную среду АТФ-зависимым трансмембранным белком Р-гликопротеином, являющимся продуктом гена ABCB1 или MDR1 [1,2], до нарушения механизмов апоптоза в самих опухолевых клетках (мутация или снижение экспрессии гена p53, нарушающие его проапоптотическую функцию) [3,4].

**Цель исследования:** Определение роли транспортного белка Р-гликопротеина, продукта экспрессии гена MDR1 в формировании множественной лекарственной устойчивости при лечении злокачественных новообразований молочной железы.

**Методы исследования:**

**Выделение ядерной ДНК из лейкоцитов крови.**

Все процедуры проводили в стерильных условиях. К 0,5мл периферической крови добавляли 2мл стерильной H<sub>2</sub>O, пробы инкубировали при комнатной температуре 2 часа. Клетки лейкоцитов осаждали при 3000 об/мин, 4<sup>0</sup>С, в течение 15 мин. Надосадочную жидкость аккуратно удаляли, к осадку желто-красных лейкоцитов добавляли 100 мкл стерильной дистиллированной воды и хранили при –20° С. К суспензии лейкоцитов (1x10<sup>6</sup>) добавляли 1мл лизирующего буфера (100мМ Tris-HCl, pH 7,6; 25мМ ЭДТА pH 8,0; 0,15М NaCl; 1% SDS, 2мМ β-меркаптоэтанол), лизис проводили надо льдом 3 мин. Затем пробы центрифугировали при 3000 об/мин., 4<sup>0</sup>С, 15мин. Супернатант переносили в новые пробирки, добавляли равный объем смеси фенол-хлороформ (1:1), инкубация 15-20 мин при покачивании. Пробы центрифугировали 10 мин при 5000 об/мин, 4<sup>0</sup>С. К супернатанту добавляли хлороформ (1:2), инкубация при покачивании в течение 15-20 мин при 160 об/мин, пробы центрифугированием при 5000 об./мин, 4<sup>0</sup>С, 10 мин. Супернатант осаждали в 3 кратном объеме 96%

этанол в присутствии 3М раствора ацетата натрия рН 5,2, пробы оставляли на ночь при  $-20^{\circ}\text{C}$ . Препараты ДНК промывали раствором 70%-го этанола. Полученные препараты ДНК можно хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$ , в течение месяца. Препараты ДНК/РНК и интактной ДНК анализировали, в 2%-м агарозном геле, содержащем 0,5мкг/мл этидиум бромид. Электрофорез вели 1ч при 100В, гель фотографировали в проходящих лучах УФ.

### Обратная транскрипция (ОТ-ПЦР)

Тотальная РНК из биопсийного материала была получена с использованием кит-набора для выделения РНК из тканей «EZ1 RNA Tissue Mini Kit» (на 48 образцов). Производитель «ИнтерлабСервис», Москва, Россия. Для получения кДНК на матрице РНК использовали кит-набор «РЕВЕРТА-L», Россия. Реакцию обратной транскрипции проводили по протоколу производителя.

В работе использовали праймеры для гена MDR1, кодирующий белок лекарственной устойчивости Р-гликопротеин. В качестве контроля использовали праймеры референтного гена GAPDH. ПЦР проводили на амплификаторе «BioRad» США. До проведения ПЦР, ПЦР продукты хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Последовательность праймеров, использованных в исследованиях

Гены	Последовательность праймеров	Размер т п.н.
MDR1 Ген лекарственного транспортера Р- гликопротеина	For: 5'-GATGGAATTGATAATGTGGAC -3' Rev: 5'-TGCTGTTCTGCCGCTGGA -3'	321
GAPDH Ген референт (контроль).	For: 5' -CCATCACCATCTTCCAGGAG -3' Rev: 5' -CCTGCTTCACCACCTTCTTG -3'	576

**Электрофорез ПЦР** продуктов проводили в 2% агарозе в ТАЕ буфере, 100В, 1ч. Затем агарозный гель окрашивали в течение 15 мин в растворе этидиум бромида (0,5мкг/мл). Результаты электрофоретического анализа в геле визуально наблюдали через проходящие лучи УФ на трансиллюминаторе «Bio-Rad». Агарозный гель после электрофореза сканировали на денситометре, который анализирует интенсивность свечения ПЦР-продуктов. Полученное изображение полос обрабатывали с помощью компьютерного денситометра (Gel-Pro-Analizer 4.0).

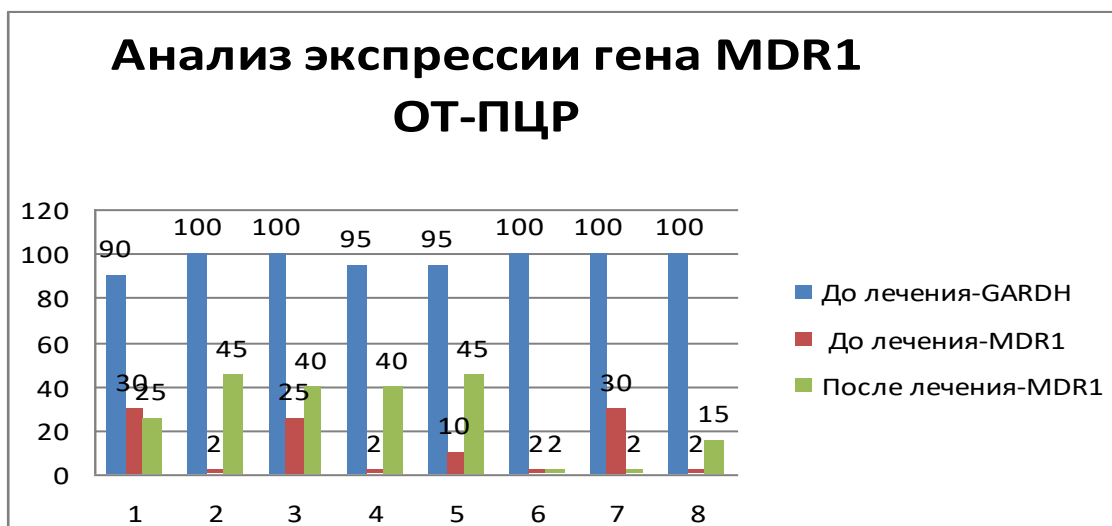
### **Результаты и их обсуждение**

Главным препятствием в достижении эффективности лечения рака молочной железы являются врожденная или приобретенная (индуцированная) лекарственная резистентность опухолей. Резистентность может проявляться уже на первых курсах химиотерапии, либо возникать в ходе первоначально успешного лечения. Иными словами, рак молочной железы представляет вариант опухоли, в которой реализуются два типа лекарственной резистентности - врожденной и приобретенной (индуцированной). Этим, объясняется наибольшая изученность рака молочной железы. Данная «модель» опухоли, обладающая разнообразием клинических проявлений, позволит получить ответ о клинической значимости Р-гликопротеина. В настоящее время, химиотерапевтическое лечение больных с операбельной формой РМЖ (около 85% всех больных РМЖ) включает помимо операции и системную химиотерапию в двух режимах: предоперационную или неоадьювантную и послеоперационную или адьювантную. Они имеют разные цели и могут отличаться по схемам. Адьювантная химиотерапия (АХТ) - вспомогательное, дополняющее хирургические и лучевые методы, лекарственное лечение. **Неоадьювантная химиотерапия (НАХТ)** является необходимым компонентом комбинированного лечения женщин с местно-распространенным раком молочной железы. При больших размерах опухоли применение НАХТ (в данном

случае называется индукционной терапией) позволяет уменьшить объем первичной опухоли, что делает возможным выполнение радикального оперативного вмешательства (5).

В качестве **объекта для исследований** были использованы образцы биопсийного материала и кровь, вновь поступивших пациенток с диагнозом РМЖ, до лечения и после 2 курсов НАХТ. Возраст больных находился в пределах 30 - 76 лет. Диагноз РМЖ у всех больных был морфологически верифицирован. У большинства пациенток была сохранена менструальная функция. Всем больным была назначена НАХТ по стандартной схеме FАС, которая содержала циклофосфан, 5-фторурацил, доксорубицин. Дополнительно к этой схеме решили добавить препарат таксанового ряда доцетаксел. Сравнивали уровень экспрессии гена MDR1 в опухоли молочной железы до лечения и после операции. Функциональную активность Р-гликопротеина, продукта экспрессии гена MDR1 изучали методом ОТ ПЦР.

У 5 пациенток наблюдалась высокая экспрессия гена MDR1, т.е. эти больные обладают первичной или предсуществующей лекарственной устойчивостью (рис.1).



Показано, что для опухоли молочной железы первичная множественная лекарственная устойчивость, определяемая начальным уровнем экспрессии гена

MDR1 влияет на проводимую НАХТ. У пациентов, обладающих первичной лекарственной устойчивостью к химиотерапии, отмечается увеличение уровня экспрессии гена MDR1 после НАХТ по сравнению с уровнем до лечения. Это показывает связь ответа на НАХТ и изменением экспрессии гена MDR1.

Развитие МЛУ, связывают с плохим ответом на химиотерапию и с плохим прогнозом. Естественная или предрасполагающая МЛУ свойственна клеткам опухоли из-за высокой экспрессии генов ABC-транспортеров, существующей в нормальных тканях, из которых происходит опухоль. В этом случае химиотерапия малоэффективна. Повышенная экспрессия наблюдается в опухолях, происходящих из тканей в норме экспрессирующих высокий уровень генов МЛУ [6]. При приобретенной или адаптивной МЛУ клетки опухоли, чувствительные к химиотерапии, находятся в состоянии готовности к быстрой активации экспрессии генов ABC-транспортеров в ответ на химиотерапию. После проведения химиотерапии погибают чувствительные клетки, а устойчивые к лечению клетки остаются.

Повышение опухолевой экспрессии гена MDR1 в процессе НАХТ является неблагоприятным прогностическим признаком агрессивности течения заболевания.

#### **Выводы:**

1. Проведен анализ экспрессии гена MDR1 при лечении рака молочной железы.
2. Показано, что повышение опухолевой экспрессии гена MDR1 в процессе НАХТ является неблагоприятным прогностическим признаком агрессивности течения заболевания, обуславливает отсутствие ответа на химиотерапию, а снижение экспрессии - хороший ответ на НАХТ.

### РЕЗЮМЕ

Рак молочной железы (РМЖ) – это наиболее часто встречающийся вид рака со смертельным исходом среди женщин в мире. При выполнении данной работы авторами проведено изучение функциональной активности Р-гликопротеина у больных при раке молочной железы до лечения и после неoadъювантной химиотерапии (НАХТ). На основании полученных результатов было показано, что 5 больных обладают первичной лекарственной устойчивостью. Было отмечено увеличение уровня экспрессии гена MDR1 после НАХТ у больных с первичной лекарственной устойчивостью, по сравнению с уровнем до лечения. Авторы пришли к выводу, что при высокой функциональной активности Р-гликопротеина больные резистентны к лечению, т.е. плохо отвечают на действие лекарственных препаратов.

### SUMMARY

A breast cancer (BC) is a most often meeting type of cancer with death among women in the world. At performing this work authors have carried out studying of functional activity of the P-glycoprotein at patients at a breast cancer before treatment and after neoadjuvant chemotherapy (NACHT). On the basis of the received results it has been shown that 5 patients possess primary medicinal stability. The increase expression level of MDR1 gene was marked after NACHT at patients with primary medicinal stability, in comparison with level before treatment. Authors have come to a conclusion that at high functional activity of the P-glycoprotein patients resistant to treatment, i.e. badly answer effect of medicines

### XУЛОСА

Ko'krak saratoni (KS) dunyodagi ayollar orasida eng keng tarqalgan va halokatli saratondir. Ushbu ishni bajarishda mualliflar ko'krak bezi saratoni bilan og'rigan bemorlarda davolashdan oldin va neoadjuvan kimyoterapiyadan (NAKT) keyin P-glikoproteinining funktsional faolligini o'rgandilar. Olingan natijalarga ko'ra, 5 bemorda birlamchi dori qarshiligi borligi ko'rsatildi. NAKT dan so'ng MDR1 genining

ekspresyon darajasining o'sishi davolashdan oldingi darajaga nisbatan birlamchi dori qarshiligi bo'lgan bemorlarda qayd etildi. Mualliflar P-glikoproteinining yuqori funktsional faolligi bilan bemorlarning davolanishga chidamliligi, ya'ni. dorilarga yomon javob beradi.

### ИСПОЛЬЗОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. He L, Hao C, Lin B, Wang Y., P-glycoprotein expression in primary breast cancer. //Chinese Medical Sciences Journal. - 1995, v. 10,-P. 12-5.
2. Allen J.D., Schinkel A.H. Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein //Mol. Cancer Ther. - 2002. - V. 1, N 6. - P. 427-434.
3. Bourdon J.-C., Khoury M.P., Diot A., Baker L., Fernandes K. p53 mutant breast cancer patients expressing p53 have as good a prognosis as wild-type p53 breast cancer patients // Breast Cancer Res. - 2011. - V. 13. - P. R7.
4. Linn SC, Honkoop AH, Hoekman K, van d, V, Pinedo HM G. p53 and P-glycoprotein are often co-expressed and are associated with poor prognosis in breast cancer// British Journal of Cancer,-1996, v. 74.-P. 63-8.
5. Загрекова Е.И., Мещеряков А.А. Лекарственное лечение рака молочной железы// Русский медицинский журнал. - 2002. - V. 10, N 14. - P. 605-608.
6. Allen J.D., Schinkel A.H. Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein //Mol Cancer Ther. - 2002. - V. 1, N 6. - P. 427-434.