

На правах рукописи

ДОМАНИЦКАЯ НАТАЛЬЯ ВАСИЛЬЕВНА

**РОЛЬ АВСС10-ТРАНСПОРТЕРА В ФОРМИРОВАНИИ МНОЖЕСТВЕННОЙ  
ЛЕКАРСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ  
ЛЕЧЕНИИ ТАКСАНАМИ**

03.01.04 – биохимия

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук, г. Новосибирск, Россия.

**Научный руководитель:** кандидат биологических наук  
**Григорьева Эльвира Витальевна**

**Официальные оппоненты:** **Белявская Валентина Александровна**  
доктор биологических наук, профессор,  
Государственный научный центр молекулярной биологии и биотехнологии «Вектор», заведующая сектором

**Попова Нэлли Александровна**  
кандидат биологических наук, доцент,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения  
Российской академии наук, старший научный сотрудник

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Научно-исследовательский институт онкологии» Сибирского  
отделения Российской академии медицинских наук

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_ 2014 г. в «\_\_» часов на заседании диссертационного совета Д.001.034.01 в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт биохимии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук (630117, г. Новосибирск, ул.Тимакова, 2; тел. 8 (383) 333-54-81)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт биохимии» Сибирского отделения Российской академии медицинских наук по адресу: [www.niibch.ru](http://www.niibch.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
кандидат биологических наук

Г.С. Русских

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** В настоящее время химиотерапия является одной из ключевых форм лечения рака молочной железы. На сегодняшний день существует множество химиотерапевтических препаратов, из которых наиболее эффективными являются доцетаксел и паклитаксел, относящиеся к группе лекарственных препаратов таксанов. На сегодняшний день ответ метастатического рака молочной железы на химиотерапию первой линии лечения составляет около 30 % -70 %, безрецидивный период после лечения зачастую достигает лишь 7-10 месяцев. Большое количество смертей от данного заболевания обусловлено низкой эффективностью химиотерапии, связанной с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) опухолевых клеток. МЛУ, устойчивость клеток к ряду лекарственных препаратов, отличающихся по химической структуре и механизму действия, остается основной проблемой при лечении злокачественных новообразований.

МЛУ возникает в результате активации опухолевой клеткой её естественных защитных механизмов. На сегодняшний день доказана клиническая значимость различных механизмов множественной лекарственной устойчивости, одним из которых является механизм, основанный на транспорте лекарственных препаратов из клетки посредством трансмембранных белков ABC-транспортеров (ATP Binding Cassette (ABC) transporters, АТФ - зависимые транспортеры). Одними из наиболее изученных и охарактеризованных ABC транспортеров является Р-гликопротеин (Pgp) или ABCB1, гиперэкспрессия которого ассоциирована с феноменом МЛУ (Riordan et al., 1985).

Ещё одним представителем данного семейства, малоизученным на сегодняшний день, но интересным для изучения развития МЛУ при лечении рака молочной железы, является транспортер ABCC10 (MRP7). ABCC10 экспрессируется в большинстве тканей человека, таких как поджелудочная железа, головной мозг, яичники, селезенка, печень, плацента, почки, сердечные и скелетные мышцы, семенники, кишечник, предстательная железа, молочные железы и др. (Dabrowska and Sirotnak, 2004; Hopper et al., 2001; Takayanagi et al., 2004). Данный транспортер обладает необычно широким спектром субстратной специфичности: гиперэкспрессия ABCC10 в опухолевых клетках *in vitro* обеспечивает устойчивость к таким препаратам, как таксаны, винка алкалоиды, нуклеотидные аналоги, а также эпотилон В (Hopper-Borge et al., 2004; Hopper-Borge et al., 2009; Oguri et al., 2008). Также в экспериментах на *Abcc10*<sup>-/-</sup> мышах *in vivo* было показано, что потеря экспрессии *Abcc10* приводит к повышенной чувствительности животных к

паклитакселу по сравнению с животными дикого типа (Hopper-Borge et al., 2011). Эти результаты позволяют предположить, что ингибирование АВСС10 может иметь клиническое значение в лечении рака молочной железы, а также других видов онкологических заболеваний, для лечения которых используют такие химиотерапевтические препараты, как таксаны. Однако механизм участия АВСС10 транспортера в возникновение множественной лекарственной устойчивости при лечении рака молочной железы не ясен.

**Целью** данной работы является исследование роли транспортного белка АВСС10, в формировании множественной лекарственной устойчивости при лечении злокачественных новообразований молочной железы.

В соответствии с целью исследования были поставлены следующие **задачи**:

1. Проанализировать экспрессию *ABCC10* в опухолях молочной железы человека по сравнению с нормальной тканью молочной железы. Изучить взаимосвязь молекулярных характеристик рака молочной железы и уровня экспрессии АВСС10 в опухолевых тканях.

2. Получить и охарактеризовать доклиническую мышиную модель рака молочной железы человека MMTV-PyVmtT нокаутную по *Abcc10*.

3. Получить первичные культуры из опухолей молочной железы, развившихся у MMTV-PyVmtT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmtT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> мышей. Изучить влияние экспрессии *Abcc10* на морфофизиологические характеристики опухолевых клеток *in vitro*.

4. Изучить влияние *Abcc10* на цитотоксические характеристики таксанов в отношении первичных культур опухолевых клеток молочной железы MMTV-PyVmtT *in vitro* и *in vivo*.

5. Изучить влияние *Abcc10* на развитие множественной лекарственной устойчивости при лечении PyVmtT доклинической модели рака молочной железы человека доцетакселом.

### **Научная новизна работы.**

В данной работе впервые было показано, что:

- экспрессия *ABCC10* повышена в опухолевых тканях молочной железы человека по сравнению с экспрессией в нормальных тканях молочной железы, при этом показана взаимозависимость экспрессии *ABCC10* и молекулярных характеристик РМЖ;
- экспрессия *Abcc10* в первичных культурах опухолевых клеток молочной железы MMTV-PyVmT оказывает влияние на морфофизиологические характеристики клеток независимо от функции транспорта химиотерапевтических препаратов: уменьшает пролиферативную и адгезионную активности, усиливая при этом миграционную активность клеток;
- MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> мыши характеризуются повышением скорости роста опухолей, повышенной степенью дифференцировки злокачественных опухолей и сниженной способностью к метастазированию в лёгкие;
- потеря экспрессии *Abcc10* не приводит к увеличению экспрессии других транспортеров, более того приводит к понижению экспрессии *Abcg2*;
- потеря экспрессии *Abcc10* повышает чувствительность опухолевых клеток молочной железы к таксанам *in vitro* и *in vivo*;
- потеря экспрессии *Abcc10* оказывает положительное влияние на терапевтический эффект доцетаксела в доклинической модели РМЖ MMTV-PyVmT *in vivo*, повышая чувствительность опухолей молочной железы к доцетакселу, и выживаемость экспериментальных животных MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup>.

### **Научно-практическая значимость**

Полученные данные не только вносят свой вклад в понимание молекулярных механизмов МЛУ при лечении рака молочной железы, но также демонстрируют *ABCC10*-транспортер как потенциальный биомаркер эффективности ответа на химиотерапию. Гетерогенность экспрессии *ABCC10* для опухолей трижды негативного рака молочной железы позволяет предположить, что *ABCC10* может являться кандидатом для клинического скрининга трижды негативного рака молочной железы и определение уровня экспрессии *ABCC10* может стать новым шагом на пути к более персонализированной химиотерапии. Данный результат имеет принципиальное значение также потому, что трижды негативный тип рака молочной железы является наиболее агрессивным и слабо поддается лечению, поскольку для данных опухолей на сегодняшний день не существует таргетной терапии. Также, данная работа определяет *ABCC10* транспортер как новую возможную цель для создания новых лекарственных

препаратов, направленных на подавление МЛУ и повышение эффективности антиопухолевой химиотерапии.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Экспрессия *ABCC10* повышена в опухолевых тканях молочной железы человека по сравнению с экспрессией в нормальных тканях молочной железы. Экспрессия *ABCC10* взаимосвязана с HER2 статусом опухоли и зависит от типа РМЖ.

2. Экспрессия *Abcc10* связана с агрессивностью злокачественных опухолей молочной железы, развившихся у MMTV-PyVmT мышей: повышенная степень дифференцировки и сниженная способность к метастазированию злокачественных опухолей молочной железы нокаутных по *Abcc10*.

3. Экспрессия *Abcc10* оказывает влияние на морфофизиологические характеристики первичных культур клеток, полученных из злокачественных опухолей, развившихся у MMTV-PyVmT мышей: уменьшение пролиферативной и адгезионной активности, увеличение миграционной активности клеток.

4. Потеря экспрессии *Abcc10* не компенсируется посредством увеличения экспрессии других транспортеров.

5. Опухолевые клетки молочной железы, полученные из злокачественных опухолей MMTV-PyVmT мышей нокаутных по *Abcc10*, более чувствительны к химиотерапевтическим препаратам группы таксаны *in vitro* и *in vivo* по сравнению с клетками, полученными из опухолей MMTV-PyVmT мышей дикого типа.

**Апробация работы.** Основные результаты исследований докладывались на следующих конференциях: ежегодных научных конференциях студентов и аспирантов Научно-исследовательского центра рака «Фокс Чейз» (Филадельфия, США, 2010-2012); VII Международной ежегодной АВСС конференции в северной Америке (Национальный институт здоровья США, Фредерик, США, 2010); VIII Международной ежегодной АВСС конференции в северной Америке (Национальный институт здоровья США, Фредерик, США, 2011); Международной ежегодной конференции «AACR» (American Association for Cancer Research) (Орландо, США, 2011); IV Международной конференции «ABC-2012» (Инсбрук, Австрия, 2012); I Международной ежегодной биомедицинской научной конференции «Temple» (Филадельфия, США, 2012); 35-й Ежегодный симпозиум по раку молочной железы/35th Annual San Antonio Breast Cancer Symposium (Сан Антонио, США, 2012).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 15 научных работ, из которых 3 публикации в рецензируемых журналах.

**Структура и объем диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка цитированной литературы. Работа изложена на 97 страницах машинописного текста, включает 34 рисунков и 6 таблиц. Библиография включает 104 наименований.

## **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

**Доклиническая мышинная модель рака молочной железы MMTV-PyVmT.** Все эксперименты с мышами были предварительно утверждены комитетом по уходу и использованию животных Fox Chase Cancer Center (Филадельфия, США). MMTV-PyVmT мыши 634Mul/J сублинии были приобретены у фирмы The Jackson Laboratory (США). Гомозиготные *Abcc10*<sup>-/-</sup> мыши (Hopper-Borge et al., 2011) были скрещены с MMTV-PyVmT мыши для создания *Abcc10*<sup>-/-</sup>; PyVmT-положительных самок для последующего анализа опухолей молочной железы. Мышей подвергали эвтаназии посредством ингаляции метоксифлураном, когда опухоли достигали 10% от массы тела.

**Ортотопическая модель рака молочной железы.** Первичные клеточные культуры, полученные из опухолей, развившихся у MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> мышей, были имплантированы в области молочной железы 8-недельных самок мышей SCID. Когда опухоли достигали 50 мм<sup>3</sup>, мышей разделяли на две группы: инъекция спиртовым раствором в качестве контроля и лечение 25 мг/кг доцетаксела. Внутрибрюшинные инъекции спиртового раствора или доцетаксела проводились еженедельно, пока опухоль не достигала максимального размера (200 мм<sup>3</sup>).

**Получение первичных клеточных культур из опухолей, развившихся у MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> мышей.** Опухоли обрабатывали 0,2% коллагеназой в течение 2 часов при 37°C, промывали бессывороточной DMEM средой, средой с низким содержанием кальция с добавлением 5% лошадиной сыворотки и помещали в T-25 фласки, покрытые 0,1% желатином, на ночь в инкубатор на 37°C. На следующий день супернатанты собирали и рассаживали в новые фласки. Свободные от фибробластов популяции клеток получали через 6-8 недель, в экспериментах использовали культуры, пересаженные менее 6 раз.

**Определение клеточной пролиферации *in vitro*.** Степень клеточной пролиферации определяли при помощи CyQUANT NF Cell Proliferation Assay (Invitrogen, США)

согласно инструкции производителя. Клетки рассаживали плотностью 100-500 клеток в 8-12 лунок 96-луночного микропланшета. Измерения проводили каждые 24 часа – удаляли среду, добавляли по 50мкл флуоресцентного красителя и инкубировали 30 минут при 37°C. Анализ проводили при помощи Fluorescence Microplate Reader (SPECTRA max, “Molecular Devices”, Великобритания), на 530 нм.

**Тест на формирование колоний.** MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клетки высевали при низкой плотности на 6-луночный планшет и обрабатывали 3нМ доцетаксела или 3 нМ паклитаксела в течение 5 дней. Колонии визуализировали окрашиванием кристаллическим фиолетовым.

**Тест на "заращение раны".** MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клетки высевали на 6-луночный планшет так, чтобы через 24 часа клеточная культура достигла состояния 95% конфлюэнтного монослоя. В монослое наносили царапины (0.5 мм) и фотографировали одни и те же участки через каждые 2 часа в течение 24 часов. Степень зарастания царапины клетками вычисляли как отношение площади царапины через 8/24 часа к площади через 0 часов после повреждения. Для обчёта площади использовали программу ImageJ.

**Определение адгезионной активности клеток.** MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клетки высевали в планшеты E-plate (Roche) и помещали в прибор RTCA, который автоматически измеряет соответствующие изменения электрических свойств сенсоров, расположенных рядом с клетками.

**Анализ клеточного цикла и апоптоза.** MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клетки были посеяны в 12-луночном планшете в количестве 2 x 10<sup>5</sup> клеток на лунку. На следующий день, к клеткам добавляли 0, 10, 25 нМ доцетаксела или паклитаксела. Через 48 часов клетки окрашивали реагентом Guava Cell Cycle или Guava Nexin согласно инструкции производителя (Millipore, США) для анализа клеточного цикла или апоптоза соответственно (для окрашивания реагентом Guava Cell Cycle клетки предварительно фиксировали 70% этанолом в течение 24 часов на 4°C). Анализ окрашенных клеток проводился при помощи проточного цитометра Guava.

**Измерение накопления [<sup>3</sup>H]-доцетаксела в клетках.** MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клетки были посеяны в количестве 2 x 10<sup>5</sup> клеток на лунку в 6-луночном планшете. На следующий день среду заменили на среду с добавлением [<sup>3</sup>H]-доцетаксела в конечной концентрации 0.1 мкМ (5 Ки/ммоль, Movarek, США), клетки инкубировали в течение 15, 30, 60 и 90 минут при 37°C, обрабатывали трипсином-PBS,



осаждали при 500 g, ресуспендировали в PBS. Радиоактивность [<sup>3</sup>H]-доцетаксела, проникшего в клетки, измеряли на “LS6500 Multi-purpose Scintillation Counter” (Beckman Coulter, США). Результаты представляли как удельную радиоактивность на 10<sup>5</sup> клеток.

**Количественная ПЦР в реальном времени.** ПЦР проводили с использованием TaqMan Assay (AppliedBiosystems, США) на приборе BioRad IQ5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (BioRad, США). Реакционная смесь содержала ~100 нг кДНК, 1x TaqMan Universal PCR Master Mix (AppliedBiosystems, США), по 100 нМ каждого праймера, 250 нМ пробы, условия реакции: 95 °С, 15 мин; 40 циклов (95 °С, 15 сек; 60 °С, 60 сек). В качестве независимого контроля использовали ген *Ppib*.

**Вестерн-блот анализ.** Разделение белков проводили по методу Лэммли в денатурирующих условиях с использованием системы Mini-Protean II Cell-system (BioRad, США). Перенос белка осуществляли на PVDF мембрану (Bio-Rad Laboratories, США). Мембрану блокировали в течение 30 мин с использованием буфера “SuperBlock T20 PBS” (Invitrogen, США), инкубировали с первичными и вторичными антителами при комнатной температуре в течение 1 часа и визуализировали ECL реагентом.

**Иммунофлуоресцентный анализ.** MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клетки выращивали на покровных стеклах до момента конfluence, фиксировали в метаноле, блокировали и инкубировали с первичными антителами ( $\alpha$ -tubulin) в течение 1 часа при комнатной температуре. В качестве вторичных антител использовали антитела, конъюгированные с Alexa-568. DAPI (4', 6-диамидино-2-фенилиндол) (Molecular Probes/Invitrogen, США) использовали для окраски ядер. Анализ проводили на спектральном конфокальном микроскопе Nikon C1 (Nikon, США).

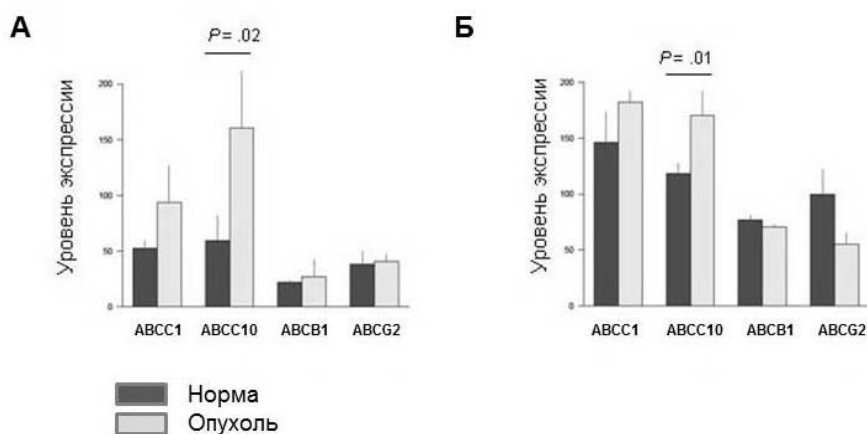
**Имуногистохимический анализ.** После депарафинизации, демаскировку антигенов проводили при помощи раствора Unmasking solution (Vector, США). Срезы инкубировали с моноклональными антителами против ABCC10 (E. Hopper-Borge, Fox Chase Cancer Center, США), с антителами против Ki-67, CD31 и каспазы 3 (Abcam, США). Инкубировали с вторичными антителами, наносили на каждый срез субстрат (ДАБ), инкубировали 5-15 минут при комнатной температуре. Анализ проводили при помощи микроскопа Nikon Eclipse, 50i, с использованием Nikon DS-Fi1 камеры.

**Статистическая обработка результатов.** Результаты представлены в виде средней величины и стандартной ошибки средней ( $M \pm m$ ). Достоверность отличий оценивали с помощью парного *t*-критерия Стьюдента. Статистическая значимость (двусторонний критерий) была установлена на уровне  $P < .05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ экспрессии *ABCC10* в нормальной и опухолевой тканях молочной железы человека

Для того, чтобы сравнить уровень экспрессии гена *ABCC10* в нормальных и опухолевых тканях молочной железы человека, мы проанализировали 2 набора данных, опубликованных в современной базе данных по экспрессии генов Gene Expression Omnibus: GSE5764 - инвазивная карцинома молочной железы, GSE8977 - полученные из костного мозга мезенхимальные стволовые клетки, содействующие метастазированию. Для сравнения *ABCC10* с другими транспортерами мы также проанализировали экспрессию хорошо изученных генов множественной лекарственной устойчивости *ABCC1*, *ABCB1* и *ABCG2*.



**Рисунок 1.** Уровень экспрессии генов *ABCC1*, *ABCC10*, *ABCB1* и *ABCG2* в образцах рака молочной железы и нормальной ткани. **А).** Анализ набора данных GSE5764. **Б).** Анализ набора данных GSE8977.

Данный анализ показал повышенный уровень экспрессии *ABCC10* в образцах инвазивной карциномы молочной железы по сравнению с нормальной тканью ( $P = .02$ ) (Рисунок 1А). Также экспрессия *ABCC10* в мезенхимальных стволовых клетках, полученных из костного мозга больных РМЖ, повышена, по сравнению с клетками нормального организма ( $P = .01$ ) (Рисунок 1Б). С учётом того, что анализ экспрессии *ABCC1*, *ABCB1* и *ABCG2* не выявил достоверной разницы между опухолевой и нормальной тканью, нами была выдвинута гипотеза, что именно *ABCC10* играет ключевую роль в формировании феномена МЛУ при раке молочной железы.

Для анализа экспрессии белка *ABCC10* нами был создан микрочип образцов опухолевой ткани молочной железы человека, состоящий из 51 образца различных молекулярных подтипов рака молочной железы человека: 18 HER2+, 15 HER2-, и 18

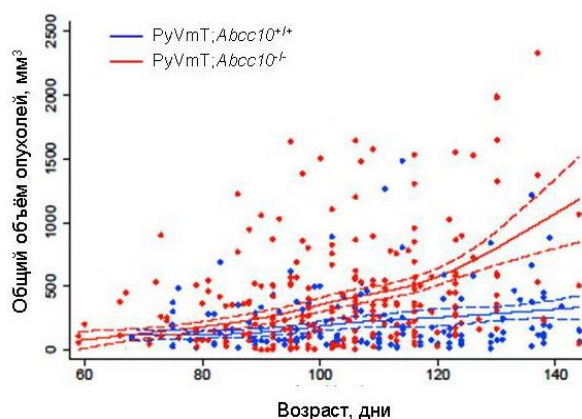
трижды негативных (ER-/PgR-/HER2-). Иммуногистохимический анализ проводили с использованием анти-ABCC10 моноклональных антител; образцы, не экспрессирующие ABCC10, были объединены в первую группу, образцы с положительной экспрессией ABCC10 были объединены во вторую группу.

Проведённый анализ показал, что экспрессия ABCC10 положительно коррелирует с положительным статусом HER2 рецептора ( $P = .039$ ). Кроме того, трижды негативный подтип рака молочной железы показал наиболее высокую степень гетерогенности экспрессии ABCC10 по сравнению с другими подтипами - 38,9% ER-/PgR-/HER2- образцов не выявили экспрессии ABCC10 по сравнению с 6,7 % и 0% для HER2- и HER2+ подтипов рака молочной железы соответственно ( $P = .002$ ).

### **Влияние экспрессии ABCC10 на развитие рака молочной железы и терапевтический эффект доцетаксела**

**Характеристика опухолей молочной железы MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>-/-</sup> мышей.** Для изучения роли Abcc10 в развитии и лечении рака молочной железы с использованием физиологической модели мы скрестили Abcc10 нокаутных мышей (Hopper-Vorge et al., 2011) с мышами, экспрессирующими MMTV-PyVmT трансген. Нами были получены MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>-/-</sup> мыши, самки которых, за счёт экспрессируемого трансгена, развивали мультифокальные опухоли молочной железы, дающие метастазы в лёгкие.

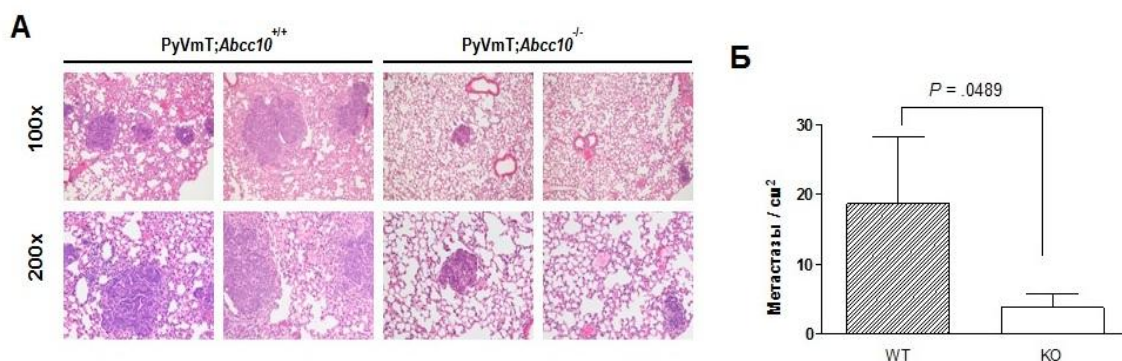
**Влияние ABCC10 на скорость роста опухолей молочной железы PyVmT мышей.** В анализе скорости образования и роста опухолей нами было использовано 26 MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>-/-</sup> мышей и 21 MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>+/+</sup> мышей. Скорость роста Abcc10-положительных опухолей была ниже по сравнению со скоростью роста Abcc10<sup>-/-</sup> опухолей. В возрасте 20 недель средний размер опухолей, образованных у MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>-/-</sup> мышей, достигал 1000 мм<sup>3</sup>; в то время как средний размер MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>+/+</sup> опухолей составлял 300 мм<sup>3</sup> ( $P = .020$ ) (Рисунок 2).



**Рисунок 2.** Скорость роста опухолей, образованных у MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> мышей.

**Влияние *Abcc10* на агрессивность и метастазирование рака молочной железы.** С учетом представленного выше результата, было удивительно, что после эвтаназии гистопатологический анализ показал, что MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> опухоли были менее дифференцированы, чем опухоли *Abcc10* нокаутных животных ( $P = .03$ ). Данный результат может говорить о повышенной агрессивности опухолей, экспрессирующих *Abcc10*: известно, что менее дифференцированные опухоли чаще всего являются более агрессивными, отличаются ранним метастазированием и наиболее плохим прогнозом (Soerjomataram *et al.*, 2008).

Анализ легких MMTV-PyVmT мышей, которые развивали первичные опухоли молочной железы, указал на более высокий уровень метастазирования MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> опухолей по сравнению с MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> опухолями (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** Лёгочные метастазы рака молочной железы MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> мышей. **А).** Окраска срезов лёгких гематоксилин-эозином. **Б).** Количество метастазов на см<sup>2</sup> у PyVmT мышей дикого типа (WT) и *Abcc10* нокаутных мышей (KO).

**Характеристика первичных культур клеток, полученных из MMTV-PyVmt;Abcc10<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmt;Abcc10<sup>-/-</sup> опухолей.** Для изучения влияния экспрессии ABCC10 на развитие рака молочной железы и множественной лекарственной устойчивости мы получили первичные культуры клеток из раковых опухолей, образовавшихся у MMTV-PyVmt;Abcc10<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmt;Abcc10<sup>-/-</sup> мышей. Для дальнейшей работы с полученными клеточными линиями необходимо было проверить их морфологические характеристики.

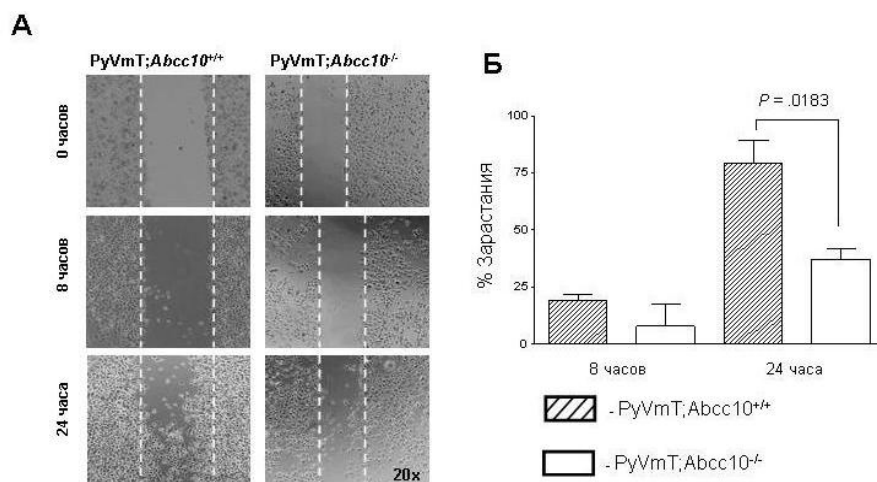
Как и в эксперименте *in vivo*, Abcc10<sup>-/-</sup> клеточные линии отличались повышенной пролиферативной активностью в сравнении с клетками дикого типа. Известно, что активно делящиеся клетки являются наиболее чувствительными к большинству химиотерапевтических препаратов, таким образом ингибирование Abcc10 не только сможет приводить к повышению чувствительности клеток к таксанам посредством снижения транспорта препарата из клетки, а также посредством регуляции пролиферативной активности, ответ на лечение может стать значительно выше.

Морфологический анализ MMTV-PyVmt;Abcc10<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmt;Abcc10<sup>-/-</sup> клеток был проведён посредством обработки клеток фаллоидином, меченным флуорохромом. Анализ препаратов на конфокальном микроскопе показал различия в размере клеток дикого типа и Abcc10<sup>-/-</sup> клеток - MMTV-PyVmt;Abcc10<sup>-/-</sup> клетки в 3 раза больше клеток дикого типа ( $P < .0001$ ).

Клеточная адгезия играет основную роль в регуляции клеточного движения и миграции, которые являются важными характеристиками, необходимыми для понимания метастатических процессов. На начальном этапе метастазирования индивидуальные клетки должны покинуть первичную опухоль, что достигается посредством изменений молекул адгезии, расположенных на поверхности клеток. С использованием системы xCELLigence, основанной на микроэлектронных биосенсорах, которые позволяют динамически в реальном времени наблюдать за адгезией клеток, была показана повышенная адгезионная активность MMTV-PyVmt;Abcc10<sup>-/-</sup> клеток ( $P = .0120$ ).

Другой важнейшей характеристикой клеток, часто ассоциированной с более агрессивным фенотипом, является способность к миграции. Миграционная активность MMTV-PyVmt;Abcc10<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmt;Abcc10<sup>-/-</sup> опухолевых клеток *in vitro* была проверена при помощи анализа «на застывание раны» (Рисунок 4А). Анализ миграционной активности показал, что через 24 ч после начала эксперимента Abcc10<sup>-/-</sup> клетки мигрировали на 40% меньше по сравнению с клетками, обладающими

положительным *Abcc10* статусом (Рисунок 4Б). Повышенная степень миграционной активности клеток дикого типа по сравнению с *Abcc10*<sup>-/-</sup> клетками, также объясняет более высокий уровень лёгочных метастазов у MMTV-PyVmt мышей дикого типа.



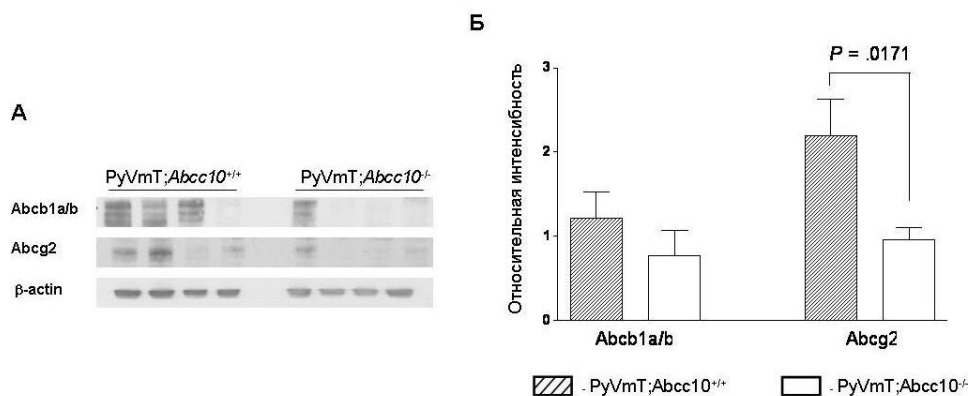
**Рисунок 4.** Анализ миграционной активности MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клеток *in vitro* при помощи теста «на застывание раны». **А).** Представлены фотографии, показывающие застывание сформированной «раны» через 8 и 24 часа после начала эксперимента. **Б).** Обсчёт площади застывания «раны» при помощи программы ImageJ.

**Влияние экспрессии ABCС10 на экспрессию ABC-транспортеров.** Зачастую потеря экспрессии/ ингибирование одного из транспортеров приводит к активации другого, тем самым компенсируя работу первого, и поэтому эффект ингибирования может отсутствовать. В связи с данным фактом, необходимым этапом для продолжения нашего исследования была проверка экспрессии других ABC-транспортеров.

Методом количественной ПЦР в реальном времени нами была проверена экспрессия таких транспортеров, как *Abcc1*, *Abcc3*, *Abcc4*, *Abcc5*, *Abcc1a/b* и *Abcg2*. Мы показали, что потеря *Abcc10* не компенсируется посредством увеличения экспрессии других ABC транспортеров. Более того, мы заметили тенденцию к снижению мРНК экспрессии некоторых транспортеров в *Abcc10*<sup>-/-</sup> клеточных линиях по сравнению с экспрессией в клетках дикого типа.

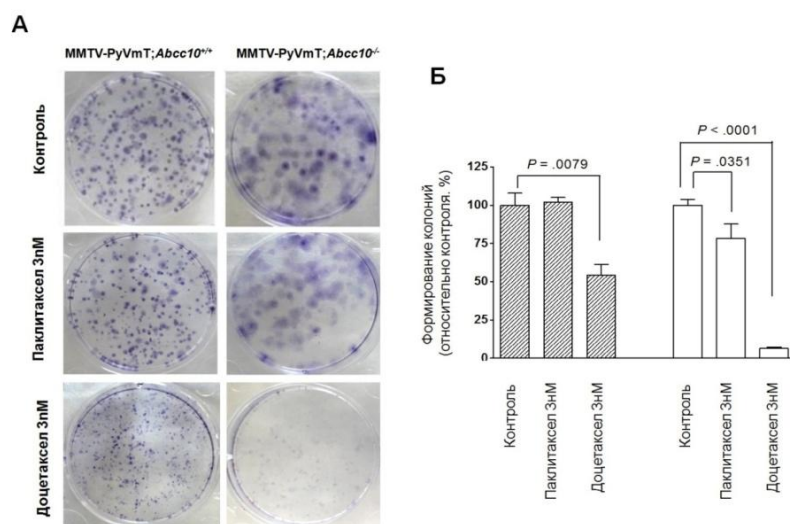
Белковая экспрессия транспортеров *Abcb1a/b* и *Abcg2* в *Abcc10*<sup>-/-</sup> клеточных линиях и линиях дикого типа была проверена при помощи вестерн-блот анализа (Рисунок 5А). Мы выявили тенденцию к снижению экспрессии *Abcb1a/b* в *Abcc10* нокаутных клеточных линиях (Рисунок 5Б). Также мы показали статистически достоверное снижение *Abcg2* в

*Abcc10*<sup>-/-</sup> клеточных линиях по сравнению с экспрессией в клеточных линиях дикого типа ( $P = .0171$ ) (Рисунок 5Б).



**Рисунок 5. А).** Вестерн-блот анализ с анти-Abcb1a/b и анти-Abcg2 антителами с использованием белковых фракций, выделенных из MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клеточных линий. **Б).** Обсчёт экспрессии Abcb1a/b и Abcg2 относительно экспрессии бета актина. MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> клетки, заштрихованные столбцы; MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клетки, белые столбцы.

**Цитотоксическая характеристика MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клеточных линий *in vitro*.** Одной из основных задач данного исследования было изучение влияния *Abcc10* на терапевтический эффект химиопрепаратов, используемых для лечения рака молочной железы. Первым шагом в этом было изучения данного эффекта с использованием *in vitro* модели. Для определения токсичности таких препаратов, как паклитаксел и доцетаксел по отношению к MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> раковым клеткам мы использовали тест на формирование колоний (Рисунок 6А). Инкубация с 3 нМ паклитаксела в течении 5 дней не оказывала влияния на способность клеток дикого типа формировать колонии, в то время как *Abcc10*<sup>-/-</sup> клетки образовывали на 20 % меньше колоний по сравнению с контролем ( $P = .0351$ ). Доцетаксел оказался более эффективным препаратом для клеток обоих генотипов в сравнении с паклитакселом. В результате инкубации с 3нМ доцетаксела в течение 5 дней клетки дикого типа образовывали на 45 % меньше колоний, по сравнению с контролем; *Abcc10*<sup>-/-</sup> клетки продемонстрировали более высокую чувствительность, снизив образование колоний на 90 % по сравнению с необработанными клетками ( $P < .0001$ ) (Рисунок 6Б).



**Рисунок 6.** Тест на формирование колоний. **А).** Колонии, образованные MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>-/-</sup> клетками при инкубации с паклитакселом/доцетакселом. **Б).** Количественный подсчет сформированных колоний с использованием программы ImageJ. MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>+/+</sup> клетки, заштрихованные столбцы; MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>-/-</sup> клетки, белые столбцы.

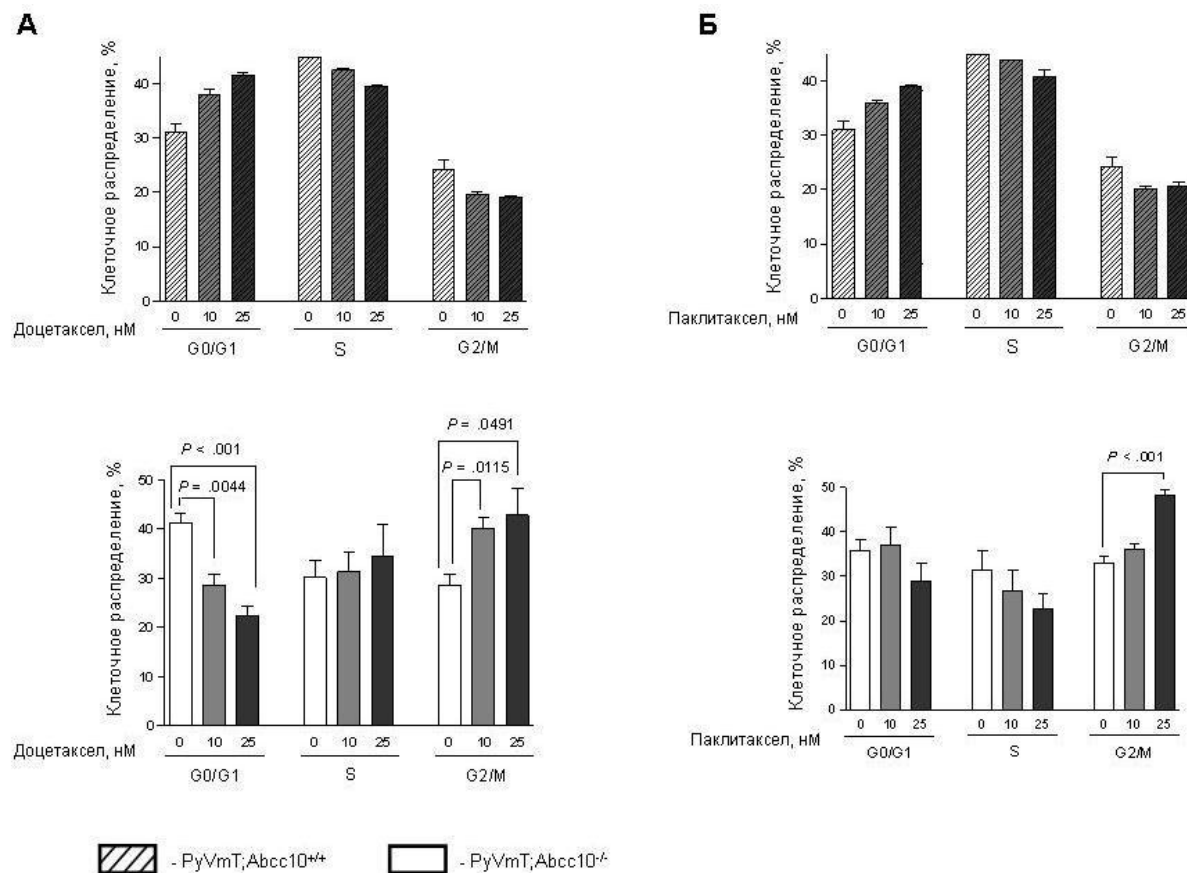
Так как механизмом действия доцетаксела является стабилизация микротрубочек, следующим шагом нашей работы была проверка прямого эффекта доцетаксела на микротрубочки посредством иммунофлуоресцентного окрашивания клеток, обработанного различной концентрацией препарата, с использованием антител  $\alpha$ -тубулину. Значительная стабилизация микротрубочек была детектирована для Abcc10<sup>-/-</sup> клеток, обработанных 3нМ доцетаксела, в то время как для достижения сравнимого эффекта на клетки дикого типа необходимо было увеличить концентрацию доцетаксела до 25нМ.

Мы также отметили эффект доцетаксела на миграционную активность MMTV-PyVmT;Abcc10<sup>-/-</sup> клеток. Через 8 часов, а также через 24 часа после начала эксперимента миграционная активность Abcc10<sup>-/-</sup> клеток, обработанных 3 нМ доцетаксела, была снижена на 50 % по сравнению с контролем. Эффект доцетаксела на миграцию Abcc10<sup>-/-</sup> клеток через 8 часов и через 24 часа был также значительно выше в сравнении с эффектом на клетки дикого типа ( $P = .0374$  и  $P = .0068$ ).

**Влияние доцетаксела и паклитаксела на развитие апоптоза и арест клеточного цикла.** Обработка клеток дикого типа паклитакселом в течение 48 часов не вызвала изменений распределения клеток по фазам клеточного цикла, в то время как обработка Abcc10<sup>-/-</sup> клеток 25 нМ паклитаксела вызывала G2/M арест клеточного цикла ( $P < .001$ ) (Рисунок 7Б). 10 нМ и 25 нМ доцетаксела также не оказывали влияния на клеточное



распределение *Abcc10*<sup>+/+</sup> клеток, по сравнению с *Abcc10*<sup>-/-</sup> клетками, для которых был детектирован G2/M арест клеточного цикла в результате обработки 10 нМ и 25 нМ доцетаксела ( $P = .0115$  и  $P = .0491$ ) (Рисунок 7А).

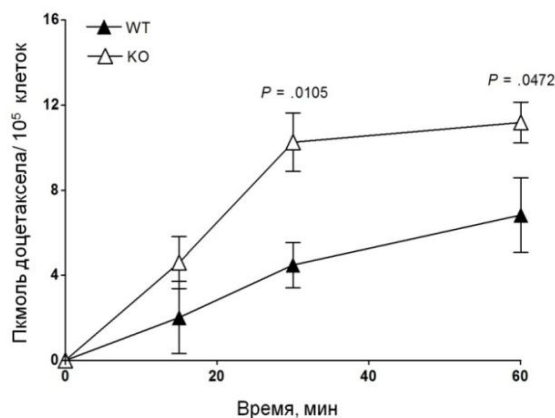


**Рисунок 7.** Анализ распределения MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клеток по фазам клеточного цикла G0/G1, S и G2/M при 48 часовой обработке 0, 10, 25 нМ доцетаксела (А) и паклитаксела (Б).

Дальнейший анализ клеточной смерти в результате обработки химиопрепаратами выявил тенденцию к уменьшению количества живых и увеличению числа MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клеток в состоянии раннего апоптоза, в то время как 48 часовая инкубация с препаратами клеток дикого типа не дала видимого результата. 48 часовая обработка *Abcc10*<sup>-/-</sup> клеток 25нМ паклитаксела давала статистически значимые уменьшение живых клеток ( $P = .0150$ ) и увеличение числа клеток, находящихся в состоянии раннего апоптоза ( $P = .0119$ ).

**Накопление доцетаксела, как субстрата ABCC10, в MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клетках.** Продемонстрированная разница, ассоциированная с *Abcc10* генотипом, может быть связана с повышением концентрации препарата в MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клетках по сравнению с клетками дикого типа, что было подтверждено в эксперименте с использованием радиоактивно-меченого доцетаксела.

Клеточные линии, полученные из MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> опухолей, накапливали до 60% меньше [<sup>3</sup>H]-доцетаксела на 30 и 60 мин после начала инкубации с препаратом в сопоставлении с клеточными линиями, полученными из MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> опухолей ( $P = .0105$  и  $P = .0472$ ) (Рисунок 8).

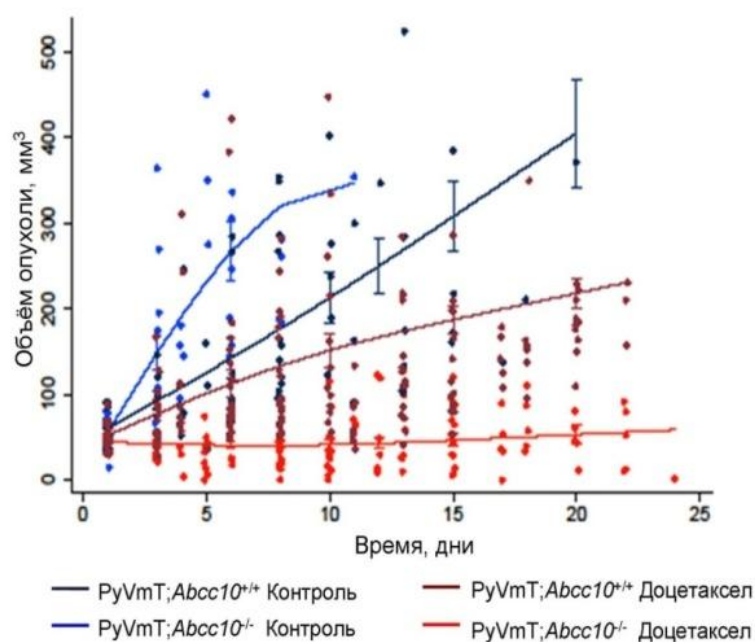


**Рисунок 8.** Клеточное накопление [<sup>3</sup>H]-доцетаксела в эпителиальных клетках, полученных из MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> (WT, чёрный треугольник) и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> (KO, белый треугольник) опухолей.

### Цитотоксическая характеристика MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клеточных линий *in vivo*

Ортотопическая модель опухолей молочной железы была использована с целью изучения MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клеток, как более клинически значимая модель *in vivo*. Для изучения влияния экспрессии *Abcc10* на чувствительность полученных первичных клеточных культур к доцетакселу *in vivo*, мы имплантировали клетки (3 клеточные линии дикого типа и 3 *Abcc10*<sup>-/-</sup> клеточные линии) в область молочной железы самок иммунодефицитных мышей SCID.

Как и в формировании первичных опухолей, опухоли, образованные посредством имплантации MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup>, росли быстрее, чем опухоли, сформированные клетками дикого типа ( $P = .001$ ) (Рисунок 9). MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> опухоли были чувствительны к лечению доцетакселом ( $P = .003$  и  $P < .001$ ). Тем не менее важно отметить, что за период лечения (21 день) опухоли, образованные из клеток дикого типа, уменьшились на 50%; в то время как эффект доцетаксела на опухоли *Abcc10*<sup>-/-</sup> клеток был более значительным: объём опухолей был сокращён в среднем на 86 % по сравнению с контрольной группой (Рисунок 9).

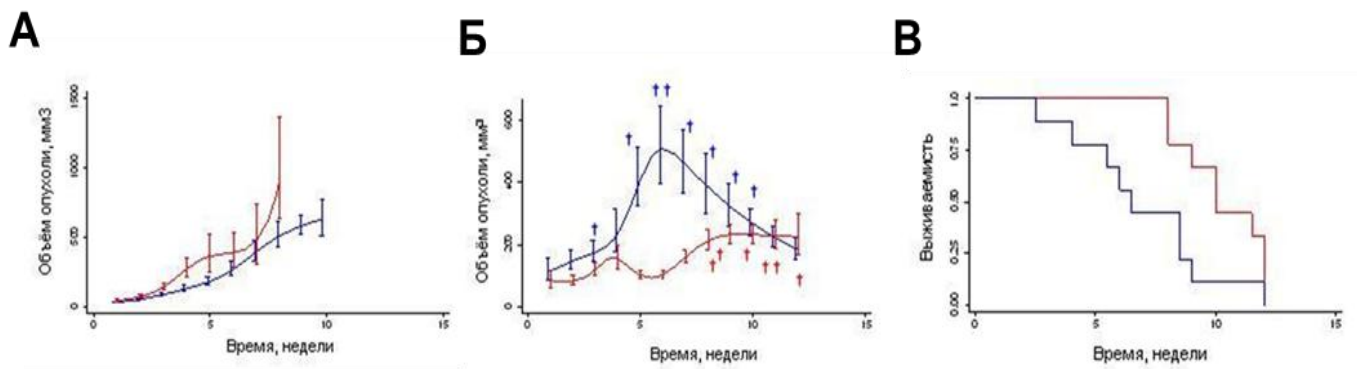


**Рисунок 9.** Скорость роста опухолей, образованных в результате имплантации MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> клеток. Представленные на графике кривые определяют скорость роста опухолей контрольных групп, а также групп, леченных доцетакселом.

Для сравнения эффективности лечения доцетакселом мы проанализировали влияние экспрессии *Abcc10* на экспрессию Ki-67, CD31 и каспазы 3, которые являются общепринятыми маркерами пролиферативной активности клеток, васкуляризации и апоптоза. Мы обнаружили, что *Abcc10*<sup>-/-</sup> опухоли группы "доцетаксел" показали значительное снижение Ki-67 положительных клеток ( $P = .0473$ ), а также снижение плотности кровеносных сосудов ( $P = .0022$ ) по сравнению с опухолями контрольной группы. Мы также отметили, что число клеток в состоянии апоптоза в леченных доцетакселом *Abcc10*<sup>-/-</sup> опухолей было увеличено более чем в 3 раза по сравнению с контрольными *Abcc10*<sup>-/-</sup> опухолями ( $P < .001$ ). Для мышей дикого типа такой разницы мы не увидели.

#### **Влияние экспрессии АВСС10 на терапевтический эффект доцетаксела**

Для оценки терапевтического эффекта доцетаксела мы использовали доклиническую модель метастатического РМЖ, MMTV-PyVmT, мыши которой развивали опухоли с *Abcc10*<sup>-/-</sup> либо *Abcc10*<sup>+/+</sup> генотипом в естественных условиях. Мышей инъецировали спиртовым носителем (контроль) или 25мг/кг доцетаксела раз в неделю на протяжении 12 недель.



**Рисунок 10.** Скорость роста опухолей, MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> (синий) и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> (красный) в контрольной группе (А) и при лечении доцетакселом (Б). Каплан-Майер анализ выживаемости MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> мышей при лечении доцетакселом (В).

Ответ на лечение MMTV-PyVmT;*Abcc10*<sup>-/-</sup> доцетакселом ( $P = .006$ ) был значительно выше ответа мышей дикого типа ( $P = .063$ ) (Рисунок 10 А, Б). Сравнение роста опухолей в группах мышей *Abcc10*<sup>+/+</sup> и *Abcc10*<sup>-/-</sup> генотипов, получавших еженедельно доцетаксел, оказалось проблематичным, так как мыши дикого типа достигали максимального объёма опухолей раньше и подвергались эвтаназии. Сравнение выживаемости давало более наглядное представление: через 8 недель после начала эксперимента лишь 44 % мышей дикого типа выжили, в то время как все *Abcc10*<sup>-/-</sup> мыши, получавшие доцетаксел, были живы. Каплан-Майер анализ выживаемости мышей, получавших доцетаксел (Рисунок 10 В), показал значительное увеличение выживаемости MMTV-PyVmT; *Abcc10*<sup>-/-</sup> мышей по сравнению с мышами дикого типа ( $P = .0298$ ).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании мы показали, что потеря экспрессии *Abcc10* ведёт к повышению пролиферативной активности опухолевых клеток молочной железы, за счёт чего опухоли *Abcc10* нокаутных животных растут быстрее опухолей дикого типа. Тем не менее, потеря *Abcc10* понижала агрессивность опухолей: *Abcc10*<sup>-/-</sup> опухоли были более дифференцированными и давали меньше метастазов в лёгкие по сравнению с опухолями дикого типа. Мы не обнаружили компенсацию потери *Abcc10* посредством увеличения экспрессии других транспортеров, более того, мы отметили снижение экспрессии *Abcg2* при потере *Abcc10*. Было продемонстрировано, что потеря *Abcc10* оказывает влияние на восприимчивость первичных культур клеток, полученных из опухолей MMTV-PyVmT мышей, к таксанам *in vitro* и *in vivo*. Данная разница была обусловлена повышением

внутриклеточной концентрации препарата для *Abcc10*<sup>-/-</sup> клеток по сравнению с клетками дикого типа, за счет снижения транспорта препарата за пределы клетки. Мы также показали, что потеря эндогенной экспрессии *Abcc10* оказывает значительное влияние на повышение чувствительности опухолей доклинической мышшиной модели рака молочной железы MMTV-PyVmt к доцетакселу, оказывая при этом положительный эффект на общую выживаемость.

Таким образом, мы продемонстрировали, что *ABCC10*-транспортер не только отвечает за транспорт химиотерапевтических препаратов, обеспечивая развитие множественной лекарственной устойчивости, но также оказывает влияние на биологию рака молочной железы. Данная работа подчеркивает необходимость исследований роли *ABCC10* в патогенезе рака молочной железы и его устойчивости к химиотерапии.

## ВЫВОДЫ

1. Экспрессия *ABCC10* повышена в опухолевых тканях молочной железы человека по сравнению с экспрессией в нормальных тканях молочной железы. Выявлена гетерогенность экспрессии *ABCC10* в трижды негативных опухолях молочной железы по сравнению с другими молекулярными подтипами.

2. Получены MMTV-PyVmt;*Abcc10*<sup>+/+</sup> и MMTV PyVmt;*Abcc10*<sup>-/-</sup> мыши, у которых развивались мультифокальные опухоли молочной железы. *Abcc10* нокаутные мыши характеризуются повышением скорости роста опухолей, повышенной степенью дифференцировки опухолей и сниженной способностью к метастазированию в лёгкие.

3. Первичные культуры, полученные из опухолей *Abcc10* нокаутных PyVmt мышей, отличаются увеличением клеточного размера, усилением пролиферативной и адгезионной активностей клеток и уменьшением миграционной активности клеток.

4. Первичные культуры, полученные из опухолей *Abcc10* нокаутных PyVmt мышей, обладают повышенной чувствительностью к химиотерапевтическим препаратам группы таксаны *in vitro* и *in vivo*.

5. Отсутствие *Abcc10* усиливает терапевтический эффект доцетаксела: повышает чувствительность опухолей, оказывая при этом положительный эффект на выживаемость.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Доманицкая Н.В.** Роль ABC-транспортеров в формировании множественной лекарственной устойчивости при лечении рака молочной железы // *Фундаментальные исследования*. – 2014. – № 6 (часть 4)
2. Малофеева Е.В., **Доманицкая Н.В.**, Иксанова А.Г., Фаттахова А. Н. и Хоппер-Борж Е. Анализ биохимических и транспортных свойств белка множественной лекарственной устойчивости MRP7 (ABCC10) на примере клеток CaCo2 // *Ученые записки Казанского государственного университета. Серия Естественные науки*. – 2013. – Т.156. – № 2. – С. 9-18
3. Malofeeva E.V., **Domanitskaya N.**, Gudima M., Hopper-Borge E.A. Modulation of the ATPase and transport activities of broad-acting multidrug resistance factor ABCC10 (MRP7) // *Cancer Research*. – 2012. – V. 72, № 24. – P. 6457-6467.
4. **Domanitskaya N.**, Paulose C., Jacobs J., Foster K., E Hopper-Borge E.A. Abcc10 status affects proliferation, metastases and tumor sensitivity. *Cancer Res.* – 2012. – V. 72, № 24, Supplement 3. – Abstract № P4-08-04.
5. **Domanitskaya N.**, Paulose C., Jacobs J., Foster K., Hopper-Borge E.A. Abcc10 as a breast cancer resistance factor // 4<sup>th</sup> FEBS Special Meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases” on ABC Proteins – Innsbruck, Austria, 2012. – P. 86.
6. **Domanitskaya N.**, Paulose C., Jacobs J., Foster K., Hopper-Borge E.A. Abcc10 status affects proliferation, metastases and tumor sensitivity // *The First Annual Temple Biomedical Research Day –Philadelphia, 2012.* –P. 74.
7. Malofeeva E.V., **Domanitskaya N.**, Gudima M., Hopper-Borge E.A. Biochemical activity and transport properties of ATP-binding cassette family, member 10 (ABCC10) // 4<sup>th</sup> FEBS Special Meeting “ATP-Binding Cassette (ABC) Proteins: From Multidrug Resistance to Genetic Diseases” – Innsbruck, Austria, 2012. – P. 115.
8. **Domanitskaya N.**, Paulose C., Jacobs J., Foster K., Hopper-Borge E.A. Abcc10 as a breast cancer resistance factor // 17<sup>th</sup> annual postdoctoral and graduate student research conference, Fox Chase Cancer Center – Philadelphia, USA 2012 – P. 4.
9. Malofeeva E.V., **Domanitskaya N.**, Gudima M., Hopper-Borge E.A. Biochemical activity and transport properties of ATP-binding cassette family, member 10 (ABCC10) // 17<sup>th</sup> annual postdoctoral and graduate student research conference, Fox Chase Cancer Center – Philadelphia, USA 2012 – P. 18.

10. Малофеева Е.В., **Доманицкая Н.В.**, Иксанова А.Г., Фаттахова А.Н. и Hopper-Borge E. Роль тирозинкиназных ингибиторов в АВСС10-зависимой множественной лекарственной устойчивости // III Международная научная онлайн конференция “Проблемы в биохимии и бионанотехнологии” – Казань, Россия, 2012. – С. 196.

11. Малофеева Е.В., **Доманицкая Н.В.**, Иксанова А.Г., Фаттахова А.Н. и Hopper-Borge E. Роль тирозинкиназных ингибиторов в АВСС10-зависимой множественной лекарственной устойчивости // “Постгеном 2012” – Казань, Россия, 2012. – С. 281.

12. **Domanitskaya N.**, Paulose C., Jacobs J., Foster K., Hopper-Borge E.A. Abcc10 as a breast cancer resistance factor // 8<sup>th</sup> Annual North American ABC Genetic Workshop – NCI – Frederick, Maryland, USA 2011 – P. 13.

13. **Domanitskaya N.**, Paulose C., Jacobs J., Foster K., Hopper-Borge E.A. Abcc10 as a breast cancer resistance factor // 16<sup>th</sup> annual postdoctoral and graduate student research conference, Fox Chase Cancer Center – Philadelphia, USA 2011 – P. 9.

14. **Domanitskaya N.**, Jacobs J., Paulose C., Hopper-Borge E.A. Mrp7 as a breast cancer resistance factor // AACR 102nd Annual Meeting - Orlando, Florida, USA 2011 – Abstract № 1693 P. 956

15. **Domanitskaya N.**, Hopper-Borge E.A. Localization of MRP7 and analysis of Mrp7 sensitivity.// 7<sup>th</sup> Annual North American ABC Meeting - NCI-Frederick, Maryland, USA 2010 – P.17