

## ЭКСПРЕССИЯ ТРАНСПОРТНЫХ И ЦИТОЗОЛЬНЫХ БЕЛКОВ ПРИ ФОРМИРОВАНИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ В КЛЕТКАХ МИЕЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА *IN VITRO*

Тамашевский А.В.<sup>1</sup>, Гармаза Ю.М.<sup>1</sup>, Пасюков В.В.<sup>2</sup>, Слобожанина Е.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси

ул. Академическая, 27, г. Минск, 220072, Республика Беларусь; e-mail: Tayzoe@mail.ru

<sup>2</sup> Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий МЗ РБ  
Долгиновский тракт, 160, г. Минск, 220053, Республика Беларусь

Поступила в редакцию: 27.07.20

**Аннотация.** Проведена оценка содержания транспортных белков, ассоциированных с феноменом множественной лекарственной устойчивости (Р-гликопротеина и белка множественной лекарственной резистентности MRP1) и уровня экспрессии цистеин-содержащих низкомолекулярных белков металлотионеинов в лимфоцитах условно здоровых доноров, В-лимфобластоидной клеточной линии IM9 и ее сублинии, резистентной к флударабелу. Обнаружено снижение соотношения экспрессии Р-гликопротеина к MRP1 в В-лимфобластоидной клеточной сублинии IM9, резистентной к флударабелу, относительно ее родительской линии IM9. Установлено, что одним из механизмов, вносящих вклад в развитие множественной лекарственной устойчивости в клеточной линии IM9 наряду с возрастанием роли белка MRP1 также выступает активация цистеин-обогащенных цитозольных белков металлотионеинов I/II классов.

**Ключевые слова:** клеточная линия IM9, белки множественной лекарственной устойчивости Р-гликопротеин и MRP1, металлотионеины, противоопухолевые препараты.

Известно, что основным методом лечения онкогематологических заболеваний является интенсивная химиотерапия. Однако, несмотря на высокий процент ремиссий, количество пациентов с долгосрочным прогнозом оказывается не таким значительным. Кроме того, что химиотерапия является причиной тяжёлых побочных эффектов, особенно у пожилых людей, часто её неэффективность может обуславливаться феноменом множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) – невосприимчивости клеток опухоли одновременно к целому ряду лекарственных средств с широким спектром механизмов воздействия на внутриклеточные мишени.

Феномен МЛУ связывают с функционированием АТФ-зависимых транспортеров суперсемейства ABC, которые снижают внутриклеточную концентрацию лекарственных соединений путем их выброса из клеток с использованием энергии гидролиза АТФ [1]. К настоящему времени у человека выявлено 49 представителей ABC суперсемейства с различными физиологическими функциями и лишь три из них (Р-гликопротеин (Р-gp), белок множественной лекарственной резистентности 1 (MRP1) и белок, ответственный за резистентность клеток рака молочной железы (BCRP)) непосредственно связаны с фенотипом МЛУ [2].

Конститутивная экспрессия транспортеров МЛУ отмечена во многих органах и тканях организма человека [3], в том числе и в лимфоцитах периферической крови [4] (за исключением BCRP [5]), однако, их физиологическая функция до сих пор точно не определена [6]. Тем не менее, значимость роли ABC транспортеров в поддержании клеточного гомеостаза подчеркивает тот факт, что почти треть дефектных ABC генов человека связана с заболеваниями [7]. В последнее время появились экспериментальные данные о тесной взаимосвязи между прогрессированием опухолей и клеточным редокс-балансом [8, 9]. Ранее нами было также показано, что изменение окислительно-восстановительного баланса играет ключевую роль в ответной реакции клетки на воздействие противоопухолевых агентов и является важным регулятором экспрессии белков-транспортеров, ассоциированных с МЛУ [10, 11]. Одним из ключевых цитозольных белков, регулирующих содержание эссенциальных и неэссенциальных микроэлементов и способных инактивировать активные формы кислорода (АФК) и азота, являются низкомолекулярные клеточные тиолы металлотионеины (MTs). Установлено, что их повышенное содержание в клетках связано с развитием опухолей, т.к. они способны защищать их от процессов программируемой гибели [12].

Таким образом, целью данной работы явилось сравнительное исследование содержания металлотионеинов и уровня экспрессии белков-транспортеров, ассоциированных с МЛУ (MRP1 и Р-gp) в лимфоцитах доноров, а также в клеточной линии IM9 и ее сублинии, резистентной к флударабелу.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использована периферическая кровь практически здоровых доноров (n=6), полученная из ГУ "Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий" МЗ РБ. Все образцы крови содержались в консерванте "гепарин".

Периферические мононуклеарные клетки крови человека (ПМНК) изолировали в градиенте плотности гистобака-1077 путем центрифугирования крови (300×g, 30 мин) и последовательных отмывок в 10 мМ фосфатном буфере (PBS, pH 7,4). После выделения ПМНК помещали в коммерческую питательную среду RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ L-глутамин. Клеточные линии и ПМНК

инкубировали в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием  $\text{CO}_2$  при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 48 ч с флударабелом – белорусский аналог флударабина (Flu; 17,5 мкМ), лейкладином – белорусский аналог кладрибина (Leu; 7 мкМ) и винкристином (Vinc; 47,2 нМ).

В-лимфобластоидную клеточную линию IM9 и ее резистентную сублинию IM9-Flu, устойчивую к флударабелу, культивировали в коммерческой среде RPMI-1640 с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 2 мМ L-глутамин при температуре  $37^\circ\text{C}$  в увлажненной атмосфере с 5%-ным содержанием  $\text{CO}_2$  в течение 1–2 недель. В дальнейших экспериментах были использованы клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста.

Степень экспрессии P-gp на поверхности плазматической мембраны ПМНК и клеточных линий оценивали с помощью моноклональных антител (MkAT, клон UIC2, Abcam), неспецифическое связывание контролировали с помощью IgG2a. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II (Becton Dickinson) в FITC-Н канале и по отношению интенсивности флуоресценции образцов, связавшихся с UIC2 ( $I_{\text{фл. о}}$ ), к интенсивности флуоресценции образцов, связавшихся с изотипическим контролем IgG2a ( $I_{\text{фл. к}}$ ), судили о количестве P-gp на поверхности исследуемых клеток.

Количество MRP1 в ПМНК и клеточных линиях определяли с помощью MkAT (клон QCRL, R&D) против данного белка. В качестве изотипического контроля использовали мышинные MkAT IgG1. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II в FITC-Н канале и по отношению интенсивности флуоресценции образцов, связавшихся с QCRL ( $I_{\text{фл. о}}$ ), к интенсивности флуоресценции образцов, связавшихся с изотипическим контролем IgG1 ( $I_{\text{фл. к}}$ ), судили о количестве MRP1 в исследуемых клетках.

Для оценки содержания металлотионеинов I и II типов ПМНК и клеточные линии фиксировали 2%-м раствором параформальдегида (60 мин,  $t=4\pm 2^\circ\text{C}$ ), отмывали путем центрифугирования (300g, 15 мин) и проводили пермеабиллизацию мембран 0,5%-м раствором детергента твин 20 в PBS буфере (10 мин,  $t=4\pm 2^\circ\text{C}$ ). Далее проводили последовательную инкубацию клеток с первичными мышинными MkAT против металлотионеинов UC1MT (12 ч,  $t=4\pm 2^\circ\text{C}$ ) и с вторичными поликлональными козлиными антителами, конъюгированными с FITC, против мышинового IgG1 (2 ч,  $t=4\pm 2^\circ\text{C}$ ). В качестве изотипического контроля использовали мышинные MkAT, конъюгированные с FITC, против IgG1, которые параллельно инкубировали с исследуемыми клетками при вышеописанных условиях. Измерения проводили на проточном цитофлуориметре FACSCanto II в FITC-Н канале и по отношению интенсивности флуоресценции образцов с комплексом “UC1MT–IgG1–FITC” ( $I_{\text{фл. о}}$ ) к интенсивности флуоресценции образцов, связавшихся с изотипическим контролем IgG1–FITC ( $I_{\text{фл. к}}$ ), судили о содержании MTs в исследуемых клетках.

О жизнеспособности ПМНК и клеточных линий после воздействия лекарственных средств, в концентрациях близких к терапевтическим, судили по степени метаболической (дегидрогеназной) активности их митохондрий с помощью 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ) теста. Результирующие данные для этого метода представлены в виде отношения среднего значения оптической плотности образца с исследуемым химиопрепаратом ( $D$ ) к среднему значению оптической плотности образца без него ( $D_k$ ), выраженного в процентах. Измерение оптической плотности образцов проводили на планшетном спектрофотометре ELISA (Sanofi Diagnostic Pasteur PR 2100) при  $\lambda=540$  нм.

Результаты экспериментов анализировали методом вариационной статистики с использованием непараметрического критерия Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при  $p<0,05$ .

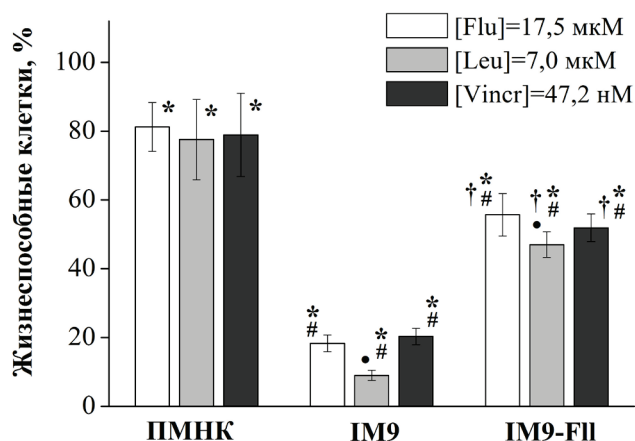
## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что множественная миелома человека – это злокачественное новообразование из плазматических клеток или дифференцированных В-лимфоцитов, продуцирующих моноклональные иммуноглобулины или их фрагменты. Данное заболевание системы крови относится к парапротеинемическим лейкозам и считается неизлечимым [13]. Для исследования этого заболевания *in vitro* часто используют В-лимфобластоидную клеточную линию IM-9, полученную от пациентки с множественной миеломой. В качестве противоопухолевого средства, способного вызвать лекарственную устойчивость клеточной линии IM9, использовали антиметаболит из класса нуклеозидных аналогов – флударабин. Он демонстрирует хорошие результаты при терапии острых лимфобластных лейкозов и неходжкинских лимфом, а также применяется в протоколах лечения В-хронического лимфоцитарного лейкоза [14]. При попадании в клетку химиопрепарат фосфорилируется нуклеозидными киназами последовательно в моно-, ди- и трифосфаты флударабина [15], последние из которых встраиваются в ДНК и иницируют в ней одноцепочечные разрывы, а также способны ингибировать ДНК полимеразу [16]. Кроме этого, 5'-трифосфат флударабина снижает уровень ДНК метилирования [14]. Совместно эти процессы блокируют синтез и репарацию ДНК и иницируют гибель патологических клеток.

Для выяснения вопроса о степени резистентности сублинии IM9-Flu к исследуемым лекарственным средствам, в концентрациях близких к терапевтическим, была проведена оценка уровня метаболической активности (жизнеспособности) данных клеток с помощью МТТ-теста.

На рисунке 1 представлены результаты по содержанию жизнеспособных клеток после воздействия флударабела, лейкладина и винкристина на ПМНК и клеточные линии (IM9 и IM9-Flu) в течение 48 ч.

Как видно из рисунка, жизнеспособность ПМНК и клеточных линий после воздействия всех исследуемых лекарственных средств статистически достоверно снижалась по сравнению с интактными клетками (контроль).



Количество интактных клеток в культуральной среде без лекарственных средств принято за 100% (контроль);

\* – различия по сравнению с контролем достоверны ( $p < 0,05$ );

# – различия достоверны по сравнению с PMNK ( $p < 0,05$ );

† – различия достоверны по сравнению с клетками IM9 ( $p < 0,05$ );

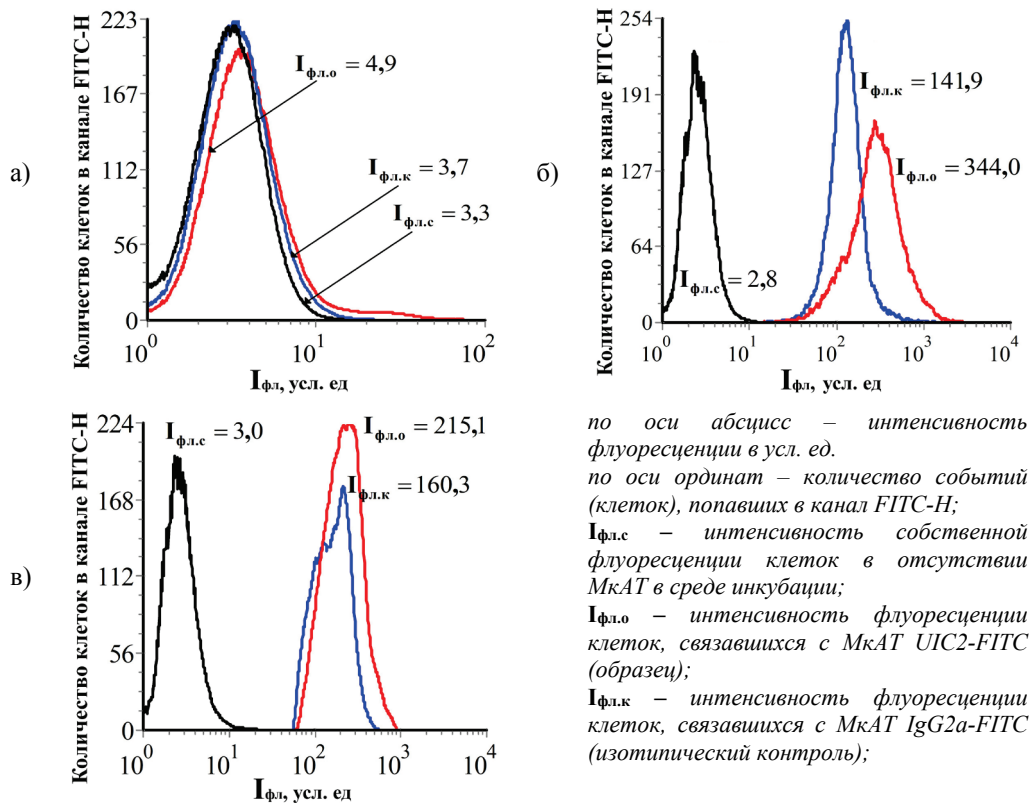
● – различия достоверны по сравнению с FII и Vincr ( $p < 0,05$ )

**Рисунок 1.** Процентное содержание жизнеспособных PMNK, IM9 и IM9-FII клеток после воздействия флударабела, лейкладина и винкристина в течение 48 ч *in vitro*

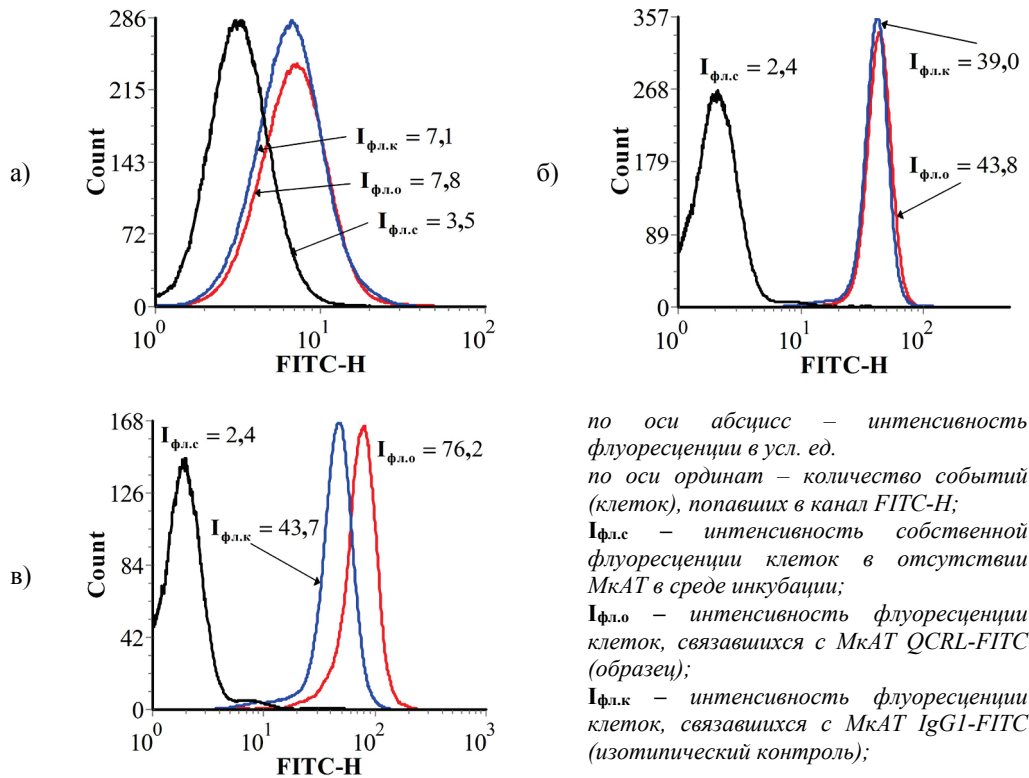
Причем, для PMNK она находилась практически на одном уровне после воздействия FII, Leu и Vincr и составила в среднем соответственно 81%, 78% и 79% (рисунок 1). Стоит отметить, что снижение жизнеспособности PMNK в среднем на 20% после воздействия FII, Leu и Vincr может указывать на их неспецифичность в отношении лимфоцитов условно здоровых доноров. Снижение жизнеспособности клеточной линии IM9 составило в среднем 80% (после воздействия FII и Vincr) и 90% (после экспозиции клеток с Leu) по сравнению с контролем, причем этот результат также статистически достоверен по сравнению с PMNK и IM9-FII клетками, что свидетельствует об эффективности данных химиопрепаратов в отношении клеток IM9 (рис. 1). Воздействие FII, Leu и Vincr на сублинию IM9-FII приводило к снижению жизнеспособности клеток в среднем на 45-55%, причем полученный результат также статистически достоверен по сравнению с PMNK и IM9 клетками. Более того, резистентность сублинии IM9-FII к Vincr, FII и Leu была в среднем в 2,6–5,2 раза выше по сравнению с родительской линией IM9, причем максимальную устойчивость IM9-FII клетки проявили к Leu, а минимальную – к Vincr (рисунок 1). Данный факт указывает на развитие перекрестной резистентности к Leu и Vincr у клеточной линии IM9-FII.

Стоит отметить, что жизнеспособность клеточных линий IM9 и IM9-FII после воздействия Leu была статистически достоверно снижена по сравнению с таковой после воздействия FII и Vincr (рис. 1). Возможно, подобная избирательность Leu связана со специфическими внутриклеточными мишенями в данном типе клеток, хотя его отличие от FII заключается в наличии атома хлора во втором положении пуринового гетероцикла вместо атома фтора, а при попадании в клетку он фосфорилируется таким же образом, как и FII, т.к. относится также к классу аналогов пуриновых нуклеозидов [15, 16]. С другой стороны, статистическая достоверность между воздействием Vincr и FII на клеточные линии IM9 и IM9-FII отсутствует, хотя Vincr относится к совершенно другому типу лекарственных средств (классу винка-алкалоидов) и в основном его цитотоксический эффект проявляется в ингибировании полимеризации микротрубочек (путем связывания с тубулином), митотического веретена деления и нарушении внутриклеточного транспорта [17]. Таким образом, клеточная сублиния IM9-FII, устойчивая к FII, приобрела перекрестную резистентность не только к лекарственным средствам из класса аналогов пуриновых нуклеозидов (Leu), но также и к соединениям из класса винка-алкалоидов (Vincr), что позволяет говорить о формировании МЛУ.

Как было сказано выше, два транспортера семейства ABC – P-gr и MRP1 ответственны за экспорт многих терапевтических агентов из лимфоцитов человека. К таким агентам также относятся и многие противоопухолевые препараты. Поэтому при проведении терапии очень важной является оценка экспрессии данных транспортеров, результаты которой могут повлиять на исход клинической картины. На сегодняшний день считается, что методы оценки “одной клетки” с помощью метода проточной цитофлуориметрии являются наиболее достоверными по сравнению с молекулярно-генетическими подходами [4]. Методом проточной цитофлуориметрии нами была проведена сравнительная оценка экспрессии белков-транспортеров P-gr и MRP1 в лимфоцитах условно здоровых доноров, клеточной линии IM9 и ее сублинии IM9-FII, резистентной к FII. На рисунке 2 представлены репрезентативные гистограммы распределения интенсивности флуоресценции MкАТ UIC2-FITC в лимфоцитах человека и клеточных линиях IM9/IM9-FII. Обнаружено, что содержание P-gr на поверхности плазматических мембран лимфоцитов доноров составляет в среднем  $1,74 \pm 0,45$ , в клетках В-лимфобластоидной линии IM9 –  $2,55 \pm 0,45$ , в то время как в флударабел-резистентной сублинии IM9-FII экспрессия P-gr снижалась и достигала в среднем значения  $1,5 \pm 0,34$ .



**Рисунок 2.** Репрезентативные гистограммы распределения интенсивности флуоресценции MkAT UIC2-FITC и IgG2a-FITC в суммарной популяции лимфоцитов доноров (а), в лимфобластоидной клеточной линии IM9 (б) и в устойчивой к флударабелу сублинии IM9-FII (в)



**Рисунок 3.** Репрезентативные гистограммы распределения интенсивности флуоресценции MkAT QCRL-FITC и IgG1-FITC в суммарной популяции лимфоцитов доноров (а), в лимфобластоидной клеточной линии IM9 (б) и в устойчивой к флударабелу сублинии IM9-FII (в)

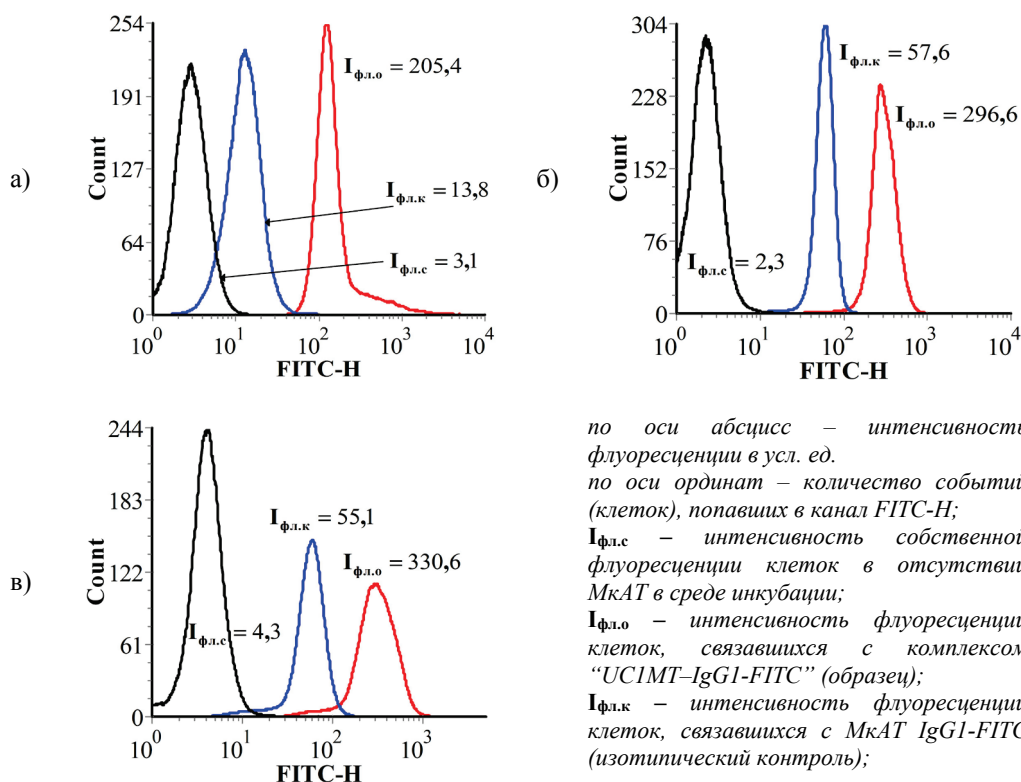
Параллельно была проведена оценка экспрессии другого белка-транспортера – MRP1 в исследуемых клеточных популяциях (рис. 3), которая выявила, что в интактных лимфоцитах доноров отношение интенсивности флуоресценции комплекса “MRP1–QCRL-FITC” к интенсивности флуоресценции комплекса “MRP1–IgG2a-FITC” (изотипический контроль) составляет в среднем  $1,33 \pm 0,31$ , в клеточной линии IM9 данный показатель составил в среднем  $1,45 \pm 0,33$ , а в ее флуорабел резистентной сублинии IM9-FII –  $2,1 \pm 0,44$ .

Полученные нами результаты демонстрируют, что в суммарной популяции лимфоцитов человека экспрессируются оба исследованных белка-транспортера, ассоциированные с феноменом МЛЮ. Степень их экспрессии хорошо согласуется с ранее установленными величинами [4]. Также было выявлено, что в мембране клеток В-лимфобластоидной клеточной линии IM9 находится как MRP1, так и P-gr. Однако, если содержание MRP1 белка, как в интактных лимфоцитах доноров, так и в В-клетках линии IM9 сопоставима, то уровень экспрессии P-gr в клеточной линии IM9 в среднем на 40–50% выше, чем был определен для суммарной популяции лимфоцитов человека. Если провести сравнительный анализ содержания MRP1 и P-gr в родительской В-лимфобластоидной клеточной линии IM9 и ее сублинии, устойчивой к FII, то можно заключить, что при формировании феномена МЛЮ в В-лимфобластоидных клетках на фоне снижения содержания P-gr усиливается экспрессия другого белка-транспортера – MRP1. Объяснением этого результата может являться тот факт, что после фосфорилирования в клетке аналогов пуриновых нуклеозидов (в частности флуарабина/флуарабела и кладрибина/лейкладина) до их монофосфатной нуклеотидной формы, последующие процессы детоксикации могут затрагивать функционирование белков, ассоциированных с МЛЮ из семейства MRP [18], хотя напрямую их транспорт не ассоциирован с функционированием данных транспортеров, т.к. за вход в клетку нуклеозидных аналогов отвечают специализированные нуклеозидтранспортные системы [15, 19]. Более того, известно, что Vincg субстратно не специфичен по отношению к транспортерам, ассоциированным с МЛЮ, и способен затрагивать функционирование как P-gr, так и MRP1 [20, 21], что объясняет устойчивость к нему клеточной линии IM9-FII.

Таким образом, установлено, что в В-лимфобластоидной клеточной сублинии IM9, резистентной к FII, по сравнению с родительской линией IM9 наблюдается снижение содержания транспортера P-gr и увеличение – MRP1, т.е. происходит снижение соотношения основных транспортных белков, ассоциированных с феноменом МЛЮ (P-gr к MRP1).

Нами параллельно также была проведена оценка содержания цистеин-содержащих низкомолекулярных белков металлотioneинов в исследуемых клеточных популяциях, уровень которых, как было установлено ранее [22, 23], непосредственно связан с оценкой и прогнозом течения заболевания и проведением химиотерапии.

На рисунке 4 представлены репрезентативные гистограммы распределения флуоресценции комплексов “UC1MT–IgG1-FITC” и “IgG1-FITC” (изотипический контроль к UC1MT) в суммарной популяции лимфоцитов доноров и клеточных линиях. Известно, что UC1MT представляют собой специфические мышинные MкАТ к двум



**Рисунок 4.** Репрезентативные гистограммы распределения интенсивности флуоресценции комплекса “UC1MT–IgG1-FITC” и MкАТ IgG1-FITC в суммарной популяции лимфоцитов доноров (а), в лимфобластоидной клеточной линии IM9 (б) и в устойчивой к флуарабелу сублинии IM9-FII (в)

классам МТs – МТ I и МТ II. По отношению интенсивности флуоресценции комплекса “UC1MT–IgG1-FITC” ( $I_{фл.о}$ ) к интенсивности флуоресценции изотипического контроля IgG1-FITC ( $I_{фл.к}$ ), характеризующему неспецифическое связывание антител, можно судить об относительном содержании МТs в исследуемых клетках.

Установлено, что для лимфоцитов доноров отношение интенсивности флуоресценции антител UC1MT–IgG1-FITC, связавшихся с клетками, к изотипическому контролю (IgG1-FITC) составило в среднем  $15,3 \pm 3,9$ , в то время как в В-клетках лимфобластоидной клеточной линии IM9 значение данного показателя составило  $5,6 \pm 1,1$ . Полученные результаты свидетельствуют, что в иммунных клетках человека содержание МТs в среднем в 2,7 раза выше, по сравнению с В-лимфобластоидной клеточной линией IM-9, в которой, очевидно, они в меньшей степени участвуют в поддержании окислительно-восстановительного гомеостаза. При проведении сравнительного анализа между содержанием МТs в клеточной линии IM9 и ее сублинии IM9-FII, было выявлено увеличение содержания данных низкомолекулярных белков в среднем на 15–25% в клетках сублинии, устойчивой к FII ( $6,7 \pm 0,8$ ) по сравнению с родительской линией IM9 ( $5,6 \pm 1,1$ ). Полученные результаты свидетельствуют, что в клеточной сублинии IM9-FII при формировании МЛУ происходит активация экспрессии металлотионеинов, которые способны принимать участие в процессах детоксикации клеток IM9-FII от метаболитов лекарственных средств.

Известно, что метаболизм Vincg в клетках происходит при участии монооксигеназной ферментативной системы (основное каталитическое звено – цитохром P-450), катализирующей протекание окислительных реакций с широким кругом субстратов [24]. В процессе циклического окисления ксенобиотиков на цитохроме P-450 могут образовываться АФК [25]. А одна из физиологических функций MRP1 в клетках состоит в регуляции гомеостаза “восстановленный – окисленный глутатион” [26], т.е. окислительно-восстановительного баланса, что также хорошо согласуется с увеличением содержания МТs в клеточной линии IM9-FII и их способностью инактивировать АФК.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, одним из механизмов, вносящих вклад в развитие феномена множественной лекарственной устойчивости клеточной линии IM9-FII, наряду с усилением экспрессии транспортного белка MRP1, также выступает увеличение в них содержания низкомолекулярных цистеин-обогащенных цитозольных белков металлотионеинов I и II классов, способных инактивировать АФК, образующиеся при метаболизме лекарственных средств и участвовать в процессах детоксикации клеток.

#### Список литературы / References:

1. Ставровская А.А., Генс Г.П. Некоторые новые аспекты исследований множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. *Успехи молекулярной онкологии*, 2014, т. 1, № 1, с. 5-11 [Stavrovskaya A.A., Guens G.P. Multidrug resistance of tumor cells: some new trends in research. *Advances in Molecular Oncology*, 2014, vol. 1, no. 1, pp. 5-11. (In Russ.)]
2. Szakács G., Váradi A., Özvegy-Laczka C., Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADME-Tox). *Drug Discovery Today*, 2008, vol. 13, no. 9-10, pp. 379-393. DOI: 10.1016/j.drudis.2007.12.010.
3. Leslie E.M., Deeley R.G., Cole S.P.C. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2005, vol. 204, pp. 216-237. DOI: 10.1016/j.taap.2004.10.012.
4. Meaden E.R., Hoggard P.G., Khoo S.H., Back D.J. Determination of P-gp and MRP1 expression and function in peripheral blood mononuclear cells *in vivo*. *Journal of Immunological Methods*, 2002, vol. 262, pp. 159-165. DOI: 10.1016/S0022-1759(02)00020-0.
5. Giraud C., Manceau S., Declèves X., Goffinet F., Morini J., Chappuy H., Batteux F., Chouzenoux S., Yousif S., Scherrmann J.-M., Blanche S., Tréluyer J.-M. Influence of development, HIV infection, and antiretroviral therapies on the gene expression profiles of ABC transporters in human lymphocytes. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2008, vol. 50, pp. 226-230. DOI: 10.1177/0091270009343696.
6. Fukuda Y., Schuetz J.D. ABC transporters and their role in nucleoside and nucleotide drug resistance. *Biochemical Pharmacology*, 2012, vol. 83, pp. 1073-1083. DOI: 10.1177/0091270009343696.
7. Dean M. The genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods in Enzymology*, 2005, vol. 400, pp. 409-429. DOI: 10.1016/S0076-6879(05)00024-8.
8. Wartenberg M., Hoffmann E., Schwindt H., Grünheck F., Petros J., Arnold J.R.S., Hescheler J., Sauer H. Reactive oxygen species-linked regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in Nox-1 overexpressing prostate tumor spheroids. *FEBS Letters*, 2005, vol. 579, pp. 4541-4549. DOI: 10.1016/j.febslet.2005.06.078.
9. Ермакова Н.В. *Исследование модификации множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток*: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.04; Рос. акад. наук, Ин-т теор. и эксперим. биофизики. М., 2005, 18 с. [Ermakova N.V. *Issledovanie modifikacii mnozhestvennoj lekarstvennoj ustojchivosti opuholevyh kletok*: avtoref. dis. kand. biol. nauk: 03.00.04; Ros. akad. nauk, In-t teor. i eksperim. biofiziki. M., 2005, 18 p. (In Russ.)]
10. Тамашевский А.В., Слобожанина Е.И., Гончарова Н.В., Хлебко П.В., Свирновский А.И. Окислительный стресс в эритроцитах при хроническом лимфоцитарном лейкозе, индуцированный противоопухолевыми препаратами. *Известия НАН Беларуси. Серия биологических наук*, 2010, № 3, с. 62-66. [Tamashevski A.V.,



Slobozhanina E.I., Goncharova N.V., Khliabkho P.U., Svirnovski A.I. Oxidative stress in lymphocytes at chronic lymphocytic leukemia induced by anticancer drugs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus, Biological series*, 2010, no. 3, pp. 62-66. (In Russ.)]

11. Тамашевский А.В., Гармаза Ю.М., Слобожанина Е.И., Свирновский А.И. Транспортная активность Р-гликопротеина при изменении редокс-баланса в лимфоцитах человека. *Новости медико-биологических наук*, 2012, т. 6, № 4, с. 173-182. [Tamashevski A.V., Harmaza Y.M., Slobozhanina E.I., Svirnovski A.I. Transport activity P-glycoproteins under redox-balance change in human lymphocytes. *News of biomedical sciences*, 2012, vol. 6, no. 4, pp. 90-95. (In Russ.)]

12. Гармаза Ю.М., Тамашевский А.В., Слобожанина Е.И. Металлотионеины млекопитающих: структура и биологическая роль. *Известия НАН Беларуси. Серия биологических наук*, 2016, № 1, с. 107-116. [Harmaza Y.M., Tamashevski A.V., Slobozhanina E.I. Mammalian methalothioneins: structure and biological role. *Proceedings of the National academy of sciences of Belarus*, 2016, no. 1, pp. 107-116. (In Russ.)]

13. Egan P., Drain S., Conway C., Bjourson A.J., Alexander H.D. Towards Stratified Medicine in Plasma Cell Myeloma. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016, vol. 17, no. 10, pp. 1760-1781. DOI: 10.3390/ijms17101760.

14. Ricci F., Tedeschi A., Morra E., Montillo M. Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: a review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 2009, vol. 5, pp. 187-207. DOI: 10.2147/term.s3688.

15. Koczor C.A., Torres R.A., Lewis W. The role of transporters in the toxicity of nucleoside and nucleotide analogs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2012, vol. 8, no. 6, pp. 665-676. DOI: 10.1517/17425255.2012.680885.

16. Калиниченко Е. Модифицированные нуклеозиды: синтез и перспективы использования в качестве химиотерапевтических агентов. *Наука и инновации*, 2004, № 9, с. 57-64. [Kalinichenko E. Modified nucleosides: synthesis and prospects for use as chemotherapeutic agents. *Science and Innovations*, 2004, no. 9, pp. 57-64. (In Russ.)]

17. Jordan M.A., Himes R.H., Wilson L. Comparison of the effects of vinblastine, vincristine, vindesine, and vinepidine on microtubule dynamics and cell in proliferation vitro. *Cancer Res.*, 1985, vol. 45, pp. 2741-2747.

18. Schuetz J.D., Connelly M.C., Sun D. MRP4: A previously unidentified factor in resistance to nucleoside-based antiviral drugs. *Nature Medicine*, 1999, vol. 5, no. 9, pp. 1048-1051. DOI: 10.1038/12487.

19. Damaraju V.L., Damaraju S., Young J.D., Baldwin S.A., Mackey J., Sawyer M.B., Cass C.E. Nucleoside anticancer drugs: the role of nucleoside transporters in resistance to cancer chemotherapy. *Oncogene*, 2003, vol. 22, pp. 7524-7536. DOI: 10.1038/sj.onc.1206952.

20. Szakács G., Paterson J.K., Ludwig J.A., Booth-Genthe C., Gottesman M.M. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nature Rev. Drug Discov.*, 2006, vol. 5, no. 3, pp. 219-234. DOI: 10.1038/nrd1984.

21. Borst P., Evers R., Kool M., Wijnholds J. A Family of Drug Transporters: the Multidrug Resistance-Associated Proteins. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2000, vol. 92, no. 16, pp. 1295-1302. DOI: 10.1093/jnci/92.16.1295.

22. Krizkova S., Fabrik I., Adam V., Hrabeta J., Eckschlager T., Kizek R. Metallothionein – a promising tool for cancer diagnostics. *Bratislavské Lekárske Listy*, 2009, vol. 110, pp. 93-97.

23. Pedersen M.O., Larsen A., Stoltenberg M., Penkowa M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis, *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 2009, vol. 44, pp. 29-64. DOI: 10.1016/j.proghi.2008.10.001.

24. Moore A., Pinkerton R. Vincristine: can its therapeutic index be enhanced? *Pediatr. Blood Cancer*, 2009, vol. 53, pp. 1180-1187. DOI: 10.1002/pbc.22161.

25. Кобляков В.А. Цитохром Р-450: Функционирование и регуляция. *Биол. мембраны*, 2003, т. 20, № 3, с. 265-272. [Kobliakov V.A. Cytochrome P-450: Functions and regulation. *Biol. membranes*, 2003, vol. 20, no. 3, pp. 265-272. (In Russ.)]

26. Cole Susan P.C. Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1, ABCC1), a “Multitasking” ATP-binding Cassette (ABC) Transporter. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, vol. 289, no. 45, pp. 30880-30888. DOI: 10.1074/jbc.R114.609248.

**EXPRESSION OF TRANSPORT AND CYTOSOLIC PROTEINS UNDER THE FORMATION OF MULTIDRUG RESISTANCE IN HUMAN MYELOMA CELLS *IN VITRO*****Tamashevski A.V.<sup>1</sup>, Harmaza Y.M.<sup>1</sup>, Pasiukov V.V.<sup>2</sup>, Slobozhanina E.I.<sup>1</sup>**<sup>1</sup> Institute of Biophysics and Cell Engineering of National Academy of Sciences of Belarus  
*Akademicheskaya st. 27, Minsk, 220072, Belarus; e-mail: Tayzoe@mail.ru*<sup>2</sup> Republican Scientific and Practical Center for Transfusiology and Medical Biotechnologies MH RB  
*Dolginovsky tract 160, Minsk, 220053, Belarus*

**Abstract.** The estimation of transport proteins associated with the phenomenon of multidrug resistance (P-glycoprotein and the protein of multidrug resistance - MRP1) amount and the cysteine-containing low-molecular-weight proteins metallothioneins level of expression in donor's lymphocytes, B-lymphoblastoid cell line IM9 and its subline resistant to fludarabel were conducted. It was found decrease in the ratio of expression of P-glycoprotein to MRP1 in IM9 subline resistant to fludarabel relative to IM9 parental cell line. So, one of the mechanisms contributing to the development of multidrug resistance in the IM9 cell line, equally with increase of MRP1 protein importance, take place cysteine-enriched cytosolic proteins metallothioneins I/II classes activation as was found.

**Key words:** *cell line IM9, multidrug resistance proteins P-glycoprotein and MRP1, metallothioneins, anticancer drugs.*