

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-253

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ С ПОМОЩЬЮ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОЙ МИКРОСКОПИИ, МОРФОЛОГИЧЕСКОГО ПРОФАЙЛИНГА И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ РЕПОРТЕРОВ\*****IDENTIFICATION OF DRUG MECHANISMS OF ACTION USING HIGH THROUGHPUT MICROSCOPY, MORPHOLOGICAL PROFILING AND FLUORESCENT REPORTERS**Т. Д. Лебедев<sup>1,2</sup>, А. М. Михеева<sup>1,2</sup>, М. А. Богомолов<sup>1,2</sup>, М. В. Семенцов<sup>1,2</sup>,  
V.A. Gasca<sup>1,2</sup>, П. В. Спиринов<sup>1,2</sup>, А. А. Буздин<sup>2,3</sup>, В. С. Прасолов<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва<sup>2</sup>Московский физико-технический институт, Долгопрудный<sup>3</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, МоскваT. D. Lebedev<sup>1,2</sup>, A. M. Mikheeva<sup>1,2</sup>, M. A. Bogomolov<sup>1,2</sup>, M. V. Sementsov<sup>1,2</sup>,  
V. A. Gasca<sup>2</sup>, P. V. Spirin<sup>1,2</sup>, A. A. Buzdin<sup>2,3</sup>, V. S. Prasolov<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow<sup>2</sup>Moscow Institute of Physics and Technology, Dolgoprudny<sup>3</sup>Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, Moscow

✉ lebedevtd@gmail.com

**Аннотация**

В нашей работе мы разработали подход, основанный на использовании флуоресцентных красителей клеточных структур и репортеров активности киназ, автоматизированной микроскопии и алгоритмов распознавания изображений, для определения механизмов действия противоопухолевых препаратов, изучения механизмов гибели клеток, формирования резистентности и поиска новых эффективных комбинаций ингибиторов.

**Abstract**

In our work, we have developed a method based on the use of fluorescent dyes for cellular structures and kinase activity reporters, automated microscopy and image recognition software to identify antitumor drugs mechanisms of action, study the processes of cell death, resistance acquirement and development of new effective combinations of inhibitors.

Несмотря на существенный прогресс в области разработки лекарств и методов терапии, онкологические заболевания остаются одной из основных причин смертности. За последние десятилетия были открыты сотни новых лекарственных препаратов, которые обладают противоопухолевой активностью. Особое развитие получило применение таргетных низкомолекулярных ингибиторов, которые воздействуют на конкретные белки-мишени или клеточные процессы. В настоящее время существует несколько сотен противоопухолевых таргетных препаратов, которые показали эффективность в клинических испытаниях, однако в настоящий момент они могут быть использованы для терапии менее 30 % пациентов. Это связано с несколькими причинами: 1) сложность в подборе новых селективных ингибиторов для конкретной мишени, 2) недостаточное понимание механизмов действия уже существующих ингибиторов в отношении определенного типа опухолей, 3) развитие резистентности к ингибиторам. Так, одной из проблем является то, что низкомолекулярные соединения могут воздействовать с десятками белков-мишеней, и эти взаимодействия будут зависеть от природы клеток. Это существенно усложняет перефилирование лекарственных препаратов, которые эффективно воздействуют на одни типы опухолей, но в клетках другого типа могут иметь совершенно другие мишени.

Для решения этих проблем сейчас исследуют изменения транскриптома, протеома, профилией фосфорилирования белков, эпигенетических и метаболических изменений. Такие методы позволяют провести многопараметрический анализ воздействия ингибиторов на различные клеточные процессы. Однако эти методы являются дорогостоящими и требуют существенных затрат времени и реактивов, что усложняет проведение широкомасштабных исследований большого количества лекарственных препаратов или использование различных клеточ-

\* Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 23-74-10103).

ных моделей злокачественных заболеваний. Одним из новых подходов для многопараметрического анализа клеточных процессов является морфологический профайлинг. Этот метод основан на использовании флуоресцентных красителей клеточных структур, автоматизированной микроскопии и использовании современных методов распознавания изображений и анализа больших данных. Преимуществами данного метода являются проведение измерений непосредственно для живых клеток, использование недорогих реактивов, возможность проведения широкомасштабных исследований и получение многопараметрических данных.

В нашей работе мы разработали собственный подход, основанный на методе морфологического профайлинга. Для исследования механизмов действия препаратов мы проводили окрашивание клеток под воздействием противоопухолевых препаратов на клеточные структуры: хроматин, тубулин, митохондрии, лизосомы; маркеры клеточной гибели: некроза, ферроптоза, апоптоза; а также использовали флуоресцентные репортерные белки для измерения активности киназ ERK1/2 и прогрессии клеточного цикла. На базе программ Cellpose и CellProfiler мы создали алгоритмы определения индивидуальных клеток с различной морфологией и клеточных структур на фотографиях, полученных с помощью флуоресцентного микроскопа. Мы разработали алгоритмы обработки данных, которые учитывают более 900 морфологических параметров и позволяют оценивать изменения фенотипов клеток, что позволяет сравнивать действие ингибиторов на различные молекулярные подтипы злокачественных опухолей. Используя данные воздействия более 50 ингибиторов и фотографии 5 млн индивидуальных клеток, мы показали возможность классификации низкомолекулярных ингибиторов с помощью данного метода. Использование флуоресцентного репортера активности киназ ERK1/2 позволило классифицировать действие 37 ингибиторов на активность ERK1/2 для 9 различных типов злокачественных заболеваний и определить наиболее эффективные комбинации лекарственных препаратов, основанные на ингибировании киназ ERK1/2. Интегрирование данных изменений морфологии, индукции клеточной гибели, активности ERK1/2 и прогрессии клеточного цикла позволяют детально изучить механизмы действия ингибиторов, определить потенциальные механизмы развития резистентности и подобрать наиболее эффективные сочетания препаратов. Таким образом, разработанный нами метод позволяет получить важную информацию для подбора препаратов с определенным механизмом действия для конкретного типа клеток, а также для определения механизмов действия новых ингибиторов.