

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ
МЕДИЦИНЫ**

На правах рукописи

**Цитотоксическая и противоопухолевая активность
рекомбинантных аналогов лактапина**

Багаманшина Анастасия Викторовна

03.01.03 - молекулярная биология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
к.б.н. Коваль Ольга Александровна

Новосибирск – 2019

Оглавление

Оглавление.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
ГЛАВА 1. ПОТЕНЦИАЛ АУТОФАГИИ И БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ В РАЗРАБОТКЕ ПОДХОДОВ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ) ..	12
1.1 Потенциал белковых препаратов в борьбе с онкологическими заболеваниями: преимущества и ограничения.....	12
1.1.1 Цитокины.....	12
1.1.1.1 Интерфероны.....	13
1.1.1.2 Интерлейкин-2.....	15
1.1.1.3 Фактор некроза опухоли α	16
1.1.1.4 Цитокин семейства фактора некроза опухоли, вызывающий апоптоз – TRAIL ..	19
1.1.1. Апоптин.....	24
1.1.6. Моноклональные антитела	26
1.1.6.1. Неконъюгированные антитела.....	26
1.1.6.2. Конъюгированные антитела.....	29
1.2. Аутофагия, как мишень для противоопухолевой терапии.....	30
1.2.1. Макроаутофагия.....	31
1.2.2. Микроаутофагия	34
1.2.3. Шаперон-зависимая аутофагия	35
1.2.4. Роль аутофагии в опухолевой прогрессии.....	36
1.2.4.2. Роль аутофагии в канцерогенезе.....	37
1.2.4.3. Аутофагия при терапии злокачественных опухолей	38
1.2.5. Модуляторы аутофагии для индукции гибели опухолевых клеток и терапии онкологических заболеваний.....	38
1.2.5.1. Ингибиторы аутофагии.....	38
1.2.5.1.1 3-Метиладенин в комбинации с различными препаратами.....	39
1.2.5.1.2. 3МА в комбинации с IL-24	40
1.2.5.1.3. 3МА в комбинации с препаратами платины	40
1.2.5.2. Модулятор аутофагии Ku55933.....	41
1.2.5.3. Ингибитор аутофагии хлорокин (CQ).....	41
1.2.5.3.1. CQ в комбинации с противоопухолевыми агентами.....	43

1.2.5.3.1.1. CQ в комбинации с иммуномодулирующим белком FIP-gts из <i>Ganoderma tsugae</i>	43
1.2.5.3.2. CQ в комбинации с 2-дезоксиглюкозой (2-DG)	44
1.2.5.3.3. CQ в комбинации с карфилзомибом	44
1.2.5.3.4. CQ в комбинации с ресвератролом	45
1.2.5.3.5. CQ в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2)	45
1.2.5.3.6. CQ в комбинации с бевацизумабом	46
1.2.5.3.7. CQ в комбинации с конъюгатом трансферрина и дифтерийного токсина 46	
1.2.5.3.8. CQ в комбинации с рапамицином	46
1.2.5.3.9. CQ в комбинации с ВКМ120.....	47
1.2.5.3.10. CQ в комбинации с селуметинибом	48
1.2.5.3.11. Заключение по комбинаторному использованию CQ с другими противоопухолевыми агентами	48
1.2.5.4. Гидроксихлорокин (НСQ) в комбинации с различными препаратами	49
1.2.6. Индукторы аутофагии.....	50
1.2.6.3. Рапалоги в комбинации с химиопрепаратами.....	51
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	53
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	54
2.1. Материалы и оборудование.....	54
2.1.1. Реактивы и материалы.....	54
2.1.2. Оборудование.....	55
2.1.3. Плазмиды.....	56
2.1.4. Буферы, растворы, среды	56
2.1.5. Клеточные культуры.....	56
2.1.6. Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые для ген-специфичного ОТ-ПЦР суммарной РНК.....	57
2.1.7. Лабораторные животные.....	58
2.2. Методы	58
2.2.1. Культивирование эукариотических клеток.....	58
2.2.2. Анализ цитотоксической активности (МТТ-тест).....	59
2.2.3. Иммуноцитохимия.....	60
2.2.4. Вестерн-блот анализ	60
2.2.5. Измерение активности катепсина D.....	60
2.2.6. Выделение суммарной клеточной РНК	60
2.2.7. Анализ экспрессии генов методом ОТ-ПЦР	61

2.2.8. Анализ экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.....	61
2.2.9. Оценка продукции анти-RL2 IgG у мышей, получавших инъекции RL2 методом ИФА.....	61
2.2.10. Определение концентрации рекомбинантного лактапина EL1 в культуральной среде методом ИФА.....	62
2.2.11. Проточная цитометрия.....	63
2.2.12. Трансмиссионная электронная микроскопия.....	63
2.2.13. Трансплантация опухолевых клеток.....	64
2.2.14. Оценка противоопухолевой активности RL2.....	64
2.2.15. Статистический анализ данных.....	65
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ.....	66
3.1. Цитотоксическая активность аналога лактапина RL2.....	67
3.1.1. Анализ клеточной гибели в клетках MDA-MB-231 под действием RL2.....	68
3.1.2. Анализ RL2-зависимой активации эффекторных каспаз в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231.....	70
3.1.3. Анализ изменения экспрессии генов апоптотического каскада в клетках MDA-MB-231 при инкубации с RL2.....	71
3.1.4. Анализ изменения уровня экспрессии генов каскада Nf-kB в клетках MDA-MB-231 и клетках здорового эндометрия KE под действием RL2 in vitro.....	75
3.2. Анализ аутофагии в опухолевых клетках человека, инкубированных с рекомбинантным аналогом лактапина RL2.....	79
3.2.1. Анализ признаков аутофагии в ультраструктуре клеток MDA-MB-231, инкубированных с рекомбинантным аналогом лактапина RL2.....	79
3.2.2. Анализ RL2-зависимого изменения основных молекулярных маркеров аутофагии в обработанных клетках.....	81
3.2.3. Анализ влияния модуляторов аутофагии на гибель опухолевых клеток, обработанных RL2.....	84
3.2.3.1. Влияние ингибитора аутофагии хлорокина на RL2-зависимую гибель клеток.....	86
3.2.3.2. Влияние ингибитора аутофагии Ku55933 на RL2-зависимую гибель клеток.....	90
3.2.3.3. Влияние ингибитора аутофагии 3-метиладенина на RL2-зависимую гибель клеток.....	92
3.2.3.4. Влияние индуктора аутофагии рапамицина на RL2-зависимую гибель клеток.....	94
3.2.3.5. Анализ изменения ультраструктуры клеток, обработанных рекомбинантным аналогом лактапина RL2 в комбинации с модуляторами аутофагии.....	95
3.2.3.6. Изменение активности катепсина D в клетках, обработанных аналогом лактапина RL2 в комбинации с модуляторами аутофагии.....	97
3.3. Исследование противоопухолевой активности аналога лактапина RL2.....	99

3.3.1. Анализ активности аналога лактапина RL2 в отношении асцитной формы гепатомы мыши ГА1 при внутривенном введении препарата	100
3.3.2. Анализ активности аналога лактапина RL2 в отношении солидной формы гепатомы мыши ГА1 при внутривенном или внутривенном режиме введения препарата	101
3.3.3. Определение оптимальной дозы и курса терапии препаратом RL2	103
3.3.4. Противоопухолевая активность аналога лактапина RL2 в комбинации с циклофосфамидом в отношении солидной формы гепатомы мыши ГА1	104
3.3.5. Анализ эффективности RL2 в комбинации с циклофосфамидом в отношении асцитной формой гепатомы мыши ГА1	105
3.3.6. Анализ активности аналога лактапина RL2 в отношении аденокарциномы молочной железы человека	107
3.3.7. Анализ противоопухолевой активности препарата RL2 в комбинации с хлорокином в отношении опухоли RLS с фенотипом лекарственной устойчивости.....	108
3.3.8. Анализ наработки нейтрализующих антител в сыворотке крови мышей, получавших инъекции препарата RL2.....	110
3.4. Аналоги лактапина, экспрессируемые в эукариотических клетках	111
3.4.1. Анализ продукции рекомбинантных аналогов лактапина в клетках HEK293T	113
3.4.2. Сравнение цитотоксической активности рекомбинантных аналогов лактапина RL2 и EL1.....	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
ВЫВОДЫ.....	119
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	121

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

a/a –раствор антибиотиков/антимикотика

БСА–бычий сывороточный альбумин

в/б – внутрибрюшинно

в/в – внутривенно

в/м - внутримышечно

ГА1 – гепатокарцинома ГА1

ДМСО – диметилсульфоксид

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПААГ – полиакриламидный гель

п/к - подкожно

РМЖ – рак молочной железы

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНКаза А – рибонуклеаза А

ТЕМЕД - N,N,N',N'-тетраметилендиамин

ТРО – торможение роста опухоли

ЦФ – циклофосфамид

Трис – 2-амино-2-гидрокси-метил-пропан-1,3-диол

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

АТСС – American Type Culture Collection, Американская типовая коллекция клеточных культур

CI – combinatorial index, комбинаторный индекс

CQ – chloroquine, хлорокин

ETCS – European Tissue Culture Society, Европейское общество тканевых культур

FBS – fetal bovine serum, сыворотка крови крупного рогатого скота

FITC – fluorescein isothiocyanate, флуоресцеин изотиоцианат

FLICA – fluorescently labeled inhibitors of caspases, флуоресцентно-меченые ингибиторы каспаз

GAPDH – glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase, глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа

HCQ – hydroxchloroquine, гидроксихлорокин
HRP – horseradish peroxidase, пероксидаза хрена
IC – index cytotoxicity, цитотоксический индекс
Ku55933 (Ku) – 2-морфолино-6- (тиантрен-1-ил) -4Н-пиран-4-он
3МА – 3-methyladenine, 3-метиладенин
PBS – phosphate buffered saline, натрий-фосфатный буфер
PI – propidium iodide, йодид пропидия
PI3 киназа – фосфатидилинозитол-3-киназа
PMSF – phenylmethylsulfonyl fluoride, фенилметилсульфонил флуорид
Rap – rapamycin, рапамицин
RL2 – recombinant analog of lactartin 2, рекомбинантный аналог лактапина 2
SD – standard deviation, стандартное отклонение
SDS – sodium dodecyl sulfate, додецилсульфат натрия
Sp – спермидин
TBS – tris-borate saline, трис-боратный буфер
TMB – 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 3,3',5,5'-тетраметилбензидин
TNF α – tumor necrosis factor alpha, фактор некроза опухоли альфа
Tregs - Regulatory T cells, регуляторные Т клетки

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время онкологические заболевания являются одной из наиболее серьезных проблем здравоохранения, которая требует разработки новых препаратов и методов лечения. Современное состояние терапии онкологических заболеваний таково, что развитие новых подходов лечения происходит без революционных прорывов, постепенно, шаг за шагом, с длительным и внимательным контролем каждого вносимого нововведения. Случаи совершенствования методов терапии онкологических заболеваний, приводящие к кардинальному улучшению результатов лечения, крайне редки, а большинство из применяемых для лечения рака препаратов являются токсичными для организма в целом. Тем не менее, и незначительные улучшения результатов терапии могут играть большую роль в клинической практике, продлевая жизнь больного. Среди противоопухолевых препаратов нового поколения многообещающими являются средства на основе рекомбинантных белков и пептидов, в том числе, способных селективно индуцировать гибель раковых клеток с минимальными токсическими эффектами по отношению к здоровым клеткам организма. Подобная селективность может быть основана на избирательной индукции в раковых клетках процессов гибели: апоптоза, аутофагии или некроптоза. Аутофагия может способствовать как выживанию клеток в стрессовых условиях путем переработки поврежденных органелл, неверно свернутых белковых агрегатов и внутриклеточных патогенов, так и клеточной гибели при чрезмерной активации процесса переваривания клеточных компонентов и деградации основных структур. При обширных индуцированных повреждениях, в случае, если апоптоз невозможен, клетка погибает по пути аутофагии. Представление о механизме индукции клеточной гибели препаратом позволяет вести как направленное конструирование терапевтических молекул с улучшенными свойствами, так и более подробно исследовать его возможные молекулярные мишени. Кроме того, новые потенциальные лекарства могут быть молекулами-партнерами уже существующих и широко применяемых препаратов, что позволит усиливать их действие в синергическом режиме. Преимуществом такой комбинированной терапии будет снижение дозы препаратов, сопряженное с повышением общей эффективности терапии и уменьшением неспецифической токсичности.

Ранее в ЛБТ ИХБФМ СО РАН из молока человека был выделен и охарактеризован пептид – лактапин – протеолитический фрагмент κ-казеина человека, который вызывал гибель раковых клеток человека в культуре [1]. На основе последовательности лактапина

был сконструирован его рекомбинантный аналог – RL2 для экспрессии в клетках-продуцентах *E.coli* [2]. Для аналога лактапина RL2 было показано, что гибель опухолевых клеток происходит по механизму апоптоза с активацией эффекторных каспаз -3 и -7 и сопровождается увеличением экспрессии гена опухолевой супрессии TP53. В качестве клеточных мишеней, с которыми взаимодействует RL2, были выявлены белки цитоскелета – α , β -тубулин и α -актинин-1. Стоит отметить, что существующий процесс наработки аналога лактапина RL2 в системе *E. Coli* и его дальнейшая очистка для получения лекарственной формы приводят к значительному снижению удельной активности препарата по сравнению с оригинальным лактапином из молока человека [3]. Тем не менее, ограниченность ресурса природного лактапина не позволяет в настоящее время надеяться на его получение в количествах, необходимых для доклинических исследований, поэтому, создание новых рекомбинантных аналогов лактапина с повышенной цитотоксической активностью, оставалась актуальной задачей.

Для поиска препаратов-партнеров, усиливающих цитотоксическое действие RL2, и для конструирования новых аналогов существовала необходимость более полно исследовать механизм гибели клеток под действием аналога лактапина, а также оценить его противоопухолевый потенциал *in vivo*.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось детальное исследование механизма клеточной гибели под действием аналога лактапина RL2, продуцируемого в бактериальных клетках, изучение его специфической противоопухолевой активности и исследование новых аналогов лактапина, продуцируемых в клетках эукариот.

В ходе исследования **решались следующие задачи:**

1. Исследование активации каскадов Bcl-2, p53 и Nf-kB при гибели опухолевых клеток под действием аналога лактапина RL2.
2. Исследование индукции аутофагии под действием аналога лактапина RL2.
3. Исследование цитотоксической активности аналога лактапина RL2 в комбинации с модуляторами аутофагии в отношении опухолевых клеток человека.
4. Анализ противоопухолевой активности аналога лактапина RL2 в моно-режиме и в комбинации с химиопрепаратами на опухолевых моделях животных и человека.
5. Исследование цитотоксической активности аналога лактапина EL1, продуцируемого в эукариотических клетках.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость.

В результате систематического исследования гибели опухолевых клеток под действием аналога лактапина RL2 впервые показано, что помимо апоптоза, RL2 на ранних этапах инкубации индуцирует аутофагию в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и MCF-7, способствующую выживанию. Впервые предложен молекулярный механизм переключения процессов RL2-индуцируемого апоптоза и аутофагии, ведущих к гибели клетки.

Показано, что модуляторы аутофагии хлорокин, Ku55933 и рапамицин усиливают цитотоксическое действие RL2 в синергетическом режиме.

Показано, что RL2 обладает противоопухолевым потенциалом *in vivo* в отношении гепатомы мыши ГА1 при различной локализации опухоли и солидной формы аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 в составе монотерапии.

Впервые показано, что комбинированная терапия мышей-опухоленосителей RL2 с циклофосфамидом и хлорокином более эффективна по сравнению с моно-режимом.

Показано, что аналог лактапина EL1, продуцируемый в эукариотических клетках, обладает более выраженным цитотоксическим эффектом по сравнению с RL2 в отношении опухолевых клеток различного гистологического происхождения.

Положения, выносимые на защиту

1. Аналог лактапина RL2 индуцирует гибель опухолевых клеток в культуре, что сопровождается активацией аутофагии с изменением соответствующих молекулярных маркеров. Аутофагия, индуцируемая в опухолевых клетках аналогом лактапина RL2, направлена на выживание опухолевой клетки.
2. Применение модуляторов аутофагии – ингибиторов хлорокина и Ku55933, а также индуктора рапамицина, усиливает цитотоксическое действие аналога лактапина RL2 в синергетическом режиме *in vitro*.
3. Аналог лактапина RL2 подавляет рост модельных опухолей различной локализации (подкожной, внутрибрюшинной, внутримышечной) *in vivo*.
4. Аналог лактапина RL2 обладает потенциалом препарата-партнера для комбинированной терапии злокачественных опухолей *in vivo*.
5. Рекомбинантный аналог лактапина EL1 в составе культуральной среды клеток-продуцентов обладает цитотоксической активностью, превышающей активность аналога лактапина RL2 на два порядка.

Публикации и апробация результатов. По результатам диссертации опубликовано 4 работы в рецензируемых журналах, получен патент РФ. Основные результаты работы были

представлены на: школе «FEBS Advance Course 360 degree Lysosome» (Измир, Турция, 2014), конференции «FEBS EMBO 2014 Conference» (Париж, Франция, 2014), школе «18th International Summer School on Immunology» (Рабац, Хорватия, 2015), российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), форуме «Биомедицина-2016» (Новосибирск, 2016), школе «Advanced lecture course on oncometabolism from conceptual knowledge to clinical applications» (Фигейра-да-Фоз, Португалия, 2017), симпозиуме «The 11th International Conference BGRS/SB (SbPCD-2018)» (Новосибирск, 2018), мультikonференции «Биотехнология - медицине будущего» (Новосибирск, 2019).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 136 страницах, включает 42 рисунка и 10 таблиц. Список литературы содержит 235 источник.

Личный вклад автора. Основная часть экспериментальной работы и анализ полученных данных выполнены лично автором. Работы с мышинными опухолевыми моделями выполнены совместно с к.б.н. Калединым В.И., к.м.н. Николиным В.П. (ИЦиГ СО РАН). Микроскопические исследования были проведены в группе микроскопического анализа ИХБФМ СО РАН Юнусовой А.Ю. Масс-спектрометрический анализ был проведен сотрудниками лаборатории проф. И.Н. Лаврик, Университет Отто фон Гюрике, г. Магдебург. Работы по культивированию клеток были выполнены совместно с н.с. ИХБФМ СО РАН к.б.н. Нуштаевой А.А. Работы по конструированию плазмиды pEL1 со встроенной последовательностью аналога лактапина выполнены сотрудниками ИМКБ СО РАН к.б.н. Горчаковым А.А., и к.б.н. Кулемзиным С.В.

ГЛАВА 1. ПОТЕНЦИАЛ АУТОФАГИИ И БЕЛКОВЫХ ПРЕПАРАТОВ В РАЗРАБОТКЕ ПОДХОДОВ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1 Потенциал белковых препаратов в борьбе с онкологическими заболеваниями: преимущества и ограничения

Рак является одним из самых тяжелых заболеваний в наши дни. Общепринятые химиотерапевтические методы с использованием небелковых препаратов остаются одними из основных способов лечения, что не всегда является эффективным из-за серьезных побочных эффектов, влияющих на нормальные клетки, а также развития устойчивости раковых клеток к химиопрепаратам. Сложившаяся ситуация требует разработки новых терапевтических препаратов для борьбы с онкологическими заболеваниями. Препараты белковой природы могут поступать в организм не только экзогенно, но и синтезироваться в виде трансгенов при использовании генно-терапевтических подходов. Белковые препараты с избирательной специфичностью действия в отношении опухолевых клеток приобретают все большую популярность в медицине, поскольку они обладают низкой общей токсичностью, высокой способностью к проникновению в ткани, а также легкостью в модификации [4]. Наибольшее число противоопухолевых препаратов белковой природы относятся к группе иммунопрепаратов, как например антитела и цитокины. Использование препаратов на основе антител, неспецифических иммуностимуляторов и других соединений, влияющих на противоопухолевый иммунный ответ, является на данный момент распространенной практикой [5]. За последнее десятилетие число белковых препаратов на фармакологическом рынке значительно выросло, что характеризует подобные препараты, как весьма перспективные лекарственные средства [4].

1.1.1 Цитокины

Цитокины и белковые молекулы с иммуномодулирующими свойствами могут быть вспомогательными препаратами при проведении химиотерапии, что усиливает противоопухолевый ответ. Интерферон альфа (IFN-а) является первым белковым препаратом, который показал свою эффективность при лечении онкологических заболеваний; этот препарат одобрен Агентством по надзору за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США (FDA) для терапии различных типов лейкозов, лимфом, рака почки и меланомы [5]. Противоопухолевая иммунотерапия с применением цитокинов, таких, как ИЛ-2,

IFN α и ФНО α к настоящему времени является основой при лечении меланомы, рака почки, волосатоклеточного лейкоза (Таблица 1), а потенциально противоопухолевыми средствами могут стать IL-12, IL-15 и IL-21 [6].

Таблица 1. Препараты на основе цитокинов при терапии онкозаболеваний.

Препарат	нозологии, получившие одобрение FDA для терапии данным препаратом	Коммерческое название	Дата выдачи разрешения на клиническое применение	Ссылка
IL-2	Метастатическая карцинома почки, метастатическая меланома	Альдеслейки, Пролейкин	5.05.1992	[7]
Слитый белок IL-2 с дифтерийным токсином	Т-клеточная лимфома кожи	Денилейкин Дефтитокс, Онтак	5.02.1999	[5]
IFN- α 2a	Волосатоклеточная лейкемия, саркома Капоши, хроническая миелогенная лейкемия, меланома, фолликулярная лимфома, почечно-клеточная карцинома	Роферон-А	-	[8]
IFN- α 2b	Волосатоклеточная лейкемия, саркома Капоши, неходжинская лимфома, меланома	Интрон А	4.06.1986	[7]

1.1.1.1. Интерфероны

В настоящее время интерфероны являются широко используемыми цитокинами для противораковой терапии хронической лейкемии, лимфомы, карциномы мочевого пузыря, меланомы и карциномы почки [9]. Интерфероны (IFNs) являются гликопротеинами, принадлежащими к семейству цитокинов, которые секретируются практически всеми типами клеток. Существуют интерфероны трех типов: I (α , β , κ , ω , ϵ), II (γ), III (λ 1, λ 2, λ 3) [10]. Интерфероны обладают противовирусной, иммуномодулирующей и противоопухолевой активностью. Противоопухолевый эффект интерферонов в большей степени характерен для интерферонов класса альфа (IFN- α 2a, IFN- α 2b) [11]. Будучи одним из ключевых регуляторов врожденного иммунитета, IFN α воздействует не только на опухолевые клетки, но и на клетки

иммунной системы, что обуславливает токсический эффект и как следствие ограничивает применение IFN α в клинике [12].

Было показано, что обработка клеток трижды негативного РМЖ *in vitro* препаратом IFN β , приводит к остановке эпителиально-мезенхимального перехода, подавлением миграции клеток, снижением способности к образованию опухолевых сфер и приобретению эпителиоподобной морфологии, что свидетельствует о снижении способности к метастазированию, и, следовательно, к потенциальному снижению возможности образования отдаленных опухолевых очагов и рецидива [13]. Экспрессия IFN β в опухолевых клетках в качестве трансгена значительно затормаживает рост опухоли. В экспериментах *in vivo* на мышцах с карциномой легкого Льюис было показано, что объем первичного опухолевого узла у мышечей с имплантированными клетками, несущими IFN β в качестве трансгена, происходит 4-х кратное торможение роста опухолевого узла по сравнению с опухолью, не экспрессирующей IFN β , а объем отдаленных метастатических узлов был в 17 раз меньше [14]. Также было показано, что IFN β обладает более выраженным антиангиогенным и антипролиферативным эффектом по сравнению с IFN α на мышцах с ксенографтами меланомы человека [9]. На данный момент известно, что IFN β прошел клинические испытания в Японии на пациентах с меланомой и применяется там в качестве адъювантной и поддерживающей терапии [15–17].

Терапевтическое применение IFN γ в первую очередь связано с системными аутоиммунными заболеваниями, а в терапии онкологических заболеваний IFN γ играет двойственную роль. Так, например, в качестве терапевтического средства в испытаниях использовали рекомбинантный IFN γ (rIFN- γ), для которого было показано проявление антипролиферативных, антиангиогенных и проапоптотических свойства в отношении онкотрансформированных клеток. Тем не менее, на группах пациентов с хронической миелогенной лейкемией, с карциномой мочевого пузыря, колоректальным раком, раком яичников и меланомой rIFN- γ действовал неоднозначно. В большинстве этих испытаний не было обнаружено выраженного положительного эффекта, и, более того, терапия rIFN- γ пациентов с меланомой привела к ухудшению показателей по сравнению с контрольной группой [15–17]. В настоящее время появляется все больше доказательств того, что IFN- γ может в большей степени играть про-туморогенную роль. Было показано, что экспрессия IFN γ опухолевыми клетками связана с развитием более агрессивного фенотипа меланомы. В настоящее время IFN- γ не входит в перечень препаратов, одобренных FDA для лечения онкологических заболеваний, но одобрен для терапии остеопетроза и хронической гранулематозной болезни.

При исследовании цитотоксической и противоопухолевой активности белков IFN λ в экспериментах *in vitro* было показано, что широкий диапазон клеточных линий злокачественных опухолей проявляет чувствительность к IFN λ , и среди них линии карциномы мочевого пузыря, шейки матки, прямой и толстой кишки, печени, кожи, гортани, легких, пищевода, а также клетки глиобластомы и остеосаркомы (Таблица 2).

Таблица 2. Клеточные линии человека, чувствительные к IFN- λ .

Тип опухоли	Клеточная линия	Ссылки
Рак мочевого пузыря	T24/83	[18]
Лимфома Беркитта	Raji	[19]
Рак шейки матки	HeLa S3	[20]
Колоректальный рак	HCT116	[20–22]
Глиобластома	LN229, LN319	[18]
Гепатоцеллюлярная карцинома	HepG2, Huh-7	[23; 24]
Нейроэндокринная карцинома поджелудочной железы	BON1	[25]
Гепатома	PEB8	[26]
Кератиноцитарная карцинома	HaCaT	[27]
Карцинома гортани	Hep2C	[18]
Карцинома легкого	A549	[20]
Меланома	1106 MEL, A375, F01	[28]
Карцинома пищевода	T.Tn, TE-2, TE-4, TE-10, TE-12, YES-2, YES-4, YES-5	[29]
Остеосаркома	MG63	[18]

Было показано, что IFN λ индуцирует гибель по типу апоптоза при обработке клеточных линий рака прямой и толстой кишки, пищевода и меланомы [12]. В экспериментах на мышах с трансплантированными клетками меланомы, было показано, что клетки, гиперэкспрессирующие IFN λ в виде трансгена, не формировали метастазы в легких и росли медленнее клеток без экспрессии IFN λ [30]. При клиническом применении IFN λ дает значительно меньший противоопухолевый эффект по сравнению с IFN α/β , поэтому его применение в терапии онкологических заболеваний в моно-режиме ограничено. Предполагается, что поскольку экспрессия рецептора IFN λ невелика, терапия IFN λ будет давать меньше побочных эффектов по сравнению с IFN α/β , и IFN λ будет более эффективен в составе комбинированной терапии [12].

1.1.1.2 Интерлейкин-2

Препарат рекомбинантного интерлейкина-2 (IL-2) - альдеслейкин (пролейкин) - одобрен FDA для применения при метастатическом раке почки и метастатической меланоме. IL2 является сигнальной молекулой, продуцируемой некоторыми типами Т-клеток, способной стимулировать рост и активацию Т- и В-клеток, что способствует развитию противоопухолевого иммунного ответа. С другой стороны, связывание IL2 с рецептором IL-2R активирует регуляторные Т-клетки (Tregs), которые ослабляют иммунный ответ. Поэтому, альдеслейкин представляет собой генно-инженерный вариант IL-2v, не способный связываться с рецепторами IL-2R и активировать Tregs. Другой препарат на основе IL-2 - денилейкин (Дифтитокс), представляет собой слитый белок из фрагмента дифтерийного токсина и последовательности IL-2, который взаимодействует с поверхностным рецептором IL-2R. После связывания с рецептором препарат проникает в регуляторные Т-клетки посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, далее каталитический домен дифтерийного токсина из образованных подкисленных везикул высвобождает в цитозоль АДФ-рибозилтрансферазу, которая переносит АДФ-рибозу от никотинамидадениннуклеотида (NAD) на фактор элонгации-2, что приводит к ингибированию синтеза белка в клетке, и в результате приводит к апоптозу Tregs. Этот препарат одобрен FDA для лечения Т-клеточной лимфомы кожи [5; 31]. Современным вариантом терапевтической формы IL2 также является слитый белок SEA-IL2v – представляющий собой альдеслейкин с высокоаффинным моноклональным антителом к карциноэмбриональному антигену (SEA). Такой модифицированный IL2 показал высокую активность в отношении SEA-положительных опухолей в комбинации с другими иммунопрепаратами – трастузумабом, цетуксимабом и ингибиторами PDL1 [32].

1.1.1.3 Фактор некроза опухоли α

Фактор некроза опухоли α (TNF α) является многофункциональным цитокином с молекулярной массой 26 кДа и играет важную роль во врожденном иммунитете, воспалительных реакциях, процессах апоптоза и выживания клетки [33]. Было обнаружено, что сыворотка крови мышей, зараженных эндотоксином, индуцирует обширный геморрагический некроз опухоли при инъекции мышам-опухоленосителям, поэтому выделенный из сыворотки цитокин, ответственный за развитие некроза, получил название фактора некроза опухоли [34]. Несмотря на то, что в названии отражена противоопухолевая функция TNF α , он применяется для лечения не только опухолевых, но и широкого спектра других заболеваний. Как противоопухолевое средство в настоящее время TNF α используют для лечения прогрессирующих сарком, метастатических меланом и других неоперабельных

опухолей конечностей вне зависимости от гистологического происхождения для предотвращения ампутации [35].

Основными клетками, синтезирующими TNF α , являются активированные макрофаги, T-клетки и NK-клетки. Незначительная экспрессия TNF α детектируется в фибробластах, клетках гладкой мускулатуры и опухолевых клетках. Синтезируется TNF α в виде связанного с мембраной предшественника, активация которого происходит в результате протеолиза под действием TNF α -конвертирующего фермента TACE (tumor necrosis factor alpha-converting enzyme) [36].

Действие TNF α на клетки-мишени происходит при связывании с рецепторами - TNFR-1 и TNFR-2. Рецептор TNFR-1 (p55) экспрессируется во всех типах клеток, а TNFR-2 (p75) преимущественно в клетках иммунной системы. Основное отличие рецепторов обусловлено присутствием в структуре TNFR-1 домена смерти DD (death domain) [37]. TNFR-1 является важным членом семейства рецепторов смерти, который способен индуцировать апоптотическую клеточную гибель [38]. Кроме участия в индукции апоптоза, TNFR1 также способен участвовать в передаче сигнала выживания клетки, но регуляция запуска одного из вариантов развития событий - выживание или гибель – до сих пор изучена недостаточно. Неправильная работа сигнальной системы TNF α может привести к патологическому обострению многих хронических воспалительных процессов.

Рекомбинантный фактор некроза опухоли человека обладает способностью индуцировать апоптоз эндотелиальных клеток [35]. Показано, что кровеносные сосуды опухоли являются основной мишенью rTNF α и разрушаются под его действием селективно. Развитие опухоли зависит от ее кровоснабжения, которое обеспечивается ангиогенными факторами, секретируемыми самими опухолевыми клетками, поэтому использование препарата, который способен разрушать сосуды внутри опухоли, может иметь терапевтическое значение, достоинством которого является наличие противоопухолевого (антиангиогенного) действия к широкому спектру опухолей [39].

На рисунке 1 представлена схема сигнальных взаимодействий TNF α и рецептора TNFR1. Внутриклеточная часть рецептора TNFR1 содержит домены смерти DD, с которыми связываются адаптерные молекулы. При связывании гомотримера TNF α с TNFR1, рецептор TNFR1 также тримеризуется, вследствие чего происходит ослабление связей между доменами DD самого рецептора и доменами DD адаптерной молекулы сайленсера домена смерти SODD, и SODD высвобождается из комплекса с рецептором [40]. После этого, со свободными доменами DD рецептора могут взаимодействовать адаптерные молекулы: рецептор 1 фактора некроза опухоли-связанный домен смерти TRADD (tumor necrosis factor receptor type-1-associated death domain protein), RIP (receptor-interacting protein), рецептор фактора некроза

опухоли-связанный фактор 2 - TRAF-2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2) и апоптотический антиген 1 -связанный белок с доменом смерти FADD (Fas-associated protein with death domain) [41].

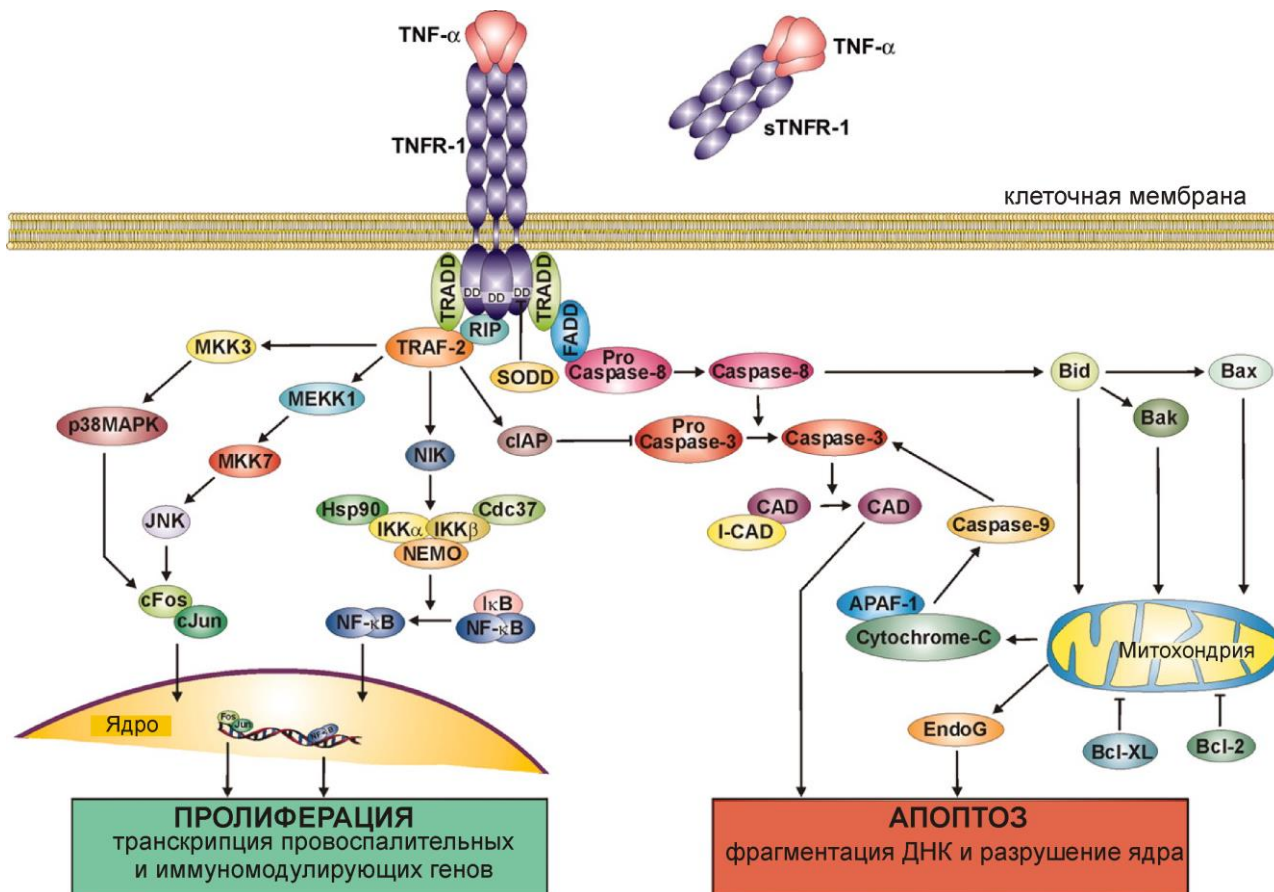


Рис. 1. Сигнальные взаимодействия TNF α и рецептора TNFR1 [38].

Адапторные молекулы способны привлекать в эффекторный комплекс ключевые молекулы апоптотического сигнального каскада: FADD связывает инициаторную прокаспазу-8, в результате чего происходит созревание каспазы-8. Активированная каспаза-8 инициирует каскад протеолитических реакций с вовлечением митохондриальных факторов (Bid, BAX, Bak) и эффекторных каспаз, в результате чего происходит апоптотическая гибель клетки. Завершающей стадией в каскаде реакций является фрагментация ДНК под действием активированных эндонуклеаз, таких как EndoG [42]

Возможен альтернативный вариант развития событий с участием рецептора TNFR-1 - запуск реакций, ведущих не к гибели клетки, а к ее выживанию и делению. В этом случае в комплекс вовлекается молекула TRAF-2 и инициирует TNF α опосредованную активацию митоген-активируемой киназы MAPK и киназы cJun (JNK), в результате чего происходит активация факторов транскрипции cFos/cJun [43]. Взаимодействие адаптерных молекул

TRAF-2 и RIP ведет к активации киназы NIK (NF-κB-активирующая киназа), которая, фосфорилирует ядерный фактор NF-κB и связывает ингибитор κB-киназного комплекса (IKK), а далее транскрипционные факторы cFos и NF-κB активируют транскрипцию антиапоптотических, пролиферативных, иммуномодулирующих генов и генов воспаления, результатом чего является выживание и/или деление клетки.

В настоящее время разработан менее травматичный для сосудов метод лечения препаратом TNFα - метод изолированной перфузии конечностей (ИПК). Метод ИПК препаратом TNFα оказался безопасным и эффективным при лечении саркомы мягких тканей и меланомы верхних и нижних конечностей. Разовая ИПК TNFα совместно с алкилирующим агентом мелфаланом обеспечивала высокую терапевтическую эффективность. ИПК TNFα и мелфаланом оказывает цитотоксическое действие на эндотелий сосудов опухоли, следствием чего является выраженный противоопухолевый эффект [35]. Показано, что применение TNFα улучшает проникновение мелфалана в опухолевые клетки, и, таким образом, реализуется таргетное воздействие на опухоль. В случае моно-терапии введение TNFα в течение 24 часов в режиме ИПК позволяет достигнуть концентрации от 200 до 545 мкг/м². При этом, дозы от 350 до 400 мкг/м² оказывают слабый эффект на опухоль. Поэтому, на многих опухолевых моделях, включая ксенографты опухолей человека, было показано, что применение только TNFα не достаточно для подавления роста опухоли. Заметное подавление роста опухоли у животных может быть достигнуто только при комбинационной терапии TNFα с другими химио- или иммунопрепаратами, например с IFN-γ [35].

1.1.1.4. Цитокин семейства фактора некроза опухоли, вызывающий апоптоз – TRAIL

TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) индуцирует апоптоз различных опухолевых клеток *in vitro*. Этот белок относится к цитокинам семейства фактора некроза опухоли и единственный среди всех представителей семейства содержит остаток цистеина - Cys230, обеспечивающий образование тримера TRAIL. Образованный таким образом тример взаимодействует с тримерами рецепторов смерти, вызывая апоптоз клеток-мишеней [44].

К настоящему времени у человека идентифицировано пять рецепторов TRAIL: TRAIL-R1, TRAIL-R2, TRAIL-3, TRAIL-R4 и растворимый рецептор остеопротегерин (OPG). В TRAIL-опосредованную активацию апоптоза вовлечены рецепторы TRAIL-R1 и TRAIL-R2. Рецепторы TRAIL-R4 и OPG содержат цитоплазматические домены DD, непосредственно передающие сигнал к апоптозу. Индукция апоптоза под действием TRAIL в клетках, экспрессирующих рецепторы TRAIL-R4 и OPG, проходит как по рецепторному пути с

активацией каспаз-8, -10, и -3, так и по митохондриальному пути, сопровождающемуся активацией каспаз-8, -10, -3 и -9 (Рис. 2) [42; 45–47].

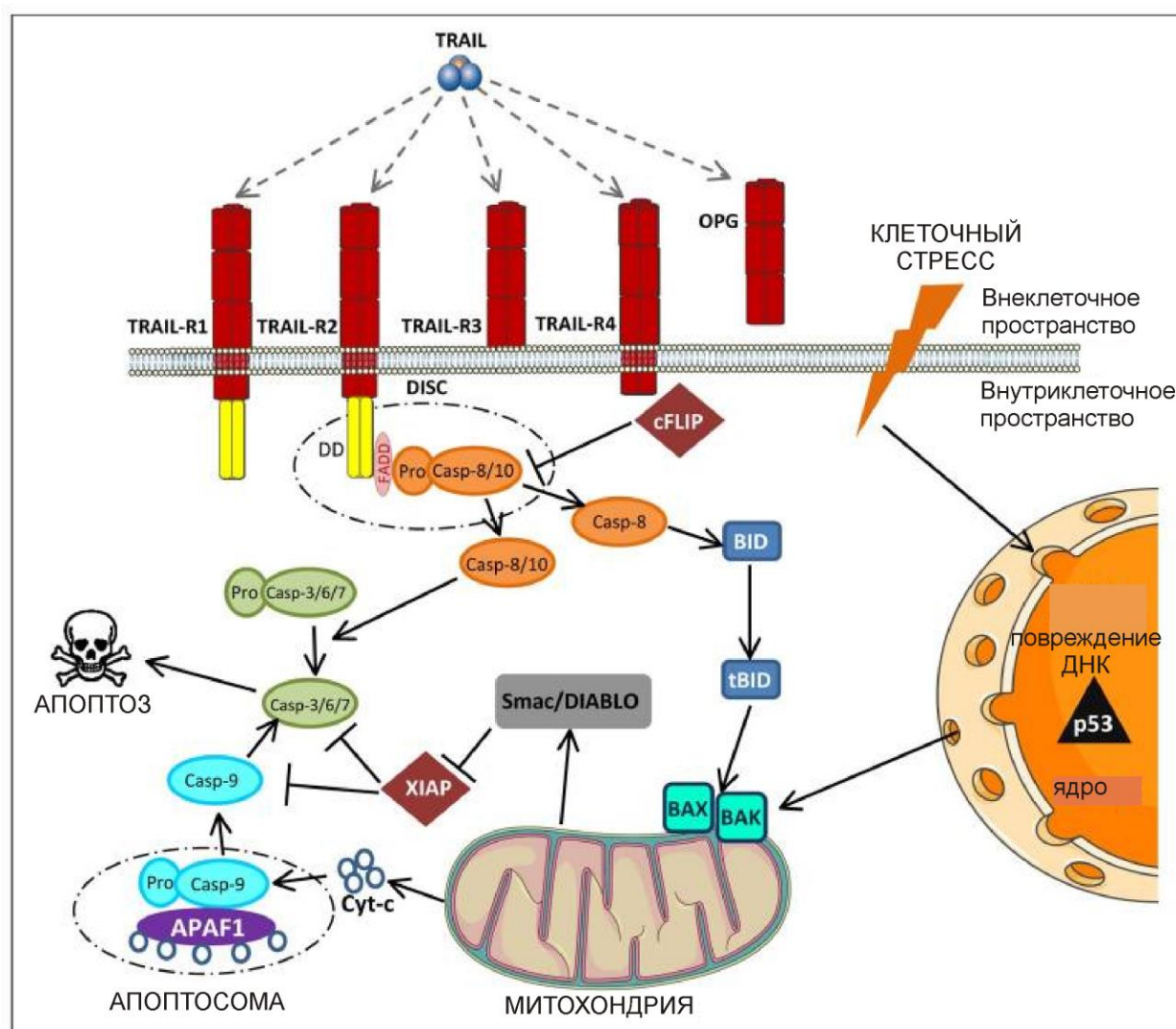


Рис. 2. Индукция апоптоза под действием TRAIL в клетках, экспрессирующих рецепторы DR4 и DR5 [48].

Активация под действием TRAIL рецепторного апоптотического сигнального каскада происходит при связывании TRAIL с указанными рецепторами на поверхности клеток. Связанные комплексы рецептор-лиганд тримеризуются и внутриклеточная область рецепторов становится доступной для связывания с адаптером FADD. Далее, с FADD взаимодействует прокаспаза-8 или -10, в результате чего формируется комплекс DISC, в котором каспазы активируются путем автопротеолиза. Активированная каспаза-8 или -10 расщепляет эффекторные прокаспазы-3 и -7, которые, в свою очередь, осуществляют протеолиз своих субстратов [49].

Внутренний (митохондриальный) апоптотический каскад запускается в ответ на повреждение ДНК, гипоксию или гиперэкспрессию онкогенов. Этот путь включает

активацию проапоптотических белков семейства Bcl-2 – BAX и BAK – или подавление экспрессии антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-xL. Активация BAX и/или BAK приводит к изменению потенциала мембраны митохондрий и выходу из митохондрий цитохрома С. В цитозоле цитохром С связывается с APAF-1, формируя апоптосому, которая активирует каспазу-9. Активированная инициаторная каспаза-9 активирует эффекторные каспазы -3, -6 или -7, которые реализуют апоптоз. Следует отметить, что в одних клетках активации каспазы-8 достаточно для прямой активации остальных каспаз, тогда как в других клетках количество активированной каспазы-8 или -10 не достаточно для активации эффекторных каспаз, и для реализации программы апоптоза необходим механизм, усиливающий действие каспазы-8 [50].

Важной особенностью цитокина TRAIL является низкая цитотоксичность по отношению к здоровым клеткам организма. Низкая цитотоксичность может быть связана с различным уровнем экспрессии либо генов рецепторов смерти TRAIL-R4 и OPG, либо генов ингибиторов апоптоза в здоровых клетках организма [51].

Эндогенный TRAIL - высокоэффективный и специфичный опухолевый супрессор. К недостаткам TRAIL для применения в клинической практике можно отнести короткий период полувыведения, проблемы с адресной доставкой, существование устойчивых опухолей и высокая коммерческая стоимость. Одним из возможных подходов использования TRAIL в противораковой терапии является индукция эндогенного синтеза TRAIL. Была выдвинута гипотеза, что регуляция экспрессии TRAIL низкомолекулярными индукторами может привести к увеличению его периода полувыведения и повышению локальной концентрации внутри опухолевого микроокружения, к улучшению биодоступности и фармакокинетических характеристик TRAIL и, как следствие, к усилению противоопухолевого эффекта. Таким индуктором является низкомолекулярное соединение TIC10, которое индуцирует p53-независимую транскрипцию TRAIL. Показано, что TIC10 обеспечивает устойчивую регуляцию выработки TRAIL в опухолевых и здоровых клетках [52].

На сегодняшний день известно, что, несмотря на показанную ранее способность специфически индуцировать апоптоз в опухолевых клетках, многие раковые клеточные культуры оказались устойчивы к действию TRAIL, а использованная в клинических испытаниях растворимая форма TRAIL оказалась нестабильной, вследствие чего противоопухолевый эффект был слабый [53]. Поэтому существует необходимость в повышении стабильности, например, за счет пегилирования и биодоставки, например, в липосомах или в составе наночастиц, а также в препарате-партнере для комбинированной терапии с показанным синергетическим эффектом. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* на клетках рака прямой кишки человека и рака простаты человека показано, что при применении

инкапсулированных в микросферы поли(лактин-ко-гликолевая кислоты) комбинации доксорубина и пегилированного TRAIL наблюдался выраженный цитотоксический и противоопухолевый эффект по сравнению с применением микросфер только с одним из препаратов [54]. Показано, что липосомы помогают преодолевать гемато-энцефалический барьер и усиливать биодоступность препарата. В экспериментах *in vitro* при комбинированной обработке клеток глиобластомы человека и клеток немелкоклеточного рака легкого человека липосомами с TRAIL и доксорубицином показан выраженный синергетический эффект по сравнению с моно-обработкой. В экспериментах *in vivo* на животных с трансплантированной глиобластомой человека и немелкоклеточным раком легкого человека противоопухолевый эффект при комбинированной терапии липосомами с TRAIL и доксорубицином был высоким при относительно низком токсическом эффекте [55; 56]. Применение наночастиц с присоединенными терапевтическими молекулами позволяет сделать противоопухолевое средство более стабильным, а повышенная проницаемость кровеносных и лимфатических сосудов в опухоли позволяет наночастицам совместно с терапевтическим средством лучше накапливаться именно в опухоли. В экспериментах *in vitro*, показано, что обработка клеток рака поджелудочной железы наночастицами, нагруженными комбинацией сывороточного альбумина человека, трансферрина, TRAIL и доксорубина приводила к значительному синергетическому эффекту по сравнению с моно-обработкой [57].

Таким образом, TRAIL является перспективным противоопухолевым препаратом при комбинированной терапии с доксорубицином.

1.1.1.5. «HAMLET» - препарат модифицированного α -лактальбумина и подобные ему комплексы.

В 1995 году профессор Сванборг (Svanborg) с коллегами обнаружили, что белок α -лактальбумин с неполным фолдингом в комплексе с олеиновой кислотой вызывает гибель трансформированных клеток, но не влияет на нормальные клетки [58]. Этот комплекс был назван HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumor cells). Белок α -лактальбумин (14.2 kDa) является кислым металлопротеином, связывающим кальций. Этот белок присутствует в молоке практически каждого млекопитающего и участвует в синтезе лактозы в период лактации. Олеиновая кислота является слаборастворимой мононенасыщенной омега-9 жирной кислотой, она помогает поддерживать необходимую конформационную структуру α -лактальбумина и определяет цитотоксическую активность HAMLET. Функция α -лактальбумина в комплексе HAMLET заключается в том, чтобы сохранять олеиновую кислоту в растворимой форме и транспортировать по кровеносному руслу [59]. Изменения, индуцированные в опухолевых клетках препаратом HAMLET, связанные с клеточной

гибелью, а именно конденсация ядра, появление выпуклых участков цитоплазматической мембраны в связи с отслоением цитоскелета от мембраны (блеббинг), фрагментация ДНК, деполяризация митохондриальной мембраны с высвобождением цитохрома С, активация каспаз 3- и 9- и экспозиция фосфатидилсерина на внешнюю сторону цитоплазматической мембраны позволяют заключить, что гибель клеток происходит по митохондриальному пути апоптоза. Было показано, что HAMLET проникая внутрь клетки, взаимодействует с лизосомами и митохондриями, меняет их проницаемость, ингибирует протеасомы, проникает в ядро, индуцирует модификацию хроматина, связывая белки гистонового октамера. Гистоны H2В, H3, H4 являются мишенями HAMLET в ядре, и в результате связывания необратимо нарушается структура нуклеосом, что, в конечном итоге, приводит к клеточной гибели. Было обнаружено, что HAMLET напрямую связывается с большим количеством нуклеотид-связывающих белков, включающих 3 АТФазы, 24 белка семейства ГТФаз Ras и 111 киназ. HAMLET действует, как ингибитор киназ, снижая активность 476-ти киназ в клетках карциномы легкого в среднем на 69% [60].

В доклинических исследованиях было показано, что HAMLET обладает противоопухолевым эффектом в отношении ксенографтов рака толстой кишки, мочевого пузыря и глиобластомы [61–63]. В клинических испытаниях было показано, что у всех пациентов с доброкачественной опухолью эпителиального происхождения – папилломой, резистентной к стандартной терапии, при ежедневной терапии HAMLET в течение 3-х недель объем опухолей снижался более чем на 75%. В течение 2-х последующих лет у 83% пациентов, получавших терапию HAMLET, наблюдалось полное исчезновение всех опухолевых очагов [64]. В клинических испытаниях на пациентах с раком мочевого пузыря, было показано, что при введении HAMLET непосредственно в пораженный орган уже после 2-х часов наблюдалась быстрая гибель некоторого количества злокачественных клеток, которые далее выводились с мочой и имели признаки апоптоза. При последующем хирургическом удалении опухоли было обнаружено уменьшение ее размеров, а гистологический анализ выявил клетки, погибшие путем апоптоза [65; 66].

Известны и другие HAMLET-подобные комплексы, которые оказывают цитотоксическое действие на опухолевые клетки, например, белково-липидный комплекс BAMLLET (bovine α -lactalbumin made lethal to tumor cells), представляющий собой комплекс лизоцима с олеиновой кислотой, комплексы олеиновой кислоты с α - и β -лактальбумином верблюда или парвальбумином щуки, что говорит о том, что характерной чертой белков с неполным фолдингом является способность образовывать комплексы с жирными кислотами [67].

В последующих экспериментах *in vitro* на культуре клеток рака шейки матки HeLa и рака легкого A-549 было показано, что BAMLET приводил к гибели 90-95% клеток, и 70% нетрансформированных клеток яичника китайского хомячка. Достоверных отличий между действием BAMLET и просто олеиновой кислоты обнаружено не было [68]. В экспериментах *in vitro* на 11-ти культурах мезотелиомы человека показан специфический цитотоксический эффект BAMLET в условиях, при которых нетрансформированные мезотелиальные клетки сохраняли жизнеспособность. Также клетки мезотелиомы, устойчивые к действию цисплатина, пеметрекседа, винорелбина и гемецетабина проявляли чувствительность к BAMLET [69]. На настоящий момент в литературных источниках исследований противоопухолевой активности BAMLET *in vivo* не описано.

1.1.1. Апоптин

Апоптин или белок VP3 вируса инфекционной анемии кур массой 13.6 кДа, содержащий 121 аминокислотный остаток, обладает избирательной цитотоксической активностью в отношении трансформированных клеток птиц и млекопитающих, не воздействуя на нормальные здоровые клетки [70]. Функционально апоптин является медиатором атрофии лимфоидной ткани и тяжелой анемии при инфицировании кур этим вирусом. При инфицировании опухолевых клеток *in vitro*, апоптин проникает в ядро и индуцирует гибель клеток, а в нормальных клетках апоптин эффективно расщепляется в цитоплазме [71]. Было показано, что апоптин проявляет цитотоксическую активность в отношении более 70-ти линий опухолевых клеток человека: меланомы, гепатомы, лимфомы, холангиокарциномы, рака толстой кишки, рака молочной железы, рака легкого и других [72; 73].

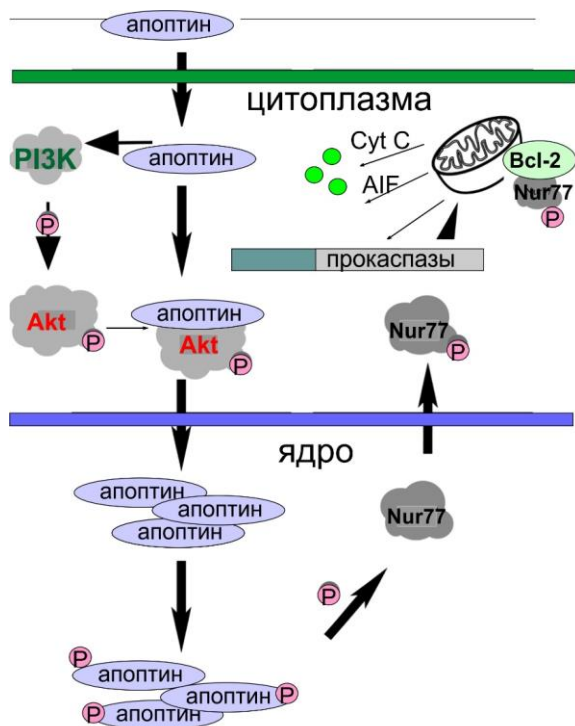


Рис. 3. Гипотетический механизм активации клеточной гибели под действием апоптоина. Адаптировано по [74].

Апоптин индуцирует опухолеспецифичный p53-независимый апоптоз, следовательно, может быть эффективен в отношении клеток с низкой экспрессией p53 или с экспрессией мутантного варианта p53. Гибель клеток под действием апоптоина происходит по митохондриальному пути: апоптин инициирует высвобождение цитохрома С с последующей активацией каспазы-9 (Рис. 3). Было показано, что опухолевые клетки с низким уровнем апоптоз-инициирующих белков митохондриального пути клеточной гибели Araf-1 и BAX резистентны к апоптоину. Апоптин фосфорилирует киназы PI3K и Akt при транслокации апоптоина совместно с Akt в ядро опухолевой клетки, Akt активирует проапоптотический белок семейства Bcl-2 – Bad, что приводит к индукции апоптоза по митохондриальному пути. Также апоптин запускает сигнал клеточной гибели стимуляцией миграции орфанного стероидного рецептора Nur77 в опухолевой клетке из ядра в цитоплазму, где Nur77, связываясь с белком Bcl-2 на поверхности мембраны митохондрии, меняет конформацию Bcl-2, что приводит к потере митохондриального мембранного потенциала с высвобождением цитохрома С и активацией каспазы-3 с последующим апоптозом [75–77].

В доклинических испытаниях было показано, что апоптин усиливает противоопухолевый эффект при комбинированной терапии с интерлейкином-18, без усиления побочных эффектов [78]. Для таргетной доставки апоптоина в клетки гепатокарциномы в моделях ксенографтов, были разработаны конструкции в составе векторов аденовируса,

модифицированного вируса птичьей оспы, онколитических вирусов и другие. Инъекция апоптин-продуцирующих вирусных векторов значительно тормозила рост гепатомы [71; 79]. Помимо генно-инженерных систем, также были получены различные белковые терапевтические средства, содержащие в своем составе апоптин. Полученный в прокариотической системе апоптин сохраняет своих опухолеспецифические цитотоксические свойства. Микроинъекции в цитоплазму нормальных клеток человека рекомбинантного слитого с апоптином мальтозо-связывающего белка (MBP) не приводили к каким-либо признакам апоптотической гибели и слитый белок не проникал в ядро. А при введении MBP-апоптина в опухолевые клетки, наблюдалось накопление апоптина в ядре с последующей индукцией апоптоза [71]. Другие слитые белки, такие как апоптин, слитый с транс-активатором транскрипции (TAT-апоптин), с доменом белковой трансдукции 4 (PTD4-апоптин) или с супероксид дисмутазой (hC-SOD3-апоптин) вызывали подобный цитотоксический эффект [64; 73–76].

Рекомбинантный апоптин - белок rAoptin содержит в своем составе фолиевую кислоту для эффективного проникновения в опухолевые клетки посредством рецепторов к фолиевой кислоте, и глутатион-S-трансферазу, которая обеспечивает стабильность белка и облегчает процесс его получения. Показано, что rAoptin обладает выраженным цитотоксическим и противоопухолевым эффектом в отношении клеток опухоли молочной железы человека - MDA-MB-231 и MCF-7 *in vitro* и моделях ксенографтов *in vivo* [75]. Продемонстрированная активность rAoptin позволяет рассматривать его как многообещающий препарат для терапии рака молочной железы.

1.1.6. Моноклональные антитела

Семейство моноклональных антител, мишенью которых являются рецепторы на внешней поверхности опухолевой клетки, постоянно пополняется. Препараты на основе антител в борьбе с раковыми клетками используют механизмы, задействующие компоненты иммунной системы пациента и меняющие передачу сигнальных путей, что приводит к торможению роста опухоли. Антитела, конъюгированные с противоопухолевыми препаратами, обладают специфичностью антител и доставляют химиотерапевтические лекарственные средства или радионуклиды точно к опухолевой клетке [5].

1.1.6.1. Неконъюгированные антитела

Наиболее распространенными противоопухолевыми препаратами на основе антител являются неконъюгированные антитела, которые проявляют цитотоксическую активность сами по себе. Они специфично связываются с определенными антигенами на поверхности опухолевой клетки и запускают каскад реакций, приводящий к клеточной гибели. Существует ряд перспективных противоопухолевых лекарственных средств, на основе неконъюгированных антител (Таблица 3) [5].

Таблица 3. Препараты на основе неконъюгированных антител при терапии различных онкозаболеваний.

Название	Тип	Мишень	Тип онкологического заболевания, для которого FDA одобрил применение препарата	Центрирование	Ссылки на клинические исследования
Алемтузумаб (Campath; Genzyme)	Гуманизированные IgG1	CD52	ХЛЛ*	Прямая индукция апоптоза и комплемент-зависимая цитотоксическая активность	[80]
Ритуксимаб (Mabthera; Roche)	Химерные IgG1 антитела человека и мыши	CD20	CD20-положительная НХЛ*, ХЛЛ* и фолликулярная CD20-положительная НХЛ*, ранее не подвергавшаяся терапии	Антитело-зависимая цитотоксическая активность, прямая индукция апоптоза и комплемент-зависимая цитотоксическая активность	[81–84]
Трастузумаб (Herceptin; Genentech)	Гуманизированные IgG1	HER2	Адьювантная терапия РМЖ*, метастатический РМЖ* с гиперэкспрессией HER2, метастатический рак желудка	Ингибирование HER2 сигнального пути и антитело-зависимая цитотоксическая активность	[85–96]
Бевацизумаб (Avastin; Genentech/Roche)	Гуманизированные IgG1	VEGF	МКРР*, НПКРЛ*, НКМЛР*, глиобластома, метастатический рак почки	Ингибирование васкулярного эндотелиального фактора роста	[97–104]
Цетуксимаб (Erbix; Bristol-Myers Squibb)	Химерные IgG1 антитела человека	EGFR	Опухоли головы и шеи, МКРР*	Ингибирование EGFR сигнального пути и антитело-	[105–112]

	и мыши			зависимая цитотоксическая активность	
Панитумумаб (Vectibix; Amgen)	Человеческие IgG2	EGFR	Ранее подвергавшийся терапии экспрессирующий EGFR МКРР*	Ингибирование EGFR сигнального пути	[113–115]
Матузумаб ¹ (EMD 72000)	Гуманизированные IgG1	EGFR	EGFR-положительный рак яичников, первичный перитонеальный рак	Ингибирование EGFR сигнального пути и антителозависимая цитотоксическая активность	[116]
Нимотузума ² (h-R3)	Гуманизированные IgG1	EGFR	Опухоли головы и шеи, глиома, назофарингеальный рак	Ингибирование EGFR	[117]
Ореговомаб ¹ (OvaRex)	Мышиные антитела	CA125	Рак яичников	Формирует иммунный комплекс с опухолевым антигеном 125 (CD125) рака яичника и индуцирует гуморальный и клеточный ответы против CD125	[118; 119]
Пертузумаб (Perjeta)	Рекомбинантные гуманизированные моноклональные антитела	HER2	HER2-положительный метастатический РМЖ*	Блокировка HER2 сигнального пути	[120–122]
Ипилимумаб (Yervoy; Bristol-Myers Squibb)	Человеческие IgG1	CTLA4	Неоперабельная или метастатическая меланома	Ингибирование CTLA4 (CD152) сигнального пути	[123; 124]

1-одобрение FDA не получено; 2 - одобрены в Азии, Южной Америке и Африке.

* ХЛЛ - хронический лимфоцитарный лейкоз, НХЛ – неходжинская лимфома, РМЖ – рак молочной железы, МКРР - метастатический колоректальный рак, НПКЛР – неплоскоклеточный рак легкого, НМКРЛ – немелкоклеточный рак легкого.

1.1.6.2. Конъюгированные антитела

Использование антител, конъюгированных с химиопрепаратами, является перспективным методом, совмещающим в себе специфичность моноклональных антител и цитотоксическую активность классических химиопрепаратов, применимых при терапии различных типов рака. Такой подход позволяет повысить эффективность лечения и снизить токсический эффект. Данный вид терапевтических средств состоит из трех компонентов: антитела, цитотоксического агента и линкера. Антитело должно проявлять специфичность к опухолевому рецептору, гиперэкспрессированному на поверхности опухолевой клетки, или к ее окружению. Антитело также может иметь противоопухолевые свойства само по себе. Цитотоксический агент должен быть эффективен в отношении опухолевых клеток и должен сохранять эту активность после присоединения к антителу с помощью линкера, также он должен быть устойчивым к трансмембранным насосам, выкачивающим из клетки чужеродные вещества. Такими свойствами обладают, например, химиотерапевтические агенты ауристин, мэйтанзин и их аналоги [125]. Линкер соединяет антитело с цитотоксическим агентом и его структура может влиять на растворимость, стабильность и высвобождение цитотоксического препарата при попадании в клетку-мишень. Первым подобным препаратом, одобренным для клинического применения, стал трастузумаб-эмтанзин (Т-DM1) [126; 127]. Трастузумаб представляет собой моноклональное антитело к рецептору эпидермального фактора роста 2 (HER2), используемое при терапии агрессивных метастатических субтипов рака молочной железы с гиперэкспрессией HER2. Эмтанзин (DM1) является производным мэйтанзина, ингибитора полимеризации тубулина, который блокирует организацию веретена деления и индуцирует апоптоз. В клинических испытаниях препарат Т-DM1 показал увеличение общей продолжительности жизни пациентов от 4 до 7 месяцев, и вызывал меньше побочных эффектов по сравнению со свободным мэйтанзином [128]. Множество подобных конструкций сейчас находятся в стадии клинических испытаний, такие как сакитузумаб-говитекан (конъюгат анти-Trop2 антитела и SN-38, активного метаболита иринотекана) и глембатумумаб-ведотин (конъюгат антитела к трансмембранному гликопротеину NMB и монометил ауристината Е) [128]. Значительным препятствием для широкого использования препаратов на основе моноклональных антител является их крайне высокая стоимость [129]. Так в 2017 средняя стоимость полного курса лечения Трастузумабом составляла 156.159\$ США для одного пациента с раком молочной железы и 314.419\$ США для пациента с раком желудка [130].

1.2. Аутофагия, как мишень для противоопухолевой терапии

В настоящее время стало понятно, что гибель клетки как программируемого типа, так и непрограммируемого типа может реализовываться различными путями. Поскольку борьба с онкологическими заболеваниями на клеточном уровне имеет конечной целью уничтожение опухолевых клеток, разнообразие противоопухолевых препаратов выявило большое количество как типических, так и атипических типов гибели клетки (Рис. 4). К I типу программируемой клеточной гибели относится апоптоз, для которого характерны конденсация цитоплазмы и ядра, фрагментация ДНК, активация инициаторных и эффекторных каспаз, распад клетки на апоптотические тельца, окруженные цитоплазматической мембраной, с последующим фагоцитозом макрофагами без развития воспалительной реакции. Аутофагия относится к программируемому II-му типу клеточной гибели.



Рис. 4. Типические и атипические варианты гибели клеток

Аутофагия это катаболический процесс, в результате которого клеточные органеллы и белки перерабатываются в аутофаголизосомах для восстановления гомеостаза и клеточного метаболизма. Аутофагию разделяют на три подтипа: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-зависимая аутофагия (ШЗА) (Рис. 5), каждый из которых имеет свои особенности.

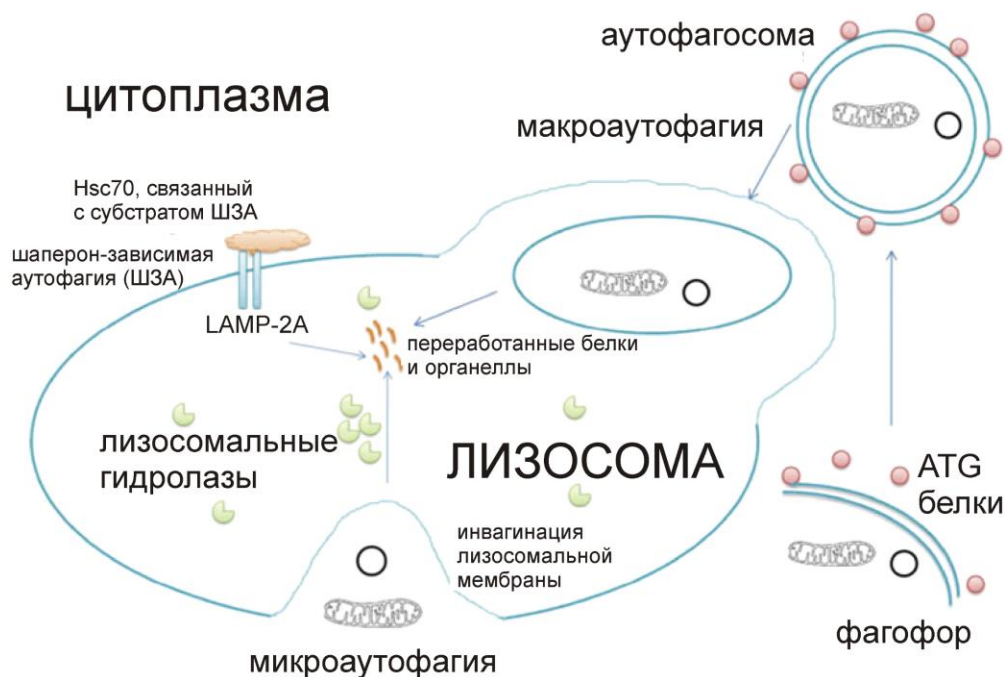


Рис. 5. Виды аутофагии [131].

1.2.1. Макроаутофагия

Макроаутофагия – это высококонсервативный процесс, преобладающий при удалении поврежденных органелл или неиспользованных белков с помощью аутофагосомы, которая окружает двойной цитозольной мембраной помеченные для уничтожения органеллы. Позднее аутофагосомы сливаются с лизосомами, образуя аутофаголизосомы, ферменты которых в процессе анаболизма разрушают нежелательные органеллы или белки. Полученные продукты распада затем выпускаются обратно в цитозоль для рециркуляции в стрессовых условиях.

На рисунках 6 и 7 представлены схемы взаимодействия белков при аутофагии. Основными ранними маркерами макроаутофагии являются белки Beclin 1, ATG5, ATG12 [132]. Beclin 1 относится к семейству фосфатидилиназитол-3 киназ класса III (PI3K) и имеет домен ВНЗ, позволяющий образовывать комплексы с белками Bcl-2 или Bcl-x1, и в такой форме он не участвует в активации аутофагии [133; 134]. После того, как Beclin 1 диссоциирует из комплекса с Bcl-2, он становится способным инициировать формирование аутофагосом и инвагинацию мембраны. Beclin 1 взаимодействует с рядом кофакторов: ATG14L, UVRAG, Bif-1, Rubicon, Ambra1, HMGB1, nPIST, VMP1, SLAM, IP₃R, PINK и сурвивином для регуляции фосфатидил-инозитол-3 киназы (Vsp-34), что способствует образованию корового комплекса Beclin 1/Vsp-34/Vsp15, который активирует аутофагию [135; 136]. С другой стороны, в результате взаимодействия ATG5 с ATG12 происходит активация аутофагии при их связывания с ассоциированным с микротрубочками белком 1 легкой цепи 3

(LC3-I), в результате чего происходит процессинг LC3-I до LC3-II [132]. LC3-I диффундирует в цитоплазме, тогда как в форме процессированного белка LC3-II прикрепляется к двойной мембране фагофора для формирования аутофагосомы [131]. Белок p62, также известный как SQSTM1, является убиквитин-связывающим белком, который действует, как аутофагический адаптер. Белок p62 через С-концевой UBA домен взаимодействует напрямую с отработанными или поврежденными убиквитинилированными белками и реже с неубиквитинилированными. Также p62 взаимодействует с белками семейства ATG8, в частности с LC3-II, прикрепленными с помощью своей липидной части к внутренней стороне мембраны растущего фагофора. Гомополимеризация p62 упрощает со-агрегацию p62 с перерабатываемыми компонентами. Полимеризация также способствует тесному взаимодействию p62-связанных компонентов с липидированными ATG8 белками на внутренней поверхности мембраны фагофора [137].

Ингибирование аутофагии приводит к увеличению уровня p62 [138]. Появление LC3-II на внутренней мембране фагофора является сигналом для формирования аутофагосомы. Аутофагосомы сливаются с лизосомами и образуют аутофаголизосомы, в которых переваривается исходное содержимое аутофагосом. Следовательно, белок LC3 в форме LC3-II является значимым маркером макроаутофагии. В конечном итоге, связывание комплекса ATG5/ATG12 с LC3 приводит к элонгации и смыканию двойной мембраны, как это представлено на Рис. 7, 8 [131].

Инициация макроаутофагии происходит через стрессовые сигналы от мишени рапамицина млекопитающих комплекса 1 (mTORC1), который активирует киназу ULK1 (ATG1), и который затем формирует комплекс с ATG13 и ATG17. После того, как активность mTORC1 ингибирована, формируется аутофагосома.

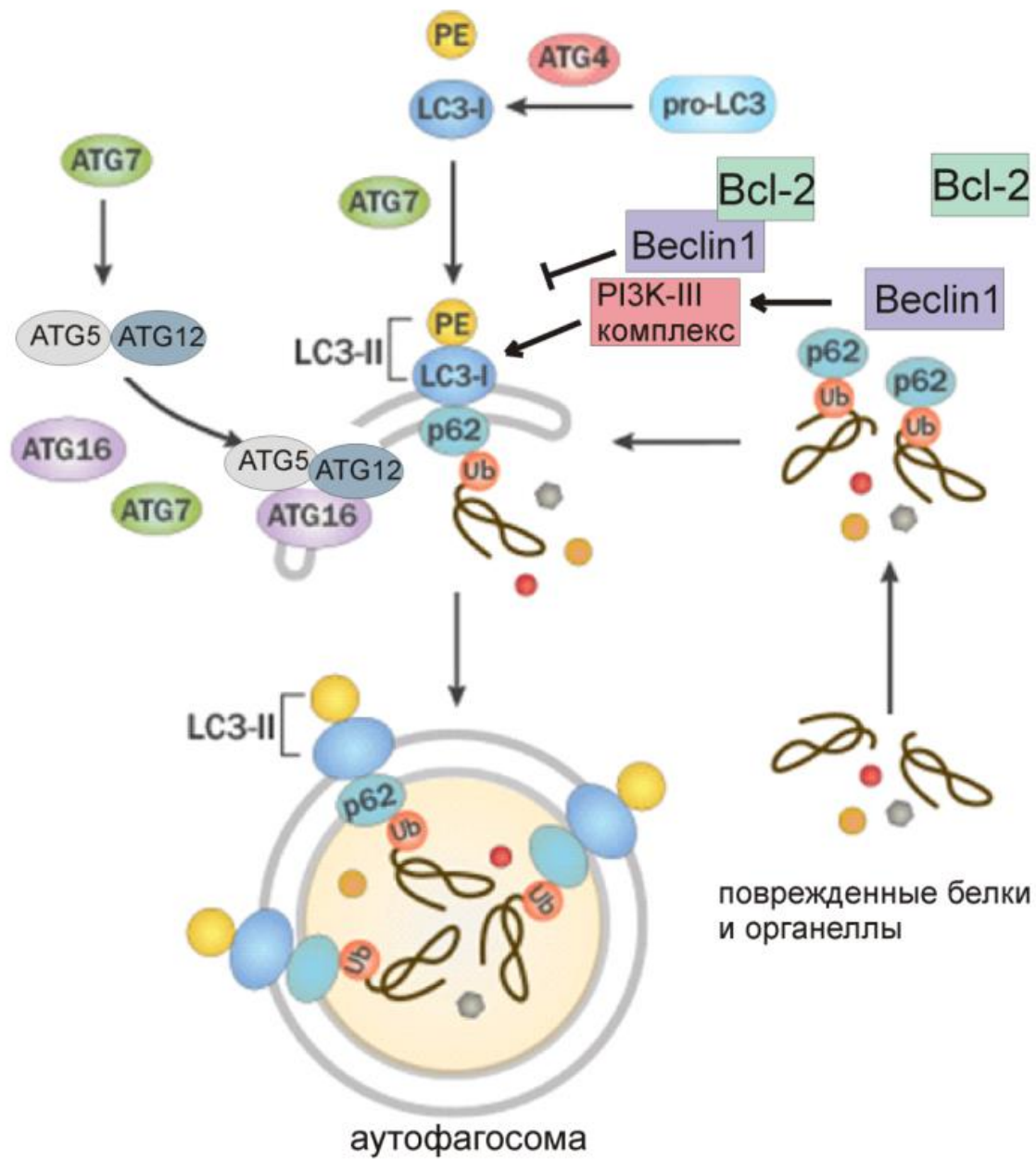


Рис. 6. Схема взаимодействия и модификаций белков аутофагии [65].

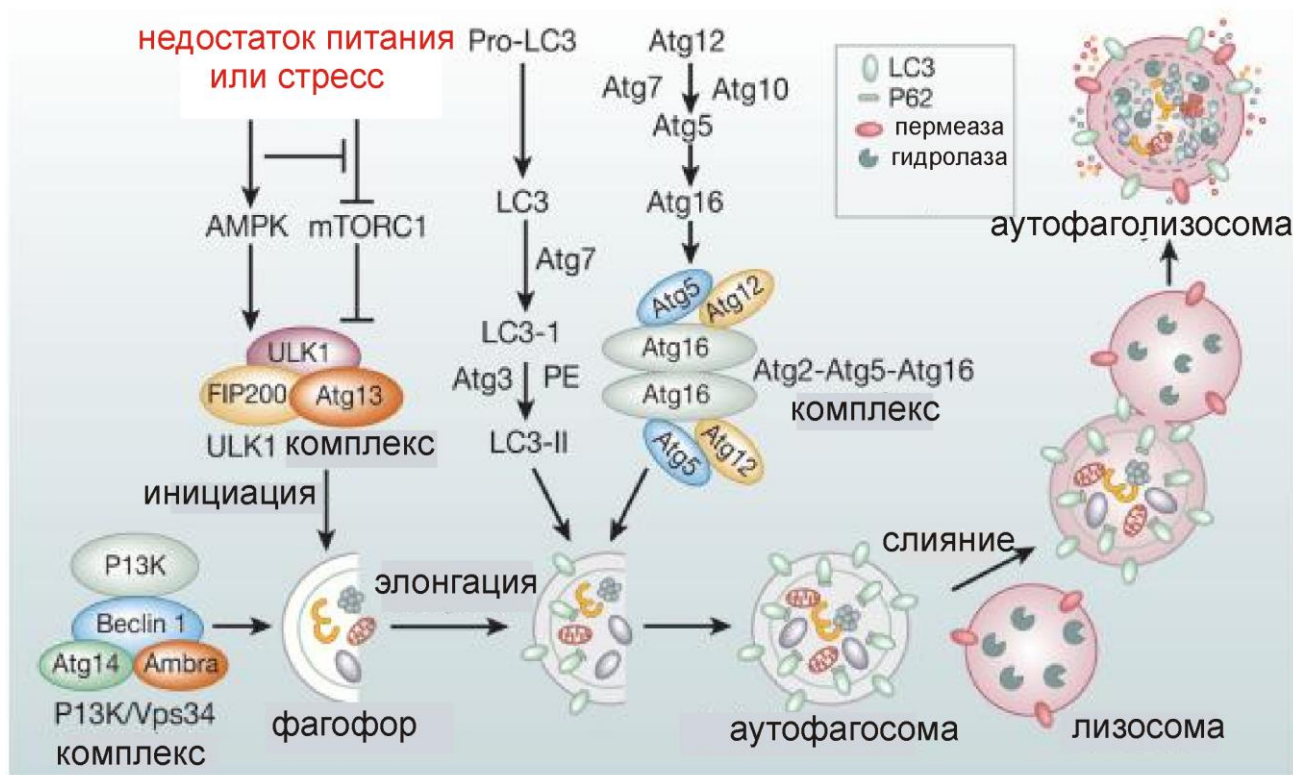


Рис. 7. Участие белков аутофагии на разных стадиях формирования аутофаголизосомы [140].

При слиянии аутофагосом с лизосомами, деградация их содержимого происходит под действием большого количества разных лизосомальных протеаз, включая катепсины [141]. Структурными морфологическими маркерами аутофагии служат мультивезикулярные тельца и мультивезикулярные лизосомы.

1.2.2. Микроаутофагия

Микроаутофагия – это неселективный лизосомальный путь деградации, где путем инвагинации формируется ранняя эндосома, созревает до поздней эндосомы, далее с помощью протонных насосов происходит накопление H^+ протонов внутри поздней эндосомы, что ведет к сдвигу рН до 5 – 4.5 и созреванию лизосомальных ферментов, а сама эндосома становится лизосомой и интернализует компоненты цитозоля (Рис. 8). Результатом является почкование везикулы в просвет вакуоли и ее последующая деградация. Также возможно прямое поглощение органелл вакуолью. Микроаутофагия может быть дополнительно подразделена на микромиитофагию, микронуклеофагию и микропексофагию. При микроаутофагии компоненты для переработки доставляются прямо в просвет везикулы, где они подвергаются деградации.



Рис. 8. Стадии созревания лизосомы. Адаптировано по [142].

В некоторых случаях для селективной доставки требуется участие белка hsc70, как и в случае шаперон-зависимой аутофагии. При микроаутофагии перерабатываются как растворимые цитозольные компоненты, так и внеклеточные субстраты.

1.2.3. Шаперон-зависимая аутофагия

Шаперон-зависимая аутофагия (ШЗА) является высокоселективным типом аутофагии по отношению к белкам цитозоля, а механизм доставки таких белков к лизосомам является специфичным для данного типа аутофагии (Рис. 5). ШЗА необходима для базового поддержания клеточного гомеостаза. Для того, чтобы белок деградировал по пути ШЗА, в нем должен присутствовать пентапептидный мотив KFERQ. Этот мотив узнается цитозольным шапероном, белком теплового шока 70 (hsc70), который направляет субстрат к поверхности лизосомы. Шаперон hsc70 способствует рефолдингу белка, а также переработке некоторых органелл. Он играет ключевую роль в процессах роста клетки, дифференцировке и клеточной гибели. Также hsc70 отвечает за стабильность связанного с лизосомой мембранного белка типа 2а (LAMP-2А) и за образование им различных комплексов в лизосомальной мембране. Эти комплексы взаимодействуют с различными субстратами с пентапептидным мотивом для поглощения лизосомой. Следовательно, LAMP-2А изменяет активность ШЗА на трансмембранном уровне, действуя как рецептор белковых субстратов ШЗА для

последующей транслокации их в лизосому [131]. Переработка субстрата в лизосоме происходит аналогично переработке при микроаутофагии.

1.2.4. Роль аутофагии в опухолевой прогрессии

Аутофагия может способствовать как выживанию клеток в условиях голодания путем переработки поврежденных митохондрий и других органелл, белковых агрегатов с неправильным фолдингом и внутриклеточных патогенов, так и клеточной гибели при чрезмерной активации процесса переваривания клеточных компонентов и деградации основных структур [143]. Из литературных источников известно, что при обширных повреждениях в случае, если апоптоз невозможен, клетка погибает по пути аутофагии [144].

В процессе развития опухоли аутофагия играет двойную роль. Переработка поврежденных белков и органелл по пути аутофагии может предотвратить образование опухоли на начальной стадии. В то же время, было показано, что аутофагия помогает выжить уже образовавшейся опухоли в условиях голодания и гипоксии в ходе опухолевой прогрессии [145]. Таким образом, аутофагия играет двойную роль в канцерогенезе и модуляция аутофагии является очень важной при лечении онкологических заболеваний.

Белковый комплекс mTORC1 регулирует рост эукариотических клеток и органов, а гиперактивация этого пути отмечена при развитии многих заболеваний, таких как онкологические заболевания и диабет. Появление в клетке большого количества питательных веществ, например аминокислот, направляет mTORC1 к сайту его активации – поверхности лизосом, что в свою очередь способствует усилению роста клеток. mTOR является атипичной серин-треонин киназой, состоящей из двух различных комплексов mTORC1 и mTORC2. Активность комплекса mTORC2 обеспечивает пролиферацию и выживание клетки, а комплекс mTORC1 отвечает за клеточный рост. При стимуляции клеточного роста mTORC1 взаимодействует с нижестоящими эффекторами для согласованной индукции анаболических программ в клетке, таких как трансляция мРНК и репрессия катаболических процессов, таких как аутофагия, что предотвращает несбалансированные циклы синтеза и деградации макромолекул.

Аутофагия также задействована в формировании противоопухолевого иммунного ответа на разных стадиях. Во-первых, аутофагия может действовать на начальной стадии развития опухоли и регулировать иммунный ответ на стадии инициации опухоли [146; 147]. Во-вторых, на последующих стадиях опухолевой прогрессии аутофагия является модулятором протеома и секретома опухолевых клеток, что позволяет опухолевым клеткам взаимодействовать с соседними клетками в опухолевой среде. И наконец, аутофагия

может также быть механизмом внутренней резистентности к иммунной системе, что позволяет опухолевым клеткам избежать иммунного надзора. Известно, что в зависимости от обстоятельств и типа стресса (например, гипоксия, химиотерапия) аутофагия может способствовать как противоопухолевому ответу, так и препятствовать ему [148].

Ингибирование аутофагии может супрессировать онкогенез, не только влияя на клеточный метаболизм и пролиферацию, но и повышая противоопухолевый иммунный ответ. Недавние исследования показали, что у аутофагии есть комплексная роль в онкогенезе и развитии опухоли в зависимости от стадии заболевания [149]. Было показано, что инактивация Atg-5-зависимой аутофагии (макроаутофагии) повышала количество опухолевых очагов и способствовала переходу от гиперплазии к аденоме в мышинной модели рака легкого с мутацией KrasG12D. Однако инактивация аутофагии на поздней стадии заболевания останавливала переход от аденомы к аденокарциномы. Также было показано, что инактивация аутофагии в пневмоцитах, несущих мутацию Kras, способствовала локальному распространению Tregs, которые контролируют инициацию рака легкого. Это исследование установило причинно-следственные отношения между ингибированием аутофагии и активацией иммуносупрессивных Tregs [149].

В работе [148] было продемонстрировано, что ингибирование аутофагии может затруднять онкогенез, повышая противоопухолевый иммунный ответ. Было показано, что CD8-положительные Т-клетки были основными эффекторами противоопухолевого иммунного ответа, опосредованного ингибированием аутофагии [148].

1.2.4.2. Роль аутофагии в канцерогенезе.

Известно, что аутофагия является важным фактором онкогенеза. Аутофагия влияет на инициацию, прогрессирование и ответную реакцию опухолевых клеток на терапию, таким образом, аутофагия – это одно из ключевых звеньев в развитии опухоли. Избыточная активация аутофагии приводит к клеточной гибели, разрушая жизненно важные клеточные структуры – мембрану, цитоскелет, ядро [150]. Аутофагия может также влиять на исход лечения определенными химиотерапевтическими агентами, обеспечивая выживание опухолевых клеток и их метастазирование, предотвращая апоптоз и развивая устойчивость к препаратам. На модели грызунов и на моделях ксенографтов опухолей человека показано, что мутации в генах каскада аутофагии - Beclin 1, UVRAG и ATG могут стать причиной развития опухолей [151]. У человека мутации в гене Beclin 1 обнаружены при раке молочной железы, яичника, простаты; мутации в гене PARK2 – при раке легкого и мозга; мутации в генах UVRAG, PARK2 – при раке желудочно-кишечного тракта [152].

1.2.4.3. Аутофагия при терапии злокачественных опухолей

Несмотря на значительный прогресс в лечении опухолевых заболеваний многие опухоли проявляют низкую чувствительность и/или устойчивость к терапии. В настоящее время большинство из используемых методов лечения, за исключением хирургии, основаны на химических методах воздействия (химиотерапия), биологических (гормоны, антитела) и физических (радиотерапия). Большинство из них индуцируют клеточный стресс и, таким образом, приводят к активации аутофагии, что впоследствии может привести к развитию устойчивости к терапии. Лечение, направленное на ингибирование аутофагии, по-видимому, может сенсibilизировать опухолевые клетки к противораковым агентам. С другой стороны, лекарственно-индуцированная аутофагия может быть полезной и выгодной для пациента, поскольку может ограничивать пролиферацию опухолевых клеток и индуцировать их гибель [153]. Показано, что развитие аутофагии под действием противоопухолевых препаратов, генерирующих активные формы кислорода, как, например, 2-метоксиэстрадиол, буфалин, карносол, циклопирокс, колистин, кукурбитацин В, дихлорацетат, дигидроартемисинин, ресвератрол, ротенон, салиномицин и урсоловая кислота, ведет к гибели клеток. Было показано, что активные формы кислорода могут модулировать различные сигнальные пути, приводящие к индукции аутофагии. Перекись водорода, поступающая из митохондрий, индуцирует клеточную гибель по типу аутофагии в злокачественных клетках глиомы в ответ на лечение сангвинарином [154]. Более того, было показано, что лечение клеток злокачественной глиомы куркумином индуцирует цитотоксическую аутофагию, зависящую от активных форм кислорода, по пути активации Par-4 (супрессорный белок апоптозного ответа рака простаты-4) и опухолевого супрессора липидного церамида [155; 156].

1.2.5. Модуляторы аутофагии для индукции гибели опухолевых клеток и терапии онкологических заболеваний

Поскольку роль аутофагии в опухолевой прогрессии подтверждена, для повышения эффективности противоопухолевой терапии было предложено использовать ингибиторы и индукторы аутофагии в процессе лечения онкологических заболеваний.

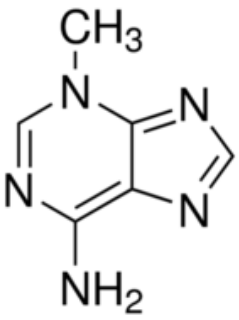
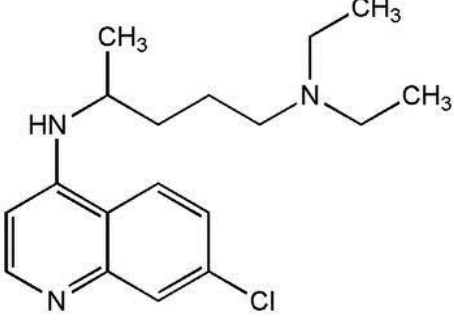
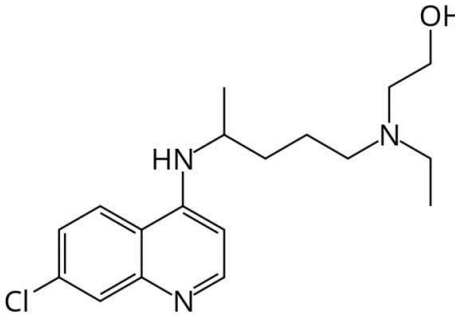
1.2.5.1. Ингибиторы аутофагии

Использование ингибиторов аутофагии актуально для опухолевых клеток, в которых наблюдается высокий базовый уровень аутофагии, способствующий выживанию при метаболическом стрессе. Использование ингибиторов аутофагии в комбинации с

радиотерапией или химиотерапией привлекает все большее внимание как возможность улучшения эффективности лечения [157]. В ряде доклинических исследований было показано, что подавление аутофагии вело к повышению эффективности химиотерапевтических средств как *in vitro*, так и *in vivo* [158].

Наиболее широко используемыми ингибиторами аутофагии являются 3-метиладенин (ЗМА), хлорокин (СQ) и гидроксихлорокин (НСQ) (Таблица 4).

Таблица 4. Структурные формулы 3-метиладенина (ЗМА), хлорокина (СQ) и гидроксихлорокина (НСQ).

ЗМА	СQ	НСQ
		

1.2.5.1.1 3-Метиладенин в комбинации с различными препаратами

ЗМА является ингибитором фосфоиназитол-3-киназ (PI3K) I-го и III-го класса. ЗМА влияет на формирование аутофагосом, подавляя аутофагию [159]. ЗМА был впервые открыт в процессе скрининга пуриноподобных веществ в гепатоцитах, полученных от крыс, подвергнутых голоданию, и является наиболее широко используемым ингибитором аутофагии *in vitro*. Было показано, что ЗМА не только подавляет аутофагию, индуцированную голоданием, но и может также способствовать аутофагии, когда он вводится в условиях избыточного питания при длительном периоде лечения. Этот неспецифический ингибитор PI3K имеет низкую эффективность, из-за чего требуется его использование в концентрации 10 мМ и выше для предотвращения аутофагии *in vitro*. При таких высоких концентрациях ЗМА может также ингибировать и другие киназы - p38MAPK или c-Jun киназу. Известно, что ЗМА влияет на различные клеточные процессы, такие как метаболизм гликогена, лизосомное подкисление, эндоцитоз и изменение проницаемости митохондрий. Также ЗМА характеризуется плохой растворимостью. Для того, чтобы повысить растворимость и эффективность ЗМА, была синтезирована библиотека из 29 производных и были

обнаружены три новых производных ЗМА с повышенной растворимостью [160]. Показано ингибирующее действие этих веществ на аутофагию, но их эффективность показана для концентраций 18-670 μM [161]. Поэтому, применение ЗМА и его производных может быть усилено комбинированием с другими препаратами.

1.2.5.1.2. ЗМА в комбинации с IL-24

IL-24 является уникальным членом семейства генов IL-10, который демонстрирует почти повсеместную специфическую противоопухолевую активность. Одним из наиболее значимых свойств IL-24 является специфическое торможение роста опухоли и индукция апоптоза в различных опухолевых клетках, без вреда для нормальных клеток. В экспериментах на мышах было показано, что IL-24 в комбинации с ЗМА наиболее эффективно подавлял рост карциномы полости рта в сравнении с контрольной группой, получавшей только IL-24, и группой, получавшей только ЗМА [158].

1.2.5.1.3. ЗМА в комбинации с препаратами платины

Цисплатин (цис-диаминодихлорплатина) является одним из самых широко используемых химиотерапевтических препаратов, однако побочные эффекты и развитие резистентности к препарату ограничивает его применение. В комбинации с цисплатином ЗМА увеличивает стресс эндоплазматического ретикула в клетках глиобластомы U251, что ведет к увеличению процента апоптотических клеток и высокой цитотоксической активности комбинации [162].

Оксалиплатин широко используется в адьювантной и паллиативной терапии рака прямой кишки, однако раковые клетки в процессе терапии приобретают устойчивость к этому препарату [163]. Поэтому, новые стратегии лечения, направленные на предотвращение развития такой устойчивости, являются актуальной задачей. Было показано, что применение ЗМА в комбинации с оксалиплатином позволяет преодолеть такую устойчивость. Выявлено, что ЗМА усиливает оксалиплатин-индуцированный апоптоз клеток карциномы прямой кишки мыши СТ26. Методом МТТ-теста было показано, что при обработке ЗМА в комбинации с оксалиплатином выживает 27.53% опухолевых клеток, против 82.86% и 53.24% при монообработке ЗМА и оксалиплатином соответственно. Методом проточной цитометрии было показано, что ЗМА в комбинации с оксалиплатином увеличивал процент апоптотических клеток до 86.81%, по сравнению с моно-режимом оксалиплатина (39.48%). На

молекулярном уровне было показано, что ЗМА увеличивал экспрессию про-апоптотических белков: ВАХ, р53 и каспазы-3 [164].

1.2.5.2. Модулятор аутофагии Ku55933

Ku55933 является специфичным ингибитором протеинкиназы АТМ, активация которой происходит в ответ на двунитевые разрывы в ДНК. Киназа АТМ запускает остановку клеточного цикла, репарацию ДНК или гибель клетки по пути апоптоза. В свою очередь, АТМ активирует киназу Akt – ключевой фермент PI3K/Akt/mTOR-сигнального пути, вовлеченного в процессы пролиферации, роста и выживания клетки [165; 166]. Ku55933, являясь ингибитором АТМ, блокирует фосфорилирование Akt в опухолевых клетках, где наблюдается аномально высокая активация Akt [167]. Поскольку фосфорилирование Akt заблокировано, комплекс mTORC1 не формируется, что приводит к индукции аутофагии [168]. Ku55933 блокирует пролиферацию опухолевых клеток, индуцируя арест клеточного цикла в фазе G1 [167]. Помимо возможности ингибировать аутофагию, для Ku55933 показана регуляция другого сигнального пути, по которому Ku55933 выступает, как индуктор аутофагии. При снижении уровня киназы АТМ происходит накопление активных форм кислорода (ROS), вследствие чего наблюдается активация TSC2 посредством активации комплекса LKB1/АМПК. Активированный TSC2 блокирует образование mTORC1, что приводит к индукции аутофагии [169].

1.2.5.3. Ингибитор аутофагии хлорокин (CQ)

Исторически хлорокин продемонстрировал высокую эффективность при лечении малярии [170], и этот препарат по сей день остается одним из базовых лекарств в этой сфере [171]. Механизм действия CQ на возбудителя малярии *Plasmodium malariae* до сих пор изучен неполностью. Однако, известно, что основной токсический эффект CQ на этого возбудителя обусловлен связыванием CQ с феррипротопорфирином IX, который является продуктом переработки гемоглобина, поступающего в пищеварительные вакуоли *Plasmodium malariae*, где накапливается CQ [172]. Феррипротопорфирин IX является токсичным для этого паразита, и он обычно выводится в виде нерастворимого полимера – гемозоина, а CQ предотвращает это выведение, тем самым индуцируя гибель *Plasmodium*. Стандартные дозы CQ для лечения и предотвращения малярии находятся в следующем диапазоне: 100 мг один раз в неделю (профилактика) и 300 мг ежедневно (лечение), максимальная доза – 5 мг/кг в день. Хотя доза

не более 10 мг/кг в день тоже безопасна, накопительная общая доза 50-100 г при долгом лечении (более 160 дней ежедневного приема 300 мг) вызывает ретинопатию. CQ в дозе свыше 20 мг/кг вызывает серьезные токсические эффекты. Минимальная летальная доза CQ при приеме внутрь составляет 86 мг/кг [173; 174].

В настоящее время более интересным свойством хлорокина является его способность ингибировать аутофагию, благодаря изменению pH лизосом, препятствуя слиянию аутофагосом с лизосомами [175; 176]. CQ является слабым основанием, он накапливается в лизосомах, повышая pH лизосом [177]. Доза CQ необходимая для ингибирования аутофагии опухолей *in vivo* еще требует исследования. Была показана возможность фармацевтического ингибирования аутофагии в раковых клетках при дозе 50 мг/кг в день на мышинной модели (Таблица 5) [178]. При этой дозе неэффективные аутофагосомы накапливаются в раковых клетках, тем самым показывая, что CQ действительно ингибирует аутофагию *in vivo*.

Таблица 5. Доза CQ для обнаружения наблюдаемых эффектов [178].

Наблюдаемые эффекты	CQ менее, чем 10 мг/мл CQ менее, чем 10 мг/кг в день	CQ более, чем 10 мг/мл CQ более, чем 10 мг/кг в день
Индукция апоптоза	-	+
Вакуолизация	+	-
Ингибирование аутофагии	-	+
Ингибирование MRP*	+	-
Забуферивание опухолевой среды	+	-
Взаимодействия с нуклеотидами	-	+
Цитотоксичность в отношении раковых стволовых клеток	+	-
Нормализация сосудистой сети	-	+
Увеличение иммунного ответа	+	-
Ингибирование иммунного ответа	+	-

*MRP – multidrug resistance protein – белок множественной лекарственной устойчивости.

Кроме того, сам CQ демонстрирует цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток. Хлорокин может проявлять токсический эффект в отношении раковых стволовых клеток при приемлемых дозах *in vivo* (Табл. 5). Следовательно, CQ может быть задействован в качестве вспомогательного вещества при лечении онкологических заболеваний, для препаратов, которые эффективны в отношении дифференцированных

раковых клеток, но не способны уничтожать раковые стволовые клетки. Также CQ повышает биодоступность противораковых препаратов [178].

1.2.5.3.1. CQ в комбинации с противоопухолевыми агентами

Поскольку для многих противоопухолевых препаратов показано синергетическое действие с CQ, его не используют в режиме монотерапии. Особенно интересно его применение в комбинированной терапии онкологических заболеваний с цитокинами, антителами и другими препаратами.

1.2.5.3.1.1. CQ в комбинации с иммуномодулирующим белком FIP-gts из *Ganoderma tsugae*

При лечении рака мочевого пузыря цисплатином, в частности, уротелиальной карциномы, часто развивается резистентность к этому препарату [179–181]. Ранее было показано, что FIP-gts, иммуномодулирующий белок из гриба трутовика вида *Ganoderma tsugae*, снижает жизнеспособность клеток рака легкого и урологических раков [131–135]. Хлорокин был протестирован как возможный препарат-партнер FIP-gts на модели опухолевых клеток, резистентных к цисплатину. Было показано, что комбинация CQ с FIP-gts, дозозависимо снижает жизнеспособность цисплатин-резистентных клеток рака мочевого пузыря линий NTUB1 и N/P на 20-40% по сравнению с монотерапией FIP-gts. Методом проточной цитометрии было показано, что комбинация CQ с FIP-gts ведет к появлению апоптотических и вторично некротических популяций клеток и ведет к снижению митохондриального потенциала в обработанных клетках. Полученные результаты позволили заключить авторам, что FIP-gts индуцирует апоптоз, а CQ усиливает его действие в клетках NTUB1 и N/P [182].

Поскольку CQ широко используется в качестве ингибитора аутофагии, был исследован его эффект на FIP-gts-индуцированную аутофагию. Показано, что CQ в комбинации с FIP-gts не влиял на уровень экспрессии инициаторного белка аутофагии Beclin1 в клетках NTUB1 и N/P. CQ в комбинации с FIP-gts повышал уровень p62 в клетках NTUB1 и не влиял на экспрессию p62 в клетках N/P. CQ усиливал FIP-gts-индуцированную активацию LC3-II в клетках NTUB1 и N/P. По изменению молекулярных маркеров апоптоза в обработанных клетках было показано, что CQ в комбинации с FIP-gts не увеличивал уровень экспрессии BAX, но увеличивал уровень экспрессии Bcl-2 в клетках N/P и усиливал отрицательную регуляцию белка сурвивина. Также было показано, что CQ в комбинации с FIP-gts не активирует PARP и каспазы-3 и -7 в клетках N/P. Данные результаты позволили заключить,

что CQ в комбинации с FIP-gts индуцируют каспаз-независимую клеточную гибель и такая комбинация препаратов является перспективным методом терапии уротелиального рака [182].

1.2.5.3.2. CQ в комбинации с 2-дезоксиглюкозой (2-DG)

Метаболизм раковых клеток отличается от метаболизма здоровых клеток. Общей чертой этого измененного метаболизма является увеличение захвата глюкозы и ферментативная переработка глюкозы в лактат. Этот феномен наблюдается даже при наличии полностью функционирующих митохондрий и носит название – “эффект Варбурга” [183]. Было показано, что ингибирование НК2-опосредованного эффекта Варбурга активирует АМПК-зависимую аутофагию, способствующую выживанию клеток рака простаты PC3 [184].

Хлорокин использовали для того, чтобы показать, что ингибирование аутофагии вызывает гибель опухолевых клеток в комбинации с ингибитором НК2-опосредованного эффекта Варбурга. Монообработка клеток PC1 препаратами 2-DG или CQ не оказывала влияния на клеточную гибель и нетрансформированных эпителиальных клеток простаты человека RWPE-1, а комбинация этих препаратов индуцировала апоптоз в опухолевых клетках PC3, но не в клетках RWPE-1. Эти результаты позволили заключить, что комбинация 2-DG и CQ специфично индуцирует гибель клеток рака простаты, но не нормальных эпителиальных клеток простаты. Эта избирательность может быть обусловлена делецией *PTEN* –/*p53* в клетках рака простаты, что влияет на гексокиназа-2-опосредованный эффект Варбурга и, следовательно, указывает на важность аутофагии для клеточного выживания при ингибировании эффекта Варбурга [184].

1.2.5.3.3. CQ в комбинации с карфилзомибом

Карфилзомиб (Carfilzomib), ингибитор протеасом нового поколения, является противораковым средством при лечении множественной миеломы (ММ). Было показано, что карфилзомиб индуцирует аутофагию, способствующую выживанию, в культурах клеток миеломы MM.1S, H929 и U266. При использовании CQ для блокирования аутофагии обнаружили, что в дозе 20 мкМ и менее, CQ не вызывал значимых цитотоксических эффектов в клетках ММ. Использование CQ в дозе 20 мкМ в комбинации с карфилзомибом (5-7 нМ) значительно увеличивало количество апоптотических клеток. При использовании другого ингибитора протеасом, бортезомиба в комбинации с CQ в аналогичных дозах, не происходило увеличения числа апоптотических клеток. Противоопухолевый эффект комбинированной терапии CQ с карфилзомибом был изучен *in vivo* на мышах NU/NU с подкожно

трансплантированными клетками H929. Мыши-опухоленосители получали инъекции CQ (10 мг/кг) дважды в неделю в течение 3-х недель и карфилзомиба (0,425 мг/кг) интраперитонеально в течение 3х недель. Было показано, что CQ значительно снижал рост опухоли по сравнению с контролем, а карфилзомиб был более эффективен, чем CQ. CQ в комбинации с карфилзомибом полностью ингибировал рост опухоли и вызывал уменьшение исходных размеров опухолевого узла [185].

1.2.5.3.4. CQ в комбинации с ресвератролом

Ресвератрол (RSV) является природным полифенолом, который содержат многие продукты питания и напитки растительного происхождения, например, красное вино. RSV способен регулировать различные физиологические функции, такие как снятие воспаления и защита от нарушений сердечнососудистой системы. Эти свойства позволяют предположить, что RSV может быть многообещающим метаболическим модификатором при раке эндометрия. Действительно, были показаны противоопухолевые свойства RSV при раке эндометрия. Кроме того, было показано, что сам RSV индуцирует аутофагию и активирует Raf/MEK/ERK сигнальный каскад.

Для анализа влияния ингибирования аутофагии на гибель опухолевых клеток под действием RSV (25 μ M), использовали его комбинацию с хлорокином CQ (5 μ M). Авторы показали, что такая комбинация на 25% более цитотоксична в отношении клеток рака эндометрия Ishikawa по сравнению со свободным RSV. Методом проточной цитометрии было показано, что CQ в комбинации с RSV увеличивал количество апоптотических клеток на 22% в сравнении с RSV. Таким образом, было показано что комбинированная обработка RSV с CQ может быть перспективной комбинацией в отношении рака эндометрия [186].

1.2.5.3.5. CQ в комбинации с интерлейкином-2 (IL-2)

Терапия высокими дозами интерлейкина-2 (IL-2) оказывает стойкий противоопухолевый эффект у 5%-10% пациентов с меланомой или карциномой почки. Однако лечение часто сопровождается побочными эффектами, такими как обратимая мультиорганная дисфункция, характеризующаяся системным аутофагическим синдромом, вызванным цитокинами. Поэтому, было выдвинуто предположение, что CQ может усилить терапевтическую эффективность IL-2 и снизить его токсичность. В экспериментах на мышах, с внутривенно трансплантированными опухолевыми клетками колоректального рака MC38, характеризующимися метастазированием в печень, было показано, что CQ в комбинации с

высокими дозами IL-2 обладает большим цитотоксическим эффектом: у 90% мышей метастазы в печени не были обнаружены. Также продолжительность жизни у таких мышей была выше, чем в группах, получавших только CQ или IL-2 [187].

1.2.5.3.6. CQ в комбинации с бевацизумабом

Антиангиогенная терапия является перспективным методом лечения опухолей, поскольку приводит к деваскуляризации и гипоксии, что ограничивает рост опухоли. Бевацизумаб является препаратом, который ингибирует биологическую активность фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Показано, что CQ в комбинации с бевацизумабом значительно ингибировал рост трансплантированной глиомы GBM39, по сравнению с группами, которые получали каждый из препаратов в отдельности [188].

1.2.5.3.7. CQ в комбинации с конъюгатом трансферрина и дифтерийного токсина

Tf-CRM107 представляет собой конъюгат трансферрина и дифтерийного токсина, который избирательно уничтожает клетки, экспрессирующие высокий уровень трансферринового рецептора, такие как клетки опухоли головного мозга. Но дифтерийный токсин является токсичным для организма и вызывает такие побочные эффекты, как тромбоз и петехиальные кровоизлияния. На крысах-опухоленосителях было показано, что в группах, получавших Tf-CRM107 в комбинации с CQ, по сравнению с группой, получавших только Tf-CRM107 продолжительность жизни была выше. Также было показано, что CQ снижает интрацеребральную токсичность Tf-CRM107 [189].

1.2.5.3.8. CQ в комбинации с рапамицином

Рапамицин (Rap) является индуктором аутофагии. Было проведено исследование цитотоксической активности CQ в комбинации с Rap и различными химиопрепаратами на клетках гепатомы Huh7.5.1 и HA22T человека. Методом MTS теста было показано, что CQ в комбинации с Rap в молярном соотношении 3:1 оказывали синергетический эффект при уровне ингибирования пролиферации клеток HA22T 30-70% (CI=0.661–0.976), а при 90% был замечен незначительный антагонизм (CI=1.331). В клетках Huh7.5.1 CQ в комбинации с Rap в молярном соотношении 3:1 оказывали аддитивный эффект (CI=0.998) при 30% уровне ингибирования и антагонизм при 50%, 70% и 90% уровне ингибирования (CI=1.16, 1.47, и 2.49 соответственно). Также был исследован цитотоксический эффект комбинации трех препаратов: CQ, Rap и препаратов: винорелбина, доцетаксела, цисплатина, 5-фторурацила и гемцитабина. Было показано, что комбинация трех препаратов лучше подавляет рост

опухолевых клеток, чем комбинация двух препаратов. Комбинация CQ, Rap и винорелбина показала наибольший синергизм. Методом проточной цитометрии было показано, что процент аутофагических клеток Huh7.5.1 был выше на 45% по сравнению с контролем, а в клетках, обработанных комбинацией CQ, Rap и винорелбина на 15% выше по сравнению с клетками, обработанными CQ и Rap. В то же время процент апоптотических клеток HA22T был значительно выше, чем в клетках Huh7.5.1. Прирост апоптотических клеток HA22T, обработанных CQ, Rap и винорелбином по сравнению с контролем составил 50%, а по сравнению с клетками, обработанными CQ и Rap составил 15%. При исследовании подавления роста опухоли комбинацией препаратов CQ, Rap и винорелбином у мышей линии NOD/SCID с трансплантированными клетками Huh7.5.1 было показано, что курс интраперитонеальных инъекций CQ (50 мг/кг) ежедневно в течение 5 дней, Rap (50 мг/кг) ежедневно в течение 5 дней, и винорелбина (5 мг/кг) по аналогичной схеме еженедельно приводил к более эффективному подавлению роста опухоли у животных, получавших комбинацию CQ, Rap и винорелбина, чем у животных, получавших комбинацию только из двух препаратов - Rap и винорелбина или CQ и винорелбина или Rap и CQ [190].

1.2.5.3.9. CQ в комбинации с ВКМ120

Высокоспецифичный ингибитор класса IPI3K NVP-ВКМ120 (ВКМ120) находится на I-ой стадии клинических испытаний. Предыдущие доклинические испытания показали, что ВКМ120 подавляет пролиферацию и индуцирует апоптоз в клетках немелкоклеточного рака легкого NSCLC и подавляет рост опухоли в моделях ксенографтов. Также было показано, что ВКМ120 индуцирует аутофагию. Чтобы понять, какой тип аутофагии – способствующий выживанию или способствующий гибели клеток индуцируется препаратом ВКМ120, использовали ингибитор аутофагии CQ. Для этого измеряли процент апоптотических клеток линий немелкоклеточного рака легкого человека, которые характеризуются резистентностью к ВКМ120, но реагируют на него с появлением процессированной формы LC3. Было показано, что ВКМ120 в комбинации с CQ оказывал более выраженный цитотоксический эффект, чем каждый из препаратов в отдельности на панели линий клеток немелкоклеточного рака легкого - A549, H1838, H157, H460 и H23, что говорит о том, что ингибирование аутофагии усиливает цитотоксический эффект ВКМ120. Методом проточной цитометрии было показано, что процент апоптотических клеток, при обработке ВКМ120 в комбинации с CQ в клетках линии A549 составил 37.7% по сравнению с 6.8% в клетках, обработанных только ВКМ120, а в клетках линии H1838 процент составил 23.7% и 11.9% соответственно. Также методом вестерн блот анализа было показано, что уровень белков PARP и

активированной каспазы-3 значительно выше в клетках линий A549 и H1838, обработанных ВКМ120 в комбинации с CQ, по сравнению с клетками, обработанными каждым из препаратов в отдельности. Таким образом, было показано, что блокирование аутофагии CQ увеличивает способность ВКМ120 индуцировать апоптоз в линиях немелкоклеточного рака легкого [191].

1.2.5.3.10. CQ в комбинации с селуметинибом

Селуметиниб является ингибитором MEK1/2, поэтому он рассматривается как перспективное противоопухолевое средство. Для того, чтобы показать, влияет ли ингибирование аутофагии на цитотоксическую активность селуметиниба, клетки колоректального рака SW480 обрабатывали CQ, селуметинибом и комбинацией этих препаратов. Методом Вестерн блота было показано, что уровень LC3-II в клетках, обработанных комбинацией препаратов выше в сравнении только с селуметинибом. Методом проточной цитометрии было показано, что процент апоптотических клеток, обработанных селуметинибом в комбинации с CQ (20μM) составил 55.4% в сравнении с 29.9% в клетках, обработанных только селуметинибом. Таким образом, заключили, что CQ в комбинации с селуметинибом значительно увеличивает количество апоптотических клеток [192].

1.2.5.3.11. Заключение по комбинаторному использованию CQ с другими противоопухолевыми агентами

Анализ литературных данных, по эффективности комбинированного воздействия различных препаратов и CQ на опухолевые клетки *in vitro* и опухоли *in vivo*, позволил систематизировать эти данные (Таблица 6).

Таблица 6. Процент апоптотических клеток и жизнеспособности различных опухолевых клеточных линий под действием CQ и различных препаратов.

комбинация	клеточная линия	% апоптотических клеток	жизнеспособность, %
10 мкМ CQ+ 0.6 мк MFIP-gts	NTUB1	14.9	40
	N/P	66.3	20
20 мкМ CQ+ 7 нМ Cgf	H929	82	-
	MM.1S	70	-
	U266	79	-
5 мкМ CQ+ 25 мкМ RSV	Ishikawa	23	30
CQ+Rap, молярное соотношение 3:1	Huh7	6	60
	HA22T	38	70
40 мкМ CQ+ 1мк MBKM120	A549	37.7	10
	H1838	23.7	15
	H157	-	22
	H460	-	7
	H23	-	15
20 мкМ CQ+10 мкМ S	SW480	55.4	-
CQ+винорелбин	Huh7	6.5	68
	HA22T	35	70
CQ+Rap+винорелбин молярное соотношение 3:1:0.5	Huh7	13	50
	HA22T	50	50

1.2.5.4. Гидроксихлорокин (HCQ) в комбинации с различными препаратами

Гидроксихлорокин – это широко используемый противомаларийный и противоревматический препарат, который имеет определенный профиль токсичности и используется при лечении аутоиммунных заболеваний. Также HCQ является ингибитором аутофагии. Как и другие производные хлорокина, гидроксихлорокин является слабым основанием, которое накапливается в кислых клеточных компартментах, таких как лизосомы, что приводит к повышению pH этих компартментов и ингибированию лизосомальных ферментов. Ингибирование аутофагии с использованием HCQ повышает чувствительность клеток хронической миелоидной лейкемии и индуцирует гибель клеток миеломы, лимфомы и гепатоцеллюлярной карциномы. Была показана эффективность HCQ в отношении протоковой аденокарциномы поджелудочной железы, а в клинических исследованиях на пациентах в данное время оценивают эффективность HCQ в комбинации с различными препаратами [157]. На основании доклинических исследований HCQ рассматривают в качестве возможного химиотерапевтического посредника для лечения онкологических заболеваний.

При поиске препаратов-партнеров HCQ было показано, что HCQ значительно повышает цитотоксическую активность темсиролимуса (CCI-779) в отношении клеток карциномы почки RCC *in vitro*. Было показано, что HCQ ингибирует рост клеток линии RCC, индуцируя апоптоз. Синергический эффект HCQ и темсиролимуса наблюдался в модельных культурах сфероидов и на моделях ксенографтов клеток меланомы человека.

Ингибирование поздней стадии аутофагии, индуцируемой гефитинибом, с помощью HCQ значительно увеличивает гибель клеток рака молочной железы, чувствительных к гефитинибу –линий SKBR3, BT474, а также резистентных к гефитинибу линий клеток - JMT-1 и MCF7-GFPLC3 в сравнении с монорежимом.

HCQ в комбинации с тамоксифеном также оказался более эффективным, по сравнению с монорежимом при использовании в отношении эстроген-позитивных клеток рака молочной железы [157].

1.2.6. Индукторы аутофагии

Несмотря на ярко выраженный терапевтический эффект, наблюдаемый при ингибировании аутофагии, приводящий к сенсбилизации раковых клеток, стимуляция аутофагии в опухолевых клетках также приводит к клеточным повреждениям и инициирует аутофагическую клеточную гибель. Существует связь между аутофагией и иммунной защитой организма. Поломки в аутофагическом каскаде стимулируют окислительный стресс и хроническое повреждение ткани, что приводит к выработке воспалительных цитокинов и стимуляцию роста опухоли. При воспалении, количество повреждений увеличивается, что связано с прогрессированием рака при недостаточном уровне аутофагии, что наводит на предположение, что терапия противовоспалительными агентами в комбинации с индукторами аутофагии при лечении рака может подавлять рост опухоли [193].

Одним из потенциальных терапевтических индукторов аутофагии является спермидин. Спермидин - это природный полиамин, который можно обнаружить в сое, брокколи, цветной капусте, мясе и картофеле. Спермидин осуществляет кардиопротекторную функцию, а также увеличивает продолжительность жизни дрожжей, мух, червей и мышей. Основным механизмом, обеспечивающим такие эффекты, является mTOR-независимый механизм, усиливающий аутофагию. Также спермидин связан с иммунным ответом. Терапия спермидином индуцирует аутофагию в T-клетках и стимулирует T-клетки памяти [193].

Наиболее изученным индуктором аутофагии является рапамицин. Каскад PI3K/mTOR стал одной из наиболее перспективных мишеней для нацеливания химиопрепаратов,

поскольку этот путь активирован практически во всех типах рака. Соответственно, ингибиторы mTOR довольно быстро признали в качестве возможных противораковых препаратов [194]. Рапамицин является природным ингибитором mTOR, также, как и его аналоги - эверолимус (RAD-001), темсиролимус (CCI-779) и дефоролимус (AP-23573). Вследствие ингибирования mTOR происходит активация аутофагии. Недавние исследования показали, что токсичность рапамицина и его аналогов при правильно подобранной концентрации при выраженном торможении роста опухоли остается низкой [194]. Было показано, что эверолимус усиливает антипролиферативный эффект паклитаксела на клетках рака эндометрия. Обработка клеток рака эндометрия и рака молочной железы человека эверолимусом в комбинации с хлорокином или параллельно с трансфекцией малыми РНК, образующими шпильки, показала, что эверолимус индуцирует клеточную гибель по пути аутофагии. В другом исследовании было показано, что рапамицин повышал чувствительность клеток рака легкого A549 к радиотерапии вследствие индукции аутофагии и замедлении репарации повреждений ДНК. В клетках глиомы рапамицин индуцировал гибель по пути аутофагии, а не апоптоза. Обработка рапамицином в комбинации с ингибиторами PI3K/Akt синергитически усиливала цитотоксический эффект в отношении чувствительных и устойчивых к рапамицину клетках глиомы. Показана активация рапамицином экспрессии Beclin 1 в клетках рака поджелудочной железы PC-2 в доза-зависимом режиме, при этом происходило увеличение образования аутофагических вакуолей, вследствие чего подавлялся процесс пролиферации и происходила индукция апоптоза [194]. В клинической практике наблюдался относительный положительный эффект при терапии рака почки и лимфомы мантийной зоны аналогами рапамицина. Однако, в большинстве случаев при монотерапии аналогами рапамицина наблюдался слабый эффект, что было показано для широкой выборки опухолевых клеток различного гистологического происхождения [193].

В настоящий момент времени эверолимус в комбинации с ингибитором аутофагии гидроксихлорокином находится на I-ой стадии клинических испытаний (NCT01266057; clinicaltrials.gov). В группу исследуемых входят женщины с лимфангиомаатозом на продвинутой стадии заболевания [194].

Таким образом, можно надеяться, что терапия рапамицином и его аналогами в комбинации с ингибиторами аутофагии или другими химиопрепаратами будет иметь более серьезный противоопухолевый эффект.

1.2.6.3. Рапалоги в комбинации с химиопрепаратами

Термином “рапалоги” обозначают терапевтические аналоги рапамицина. В 2012 году эверолимус в комбинации с экземестаном, ингибитором ароматазы, был одобрен FDA для лечения женщин с прогрессирующим рецидивирующим рецептор-положительным HER-2-отрицательным раком молочной железы, находящихся в постменопаузе или женщин, с рецидивами после лечения летрозолом или анастрозолом (ингибиторы ароматазы) в режиме монотерапии. Более того, множество клинических испытаний в настоящее время оценивают эффективность рапалогов в комбинации с химиотерапевтическими агентами, включая паклитаксел, доксорубин и капецитабин. Доклинические и клинические испытания подтверждают, что рапалоги действуют эффективно в комбинации с направленными терапевтическими средствами, такими как РТК (рецепторные тирозинкиназы)-направленные препараты, препараты на основе гормонов, ингибиторы ангиогенеза и ингибитором IGF-IR (рецептор инсулиноподобного фактора роста).

Комбинация рапамицина и эрлотиниба (ингибитор рецептора эпидермального фактора роста) приводит к синергетическому эффекту *in vitro* и к значительному торможению роста опухоли *in vivo* в сравнении с монотерапией. Это может быть связано с активацией РТК вследствие ингибирования PI3K/Akt/mTOR сигнального пути. Предварительные клинические испытания (первая фаза) эверолимуса с пасиреотидом, аналогом соматостатина, на пациентах с прогрессирующими нейроэндокринными опухолями показали, что такая комбинация обладает выраженной противоопухолевой активностью. Было показано, что эверолимус в комбинации с BEZ235 (ингибитором mTOR) в низких дозах может ингибировать рост многих типов опухолей, в которых активирован mTOR [195].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В обзоре литературы рассмотрены два аспекта разработки подходов терапии онкологических заболеваний, а именно, потенциал белковых препаратов, включая преимущества и ограничения, а также современные представления об аутофагии, как мишени для противоопухолевой терапии. Разработка теоретической базы и экспериментальная апробация новых препаратов и методов лечения, характеризующихся высокой эффективностью и низкой общей токсичностью являются ключевыми проблемами в лечении онкологических заболеваний. Для традиционных химиопрепаратов, уже давно подтвердивших свой противоопухолевый потенциал, а также для новых иммунопрепаратов, постоянно идет широкий поиск молекул-партнеров, которые позволили бы усиливать их действие в синергическом режиме. Преимуществом такой комплексной химиотерапии будет снижение дозы химиопрепаратов, сопряженное с повышением общей эффективности терапии и уменьшением неспецифической токсичности. Безусловно, достигшими наибольшей степени внедрения в практику белковыми противоопухолевыми препаратами являются антитела – как основные молекулы или в составе конъюгатов с цитотоксическими агентами. Многообразный репертуар антигенов и антигенных паттернов на поверхности опухолевых обуславливает широкие возможности дальнейшего конструирования лекарств на основе антител.

В 2013 г Нобелевская премия по физиологии и медицине была вручена Ёсинори Осуми за открытие механизмов аутофагии. В обзоре рассмотрены ключевые белки и белковые ансамбли, вовлеченные в аутофагию. Поскольку уже показано, что высокий базовый уровень аутофагии является одним из механизмов резистентности опухолей к химиопрепаратам, нет сомнения в важности исследования этого процесса. Модуляторы аутофагии – индукторы и ингибиторы являются инструментами исследования механизма аутофагии, и также уже подтвердили свой потенциал препаратов-партнеров в онкологии.

Представленный аналитический обзор литературы дает представление о современном состоянии исследований в области разработки противоопухолевых белковых препаратов, рассматривает успешные стратегии комбинирования препаратов с модуляторами аутофагии.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы и оборудование

2.1.1. Реактивы и материалы

В работе использовали следующие реактивы и материалы: гуанидинтиоцианат-фенол-хлороформ Trizol Reagent (Life Technologies, США), 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ), 2-меркаптоэтанол, додецилсульфат натрия (SDS), 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолина бромид (МТТ), диметилсульфоксид (ДМСО), фенолметилсульфонил флуорид (PMSF), краситель Coomassie Blue R250, 4-хлоро-1-нафтол (Sigma, США), этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) (MP Biomedicals, США), акриламид 2K Standard Grade (Медиген, Россия), N,N'-метилен-бис-акриламид (ICN, США), персульфат аммония (Gerbu, Германия), перекись водорода (ЮжФарм, Краснодарский край, Россия), серная кислота, метанол, параформальдегид, соляная кислота (Реахим, Россия), физиологический раствор 0.9% хлорид натрия (Мосфарм, Московская область, Россия), трис, глицин, глицерол, краситель бромфеноловый синий, краситель ксиленцианол, N,N,N',N'-тетраметиленамин (ТЕМЕД), Твин-20, Triton X-100, ацетат натрия (Хеликон, Россия), бычий сывороточный альбумин (БСА), натрий-фосфатный буфер (PBS) (Amresco, США), этанол (ОАО «Кемеровская фармацевтическая фабрика», Россия), хлорид натрия, карбонат натрия, гидрокарбонат натрия (AppliChem, Германия), желатин (Merk, США), маркер молекулярной массы белков, маркер молекулярной массы ДНК (Thermo Scientific, Литва), матригель BD Matrigel Basement Membrane Matrix (BD Bioscience, США), коктейль ингибиторов протеаз Complete (Roche Diagnostics, Германия), буфер NuPAGE, буфер iBindSolution (Novex Life Technologies, США), хемилюминесцентный субстрат (Novex®ECL, Invitrogen, США), рибонуклеаза А (РНКаза А), рекомбинантный аналог лактапина RL2 был получен и очищен, как было описано ранее [3], хлорокина дифосфат (Tocris Bioscience, Sigma, США), Ku55933 (Tocris Bioscience, США), 3-метиладенин, рапамицин, сперимидин (Sigma, США), 96-луночный иммунологический планшет, белый непрозрачный 96-луночный планшет (Costar, США), нитроцеллюлозная мембрана (BioRad, США), корм (Ssniff, Soest, Германия).

Реактивы для культивирования клеток эукариот: культуральные среды Leibovitz`s L-15 (L15), Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium (IMDM), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI); трипсин-ЭДТА, L-глутамин (Sigma-Aldrich, США), эмбриональная сыворотка телят (FBS), Kaighn`s Modification of Ham`s F-12 Medium (F-12K), Minimum Essential Medium

(MEM), раствор антибиотиков-антимикотика (a/a) (GIBCO, Life Technologies, США), FBS (HyClone, GE Healthcare, Швеция), культуральные флаконы площадью 25 см², 96-луночные планшеты (TPP, Швейцария), 6-луночные планшеты (Nunc, Thermo Fisher Scientific, США), культуральные 4-х луночные стекла (BD, Falcon, Bedford, MA, США).

Наборы и смеси: смесь для ОТ-ПЦР (ООО «Биосан», Россия), набор для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) «MasterMixRT» (BioLabMix, Россия), набор для детекции апоптоза «FITC AnnexinV Apoptosis Detection Kit» (BD Bioscience, США), набор для определения активности каспаз -3, -7 «Vybrant FAM caspase-3, -7 assay kit» (Molecular Probes, США), набор для анализа активности катепсина D «Cathepsin D activity assay kit» (Abcam, Англия).

Первичные антитела: моноклональные антитела к RL2 клон F14, конъюгированные с HRP, моноклональные антитела к RL2 клон F21, моноклональные антитела к RL2 клон F15, конъюгированные с HRP (ООО «Биосан», Россия), антитела к белкам человека: LC3A/B, MDM2, Вах, Tubulin, ATG-5 (Abcam, Англия), p53, Bcl-2, p62/SQSTM1, Beclin 1 (Sigma-Aldrich, США).

Вторичные антитела: антитела кролика против IgG мыши, конъюгированные с HRP, антитела мыши против IgG кролика, конъюгированные с HRP, антитела козы против IgG мыши, конъюгированные с HRP, антитела козы против IgG кролика, конъюгированные с HRP (ООО «Биосан», Россия), антитела козы против IgG кролика, конъюгированные с флуоресцеином изотиоцианатом (FITC) (Sigma-Aldrich, США),

2.1.2. Оборудование

В работе использовали следующее оборудование: амплификатор Master cycler gradient (Eppendorf, Германия), амплификатор для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени iQ5 Cycler (BioRad, США), инкубатор для клеточных культур (Heraeus HERA cell, Германия), кельвинатор (GFR, Германия), термостат (BioSan, Латвия), центрифугу mini-spin (Eppendorf, Германия), центрифугу Centrifuge 5415R, Германия), спектрофотометр Apollo 8 LB 912 (Berthold technologies, Германия), проточный цитометр (BD FACSCanto II, США), дистиллятор (Atoll, США), миликью дистиллятор Water Purification System Ultra Clear (SQ, Германия), систему документации гелей Gel Doc XR+ (BioRad, США), флуориметр INCELL Analyzer system (GE Healthcare, Швеция), флуориметр Cary Eclipse (Varian, Австралия), флуоресцентный микроскоп Axioscop 2 PLUS (Carl Zeiss, GmbH, Германия), камеру для электрофореза 12 см × 16 см × 18 см (BioRad, США), камеру для

электропереноса (GE Healthcare, США), прибор iBind Western (Life Technologies, США), люминесцентный сканер C-Digit (LI-COR, США), ультрамикротом EM UC7 (Leica, Германия), электронный микроскоп JEM 1400 (JEOL, Япония), оснащенный цифровой камерой бокового ввода Veleta (Olympus Soft Imaging Solution, Германия), люминометр CLARIOstar (BMG Labtech, Германия), вентилируемые клетки для лабораторных мышей (Animal Care Systems, Colorado, США).

2.1.3. Плазмиды

Плазмиды pEL-1 и pEL-2 несущие вставку лактапина с лидерной последовательностью (ИМКБ СО РАН, Россия) [196].

2.1.4. Буферы, растворы, среды

В работе использовали следующие буферы, растворы, среды:

TBS: 150 mM NaCl, 20 mM Трис-НСl, pH 7.5;

PBS: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM (PO_4^{3-}), pH 7.5;

Буфер А: 150 mM NaCl, 25 mM Трис-НСl, 0.05% Tween-20, pH 7.4;

Блокировочный буфер: 150 mM NaCl, 25 mM Трис-НСl, 0.05% Tween-20, 0.9% BSA, 0.05%, pH 7.5;

Натрий-ацетатный буфер: 500 mM NaOAc, pH 5.5;

Буфер для нанесения: 50 mM Трис-НСl, 100 mM β -меркаптоэтанол, 1% SDS, 10% глицерин, бромфеноловый синий (75нг/мл), ксиленцианол (75нг/мл), pH 6.8;

Субстрат для HRP ИФА: 0.1 мг/мл ТМВ, 500 mM NaOAc, 0.02% H_2O_2 , pH 5.5;

Буфер для лизиса: 50 mM Трис, 5 mM ЭДТА, 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1 mM PMSF, коктейль ингибиторов протеаз, pH 8.0;

Карбонат-бикарбонатный буфер: 0.015 M Na_2CO_3 , 0.035 M NaHCO_3 , pH 9.6;

Раствор антибиотиков/антимикотика (а/а): 0.25 мкг/мл амфотерицина В, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина;

Раствор трипсин-ЭДТА: 0.9% NaCl, 0.5 г/л свиного трипсина, 0.2 г/л тетранатриевой соли ЭДТА;

Буфер 1 для разведения антител в PBS: 0.05% Tween-20, 1% желатин.

2.1.5. Клеточные культуры

В работе использовали иммортализованные коллекционные культуры клеток человека: аденокарциному молочной железы: MDA-MB-231 (Российская коллекция клеточных культур, ЦВТ «ХИМРАР», Москва, Россия), аденокарциному молочной железы MCF-7 и Hs578T,

аденокарциному поджелудочной железы AsPc1, глиобластому T98G (Российская коллекция клеточных культур позвоночных ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия), аденокарциному простаты PC3 CRL-1435, клетки почки эмбриона человека HEK293T CRL-11268 (ATCC, США), аденокарциному прямой кишки SW837 (Российская коллекция клеточных культур ETCS, Санкт-Петербург, Россия), неопухолевые эпителиальные клетки нормального эндометрия KE (коллекция клеточных культур ИХБФМ СО РАН, Новосибирск, Россия) глиобластому U87MG, U343, U251 (коллекция клеточных культур ИМКБ СО РАН), нетрансформированные мезенхимальные стволовые клетки MSC (любезно предоставлены к. б. н., н. с. ИХБФМ СО РАН Матвеевой В. А).

В работе использовали иммортализованные коллекционные культуры клеток мыши: рабдомиосаркому MX82 (Российская коллекция клеточных культур позвоночных ИНЦ РАН, Санкт-Петербург, Россия), лимфосаркому RLS и гепатокарциному ГА1 (любезно предоставлены к. б. н., с. н. с. ИЦиГ СО РАН Калединым В.И.).

2.1.6. Олигодезоксирибонуклеотиды, используемые для ген-специфичного ОТ-ПЦР суммарной РНК

Синтетические олигодезоксирибонуклеотиды были синтезированы в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН.

Ген *A20*:

A20_1-5'-TGGAACCTGATTCCAAACTTC-3'

A20_2-5'-CTCAGGAATTTGTTGAAACGG-3'

Ген *IkBa*:

IkBa_1-5'-TGTCTACACTTAGCCTCTATC-3'

IkBa_2-5'-TCTGTGAACTCCGTGAACTC-3'

Ген *CXCL1*:

CXCL1_1-5'-CTGAACAGTGACAAATCCAAC-3'

CXCL1_2-5'-CCTAAGCGATGCTCAAACAC-3'

Ген *GAPDH*:

GAPDH_1.1-5'-CTGAGCTGAACGGGAAGCTC-3'

GAPDH_2.1-5'-CACCTGGTGCTCAGTGTAGC-3'

GAPDH_1.2-5'-GAAGGTGAAGGTCCGAGT-3'

GAPDH_2.2-5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'

Ген *Bcl-2*

Bcl-2_1-5'-GGAAACTTGACAGAGGATCATGC-3'

*Bcl-2*_2-5'-TTCTGGTGTTCCTCCCTTGG-3'

Ген *MDM2*

*MDM2*_1-5'-GGTGCTGTAACCACCTCACA-3'

*MDM2*_2-5'-TGGCACGCCAAACAAATCTC-3'

Ген *p53*

*p53*_1-5'-GGAGGAGACCATTTCCACGG-3'

*p53*_2-5'-TCACCGAGAGGTTCTGGTCT 3'

Ген *BAX*

*BAX*_1-5'-TGATGGACGGGTCCGGG-3'

*BAX*_2-5'-TGAGACACTCGCTCAGCTT C -3'

2.1.7. Лабораторные животные

В работе использовали мышей линий C57BL/6 (8 – 10 недель), CBA (6 – 8 недель), A/Sp (10-12 недель, 14 – 16 недель) разведения Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в стандартных условиях вивария, на стандартном пищевом и питьевом рационе, согласно действующим нормам.

В работе использовали мышей линии SCID Hairless Outbred SHOP kdc scidHrHrMouseOutbred (3 – 4 и 6 – 8 недель) и A/J (6 – 8 недель) разведения ЦКП «SPF-виварий» Института цитологии и генетики СО РАН. Животных содержали в индивидуальных вентилируемых клетках в группах по 1-4 особи со свободным доступом к корму и воде. Животных содержали в специальных чистых помещениях класса «С» свободных от патогенов при постоянной температуре воздуха $22 \pm 2^\circ\text{C}$ с режимом освещения день/ночь 14/10 часов и относительной влажности $45 \pm 15\%$.

Все эксперименты с лабораторными животными выполнены в соответствии с рекомендациями и требованиями по использованию и уходу за лабораторными животными (ЕСС Directive 86/609/ЕСС) и были одобрены Комитетом по этике экспериментов на животных Администрации СО РАН.

2.2. Методы

2.2.1. Культивирование эукариотических клеток

Клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, аденокарциномы прямой кишки SW837, рабдомиосаркомы мыши MX82 и клетки первичной культуры нормального эндометрия KE культивировали в среде IMDM в присутствии 10% FBS, 2 mM L-глутамина и а/а.

Клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 культивировали в среде L15 в присутствии 10% FBS, 2 мМ L-глутамин и а/а.

Клетки аденокарциномы простаты человека PC3 культивировали в среде F-12K в присутствии 10% FBS, 2 мМ L-глутамин и а/а.

Клетки глиобластомы человека T98G, U343, U251, U87MG культивировали в среде MEM в присутствии 10% FBS, 2 мМ L-глутамин и а/а.

Клетки аденокарциномы поджелудочной железы AsPc1 культивировали в среде RPMI в присутствии 10% FBS, 2 мМ L-глутамин и а/а.

Клетки мышинной гепатокарциномы ГА1, клетки почки эмбриона человека HEK293T, аденокарциномы молочной железы человека Hs578T и мезенхимальные стволовые клетки человека MSC культивировали в среде DMEM в присутствии 10% FBS, 2 мМ L-глутамин и а/а.

Клетки лимфосаркомы RLS пассировали на животных: пересаживали внутрибрюшинно мышам линии СВА (1.5×10^4 кл/мышь). На 10-й день развития опухоли животным внутрибрюшинно вводили 0.5 мл физиологического раствора и собирали асцитную жидкость для последующего получения опухолевых клеток и их внутримышечной трансплантации. Все клеточные культуры культивировали при $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$ в атмосфере $5.0 \pm 0.5\% \text{CO}_2$.

2.2.2. Анализ цитотоксической активности (МТТ-тест)

Клетки высевали в 96-луночные культуральные планшеты в количестве 1.5×10^3 клеток на лунку в объеме 100 мкл и культивировали в стандартных условиях в среде RPMI-1640 в присутствии 10% FBS, раствора 2 мМ L-глутамин и а/а. Через 24 ч к клеткам добавляли 100 мкл исследуемых соединений, растворенных в среде RPMI и продолжали культивирование в течение 48 ч, после чего среду в лунках заменяли на 200 мкл среды RPMI без сыворотки, содержащей МТТ (0.25 мг/мл), и продолжали культивирование в течение 4 ч при 37°C . Далее, среду из лунок удаляли и добавляли в лунки по 150 мкл ДМСО. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли при длине волны $\lambda = 570$ нм на спектрофотометре. Жизнеспособность клеток определяли относительно жизнеспособности контрольных клеток $(100\%) \pm \text{SD}$ по трем независимым экспериментам. Данные МТТ были использованы для расчета комбинаторных коэффициентов CI помощью программы CompuSyn (ComboSyn, США).

2.2.3. Иммуноцитохимия

Клетки (1×10^4) растили в 4-х луночных культуральных слайдах, фиксировали 4% параформальдегидом и последовательно инкубировали с первичными антителами и конъюгированными с FITC вторичными антителами 20 мин в буфере для разведения антител. Окрашенные клетки визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа.

2.2.4. Вестерн-блот анализ

Клетки растили в 6-луночных культуральных планшетах до 70% монослоя, инкубировали с исследуемыми препаратами и лизировали в буфере для лизиса. Белки в анализируемых образцах разделяли электрофорезом в ПААГ (5% концентрирующий, 15% разделяющий) при 110-150В в денатурирующих условиях. Далее белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану путем влажного электропереноса при 150В в течение 1 ч в буфере NuPAGE. Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в буфере iBind Solution на приборе iBind Western в течение 2.5 ч – 18 ч с добавлением первичных антител к исследуемым белкам и вторичных антител, конъюгированных с HRP. После этого мембрану инкубировали с хемилюминесцентным субстратом в течение 1 мин и визуализировали на люминесцентном сканере. Полученные изображения обрабатывали с помощью программного пакета ImageStudioVer 4.0 digits (LI-COR, США).

2.2.5. Измерение активности катепсина D

Клетки (2×10^5) растили в 6-ти луночных культуральных планшетах, инкубировали с исследуемыми препаратами и готовили клеточные лизаты. К лизатам добавляли субстрат, меченный метил-кумарил-амидом из коммерческого набора «Cathepsin D activity assay kit». Образцы анализировали на флуориметре при длинах волн $E_x/E_m=328/400$ нм.

2.2.6. Выделение суммарной клеточной РНК

Клетки, растущие в лунке 6-луночного культурального планшета, промывали 1мл PBS, лизировали добавлением 1 мл Trizol и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. К лизату добавляли хлороформ в расчете 1:5 по отношению к объему Trizol, полученную смесь интенсивно встряхивали и центрифугировали 15 мин при 16000g и 4°C. Водную фазу собирали, добавляли к ней равный объем изопропилового спирта, смесь выдерживали 1 час при 4°C и центрифугировали 15 мин при 16000g и 4°C. Супернатант удаляли, осадок промывали в 1 мл 75% этилового спирта. Осадок клеточной РНК

высушивали, растворяли в 40 мкл деионизованной воды и прогревали 10 мин при 55°C, растворы РНК хранили при -20°C.

2.2.7. Анализ экспрессии генов методом ОТ-ПЦР

Реакцию обратной транскрипции суммарной мРНК и амплификацию кДНК проводили с использованием смеси для ОТ-ПЦР и специфических праймеров на приборе Master cycler gradient. Реакцию проводили при следующих условиях: 30 мин при 45°C, 5 мин при 95°C; 35–40 циклов: 15 с при 95°C (денатурация), 15 с при 61°C (отжиг), 25 с при 72°C (элонгация); 11 с при 80°C.

Длина целевых продуктов амплификации составляла: 221 п.н. (*A20*), 343 п.н. (*IkBα*), 157 п.н. (*CXCL1*) и 178 п.н. (*GAPDH*). Продукты амплификации анализировали электрофорезом в 15%-ном ПААГ. Результат электрофореза визуализировали на системе документации гелей. Полученное изображение денситометрировали с помощью программного обеспечения Gel-ProAnalyzer 3.1 (MediaCybernetics, L.P., США). Данные по экспрессии мРНК специфических генов нормировали на относительное количество мРНК глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (*GAPDH*).

2.2.8. Анализ экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Для количественной оценки изменения экспрессии исследуемых генов в образцах суммарной мРНК проводили ОТ-ПЦР в режиме реального времени на приборе iQ5 Cycler. Каждый образец содержал 1 мкг суммарной мРНК, 30 пмоль праймеров и смесь для ОТ-ПЦР «MasterMixRT». Данные амплификации анализировали с помощью программного пакета iQ5 SystemSoftware (Bio-Rad). Полученные результаты нормировали на количество мРНК глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (*GAPDH*).

2.2.9. Оценка продукции анти-RL2 IgG у мышей, получавших инъекции RL2 методом ИФА

Самкам мышей линий C57BL/6 (8–10 недель) и SCID (6–8 недель) развода вивария ИЦИГ СО РАН (Новосибирск, Россия) вводили RL2 (80 мг/кг) внутривенно или внутрибрюшинно в объеме 0.5 мл. Через определенные промежутки времени животных умерщвляли декапитацией и осуществляли забор крови. Для получения сыворотки кровь инкубировали 15 мин при 37°C, образцы центрифугировали 10 мин при 100g и переносили сыворотку в отдельную пробирку. Образцы сыворотки крови хранили при $-50 \pm 5^\circ\text{C}$.

Уровень анти-RL2-антител в сыворотке крови мышей определяли методом ИФА. Для этого в каждую лунку 96-луночного иммунологического планшета помещали 100 мкл раствора RL2 (50 нг) в TBS и инкубировали 2 ч при 37°C, после чего планшет дважды промывали буфером А. В лунки добавляли 200 мкл блокировочного буфера, инкубировали 1 ч при 37°C и дважды промывали буфером А. Далее в лунки подготовленного планшета добавляли по 100 мкл образцов сыворотки крови мышей, разбавленной блокировочным буфером (1 : 2, v/v). Для построения калибровочной кривой в лунки того же планшета добавляли по 100 мкл моноклональных антител к RL2 (клон F21) в диапазоне концентраций 0–800 нг/мл. Планшет инкубировали 1 ч при 37°C и трижды промывали буфером А. В лунки вносили по 100 мкл (1 мг/мл) антител кролика против IgG мыши, конъюгированных с HRP, инкубировали 1 ч при 37°C, промывали буфером А, добавляли 100 мкл раствора субстрата для HRP, содержащего тетраметилбензидин (ТМВ), и инкубировали 20 мин при 23°C в темноте. Реакцию останавливали добавлением раствора 2 М H₂SO₄ (100 мкл/лунка). Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на спектрофотометре Apollo 8 LB 912 при длине волны $\lambda=450$ нм, референсная волна $\lambda=620$ нм. Полученные данные использовали для построения калибровочной кривой в координатах оптическая плотность/концентрация, содержание антител в образцах рассчитывали по калибровочной кривой.

2.2.10. Определение концентрации рекомбинантного лактапина EL1 в культуральной среде методом ИФА

Моноклональные антитела к лактапину (клон F21) (100 мкл) в карбонат-бикарбонатном буфере иммобилизовали на 96-луночные иммунологические планшеты для ИФА и инкубировали последовательно 60 мин при 37°C и далее 18 ч при 4°C. Содержимое лунок удаляли, планшет дважды промывали буфером А, добавляли в лунки по 200 мкл блокировочного буфера и инкубировали 1 ч при 37°C. Лунки дважды промывали промывочным буфером и наносили в трех повторах образцы кондиционированной среды, разбавленной в 2, 5 и 10 раз. Для построения калибровочной кривой аликвоты RL2 с известной концентрацией помещали (100 мкл) в трех повторах в подготовленные ИФА планшеты. Планшеты инкубировали 1 ч при 37°C, после чего содержимое лунок удаляли и добавляли в каждую лунку по 100 мкл моноклональных антител к лактапину (клон F15), конъюгированных с HRP и инкубировали 1 ч при 37°C. Лунки промывали промывочным буфером, добавляли по 100 мкл субстрата для HRP, содержащего тетраметилбензидин (ТМВ), и инкубировали 20 мин в темноте при 24°C. Реакцию останавливали добавлением 100 мкл 2 М H₂SO₄. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на планшетном спектрофотометре при длине волны $\lambda=450$ нм, референсная волна $\lambda=620$ нм. По полученным результатам

строили калибровочную кривую и по линейному участку определяли содержание рекомбинантного лактапина EL1 в образцах.

2.2.11. Проточная цитометрия

Клетки растили в 24-х луночных культуральных планшетах в стандартных условиях. По достижении 80% монослоя клетки обрабатывали исследуемыми препаратами и продолжали культивирование. По окончании инкубации среду с открепившимися клетками собирали в отдельные пробирки. Клетки промывали PBS и открепляли раствором трипсин-ЭДТА. Для предотвращения протеолиза по окончании инкубации к клеткам добавляли ингибитор трипсина. Среду с открепившимися клетками и открепленные клетки объединяли, центрифугировали 5 мин при 50g и промывали PBS. Далее к клеткам добавляли реагенты из коммерческого набора для детекции апоптоза «FITC AnnexinV Apoptosis detection kit» или набора для определения активности каспаз -3, -7 «Vybrant FAM caspase-3, -7 assay kit» согласно инструкции производителя. Анализ образцов проводили на проточном цитометре.

2.2.12. Трансмиссионная электронная микроскопия

Клетки MDA-MB-231 (1×10^5) растили в 6-ти луночных планшетах в стандартных условиях 24 ч. К клеткам добавляли исследуемые препараты и инкубировали при 37°C. Далее, к клеткам добавляли 100 мкл FBS, продолжали инкубацию, и затем открепляли клетки от подложки добавлением раствора 0.5% трипсина в PBS, клетки разбавляли 1 мл среды L15 с 10% FBS и центрифугировали 5 мин при 600g. Осажденные клетки фиксировали 4% параформальдегидом, промывали средой и фиксировали 1% раствором тетраоксида осмия в течение 2 ч. После этого клетки промывали средой и выдерживали в водных растворах этилового спирта восходящих концентраций: в 30%-ом растворе 5 мин, в 50%-ом растворе – 2 раза по 5 мин, в 70%-ом – 3 раза по 10 мин, в 96%-ом – 3 раза по 10 мин; затем осадки промывали абсолютным раствором ацетона 5 раз по 15 мин, после чего осадки выдерживали в смеси смолы и ацетона (1:1) в течение 24 часов. Осадки высушивали на воздухе, помещали в конические формочки и заливали смолой, смешанной с катализатором (DMP-30). Для полимеризации смолы образцы выдерживали в термостате при 30°C 7 часов, при 42°C 12 часов и при 54°C 48 ч. Из полученных блоков изготавливали ультратонкие срезы на ультрамикротоме EM UC7, срезы контрастировали растворами уранил ацетата и цитрата свинца. Контрастированные ультратонкие срезы изучали в просвечивающем электронном микроскопе JEM 1400 (JEOL, Япония), оснащенный цифровой камерой бокового ввода Veleta (Olympus Soft Imaging Solution, Германия).

2.2.13. Трансплантация опухолевых клеток

Для внутрибрюшинной трансплантации использовали разведенные физиологическим раствором клетки гепатомы А1 (2×10^6 клеток/мышь) в объеме 200 мкл. В качестве экспериментальных животных использовали самок мышей линии А/Ж в возрасте 6 – 8 недель или самок мышей линии А/Sn в возрасте 10-12 недель.

Для внутривенной трансплантации опухолевых клеток иммунокомпетентным мышам использовали разведенные физиологическим раствором клетки гепатомы А1 (1.5×10^5 клеток/мышь) в объеме 100 мкл. В качестве экспериментальных животных использовали самок мышей линии А/Sn в возрасте 14 – 16 недель.

Для подкожной трансплантации опухолевых клеток иммунокомпетентным мышам использовали разведенные физиологическим раствором клетки гепатомы А1 (2×10^5 клеток/мышь) в объеме 100 мкл. В качестве экспериментальных животных использовали самок мышей линии А/Sn в возрасте 10 – 12 недель.

Для подкожной трансплантации опухолевых клеток самкам иммунодефицитных мышей линии SCID (SHO-PRKDCSCIDHR/HR1EW 43375) возраста 6 – 8 недель использовали разведенные физиологическим раствором клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 (2.5×10^6 клеток/мышь).

Для внутримышечной трансплантации клеток лимфосаркомы мыши линии RLS самкам мышей линии СВА возраста 8-10 недель клетки трансплантировали в бедро задней лапы в количестве 2.5×10^5 клеток/мышь.

2.2.14. Оценка противоопухолевой активности RL2

Для определения противоопухолевой активности препарат RL2 разводили физиологическим раствором до необходимой концентрации в асептических условиях. Препарат RL2 вводили мышам внутривенно в латеральную хвостовую вену в объеме 100 мкл или внутрибрюшинно в объеме 200 мкл. Животным контрольной группы вводили физиологический раствор в равном с RL2 объеме. Размер подкожной или внутримышечно растущей опухоли измеряли штангенциркулем в горизонтальной и вертикальной плоскости каждые 3-5 дней. Объем (V) опухоли считали по формуле: $V = (\pi/6) \times (a^2 \times b)$, где a – наименьшее значение из двух измеренных диаметров. Эвтаназию животных осуществляли

ингаляцией двуокси углерода (CO₂) или путем смещения шейных позвонков, опухоли извлекали и взвешивали. Противоопухолевую активность RL2 определяли, рассчитывая индекс торможения опухоли (ТРО, %) по формуле:

$$\text{ТРО}(\%) = (K_{\text{cp}} - \text{Э}_{\text{cp}}) \times 100 / K_{\text{cp}}, \text{ где}$$

K_{cp} – средний размер опухоли/средняя продолжительность жизни в контрольной группе

Э_{cp} – средний размер опухоли/средняя продолжительность жизни в экспериментальной группе.

2.2.15. Статистический анализ данных

Для статистического анализа данных, полученных в экспериментах *in vitro* и *in vivo* использовали параметрический t-критерий Стьюдента и непараметрический U-критерий Манна-Уитни. При $p \leq 0.05$ различия между группами считали достоверными.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для анализа цитотоксических и противоопухолевых свойств рекомбинантный аналог лактапина RL2 (Рис. 9) с молекулярной массой 14 кДа был наработан в клетках-продуцентах *E.coli* и очищен по стандартам GMP [1].

10	20	30	40	50
MKSFLLVVNA	LALTLPLAV	EVQ NQ Q Q PAC	HENDERPFYQ	КТАР Y VPMYY
60	70	80	90	100
VPNSYPY YGT	NLY Q RRPAIA	INNPY V PRTY	YANPAVVRPH	AQIP Q QYLP
110	120	130	140	150
NSHPPTV VRR	PNLHPSFIAI	PPKKIQDKII	IPTINTIATV	ЕРТРАРАТЕР
160	170	180		
TVDSVVTPEA	FSESIITSTP	ETTTVAVTTP	TA	

Рис. 9. Аминокислотная последовательность каппа-казеина человека и протеолитического фрагмента каппа-казеина – лактапина. Последовательность лактапина выделена красным, последовательность RL2 подчеркнута синим.

Ранее цитотоксическая активность RL2 была исследована в отношении онкотрансформированных и здоровых клеток человека: RL2 был активен в отношении опухолевых клеток человека - карциномы легкого A549 и карциномы гортани Нер-2, но максимальный цитотоксический эффект был показан для аденокарциномы молочной железы MCF-7, при этом жизнеспособность обработанных здоровых клеток - мезенхимальных стволовых клеток MSC не менялась [2]. В пилотных исследованиях механизма клеточной гибели для наиболее чувствительной к действию RL2 клеточной линии MCF-7 было показано, что гибель клеток сопровождается характерными для апоптоза изменениями, а именно: транслокацией фосфатидилсерина с внутренней поверхности плазматической мембраны на внешнюю, изменением трансмембранного потенциала митохондрий, активацией каспаз -7, -8 и -9, олигонуклеосомной фрагментацией ДНК. Анализ транскриптома клеток MCF-7, обработанных препаратом RL2, показал, что под действием RL2 происходит увеличение уровня экспрессии гена-онкосупрессора TP53, а также изменение уровня экспрессии генов циклинов (A, B, E, D), что указывало на остановку клеточного цикла в фазах G2/M или S/G2, и соответственно на отличный от апоптоза тип клеточной гибели – митотическую катастрофу. При поиске белков, взаимодействующих с RL2, в клетках MCF-7 были выявлены белки-партнеры, которые относятся к белкам цитоскелета: α , β -тубулин и α -актинин-1. На основании

совокупности полученных данных был предложен возможный механизм действия RL2 в отношении клеток рака молочной железы человека MCF-7 [3].

Учитывая полученные ранее результаты, существовала необходимость более полно исследовать механизм гибели клеток под действием RL2 и оценить противоопухолевый потенциал *in vivo*.

3.1. Цитотоксическая активность аналога лактапина RL2

Для выявления линий опухолевых клеток, наиболее чувствительных к аналогу лактапина RL2, цитотоксическая активность препарата была протестирована в отношении опухолевых культур клеток человека: аденокарциномы молочной молочной железы MCF-7, MDA-MB-231 и Hs578T, аденокарциномы прямой кишки SW837, аденокарциномы поджелудочной железы AsPc1, а также опухолевых культур мыши: гепатомы ГА1 и рабдомиосаркомы MX82. Аденокарцинома MCF-7 была использована как референсная чувствительная к RL2 линия клеток. Нетрансформированные мезенхимальные стволовые клетки человека MSC и клетки нетрансформированного эндометрия KE использовали в качестве контрольных «здоровых клеток». Было обнаружено, что все опухолевые культуры клеток были чувствительны к действию аналога лактапина RL2 (Таблица 7). Наибольшую чувствительность проявили опухолевые клетки молочной железы человека MDA-MB-231 и Hs578T и клетки гепатомы мыши ГА1. На основе данных о чувствительности к аналогу лактапина RL2 линии MCF-7 и MDA-MB-231 были выбраны в качестве клеточных моделей для дальнейших экспериментов. Диапазон концентраций RL2 0.1 – 0.35 мг/мл был использован для дальнейших экспериментов *in vitro*.

Таблица 7. IC50 препарата RL2 для различных культур клеток.

Линия	MSC	KE	MCF-7	MDA-MB-231	Hs578T	SW837	AsPC-1	ГА1	MX82
IC50, мкг/мл	0.75±0.10	0.64±0.03	0.20±0.04	0.23±0.03	0.27±0.08	0.42±0.12	0.44±0.10	0.15±0.05	0.30±0.07

Клетки инкубировали с RL2 (0.05 – 0.5 мг/мл) в течение 48 часов и проводили МТТ анализ. По результатам МТТ анализа рассчитывали IC50 – концентрацию RL2, при которой погибали 50% клеток. Данные представлены как относительное среднее значение (%) ± SD.

3.1.1. Анализ клеточной гибели в клетках MDA-MB-231 под действием RL2

Известно, что апоптотическая гибель клетки сопровождается многочисленными биохимическими изменениями, происходящими в ее компартментах и на поверхности цитоплазматической мембраны. Одним из наиболее характерных изменений плазматической мембраны клетки при апоптозе является транслокация полярной части фосфатидилсерина (ФС) с внутренней стороны липидного бислоя на внешнюю сторону, что может быть выявлено как раннее событие апоптоза в клетках путем дифференциального окрашивания мембраны таких клеток флуоресцентно-меченым белком AnnexinV, который аффинно связывается с полярной частью ФС [197]. При этом апоптотические клетки остаются непроницаемыми для йодида пропидия (PI), окрашивающего клеточные нуклеиновые кислоты. Использование PI в паре с AnnexinV позволяет дифференцировать ранние апоптотические AnnexinV⁺/PI⁻, некротические AnnexinV⁻/PI⁺ и поздние апоптотические либо вторично некротические клетки AnnexinV⁺/PI⁺ [198].

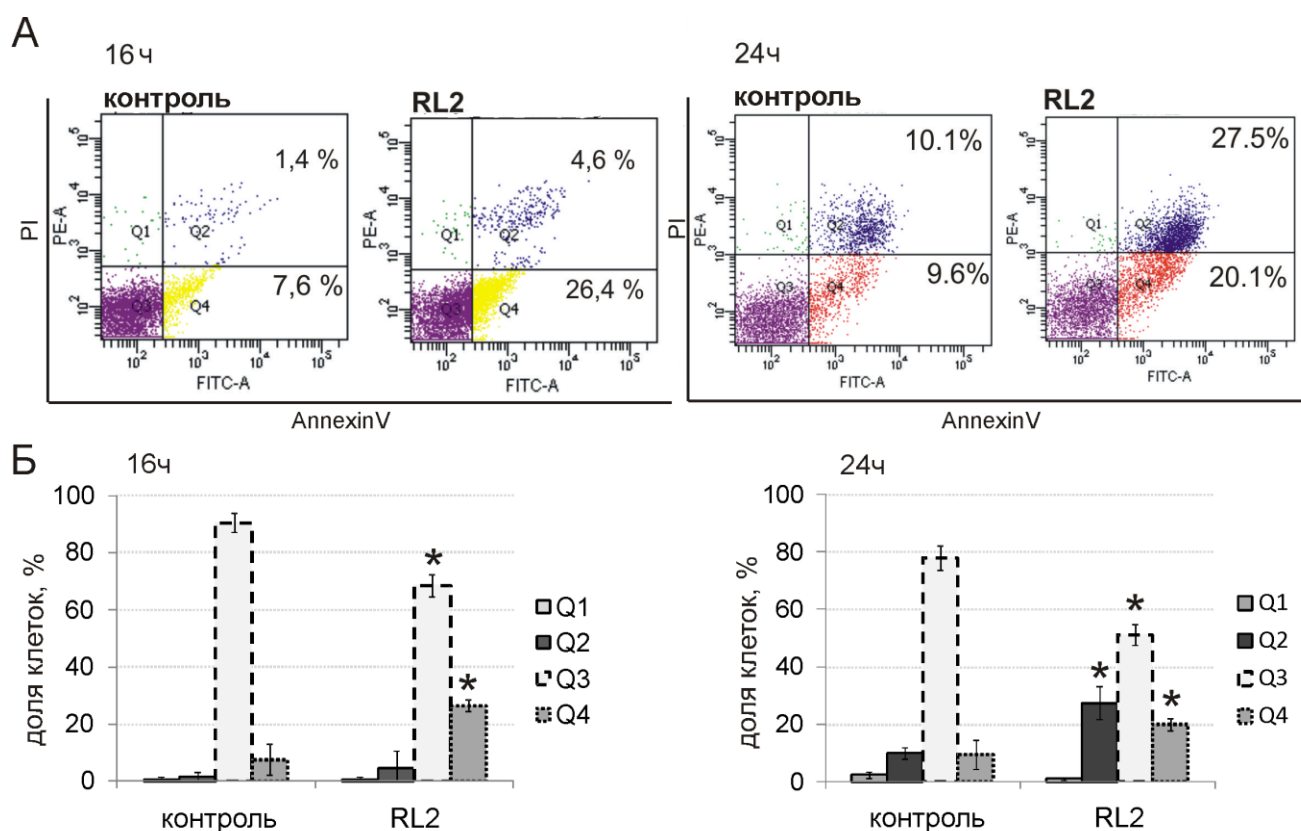


Рис. 10. Анализ апоптоза в клетках MDA-MB-231, обработанных RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.15 мг/мл) в течение 16 ч и 24 ч и анализировали методом проточной цитометрии с использованием окрашивания Annexin V/PI. Q1 – некротическая популяция, Q2 – ранняя апоптотическая популяция, Q3 – живые клетки, Q4 – поздняя апоптотическая или вторично некротическая популяция. **А.** Характерный пример анализа. **Б.** Гистограммы распределения клеток по популяциям. Данные представляли как среднее значение трех независимых измерений \pm SD. * - отличие от контроля (необработанные клетки) $p < 0.05$.

Для того, чтобы подтвердить индукцию апоптоза в клетках MDA-MB-231, клетки инкубировали с RL2 и окрашивали системой красителей AnnexinV/PI после чего анализировали образцы методом проточной цитометрии. Показано, что популяция AnnexinV⁺/PI⁻ (ранняя апоптотическая популяция) составляла в среднем 26.4% и 20.1% при инкубации 16 ч и 24 ч соответственно (Рис. 10). Популяция AnnexinV⁺/PI⁺ (поздняя апоптотическая и вторично некротическая популяция) составляла 4.6% и 27.5% при времени инкубации 16 ч и 24 ч соответственно. Можно предположить, что не все клетки обладают одинаковой чувствительностью к RL2. Со временем, ранние апоптотические клетки AnnexinV⁺/PI⁻ переходят в популяцию поздних апоптотических AnnexinV⁺/PI⁺, но в то же

время более длительная инкубация индуцирует апоптоз и в более резистентных клетках, что отражается в уменьшении доли живых клеток AnnexinV⁻/PI и практически неизменному количеству ранних апоптотических клеток AnnexinV⁺/PI в образцах соответствующих 24 ч инкубации по сравнению с образцами, инкубированными в течение 16 ч. Таким образом, в клетках MDA-MB-231, как и в случае исследованной ранее линии аденокарциномы молочной железы MCF-7, аналог лактапина RL2 также вызывает гибель с признаками апоптоза.

3.1.2. Анализ RL2-зависимой активации эффекторных каспаз в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231

Каспазы являются цистеиновыми протеазами, которые осуществляют протеолитическое расщепление специфических субстратов, а также участвуют в процессах клеточной гибели. Инициаторные каспазы (-8, -9, -10) активируют эффекторные каспазы (-3, -7), которые, в свою очередь, непосредственно расщепляют клеточные структуры при апоптозе. Протеолитическая активность каспаз -3 и -7 сигнализирует о том, что в клетке запущена программа апоптоза [199]. Для определения активности эффекторных каспаз -3 и -7 в клетках MDA-MB-231, обработанных RL2, использовали коммерческий набор, содержащий флуоресцентно-меченный модифицированный субстрат (FAM), способный ковалентно модифицировать активированные каспазы -3 и -7. При анализе популяции клеток с активированными каспазами -3 и -7 методом проточной цитометрии было обнаружено, что в клетках MDA-MB-231, обработанных RL2, возрастает на 35% популяция клеток с флуоресцентным сигналом по сравнению с необработанным контролем, что свидетельствует об RL2-индуцированной активации каспаз -3 и -7 (Рис. 11) в этих клетках. Таким образом, в клетках MDA-MB-231 так же, как и в клетках MCF-7, RL2 стимулирует активацию эффекторных каспаз -3 и -7, что характерно для гибели клеток по пути апоптоза. Суммарная доля апоптотических и вторично некротических клеток, выявленная окрашиванием Annexin V/PI для 24 ч инкубации, соответствует доле клеток с активированными каспазами-3 и -7.

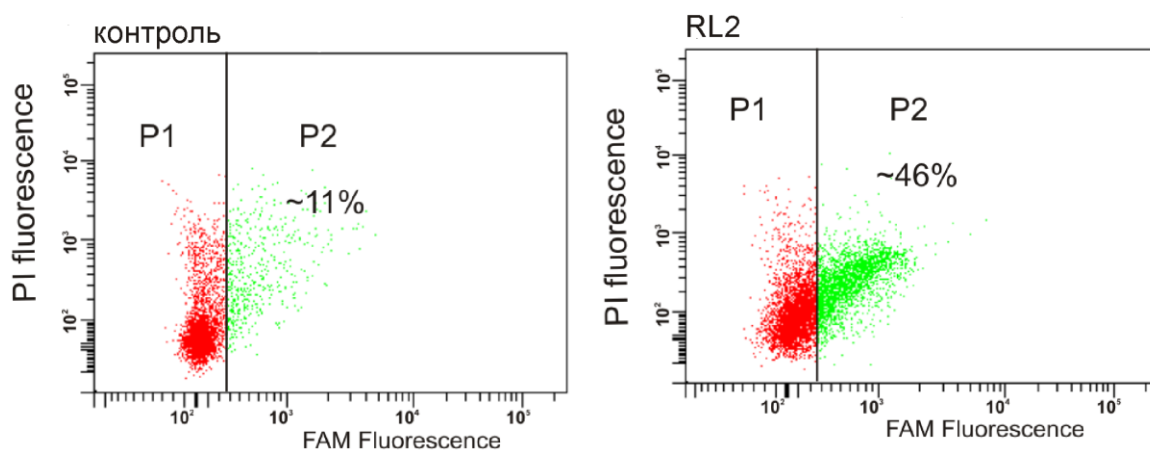


Рис. 11. Влияние RL2 на активацию каспазы-3 и -7 в клетках MDA-MB-231. Клетки инкубировали с RL2 (0.2 мг/мл) в течение 24 часов и анализировали проточной цитометрией. Характерный пример анализа.

3.1.3. Анализ изменения экспрессии генов апоптотического каскада в клетках MDA-MB-231 при инкубации с RL2

Индукция апоптоза в клетках сопровождается изменением экспрессии значительного числа генов, а также трансляцией с последующим процессингом соответствующих им белков, поэтому важно было исследовать изменение экспрессии генов и уровня белков каскада апоптоза при обработке опухолевых клеток аналогом лактапина RL2. Ранее, в экспериментах на клетках линии MCF-7, при анализе экспрессии генов на чипах Illumina была показана RL2-зависимая позитивная регуляция гена TP53. Белок опухолевой супрессии p53 – продукт гена TP53 – является транскрипционным фактором и регулирует экспрессию около 150 генов, а недостаточная функция p53 ведет к ингибированию апоптоза. Физиологическая инактивация p53 осуществляется путем его убиквитинирования E3-убиквитин лигазой MDM2. Белок MDM2 распознает N-концевой транс-активационный домен белка-опухолевого супрессора p53, убиквитинирует его, и p53 подвергается деградации в протеосомах, в результате чего p53-опосредованная транскрипция блокируется [200; 201]. Белки семейства Bcl-2 являются ключевыми белками апоптотического каскада, которые обладают как про- (белки BAX, BAK), так и антиапоптотическим (белки Bcl-2, Bcl-xL) действием. Антиапоптотический белок Bcl-2 обеспечивает целостность внешней мембраны митохондрий, напрямую блокируя действие проапоптотических белков семейства Bcl-2 – BAX и BAK, и регулируя митохондриальный путь апоптоза [202; 203].

Учитывая ключевое значение белков p53, MDM2, Bcl-2 и BAX в процессах клеточной гибели, для выявления особенностей RL2-зависимого апоптоза было проанализировано

изменение экспрессии генов: *Mdm2*, *p53*, *Bcl-2*, и *Bax*, и изменение белковых продуктов этих генов. Из клеток MDA-MB-231, инкубированных с RL2, выделяли суммарную клеточную РНК и оценивали относительное изменение мРНК исследуемых генов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (Рис. 12 А). Как видно из представленных данных, обработка клеток аналогом лактапина RL2 ведет к достоверному повышению уровня экспрессии *Bcl-2* через 2 ч инкубации, после чего уровень экспрессии *Bcl-2* снижается относительно *Bcl-2* мРНК в контрольных образцах. Уровень мРНК *Bax* достоверно снижался после 24 ч инкубации с RL2 относительно контрольных клеток. Полученные данные позволяют предположить, что активация апоптотического каскада происходит постепенно в процессе инкубации с RL2.

Анализ мРНК *Mdm2* показал, что уровень *Mdm2* мРНК достоверно снижался после 6 ч инкубации с RL2 и оставался низким в течение всего наблюдаемого периода времени. При анализе экспрессии гена *p53* в клетках, обработанных RL2, достоверных отличий в уровне *p53* мРНК по сравнению с контрольными клетками обнаружено не было. Можно предположить, что в обработанных RL2 клетках при сниженной экспрессии *Mdm2* мРНК количество белка MDM2 в клетке регулируется на уровне трансляции и остается относительно постоянным. Появление расщепленной формы MDM2 влияет на количество функционально активной MDM2 убиквитинлигазы, что способствует снижению деградации p53 в протеосомах. Все эти события способствуют сохранности p53, активации экспрессии p53-зависимых генов и последующему апоптозу. Для подтверждения этой гипотезы был проведен анализ белковых продуктов указанных генов (Рис. 12 Б, В).

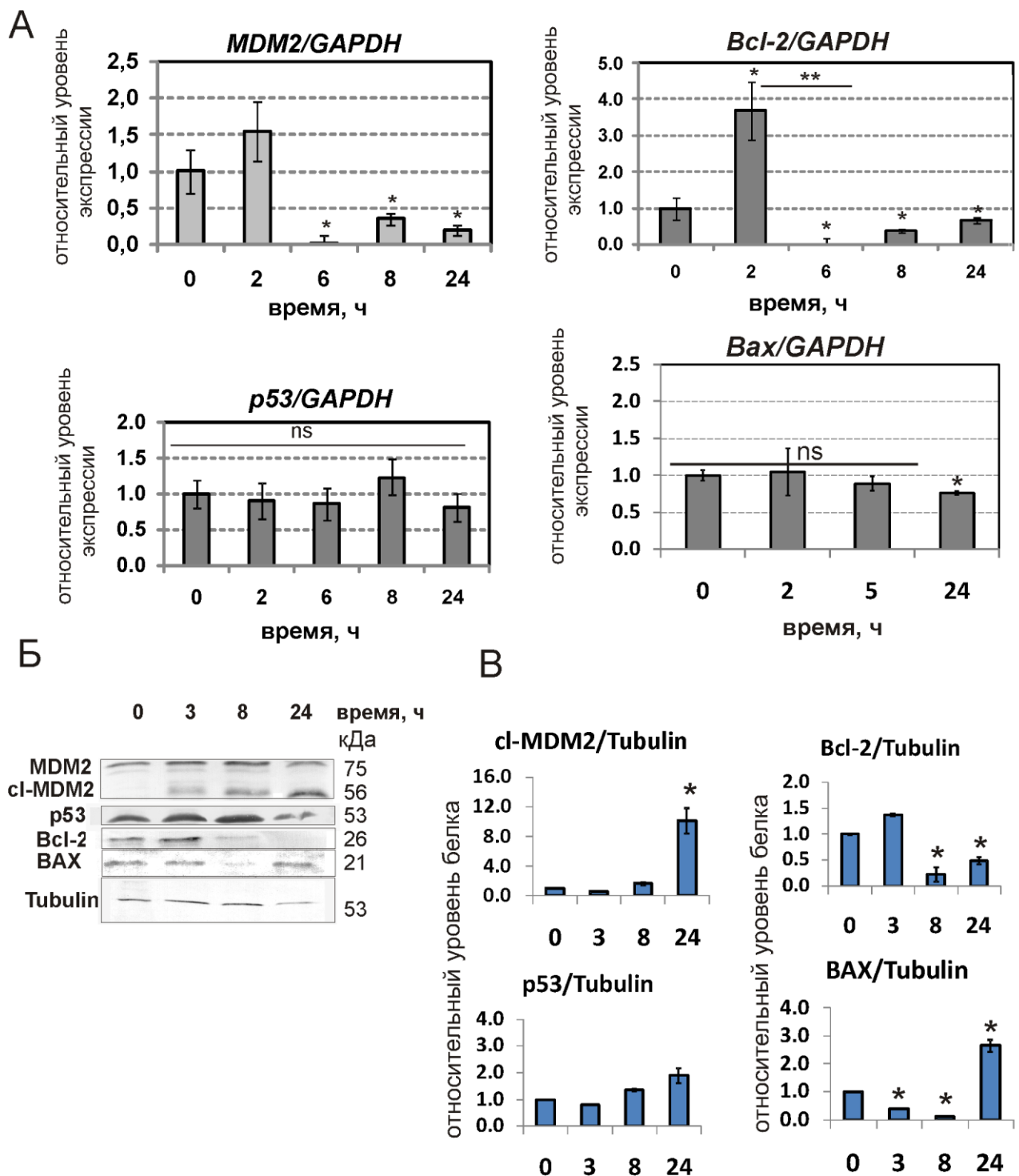


Рис. 12. Относительный уровень экспрессии мРНК *Mdm2*, *p53*, *Bcl-2* и *Bax* и уровень белковых продуктов этих генов в культуре клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, инкубированных с RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.2 мг/мл) в течение 0 – 24 ч. **А.** Уровень транскриптов анализировали методом ОТ-ПЦР со специфическими праймерами. Уровень мРНК *GAPDH* использовали в качестве внутреннего стандарта. Соотношение мРНК целевого гена/*GAPDH* в контрольных клетках принимали за единицу. Данные представлены как среднее значение соотношения целевого гена/

GAPDH±SD. Различия при $p \leq 0.05$ (*) и $p < 0.005$ (**) считали достоверными, ns - отличия между группами не достоверные ($p > 0.05$). **Б.** Характерный пример анализа клеточных белков методом Вестерн блота. **В.** Денситометрический анализ данных Вестерн блотов с использованием программного пакета Gel-Pro Analyzer 3.1. Данные представлены как относительное среднее значение ± SD, нормализованное к уровню тубулина.

Как видно из представленных данных, уровень белка Bcl-2 возрастал через 3 ч инкубации с RL2, а далее происходило уменьшение Bcl-2 в обработанных клетках, что хорошо подтверждает результаты, полученные для мРНК Bcl-2 (Рис. 12 А). Уровень белка BAX в обработанных клетках снижался относительно контрольных клеток через 8 ч инкубации. В канонической модели апоптотической гибели клетки по митохондриальному пути Bcl-2 помогает сохранить целостность внешней мембраны митохондрий, ингибируя напрямую проапоптотический белок BAX: Bcl-2 связывает белок BAX, что предотвращает олигомеризацию BAX на внешней мембране митохондрии. Если концентрация Bcl-2 в клетке не достаточна для связывания большого количества BAX, то BAX олигомеризуется на внешней мембране митохондрии образуя поры, через которые высвобождается цитохром С, что является сигналом к апоптозу. Можно видеть, что постепенное снижение Bcl-2 сопровождается увеличением BAX через 24 ч инкубации с RL2, и наиболее вероятно, стимулируется митохондриальный путь апоптоза.

При анализе данных Вестерн блотов можно видеть, что количество белка p53 остается неизменным до 8 часов инкубации клеток с RL2 относительно контрольных клеток и незначительно увеличивается к 24 ч инкубации. При анализе белка MDM2 в клетках, обработанных RL2, не было отмечено его негативной регуляции с течением времени, но было обнаружено появление формы меньшего молекулярного веса - cl-MDM2, также выявляемой антителами к MDM2, которая соответствует форме MDM2, подвергшейся частичной протеолитической деградации. На основании полученных данных мы предполагаем, что RL2 не участвует в активации транскрипции p53, поскольку уровень p53 мРНК относительно стабилен в обработанных клетках, но за счет уменьшения функционально активной MDM2 убиквитинлигазы сохраняется пул функционально активного p53. Далее, мы предполагаем, что попадая в ядро, p53 активирует транскрипцию зависимых генов, в том числе BAX, что способствует активации p53-зависимого митохондриального пути клеточной гибели. Тем не менее, полученные данные позволяют предположить наличие дополнительных механизмов гибели клеток при инкубации с RL2.

3.1.4. Анализ изменения уровня экспрессии генов каскада *Nf-kB* в клетках MDA-MB-231 и клетках здорового эндометрия KE под действием RL2 *in vitro*

Клеточный ответ каскада NF-kB является одним из ключевых ответов иммунной системы на различные стимулы – воспалительные цитокины и продукты вирусного или бактериального происхождения, а также он вовлечен в каскады, регулирующие пролиферацию клетки и апоптоз. Уже показано, что разбалансированная регуляция пути NF-kB ведет к хроническому воспалению и онкотрансформации клеток. К генам-мишеням NF-kB, белковые продукты которых ингибируют апоптоз и способствуют выживанию, относят белки cFLIP, IAP и A20 [204]. Так известно, что активация каскада NF-kB под действием фактора некроза опухолей α (TNF α) сопровождается экспрессией *cFLIP* и *A20* и носит антиапоптотический характер. Белки I κ B α и A20 являются негативными регуляторами Nf-kB по механизму обратной связи (Рис. 13). Транскрипция генов *I κ B α* и *A20* находится под контролем Nf-kB. Находясь в комплексе с I κ B α в цитоплазме, Nf-kB не способен проникнуть в ядро и активировать транскрипцию генов I κ B α и A20. Активирующие стимулы активируют киназы семейства I κ k, которые фосфорилируют белок-ингибитор I κ B α , после чего он диссоциирует из комплекса с Nf-kB и Nf-kB немедленно транслоцируется в ядро, где активирует транскрипцию генов-мишеней, в том числе I κ B α и A20. Новосинтезированный I κ B α связывает цитоплазматический Nf-kB, а A20 ингибирует активацию киназ I κ k, и, таким образом, реализуется два пути инактивации NF-kB. Благодаря такой дублирующей системе регуляции, в норме NF-kB находится в активном состоянии кратковременно. Экспрессия мРНК I κ B α и A20 указывает на активацию NF-kB. Исследование активации генов каскада NF-kB важно для анализа действия противоопухолевых препаратов.

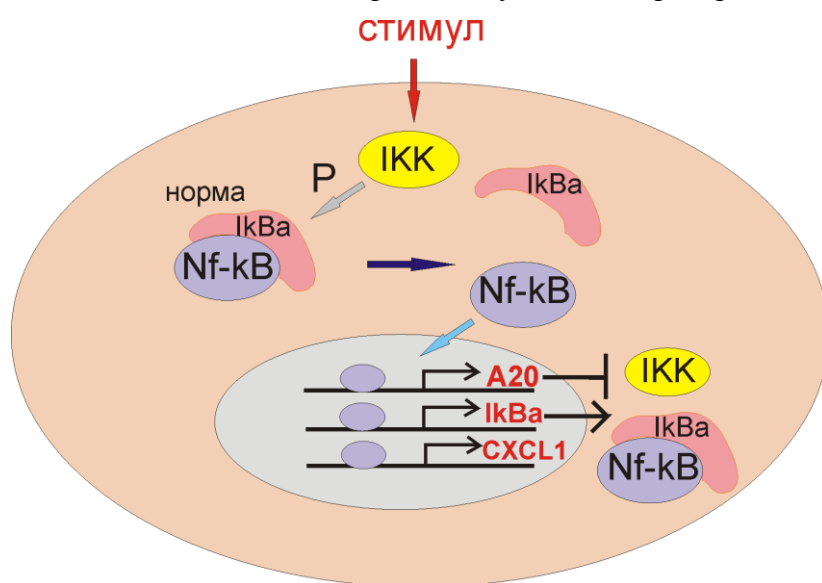


Рис. 13. Схема регуляции Nf-kB сигнального пути.

Для того, чтобы исследовать влияние рекомбинантного аналога лактапина RL2 на экспрессию генов каскада NF-kB в раковых клетках в сравнении с нетрансформированными здоровыми клетками, в качестве моделей использовали опухолевую линию клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и линию нетрансформированных клеток нормального эндометрия человека KE. Было показано, что клетки KE были слабо чувствительны к RL2 – IC50 составляла 0.68 ± 0.03 мг/мл (Таблица 7) [205]. Клетки обрабатывали препаратом RL2, после чего из клеток выделяли суммарную РНК и определяли уровень экспрессии генов *IkB α* , *A20* и *CXCL1* методом ОТ-ПЦР. Из данных, представленных на Рис. 14, можно видеть, что изменения экспрессии этих генов под действием RL2 различны для раковых клеток MDA-MB-231 и нетрансформированных клеток KE. Инкубация с RL2 клеток KE вела к повышению экспрессии мРНК *A20* и *IkB α* , указывая на активацию NF-kB. В клетках аденокарциномы MDA-MB-231 инкубация с RL2 вела к увеличению экспрессии мРНК *IkB α* и снижению мРНК *A20* (Рис. 14). Можно предположить, что значительное снижение экспрессии мРНК *A20* в раковых клетках MDA-MB-231, обработанных RL2, ведет к нарушению негативной регуляции NF-kB и способствует развитию апоптоза, а увеличение экспрессии *A20* в клетках нормального эндометрия KE повышает их выживаемость и носит антиапоптотический характер, как и описано в литературе для TNF α -зависимой активации NF-kB. Таким образом, при использовании RL2 в качестве противоопухолевого препарата *in vivo* можно предположить устойчивость к его апоптоз-индуцирующему действию клеток здоровых тканей организма. Наблюдаемая NF-kB-независимая регуляция *A20* может быть опосредована действием факторов, отличных от генов каскада NF-kB, например, микроРНК - *miR125a* и *miR125b*, как это показано для клеток В-клеточной лимфомы [206].

Известно, что экспрессия мРНК *CXCL1* (хемокиновый лиганд 1) активируется различными внешними стимулами, например, TNF α или интерлейкином 1. Промотор гена *CXCL1* содержит сайт связывания NF-kB и транскрипция *CXCL1* находится под контролем фактора транскрипции NF-kB. Поэтому, увеличение мРНК *CXCL1* также свидетельствует об активации NF-kB. Можно видеть, что инкубация клеток с RL2 ведет к супрессии мРНК гена *CXCL1* в клетках MDA-MB-231 (Рис. 14 Д), в то время клетки нормального эндометрия человека реагировали значительным увеличением экспрессии *CXCL1* после 5 ч инкубации (Рис. 14 Е), а далее происходило снижение до базового уровня через 24 ч.

Таким образом, в здоровых клетках KE рекомбинантный аналог лактапина RL2 индуцирует согласованную активацию каскада NF-kB с последующей инактивацией по механизму обратной связи, что показано для всех трех исследованных NF-kB-зависимых генов. Такая полноценная активация NF-kB с последующей согласованной инактивацией носит антиапоптотический характер. Полученные данные для клеток аденокарциномы MDA-

MB-231 позволяют предположить, что и в этих клетках RL2 также активирует каскад NF- κ B, но из-за нарушений, связанных с онкотрансформацией, активация не сопровождается последующей инактивацией, как в случае нормальных клеток KE, более того, не происходит увеличения экспрессии A20, для которого показано антиапоптотическое действие при TNF α -индуцированном апоптозе [207]. Мы полагаем, что продолжительная RL2-индуцированная активация NF- κ B, наблюдаемая в клетках MDA-MB-231, способствует гибели этих клеток.

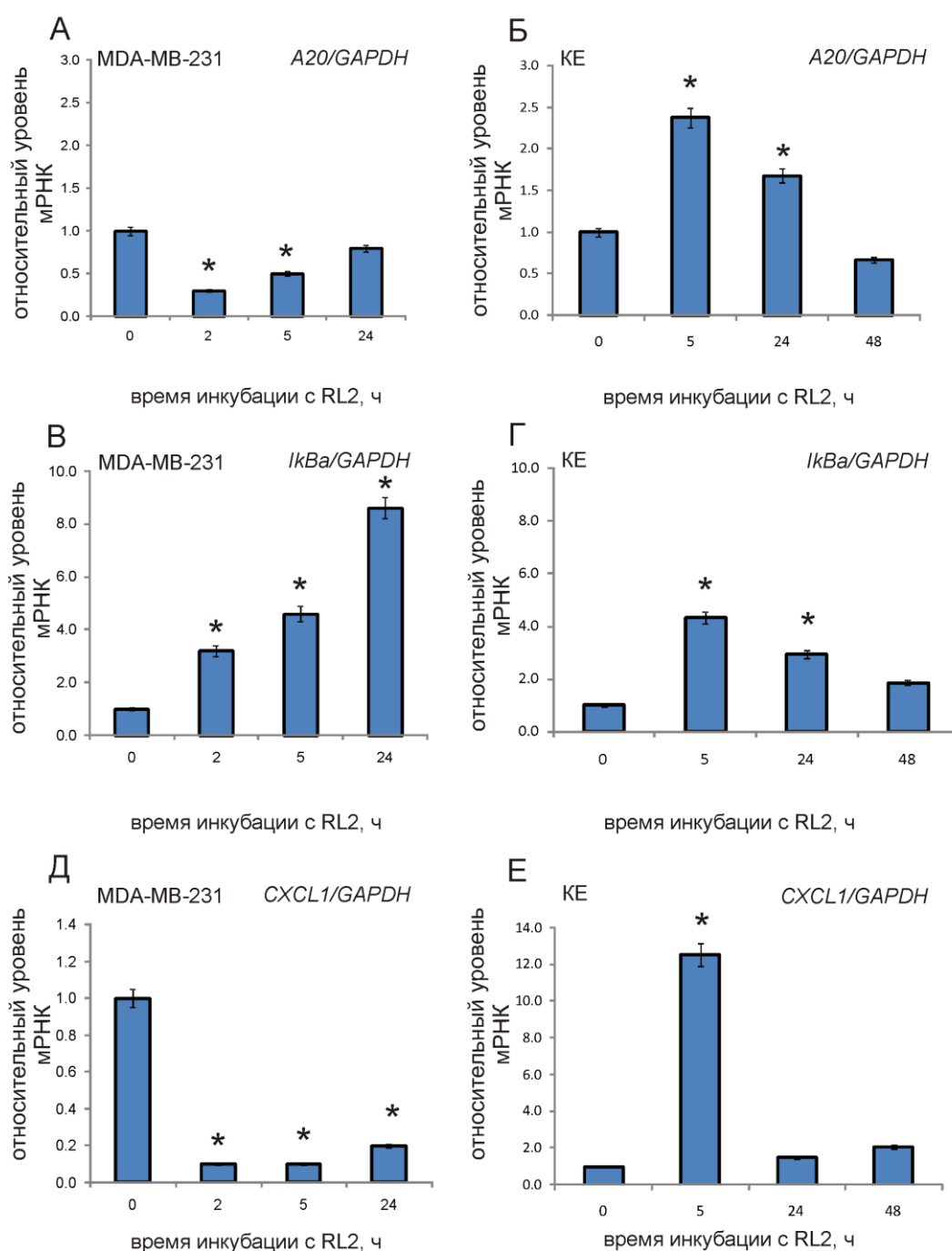


Рис. 14. Относительный уровень экспрессии мРНК *CXCL1*, *A20* и *IkBa* в культурах клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 (А, В, Д) и нетрансформированного эндометрия человека KE (Б, Г, Е), инкубированных с RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.35 мг/мл) в течение 0 - 48 часов. Уровень мРНК *GAPDH* использовали в качестве внутреннего стандарта. Соотношение мРНК целевого гена/*GAPDH* в контрольных клетках принимали за единицу. Данные представлены как среднее значение соотношения целевого гена/*GAPDH* ± SD, * - $p < 0.05$ отличия от контроля считали достоверными.

3.2. Анализ аутофагии в опухолевых клетках человека, инкубированных с рекомбинантным аналогом лактапина RL2

Аутофагический тип клеточной гибели (тип II программируемой клеточной гибели) отличается морфологически от апоптоза и не зависит от активации каспаз [208]. В настоящее время существует ряд традиционных химиопрепаратов, которые индуцируют гибель раковых клеток по аутофагическому пути, а также описаны соединения, индуцирующие параллельно апоптоз и аутофагию [209]. Традиционным индуктором аутофагии является голодание, и в этом случае аутофагия направлена на преодоление временного недостатка питательных веществ. Аутофагия может способствовать подавлению роста опухоли за счет элиминации онкогенных белковых субстратов, токсичных белков, поврежденных органелл. В то же время, именно аутофагия обеспечивает опухолевую клетку субстратом для метаболических процессов при недостатке питательных ресурсов и поддерживает пул функциональных митохондрий. Белки, присутствующие внутри клетки в избыточном количестве, могут быть подвержены деградации в аутофаголизосомах, как и белки с неправильным фолдингом.

Поскольку концентрация аналога лактапина RL2, индуцирующая гибель опухолевых клеток, достаточно значительная – около 200 мкг/мл, мы предположили, что попадание RL2 внутрь клетки может активировать аутофагию. Детекция аутофагии может осуществляться как непосредственным наблюдением аутофагосом методом электронной микроскопии, так и по изменению основных молекулярных маркеров. Для аутофагического типа клеточной гибели характерно накопление аутофагосом, процессинг белка LC3 и изменение уровня характерных молекулярных белков-маркеров: p62, Beclin1, ATG. Белок LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3) является одним из основных структурных белков мембраны аутофагосом. Этот белок участвует в формировании аутофагосом на стадии инициации и является молекулярным маркером аутофагии [210, с. 3; 211]. При активации аутофагии, цитоплазматическая форма LC3-I (18 kDa) подвергается процессингу с присоединением фосфатидилэтаноламина с образованием формы LC3-II (16 kDa). Появление LC3-II является индикатором того, что в клетке индуцирована аутофагия.

3.2.1. Анализ признаков аутофагии в ультраструктуре клеток MDA-MB-231, инкубированных с рекомбинантным аналогом лактапина RL2

Для визуализации клеток с признаками аутофагии, а именно, образования фагофоров, миелиноподобных структур, мультивезикулярных телец, аутофагосом, аутофаголизосом в клетках, инкубированных с RL2, использовали метод трансмиссионной электронной

микроскопии. Клетки MDA-MB-231 инкубировали с RL2, в качестве контрольных использовали необработанные клетки (Рис. 15) (анализ препаратов выполнен Юнусовой А.Ю., группа микроскопических исследований, ИХБФМ СО РАН).

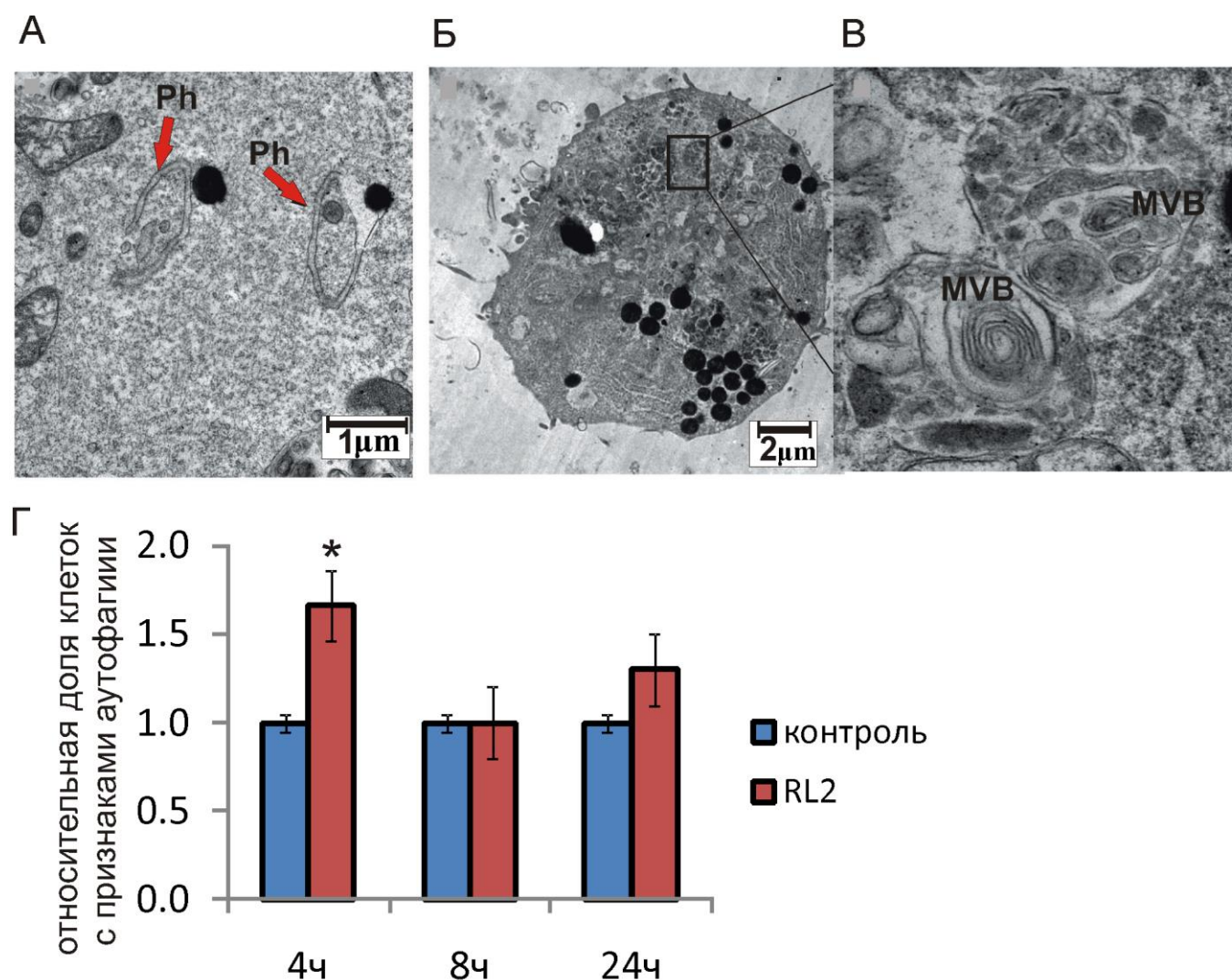


Рис. 15. Анализ аутофагических структур в клетках MDA-MB-231 с признаками аутофагии, обработанных RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) в течение 4 – 24 ч и анализировали методом трансмиссионной электронной микроскопии. **А.** Формирование фагофора в клетках, инкубированных с RL2 в течение 4 ч. Ph – фагофор. **Б.** Клетка с многочисленными аутофаголизосомами. **В.** Фрагмент клетки с миелино-подобными структурами и фрагментом цитоплазмы. MVB – мультивезикулярные тельца. **Г.** Относительная доля клеток с признаками аутофагии. Долю клеток с признаками аутофагии в контрольных необработанных клетках принимали за единицу. * - $p < 0.05$ отличия от контроля считали достоверными.

На представленных изображениях (Рис. 15 А–В) в клетках, обработанных RL2, можно различить как хорошо оформленные аутофаголизосомы, так и фагофор на стадии формирования. Для анализа относительного числа клеток с признаками аутофагии в одном образце, проводили подсчет в 3-5 срезах, что приблизительно составляет 280-480 клеток на образец. Анализ относительного количества аутофагосом и аутофаголизосом в клетках MDA-MB-231 выявил увеличение доли этих структур в образцах, инкубированных с RL2 в течение 4 ч (Рис. 15 Г). Таким образом, на ранних стадиях инкубации с RL2 в клетках индуцируется аутофагия.

3.2.2. Анализ RL2-зависимого изменения основных молекулярных маркеров аутофагии в обработанных клетках

Для исследования активации аутофагии под действием RL2, клетки MDA-MB-231 инкубировали с аналогом лактапина и визуализировали белок LC3A/B методом иммуноцитохимии с флуоресцентно-мечеными антителами. Можно видеть, что по сравнению с контрольными необработанными образцами, в клетках, обработанных RL2, наблюдается увеличение LC3A/B (Рис. 16 А). Исследование процессированной формы LC3-II показало, что инкубация с RL2 ведет к появлению LC3-II в клетках MDA-MB-231. На ранних стадиях инкубации LC3-II присутствует в образцах после 3 ч и 8 ч обработки RL2 и снижается до значения контрольных клеток к 24 ч инкубации (Рис. 16 Б), что свидетельствует в пользу ингибирования аутофагии при длительной инкубации с RL2.

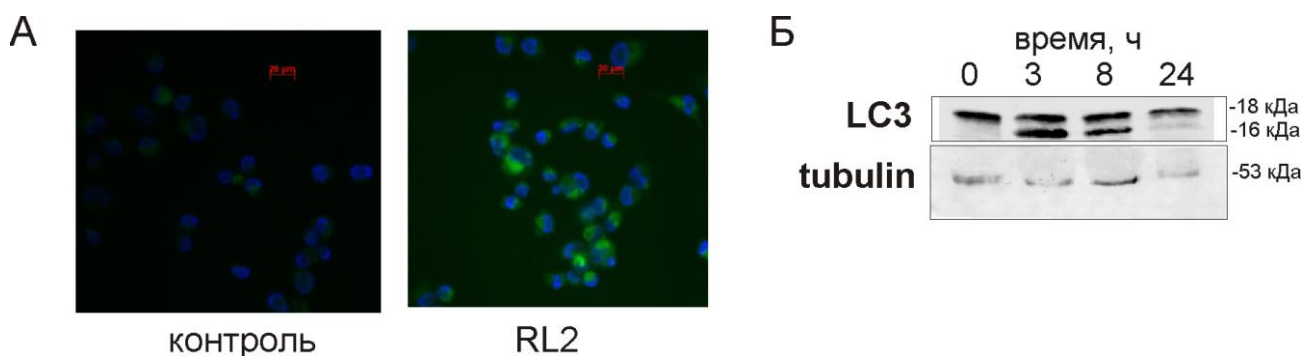


Рис. 16. Иммунофлуоресцентный анализ (А) и Вестерн блот анализ (Б) белка LC3 в клетках MDA-MB-231 при обработке RL2. **А.** Клетки инкубировали с RL2 (0.2 мг/мл) в течение 8 ч и анализировали методом иммуноцитохимии с окрашиванием антителами к LC3A/B. DAPI – синий сигнал. Анти-LC3-FITC – зеленый сигнал. **Б.** Клетки инкубировали с RL2 (0.2 мг/мл) в течение 0 – 24 ч и анализировали лизаты клеток методом Вестерн блота.

В качестве дополнительных молекулярных маркеров аутофагии в клетках, обработанных RL2, было исследовано изменение белков p62/SQSTM1 (p62), Beclin 1 и ATG-5 (Рис. 6, 7). Функциональная роль p62/SQSTM1 (p62), Beclin 1 и ATG-5 в аутофагии обусловила выбор именно этих маркеров. В отсутствие аутофагии уровень адаптерного белка p62 в клетке достаточно стабилен, а при активации аутофагии p62 доставляется вместе с карго в формируемую аутофагосому, где происходит его деградация, поэтому снижение уровня p62, является признаком аутофагии. Белок p62 является связующим звеном между субстратом, который должен подвергнуться аутофагии и внутренней мембраной растущего фагофора (Рис. 6, 7) [138]. Becline 1 в комплексе с Vcl-2 ингибирует аутофагию, а диссоциация белков из комплекса ведет к активации аутофагии. Диссоциация комплекса Becline 1/Vcl-2 может происходить при конкурентном комплексообразовании Vcl-2 с белками ВАХ или ВАК. Свободный Beclin 1 является одним из ключевых компонентов иницирующего комплекса, в который также входят PI3K киназа класса III и белок p150 [212]. Таким образом, белок Beclin 1 в комплексе с Vcl-2 может осуществлять взаимное переключение аутофагии и апоптоза. Переключение аутофагии на апоптоз также может быть опосредовано расщеплением Beclin 1 активированной каспазой-3 (Рис. 6, 7). Белок ATG-5 в комплексе с ATG-12 формируют фагофор на стадиях инициации и элонгации, а в дальнейшем ATG-5 участвует в кластеризации липидных везикул при образовании липидной мембраны аутофагосомы [213]. Гиперэкспрессия ATG-5 ведет к активации аутофагии.

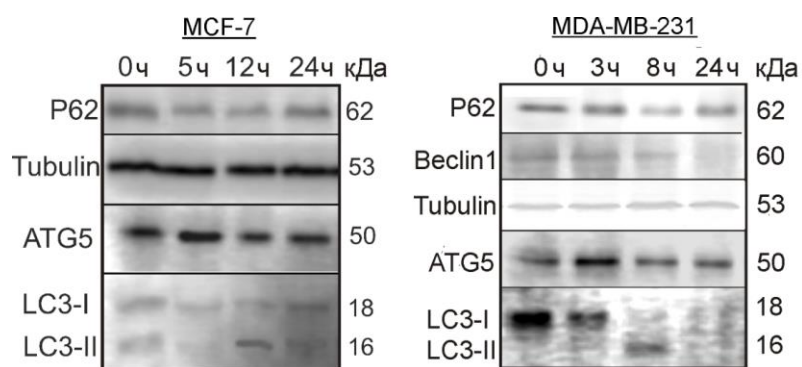


Рис. 17. Анализ белков аутофагии в клетках MDA-MB-231 и MCF-7, инкубированных с RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) в течение 0 – 24 ч. Лизаты клеток анализировали методом Вестерн блота. Характерный пример Вестерн блота.

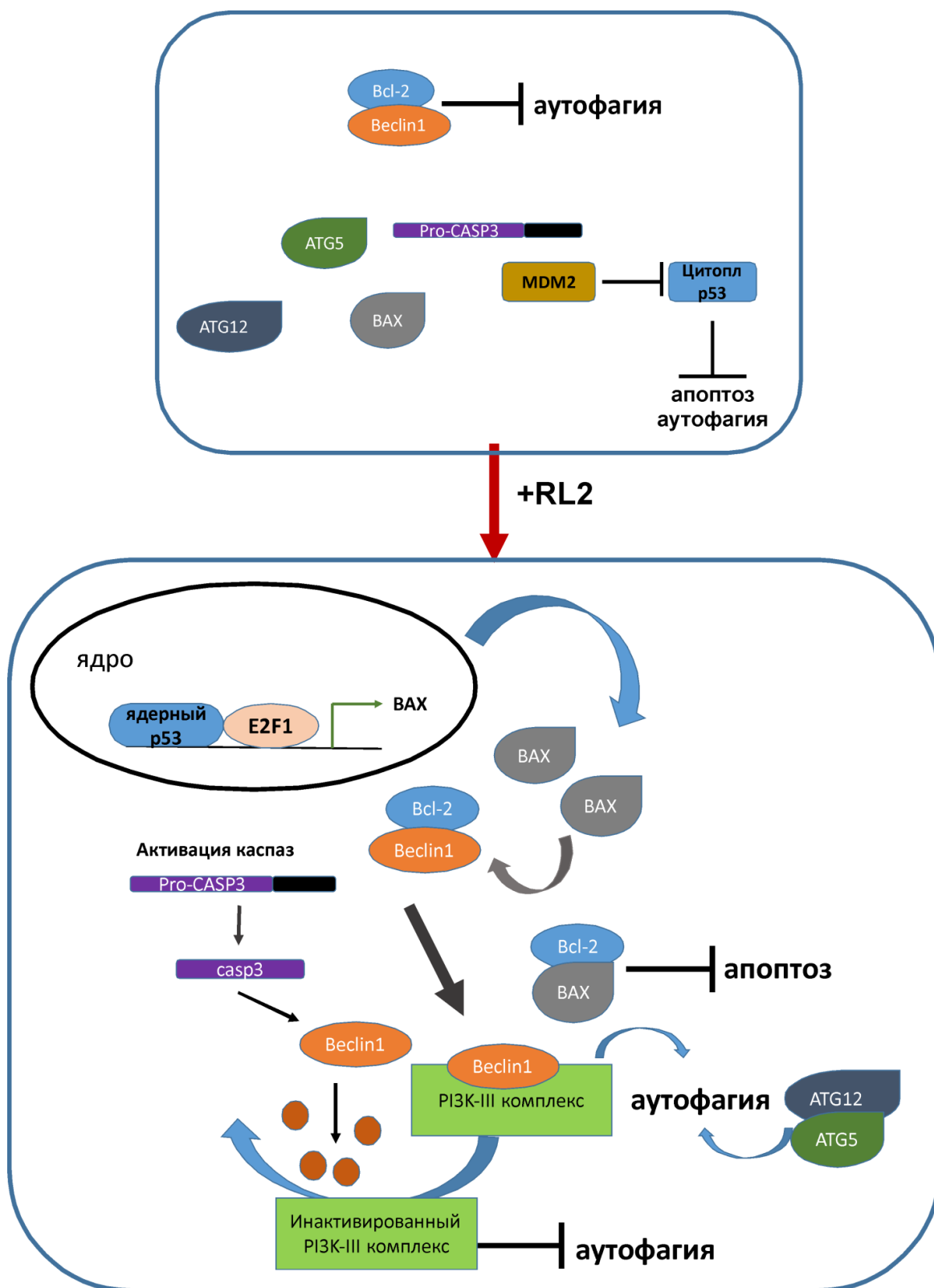


Рис. 18. Схема взаиморегуляции процессов апоптоза и аутофагии в опухолевой клетке под действием RL2.

При анализе p62, Beclin 1 и ATG-5 в клетках MCF-7 и MDA-MB-231, обработанных RL2, обнаружено, что такая обработка ведет к снижению p62 и резкому увеличению ATG-5, подтверждая наблюдаемую методом электронной микроскопии инициацию аутофагии на

ранних этапах инкубации (Рис. 17). Снижение Beclin 1 через 8 ч и 24 ч инкубации с RL2 свидетельствует в пользу его расходования в иницирующем комплексе, а также, возможно, указывает на расщепление Beclin 1 каспазой-3 при параллельно активированном апоптозе. Полученные данные позволяют заключить, что RL2 на ранних стадиях инкубации активирует аутофагический каскад в клетках MDA-MB-231 и MCF-7. Эти данные согласуются с результатами, полученными методом электронной микроскопии, о том, что RL2 активирует аутофагию именно на ранних стадиях инкубации.

На основании полученных данных по изменению белковых ансамблей аутофагии и апоптоза была разработана схема, объясняющая параллельное развитие апоптоза и аутофагии в клетках, обработанных рекомбинантным аналогом лактапина RL2 (Рис. 18). Мы полагаем, что проникая в опухолевые клетки MDA-MB-231, RL2 параллельно активирует апоптоз с активацией каспазы-3 и аутофагию. В результате активации аутофагии Bcl-2 диссоциирует из комплекса с Beclin 1 и формирует комплекс Bcl-2/BAX, ингибирующий апоптоз. В процессе аутофагии часть RL2 деградирует в аутофаголизосомах, а активируемый свободным RL2 процесс апоптоза с активированной каспазой-3 ведет к деградации Beclin 1 и супрессии аутофагии.

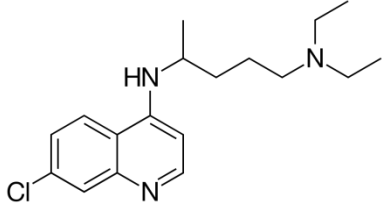
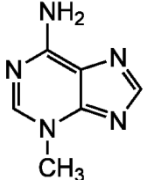
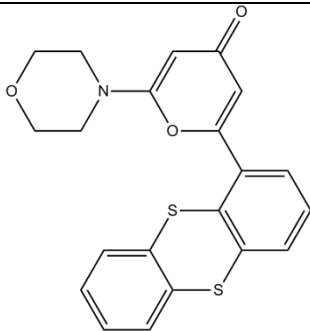
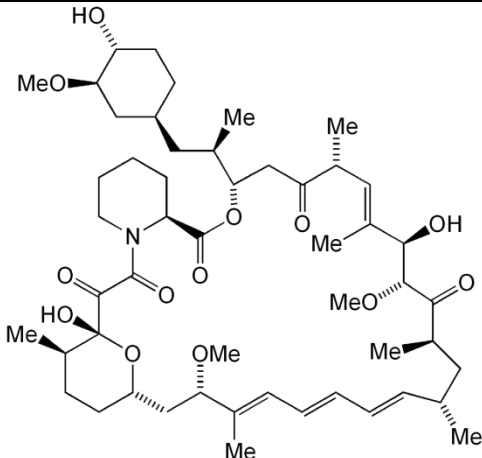
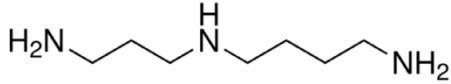
Таким образом, можно предположить, что на ранних этапах инкубации с RL2 в клетках превалирует аутофагия, а далее равновесие сдвигается в сторону апоптоза. При этом открытым остается вопрос – способствует ли активируемая RL2 аутофагия выживанию или гибели клетки.

3.2.3. Анализ влияния модуляторов аутофагии на гибель опухолевых клеток, обработанных RL2

Поскольку активация аутофагии может носить как опухоль-подавляющий, так и опухоль-поддерживающий характер, индукторы и активаторы аутофагии способны модулировать клеточную гибель, сопряженную с аутофагией.

Использование модуляторов аутофагии позволяет не только понять направленность RL2-индуцируемой аутофагии, но и повысить эффективность цитотоксического действия аналога лактапина. Таким образом, в задачи исследования входило выявление характера RL2-индуцирующей аутофагии – стимулирующей гибель клетки или способствующей выживанию. Для решения этой задачи использовали модуляторы аутофагии, представленные в Таблице 8. В экспериментах использовали постоянную концентрацию RL2 (0.1 мг/мл), при которой наблюдается гибель в среднем не более 25 % клеток линий MDA-MB-231 и MCF-7.

Таблица 8. Структурные формулы ингибиторов и индукторов аутофагии, используемых в исследовании.

Название	Влияние на аутофагии	Формула
Хлорокина дифосфат (CQ)	ингибитор	
3-метиладенин (ЗМА)	ингибитор	
Ku5593355933 (Ku55933)	ингибитор	
Рапамицин (Rap)	индуктор	
Спермидин (Sp)	индуктор	

3.2.3.1. Влияние ингибитора аутофагии хлорокина на RL2-зависимую гибель клеток

Препарат хлорокин (CQ) изначально применяли в качестве средства для лечения малярии, а позже было обнаружено, что CQ ингибирует аутофагию в клетках эукариот [214]. Известно, что в опухолевых клетках базовый уровень аутофагии повышен для преодоления метаболического голодания вследствие быстрого роста опухоли. Поэтому, ингибирование аутофагии в опухолевых клетках, как правило, способствует гибели таких клеток. CQ вызывает гибель различных опухолевых линий клеток, блокируя функцию лизосом (Рис. 19). При нейтральных рН CQ не заряжен и беспрепятственно проникает сквозь плазматическую мембрану. В кислой среде внутри лизосом CQ протонируется, в результате чего он теряет способность свободно диффундировать сквозь мембрану и остается внутри лизосом, повышая рН, вследствие чего активность лизосомальных ферментов ингибируется [161].

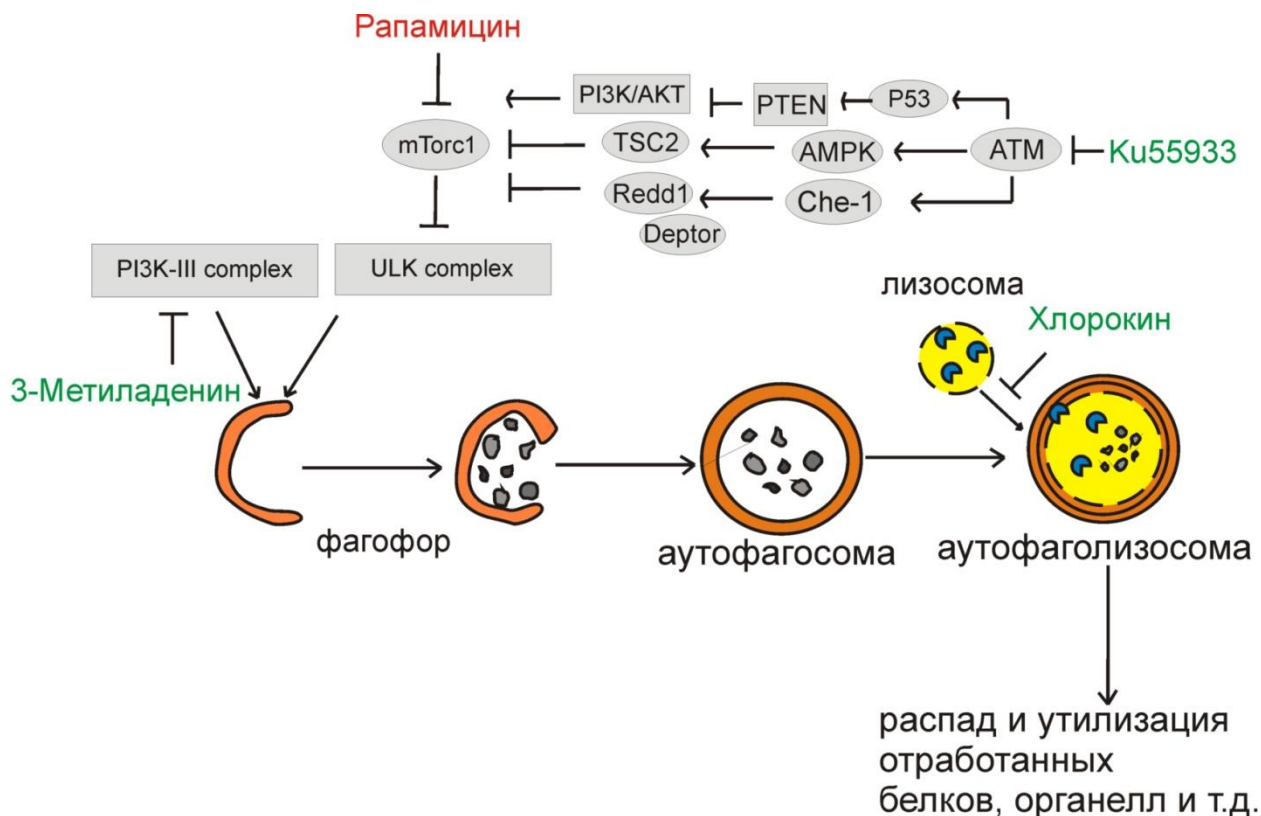


Рис. 19. Ключевые точки воздействия ингибиторов и индуктора аутофагии на разных этапах формирования аутофаголизосомы.

Для анализа влияния CQ на RL2-зависимую клеточную гибель клетки MDA-MB-231 и MCF-7 инкубировали с CQ (5 – 100 мкМ) в моно-режиме и в комбинации с RL2 (0.1 мг/мл) и анализировали выживаемость клеток методом МТТ (Рис. 20 А). На основании данных МТТ-теста были построены кривые зависимости жизнеспособности клеток от концентрации

препаратов. Показано, что комбинация CQ и RL2 вызывала цитотоксический эффект, превышающий эффекты моно-обработки препаратами (Рис. 20 Б, В). Комбинаторный индекс (CI) действия препаратов рассчитывается на основании данных «доза-эффект», значения CI для синергизма составляют $0 \leq CI < 1$; для антагонизма $1 < CI \leq \infty$; при этом $CI=1$ относят к аддитивному эффекту [215]. Комбинаторный индекс для клеток MDA-MB-231 составил 0.97 (20 мкМ CQ, 0.1 мг/мл RL2), для клеток MCF-7 CI составил 0.77 – 0.8 (5 – 20 мкМ CQ, 0.1 мг/мл RL2), что соответствует синергетическому эффекту.

Поскольку CQ является ингибитором аутофагии, его применение может изменять тип клеточной гибели. Было интересно исследовать, ведет ли супрессия аутофагии к усилению апоптоза при обработке RL2. Клетки MDA-MB-231 и MCF-7 инкубировали с CQ (20 мкМ) и RL2 (0.15 мг/мл) по отдельности и в комбинации и анализировали методом проточной цитометрии. Было показано, что процент поздних апоптотических клеток MDA-MB-231 (Annexin V⁺/PI⁺) и ранних апоптотических клеток MCF-7 (Annexin V⁺/PI) в образцах клеток, обработанных комбинацией препаратов RL2 и CQ был достоверно выше, по сравнению с образцами, обработанными препаратом в отдельности (Рис. 21). Процент живых клеток в образцах с комбинацией препаратов был достоверно ниже, что коррелирует с результатами МТТ-теста (Рис. 20).

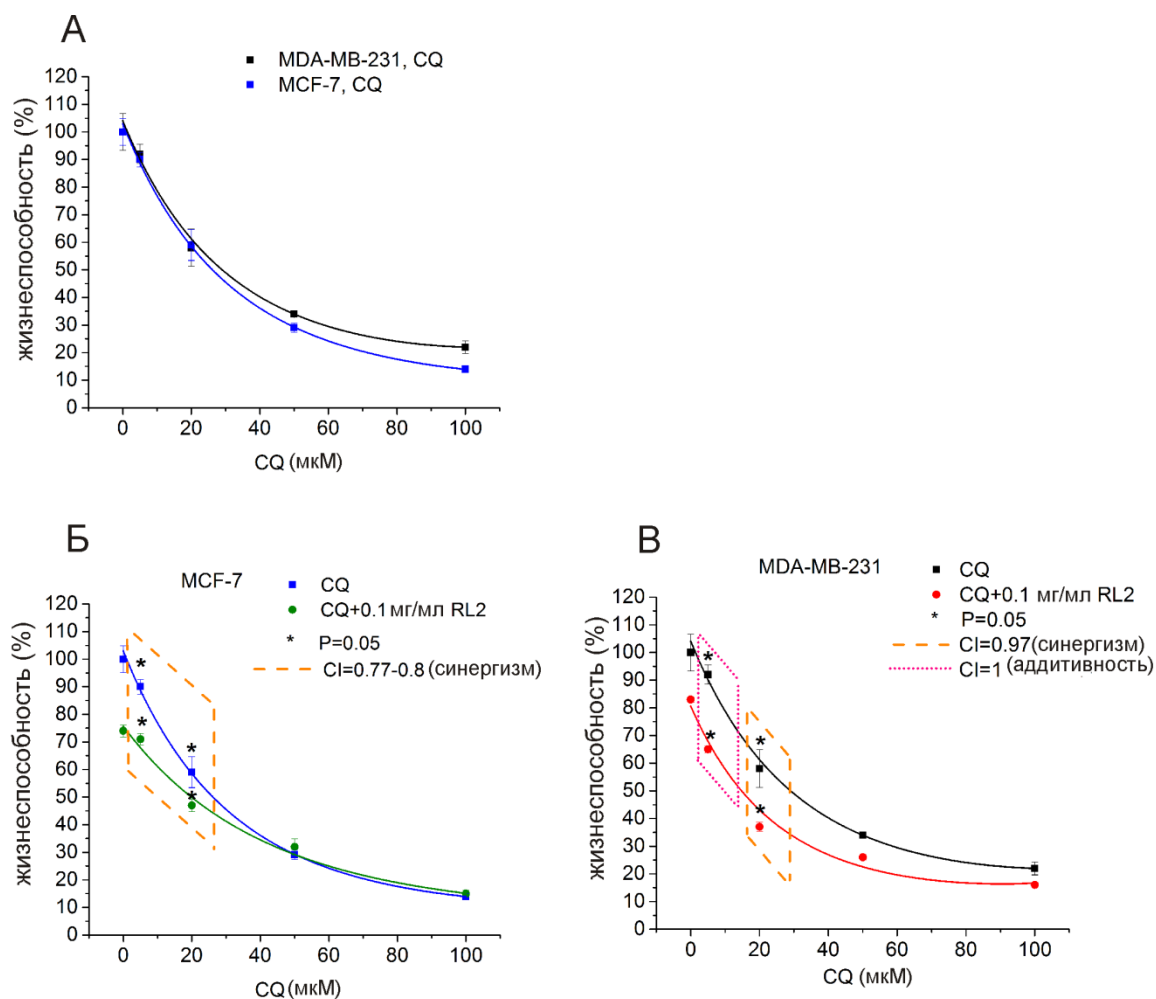


Рис. 20. Зависимость жизнеспособности клеток MDA-MB-231 и MCF-7 от концентрации CQ в моно-режиме и в комбинации с RL2. Клетки инкубировали с CQ (0 – 100 μ M) и RL2 (0.1 мг/мл) в течение 48 часов. Данные жизнеспособности представлены как относительное среднее значение (%) по сравнению с контрольными клетками, обработанными PBS, по результатам трех независимых экспериментов \pm SD.

Изменение белковых маркеров аутофагии в клетках, обработанных RL2 и CQ, оценивали методом Вестерн-блота (Рис. 21 А). Можно видеть, что при обработке клеток MDA-MB-231 комбинацией CQ и RL2 наблюдалось значительное увеличение уровня белка p62 после 3 ч инкубации, что указывает на эффективное подавление процесса аутофагии. Поскольку CQ в комбинации с RL2 приводит к более эффективной гибели клеток MDA-MB-231 и MCF-7, можно предположить, что RL2 вызывает аутофагию, способствующую выживанию раковых клеток.

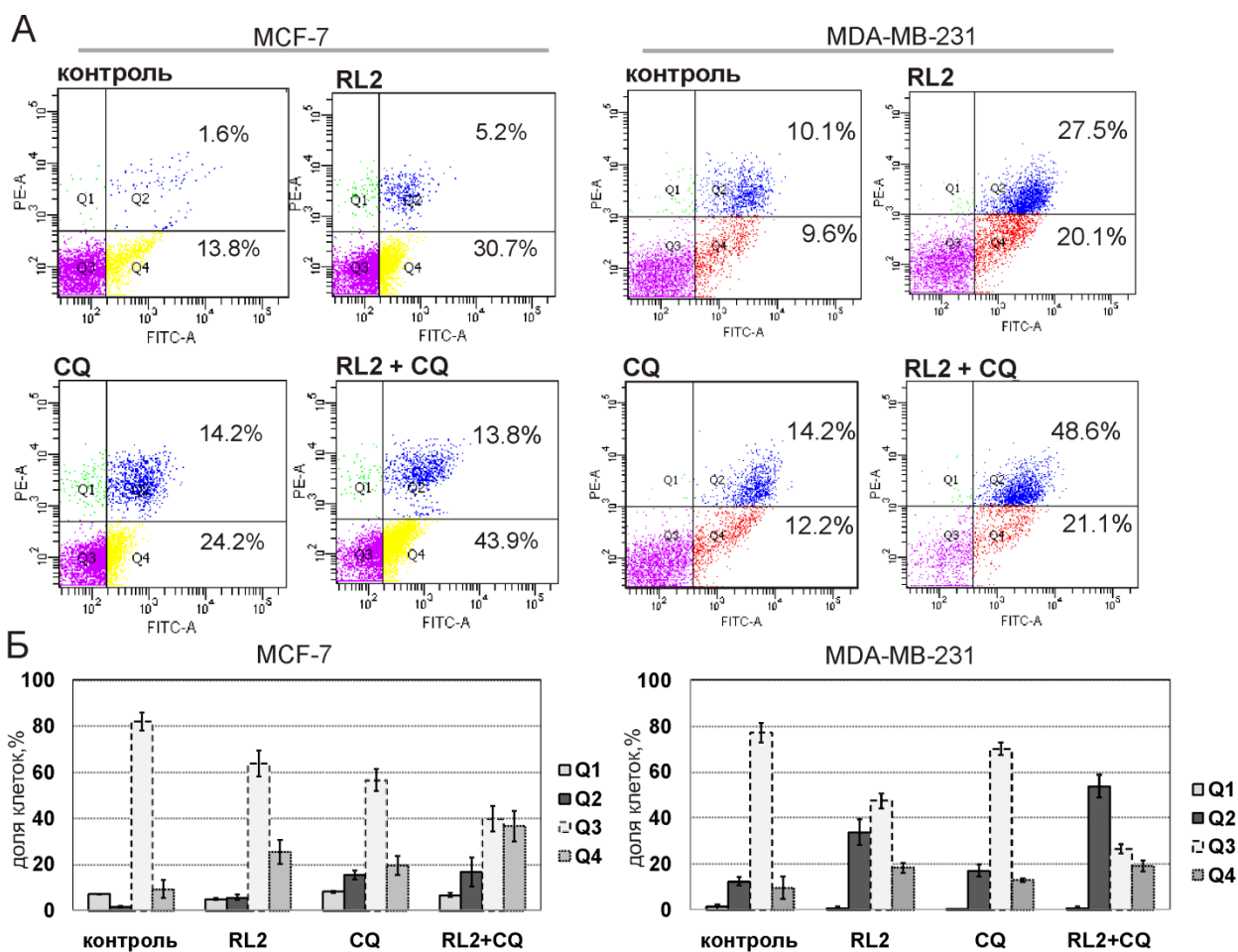


Рис. 21. Анализ гибели клеток MDA-MB-231 и MCF-7, инкубированных с RL2, CQ и комбинацией препаратов в течение 24 ч. **А.** Клетки инкубировали с RL2 (0.15 мг/мл), CQ (20 мкМ) и с комбинацией препаратов и анализировали методом проточной цитометрии с использованием окрашивания Annexin V/PI. **Б.** Гистограммы представленности популяций клеток в образцах, инкубированных с RL2 и CQ.

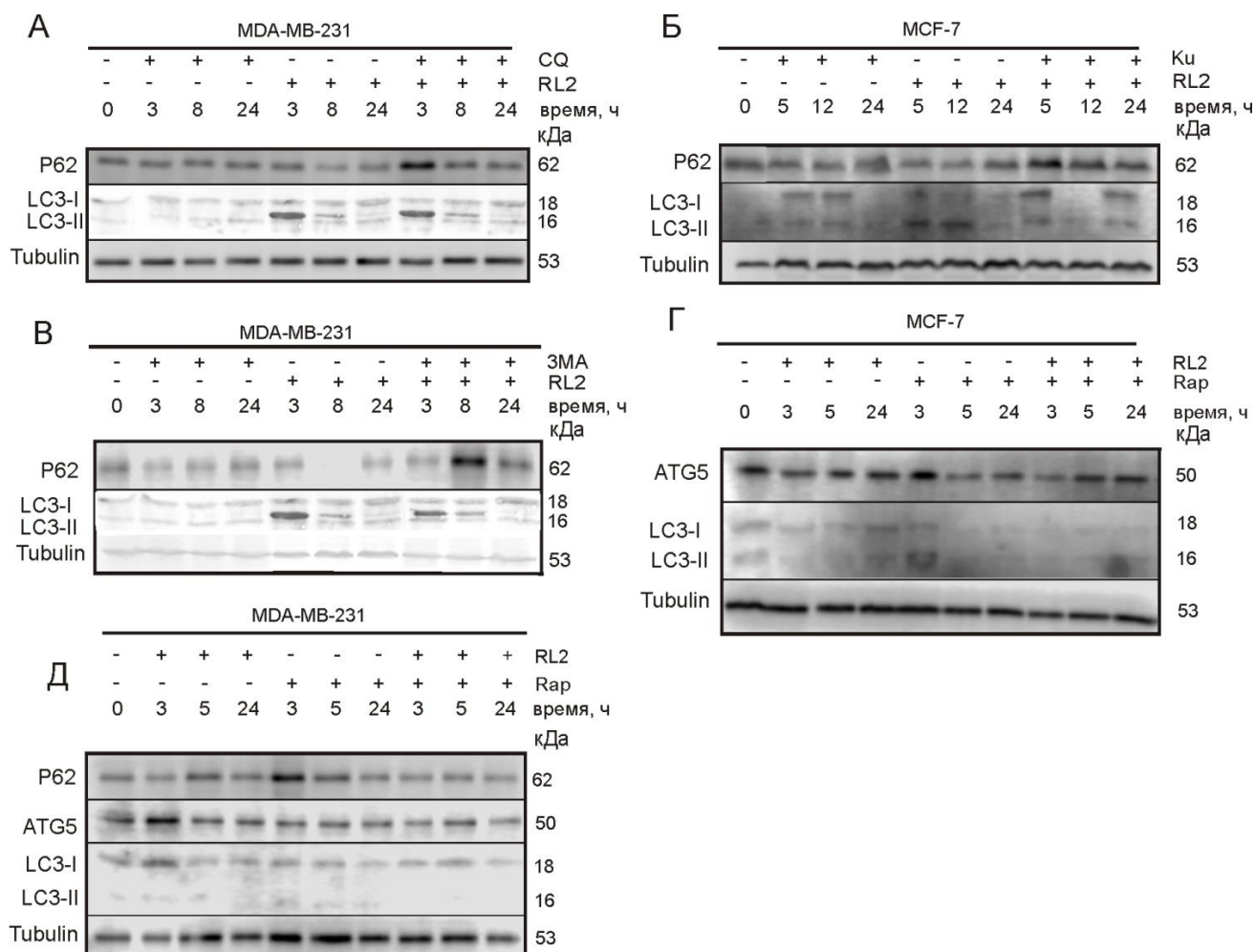


Рис. 22. Анализ белков аутофагии в лизатах клеток MDA-MB-231 и MCF-7, инкубированных с RL2 и модуляторами аутофагии. Клетки MDA-MB-231 (А, В, Д) и MCF-7 (Б, Г.) инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл), CQ (10 мкМ), 3МА (10 мМ), Ku55933 (30 мкМ), Rap (10 мкМ) и комбинацией препаратов в течение 0 – 24 ч как указано на рисунке. Представлены примеры характерных анализов образцов методом Вестерн блота.

3.2.3.2. Влияние ингибитора аутофагии Ku55933 на RL2-зависимую гибель клеток

Ku55933 – специфический ингибитор АТМ киназы (Рис. 11), который опосредованно ингибирует аутофагию [216]. Из литературных данных известно, что Ku55933 обладает цитотоксическим эффектом в отношении клеток рака молочной железы человека, рака простаты, рака печени, остеосаркомы, меланомы, рака гортани, рака шейки матки и др. как при моно-режиме, так и в комбинации с лучевой терапией и химеопрепаратами [217; 218]. Поэтому было важно исследовать цитотоксическую активность Ku55933 в отношении клеток MCF-7 и MDA-MB-231 в моно-режиме и в комбинации с RL2. Для анализа жизнеспособности клеток, обработанных препаратами Ku55933 (5 – 40 мкМ) и RL2 (0.1

мг/мл), проводили МТТ-анализ, данные которого использовали для построения кривых зависимости жизнеспособности клеток от концентрации препаратов. Было показано, что Ku55933 вызывает гибель клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231, причем клетки MCF-7 были более чувствительны к Ku55933 по сравнению с MDA-MB-231, что отражено в значении IC50 - 26.1 мкМ и 57.2 мкМ для указанных клеточных линий, соответственно (Рис. 23 А). При обработке клеток MCF-7 и MDA-MB-231 комбинацией Ku55933 с RL2 наблюдался отчетливый синергетический эффект (Рис. 23 Б, В) как для клеток MCF-7 (CI=0.65 – 0.95), так и для MDA-MB-231 (CI=0.47 – 0.64).

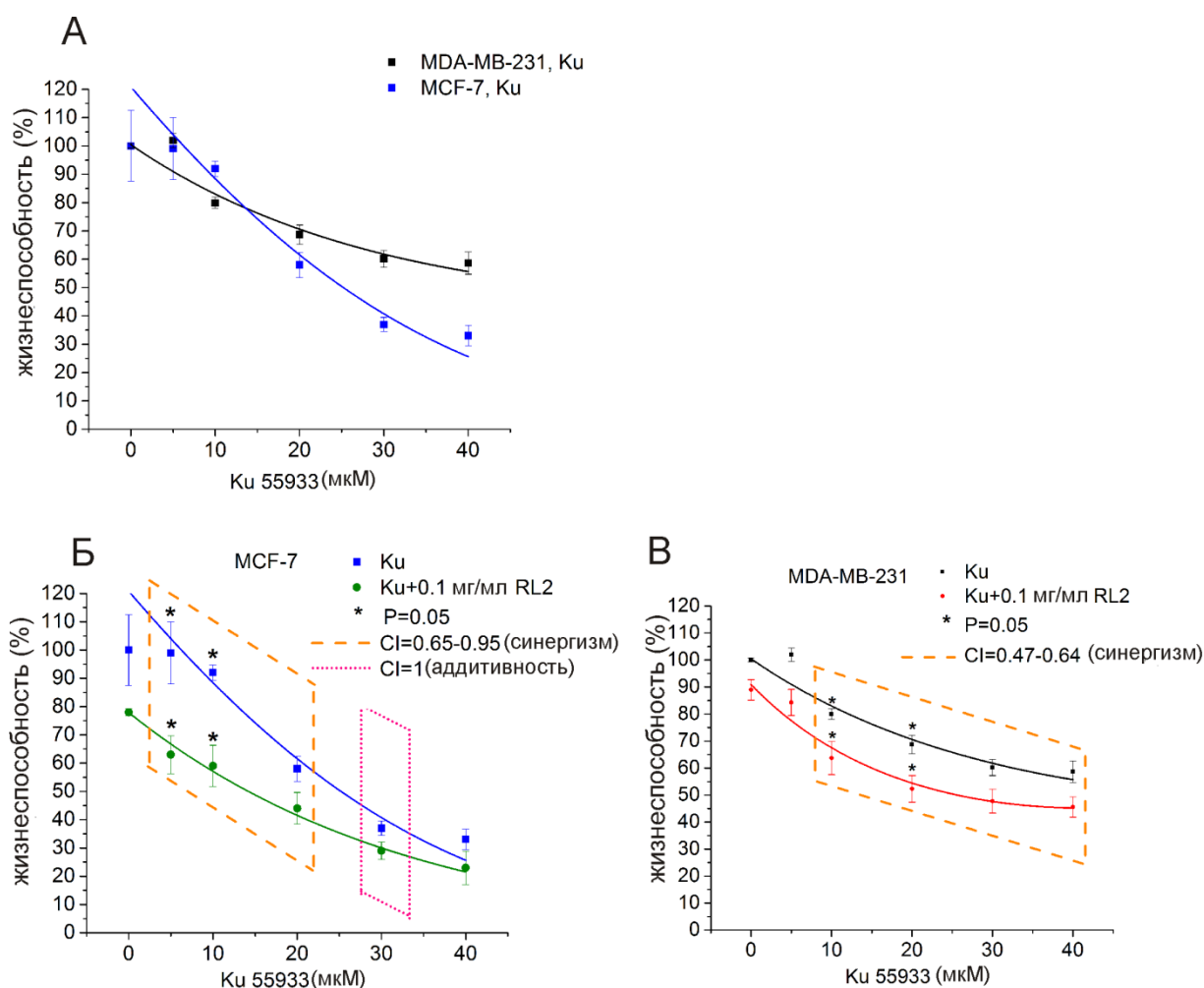


Рис. 23. Зависимость жизнеспособности клеток MDA-MB-231 и MCF-7 от концентрации Ku55933 в моно-режиме и в комбинации с RL2. Клетки инкубировали с Ku55933 (0 – 40 μM) в моно-режиме и в комбинации с RL2 (0.1 мг/мл) в течение 48 часов. Данные жизнеспособности представлены как относительное значение (%) по сравнению с контрольными клетками, обработанными PBS. В зависимости указано среднее значение трех независимых экспериментов ± SD.

Поскольку, линия клеток MCF-7 оказалась более чувствительной как к Ku55933, так и к комбинации Ku55933 и RL2, изменение уровня белков аутофагического каскада – p62 и LC3, анализировали в клетках MCF-7 (Рис. 23 Б). Методом Вестерн блота показано, что при обработке клеток MCF-7 Ku55933 в комбинации с RL2 уровень белка p62 увеличивался по сравнению с контрольными необработанными клетками на протяжении всего времени инкубации (5 – 24 ч), что говорит о подавлении аутофагии (Рис. 22). Уровень LC3-II в клетках, обработанных комбинацией препаратов, также снижался.

Полученные данные позволяют заключить, что Ku55933 эффективно ингибирует аутофагию в клетках MCF-7, и такое ингибирование аутофагии способствует RL2-зависимой клеточной гибели, что также подтверждает предположение о том, что RL2-зависимая аутофагия способствует выживанию клеток, обработанных RL2.

3.2.3.3. Влияние ингибитора аутофагии 3-метиладенина на RL2-зависимую гибель клеток

Известно, что ингибирование аутофагии препаратом 3МА обусловлено ингибированием активации PI3K класса III, то есть стадии инициации образования фагофора (Рис. 19). Из литературных данных известно, что 3МА обладает цитотоксическим действием в отношении клеток рака простаты и рака печени, а также 3МА усиливает цитотоксический эффект доцитаксела *in vitro* [219; 220]. Для исследования цитотоксической активности 3МА в отношении клеток MCF-7 и MDA-MB-231 в моно-режиме и в комбинации с RL2 клетки MCF-7 и MDA-MB-231 инкубировали с 3МА (5 – 40 мМ) и RL2 (0.1 мг/мл). На основании данных МТТ-теста были построены кривые зависимости жизнеспособности клеток от концентрации препаратов. Показано, что комбинация RL2 с 3МА не увеличивает цитотоксический эффект по сравнению с моно-обработкой (Рис. 24), что позволяет предположить, что ингибирование RL2-зависимой аутофагии на уровне PI3K может также блокировать RL2-зависимый апоптоз

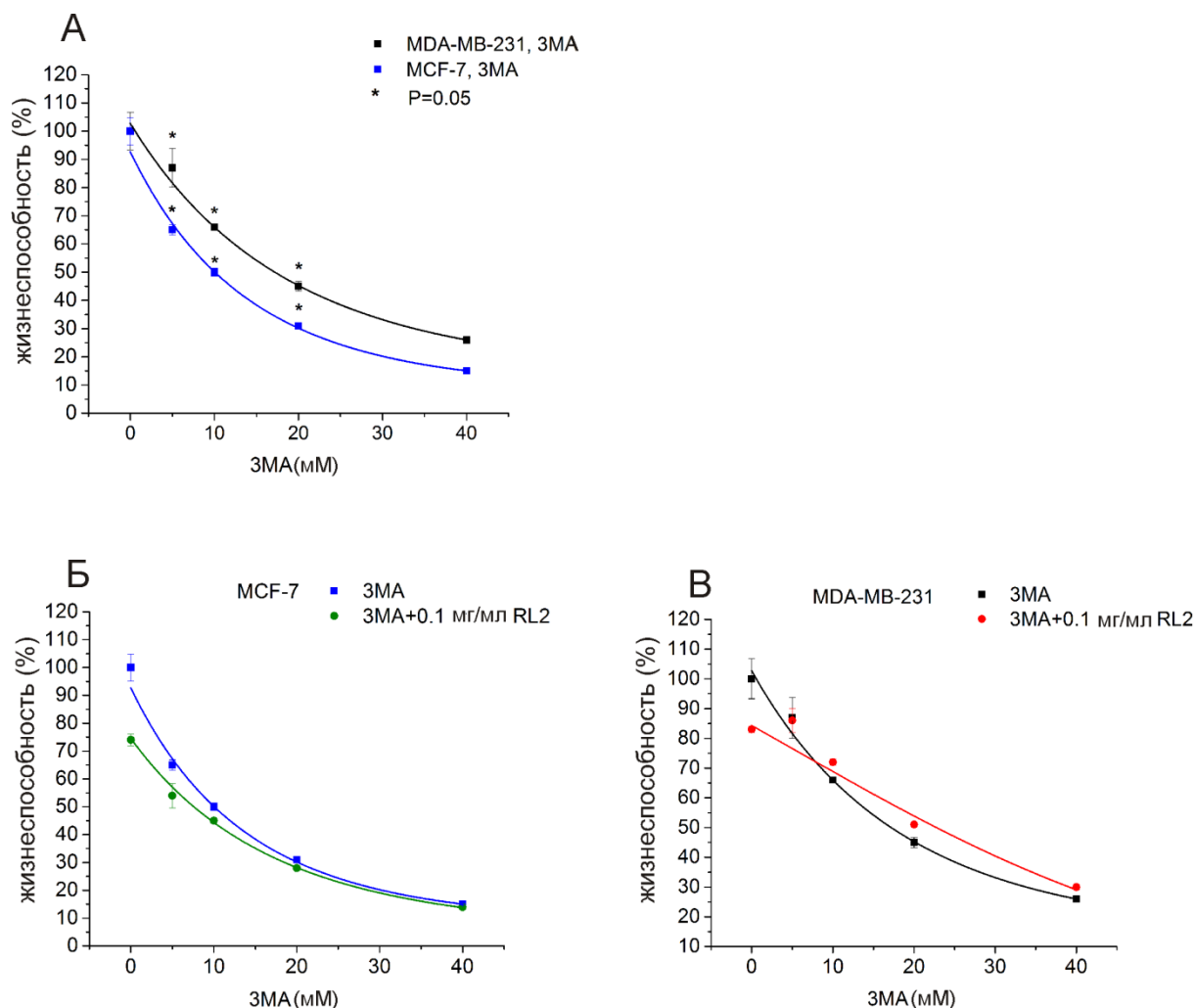


Рис. 24. Влияние 3-метиладенина и RL2 на жизнеспособность клеток MDA-MB-231 и MCF-7. Клетки инкубировали с 3MA (0 – 40 мМ) в моно-режиме и в комбинации с RL2 (0.1 мг/мл) в течение 48 часов. Данные жизнеспособности представлены как относительное значение (%) по сравнению с контрольными клетками, обработанными PBS. В зависимости указано среднее значение трех независимых экспериментов \pm SD.

Анализ изменения белка p62 в клетках MDA-MB-231 методом Вестерн-блота показал, что через 8 часов инкубации RL2 в комбинации с 3MA происходит увеличение уровня p62, что говорит об эффективном ингибировании аутофагии (Рис. 22 В). В то же время, происходит снижение процессированной формы LC3-II по сравнению с моно-обработкой RL2, что также может свидетельствовать о подавлении аутофагии. Таким образом, полученные данные подтверждают предположение о том, что помимо аутофагии 3MA также опосредованно ингибирует RL2-зависимый апоптоз. Такое предположение вполне обосновано, так как из литературных данных известно, что 3MA может ингибировать активацию каспаз и, таким образом, снижать уровень апоптоза.

3.2.3.4. Влияние индуктора аутофагии рапамицина на RL2-зависимую гибель клеток

Рапамицин является препаратом-иммуносупрессором, который ингибирует протеинкиназу – мишень рапамицина у млекопитающих (mTOR), которая, в свою очередь, играет ключевую роль в процессах пролиферации, роста, дифференцировки, миграции и выживания (Рис. 19). Поскольку, ингибирование mTOR приводит к индукции аутофагии, рапамицин в настоящее время широко используют в качестве индуктора аутофагии *in vitro* [221]. Стимуляция аутофагии рапамицином значительно супрессирует апоптоз в обработанных клетках.

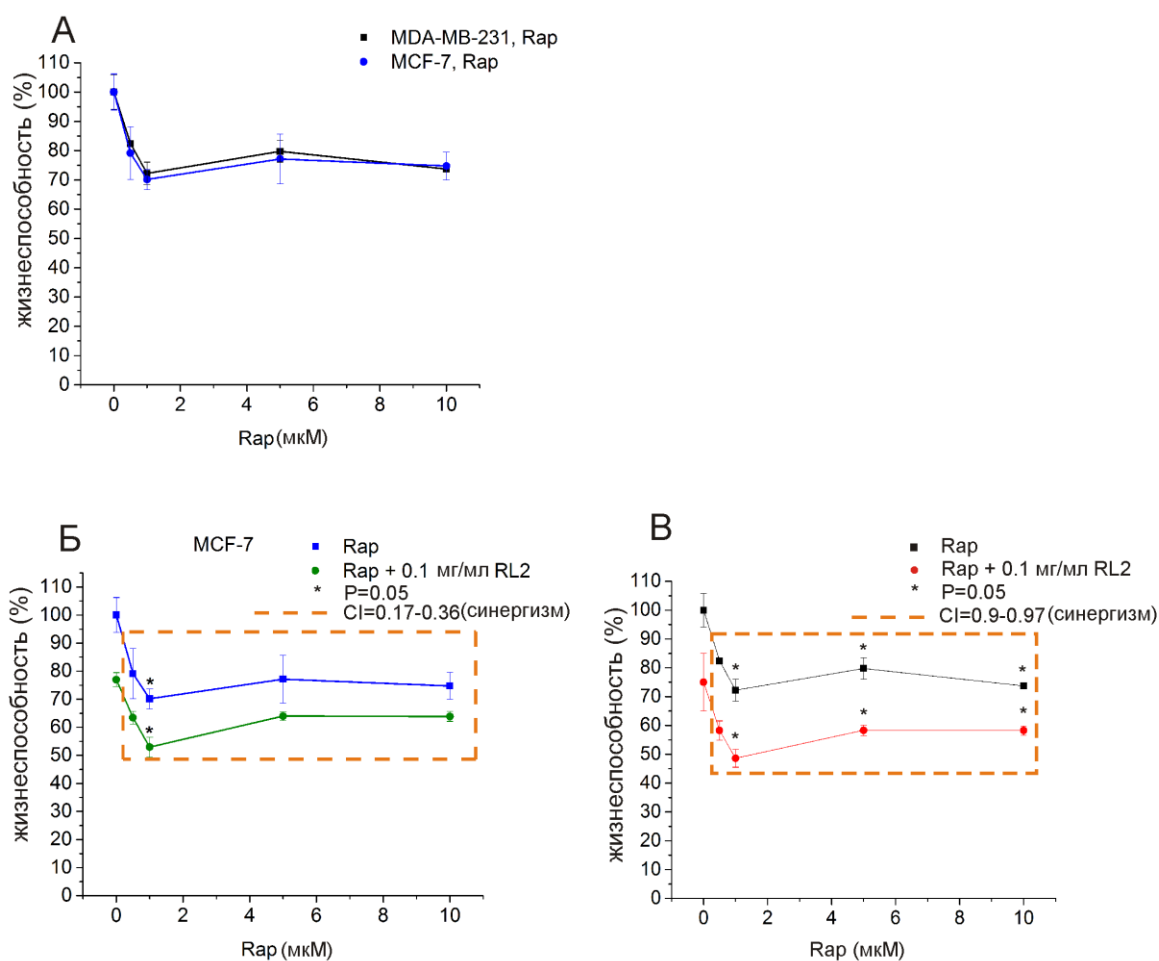


Рис. 25. Зависимость жизнеспособности клеток MDA-MB-231 и MCF-7 от концентрации Rap в моно-режиме и в комбинации с RL2. Клетки инкубировали с Rap (0 – 10 μ M) в моно-режиме и в комбинации с RL2 (0.1 мг/мл) в течение 48 часов. Данные жизнеспособности представлены как относительное значение (%) по сравнению с контрольными клетками, обработанными PBS. В зависимости указано среднее значение трех независимых экспериментов \pm SD.

Применение рапамицина в концентрациях больших, чем 10 мкМ вызывают клеточную гибель по пути аутофагии [222]. Учитывая такую активность препарата, в работе были использованы концентрации Rap не более 10 мкМ. Клетки MDA-MB-231 и MCF-7 инкубировали с RL2 и Rap в моно-режиме и в комбинации. На основании данных МТТ-теста были построены кривые зависимости жизнеспособности клеток от концентрации препаратов (Рис. 25). Было показано, что обе клеточные линии – и MCF-7, и MDA-MB-231, не проявили высокой чувствительности к Rap. Тем не менее, при обработке этих клеточных линий Rap в комбинации с RL2, наблюдали увеличение цитотоксического эффекта по синергетическому типу в диапазоне используемых концентраций Rap. Для клеток линии MCF-7 комбинаторный индекс CI составил 0.17 – 0.36 (Рис. 25 Б), а для клеток линии MDA-MB-231 CI составил 0.9 – 0.97 (Рис. 25 В).

Анализ белка p62 методом Вестерн блота показал, что обработка RL2 клеток MDA-MB-231 в комбинации с Rap вела к снижению p62, по сравнению с моно-режимом (Рис. 22 Д). Форма LC3-II не наблюдалась как в клетках MDA-MB-231, так и в клетках MCF-7, наряду с тем, что форма LC3-I также слабо детектировалась (Рис. 22 Д, Г), можно предположить, что белок LC3 подвергся деградации в аутофаголизосомах на фоне активной индукции аутофагии обоими препаратами. В обработанных клетках также происходила негативная регуляция ATG-5. Поскольку показано, что Rap в комбинации с RL2 значительно усиливает цитотоксический эффект, можно предположить, что комбинированная инкубация опухолевых клеток с RL2 и Rap приводит к повышенной активации аутофагии и стабильной супрессии апоптоза. Таким образом, при использовании комбинации RL2 с Rap аутофагия становится причиной клеточной гибели.

3.2.3.5. Анализ изменения ультраструктуры клеток, обработанных рекомбинантным аналогом лактапина RL2 в комбинации с модуляторами аутофагии

Для визуализации образования аутофагосом и аутофаголизосом в клетках, инкубированных с RL2 и модуляторами аутофагии, использовали метод трансмиссионной электронной микроскопии. Клетки MDA-MB-231 инкубировали с RL2, CQ и Rap в моно режиме и в комбинации (Рис. 26).

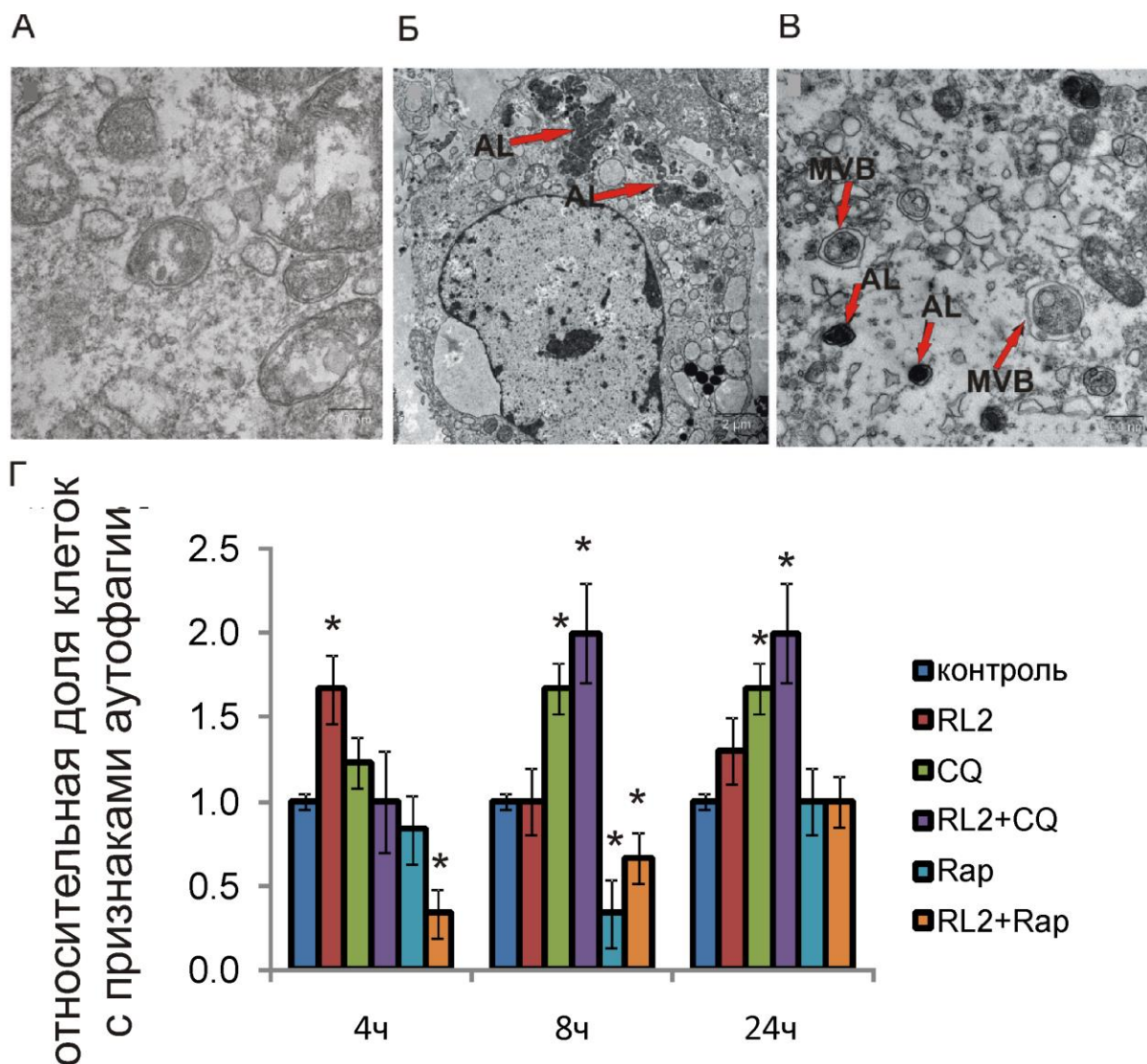


Рис. 26. Анализ клеток MDA-MB-231 с признаками аутофагии, обработанных модуляторами аутофагии и RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл), CQ (20 мкМ) и Rap (100 нМ) в моно-режиме и в комбинации в течение 4 – 24 ч и анализировали методом трамиссионной электронной микроскопии. **А.** Аутофаголизосомы в клетках, инкубированных с Rap в течение 8 ч. **Б.** Клетка, погибшая после 24 ч инкубации с комбинацией RL2 и Rap. AL – аутофаголизосомы. **В.** Аутофагосомы в клетке, погибшей после 24 ч инкубации с комбинацией RL2 и CQ. MVB – мультивезикулярные тельца. **Г.** Относительная доля клеток с признаками аутофагии, обработанных RL2, CQ и Rap. Долю клеток с признаками аутофагии в контрольных необработанных клетках принимали за единицу. * - $p < 0.05$ отличия от контроля считали достоверными.

В клетках, обработанных RL2, CQ и Rap хорошо выделялись структуры, характерные для аутофагии – аутофаголизосомы и мультивезикулярные тельца (Рис. 26 А, Б, В) (анализ выполнен Юнусовой А.Ю., группа микроскопических исследований, ИХБФМ СО РАН). В

препаратах подсчитывали относительную долю клеток, содержащих структуры, характерные для аутофагии и нормировали это количество на количество таких клеток в контрольных образцах (Рис. 26 Г). В клетках, обработанных CQ, после 8-24 ч инкубации наблюдали увеличение количества аутофагосом и аутофаголизосом в 1.5 раз по сравнению с необработанным контролем. В клетках, обработанных RL2 в комбинации с CQ после 8-24 ч инкубации относительное количество аутофагосом/аутофаголизосом увеличивалось в 2 раза по сравнению с необработанным контролем. Поскольку известно, что CQ блокирует аутофагический каскад на уровне подавления слияния аутофагосом с лизосомами, наблюдаемое накопление аутофагосом не ведет к реализации катаболического процесса, а сдвигает равновесие в сторону клеточной гибели. Таким образом, данные электронной микроскопии подтверждают результаты тестов цитотоксической активности комбинации RL2 и CQ. В случае рапамицина наиболее вероятно для получения более ясных результатов необходимо было варьировать продолжительность инкубации в более широком диапазоне и выбирать как точки до 4 ч, так и более 24 ч.

3.2.3.6. Изменение активности катепсина D в клетках, обработанных аналогом лактапина RL2 в комбинации с модуляторами аутофагии

Деграляция содержимого в аутофаголизосомах происходит под действием специфических лизосомальных протеаз. Активность лизосомальных протеаз влияет на эффективность аутофагии. Лизосомальные катепсины участвуют в реализации различных типов клеточной гибели помимо аутофагии [223]. Катепсин D является лизосомальной аспартатной протеазой, которая участвует в деградации поврежденных и ненужных белков. Нарушение ферментативной активности катепсина D приводит к изменениям функций белков и факторов роста клетки, что в дальнейшем может стать причиной различных заболеваний [224–226]. Известно, что высвобождение катепсина D в цитозоль стимулирует выход цитохрома C и последующую активацию каспаз -3 и -7, индуцируя апоптоз. Из данных литературы известно, что CQ и Ku55933 снижают активность катепсина D [227–229]. Поэтому было важно исследовать изменение активности катепсинов D в клетках MDA-MB-231 как при моно-обработке RL2 и модуляторами аутофагии, так и в комбинации [226; 230].

Для анализа влияния модуляторов аутофагии на активность катепсина D клетки MDA-MB-231 инкубировали с RL2 в комбинации с CQ, Ku55933, 3MA, спермидином (Sp) и Rap в течение 24 ч и измеряли активность катепсина D в клеточных лизатах (Рис. 27 А). Спермидин использовали как дополнительный неспецифический индуктор аутофагии. В клетках MDA-MB-231 инкубация с RL2 вызывала незначительное снижение активности катепсина D, тогда

как инкубация с CQ снижала активность катепсина D в два раза, а использование комбинации RL2 с CQ оказывало сходное влияние на катепсин D в сравнении с моно-обработкой CQ. Ku55933, как в комбинации с RL2, так и в моно-режиме незначительно снижал активность катепсина D. ЗМА снижал активность катепсина D, также как и CQ. Несмотря на то, что спермидин и Rap являются индукторами аутофагии, обработка этими препаратами по-разному регулировала активность катепсина D. Спермидин в моно-режиме повышал активность катепсина D, а добавление в комбинацию RL2 носило негативную регуляцию катепсина D. Rap в моно-режиме не изменял активности катепсина D, но добавление в комбинацию RL2 также негативно регулировало активность катепсина D. Полученные данные позволяют рассматривать RL2 негативным регулятором катепсина D. Поскольку RL2-зависимая аутофагия в обработанных клетках уже подтверждена независимыми методами, мы предположили, что ингибирование катепсина D может происходить вследствие непосредственного взаимодействия/связывания катепсина D и RL2. Такое связывание может стимулировать выход катепсина D в цитозоль с последующей активацией апоптоза. Действительно, при исследовании белков, способных связывать RL2, был выявлен катепсин D (совместное исследование с лабораторией проф. И. Лаврик, Университет Отто фон Гюрике, г. Магдебург, Германия) (рис. 27). Для анализа белков, взаимодействующих с лактапином, гранулы сефарозы с иммобилизованным белком А, нагружали антителами к белку κ-казеину, образующими также комплекс и с RL2, и инкубировали с лизатами клеток MDA-MB-231, обработанными RL2. Предполагалось, что такой подход обеспечит связывание с анти-κ-казеин антителами комплексов RL2-клеточный белок. Связавшиеся с антителами белковые комплексы подвергали трипсинолизу и идентифицировали тандемной масс-спектрометрией. Таким образом, ингибирование катепсина D препаратом RL2 происходит не вследствие ингибирования аутофагии, а вследствие прямого взаимодействия, нарушающего ферментативную активность катепсина D.

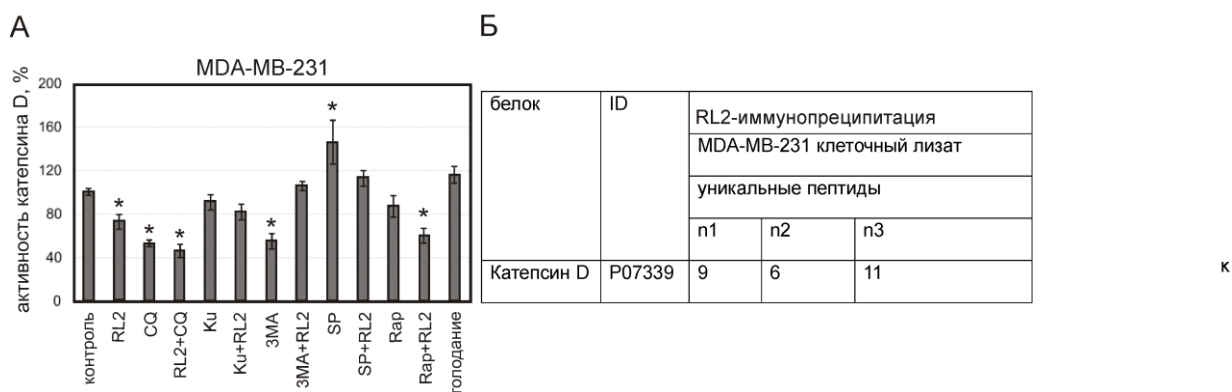


Рис. 27. Анализ вовлеченности катепсина D в RL2-зависимую гибель клеток MDA-MB-231. **А.** Анализ активности катепсина D под действием RL2 и модуляторов аутофагии. Клетки инкубировали с RL2 (0.2 мг/мл), CQ (5 мкМ), Ku55933 (30 мкМ), 3MA (15 мМ), Sp (6 мкМ), и Rap (15 мкМ) в моно-режиме и в комбинации в течение 24 ч. Голодание инициировали депривацией сыворотки в культуральной среде. Анализ проводили с использованием флуоресцентного субстрата, с метилкумарил амидной меткой флуориметрическим методом. Данные представлены как среднее значение трех независимых экспериментов \pm SD относительно контроль (100%). **Б.** Идентификация продуктов трипсинолиза по результатам масс-спектрометрии. Гранулы сефарозы с иммобилизованным белком А, нагружали антителами к к-казеину и инкубировали с лизатами клеток MDA-MB-231, обработанными RL2.

3.3. Исследование противоопухолевой активности аналога лактапина RL2

В задачи работы входило исследование противоопухолевой активности RL2 *in vivo* и определение эффективной схемы терапии. Одной из важнейших оценок результата лечения онкологических заболеваний является общая выживаемость при исследовании новых препаратов и методов лечения. Для оценки преимуществ, которые может дать новый способ лечения, проводится сравнительный анализ кривых выживания экспериментальных и контрольной групп. Как известно, различная локализация злокачественных опухолей в организме делает их в разной степени доступной для терапии. Трансплантация опухолевых клеток в брюшную полость с формированием асцитной формы опухоли подразумевает возможность непосредственного контакта препарата с опухолевыми клетками в случае внутрибрюшинного введения препарата. Помимо чувствительности к аналогу лактапина RL2, гепатома мыши ГА1 способна расти в асцитной форме при внутрибрюшинной трансплантации и в виде солидной опухоли при подкожной трансплантации. Учитывая

указанные особенности, гепатома мыши ГА1 была выбрана для пилотных исследований противоопухолевой активности RL2 *in vivo*.

3.3.1. Анализ активности аналога лактапина RL2 в отношении асцитной формы гепатомы мыши ГА1 при внутрибрюшинном введении препарата

В работе использовали две опухолевые модели гепатомы ГА1 мышей: клетки трансплантировали внутрибрюшинно для формирования асцитной формы опухоли и подкожно для формирования солидных опухолей. Оценку противоопухолевой активности аналога лактапина в случае солидной формы опухоли проводили путем сравнения средних размеров опухолей в экспериментальных и контрольных группах, а в случае асцитной формы оценивали продолжительность жизни животных-опухоленосителей. При этом, проводили исследование двух путей введения аналога лактапина – внутрибрюшинного и внутривенного.

Для того, чтобы исследовать противоопухолевое действие аналога лактапина RL2 *in vivo* при внутрибрюшинном введении в отношении асцитной формы гепатомы мыши ГА1, мышам линии A/Sp внутрибрюшинно трансплантировали клетки ГА1 (2×10^6 кл/мышь), после чего проводили терапию: через 1 день после трансплантации клеток ГА1 экспериментальная группа (8 мышей), получала внутрибрюшинные инъекции RL2 (12.5 мг/кг), контрольная группа (9 мышей) – инъекции физ. раствора. Промежуток между инъекциями – 3 дня, курс состоял из 2-х инъекций. Показано, что средняя продолжительность жизни мышей контрольной группы составила 12.2 ± 0.43 дней, тогда как средняя продолжительность жизни мышей экспериментальной группы, получавшей 2 инъекции RL2 (12.5 мг/мл), составила 18.3 ± 0.53 дня ($p < 0.001$) (Рис. 28).

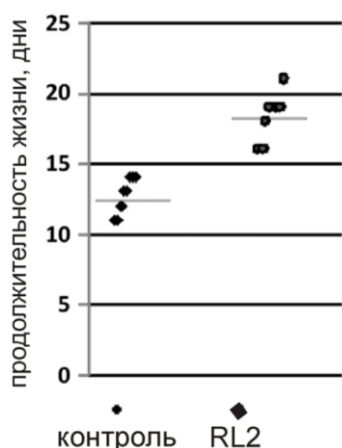


Рис. 28. Влияние RL2 на продолжительность жизни мышей линии A/Sn, с трансплантированными в/б клетками гепатомы мыши ГА1. Данные представлены как диаграмма рассеяния, где каждая точка соответствует отдельному животному. Статистический анализ различия продолжительности жизни между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, при $p < 0.05$ различия считали достоверными.

Таким образом, показан терапевтический эффект RL2 в отношении асцитной формы гепатомы мыши ГА1. Можно заключить, что лечение препаратом RL2 опухоли, трансплантированной в брюшную полость, ведет к увеличению продолжительности жизни животных с опухолью по сравнению с животными контрольной группы. Следовательно, препарат RL2 оказывает противоопухолевое действие на клетки опухоли внутрибрюшинной локализации (асцит) при внутрибрюшинном способе введения.

3.3.2. Анализ активности аналога лактапина RL2 в отношении солидной формы гепатомы мыши ГА1 при внутривенном или внутрибрюшинном режимах введения препарата

Для того, чтобы исследовать эффективность аналога лактапина RL2 при внутривенном и внутрибрюшинном введении в отношении солидной формы гепатомы мыши ГА1, мышам линии A/Sn подкожно трансплантировали клетки ГА1 (2×10^5 кл/мышь). По достижении опухоли диаметра 3 мм мышам экспериментальных групп вводили RL2 или физ. раствор согласно схеме (Рис. 29).

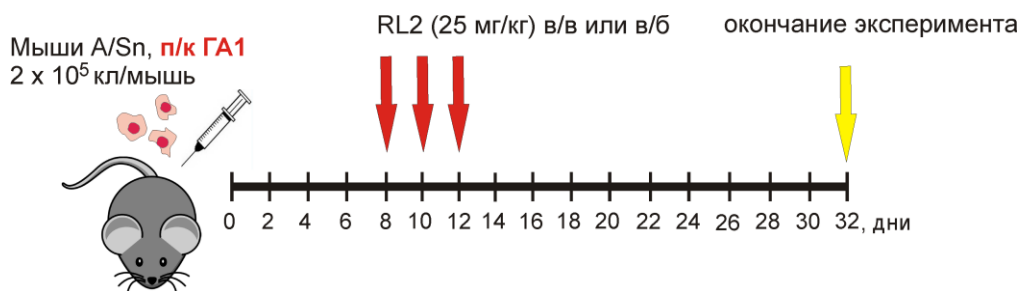


Рис. 29. Схема эксперимента по сравнению противоопухолевой эффективности внутривенного (в/в) внутрибрюшинного (в/б) способов введения RL2. Мышам линии A/Sp возрастом 10 – 12 недель трансплантировали подкожно клетки гепатомы мыши ГА1. По достижении опухоли диаметра 3 мм мышам вводили препарат RL2 (25 мг/кг) как указано на схеме.

Было показано, что через 20 дней после последней инъекции средний вес опухоли мышей экспериментальных групп, получавших RL2, был в ≈ 2.5 раз меньше по сравнению с контрольной группой (Рис. 30). При сравнении средних размеров опухолей животных, получавших внутривенное и внутрибрюшинное введение RL2, достоверных отличий не обнаружено (Рис. 30). Таким образом, было показано, что системное введение препарата RL2 замедляет рост солидной формы опухоли ГА1 с одинаковой эффективностью для внутривенного и внутрибрюшинного режима введения.

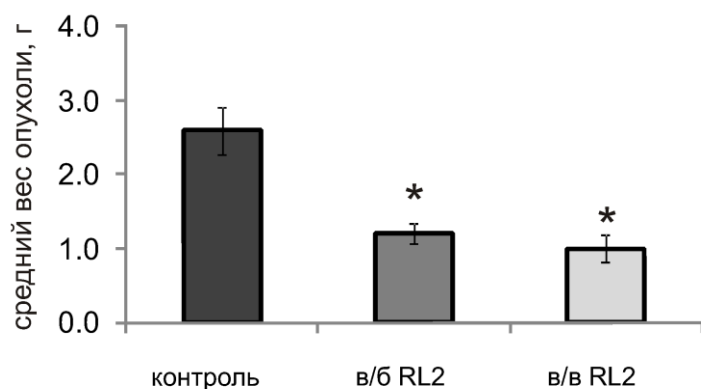


Рис. 30. Влияние RL2 на рост солидной формы опухоли гепатомы мыши ГА1. RL2 (25 мг/кг) вводили животным внутрибрюшинно (в/б) или внутривенно (в/в). Статистический анализ различия массы опухолей между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, при $p < 0.05$ (*) различия считали достоверными. Данные представлены как среднее значение \pm SD.

3.3.3. Определение оптимальной дозы и курса терапии препаратом RL2

Для выявления эффективной дозы и курса лечения препаратом RL2 была выбрана внутривенная и подкожная локализация гепатомы ГА1.

Гепатома ГА1 мышей была трансплантирована внутривенно в количестве $1,5 \times 10^5$ опухолевых клеток мышам линии A/Sp возрастом 14-16 недель. На 2-ой день после трансплантации животные в группах ежедневно получали внутривенную инъекцию RL2 в дозе 0,4 - 150 мг/кг веса. Курс лечения состоял из 2-х инъекций. На Рис. 31 А представлены результаты влияния препарата RL2 на продолжительность жизни животных в зависимости от вводимой дозы препарата. Из Рис. 31 А видно, что введение животным RL2 в дозах 16 - 150 мг/кг веса приводит к достоверному увеличению продолжительности жизни животных. Увеличение дозы до 150 мг/кг не ведет к достоверному увеличению продолжительности жизни по сравнению с дозой 40 мг/кг. Доза препарата менее 8 мг/кг веса не увеличивала продолжительность жизни по сравнению с контролем.

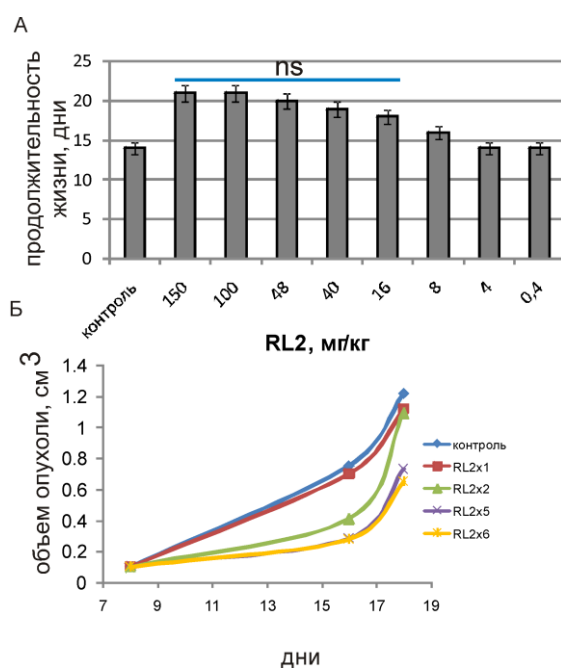


Рис. 31. Влияние RL2 на среднюю продолжительность жизни мышей с опухолью, трансплантированной в/в, при разных дозах RL2 (А). Средний объем опухоли в динамике мышей с опухолью, трансплантированной п/к, при разных курсах инъекций (Б). Статистический анализ различия средней продолжительности жизни и объема опухолей между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, при ns - различия считали недостоверными. Данные представлены как среднее значение \pm SD.

Для определения эффективного курса терапии препаратом RL2 гепатома ГА1 мыши была трансплантирована подкожно в районе лопатки мышам линии A/Sn в возрасте 14-16 недель в количестве 5×10^6 опухолевых клеток. Начиная с 15-ого дня после трансплантации, когда размер опухоли в среднем составлял не менее 10 мм^3 , мыши были разделены на группы и получали ежедневную внутривенную инъекцию RL2 в дозе 40 мг/кг веса животного, поскольку доза 40 мг/кг была определена как эффективная. Курс терапии в разных группах состоял из 1-го, 2-х, 5-ти или 6-ти введений препарата. Показано, что в процессе лечения происходит стабильное подавление роста опухоли (Рис. 31 Б): увеличение курса лечения с 2-х до 6-ти инъекций RL2 способствует достоверному снижению темпа роста опухолей по сравнению с контрольной группой. Для 6-ти инъекций ТРО составил 43%.

В результате проведенных экспериментов показано, что внутривенное введение препарата RL2 вызывает торможение роста опухолей различной локализации: подкожной, внутривенной и внутрибрюшинной и/или увеличение продолжительности жизни.

3.3.4. Противоопухолевая активность аналога лактапина RL2 в комбинации с циклофосфамидом в отношении солидной формы гепатомы мыши ГА1

Поскольку циклофосфамид (ЦФ) является широко используемым противоопухолевым препаратом, а опухоль ГА1 характеризуется чувствительностью к циклофосфамиду, он был выбран в качестве препарата сравнения в экспериментах *in vivo* [231; 232].

Мышам линии A/Sn трансплантировали клетки гепатомы мыши ГА1 подкожно и проводили терапию согласно схеме (Рис. 32).

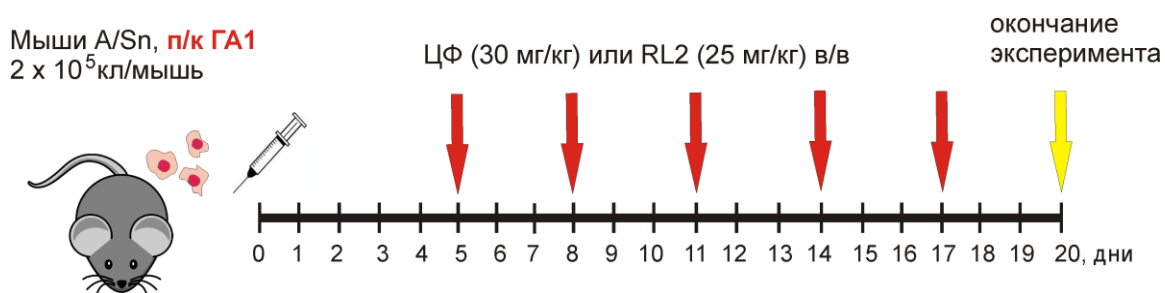


Рис. 32. Схема трансплантации опухолевых клеток и введения RL2, ЦФ (циклофосфамид) и физ. раствора мышам. Мышам линии A/Sn возрастом 10 – 12 недель трансплантировали подкожно клетки гепатомы мыши ГА1. Животные получали внутривенные инъекции: RL2 (25 мг/кг), ЦФ (30 мг/кг) и контрольная группа – инъекции физ. раствора.

Обнаружено, что в группах животных, получавших лечение RL2 и ЦФ средняя масса опухоли была достоверно меньше, чем в контрольной группе (Таблица 9). Сравнение средней

массы опухоли в группах RL2 и ЦФ не выявляло достоверных различий. Таким образом, было показано, что RL2 обладает выраженным противоопухолевым эффектом в отношении подкожно трансплантированной гепатомы мыши ГА1, сравнимым с эффектом циклофосфамида при выбранной схеме терапии.

Таблица 9. Терапевтический эффект RL2 в сравнении с циклофосфамидом на мышках-опухоленосителях с подкожно трансплантированной гепатомой мыши ГА1.

	Физ. раствор (контроль)	Циклофосфамид (30 мг/кг)	RL2 (25 мг/кг)
Количество мышей в группе	6	6	7
Начальный вес мышей, г	20.0	19.3	20.6
Конечный вес мышей, г	19.3±0.6	17.7±0.6	20.2±0.5
Конечный вес мышей, % от начального веса	96.5	91.7	98.1
Масса опухоли, г	1.10±0.22	0.53±0.08	0.47±0.05
Масса опухоли, % от контроля	100	48.2	42.7
Торможение роста опухоли, %	-	51.8	57.3

Статистический анализ различия между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, при $p < 0.05$ различия считали достоверными. Данные представлены как среднее значение \pm SD.

3.3.5. Анализ эффективности RL2 в комбинации с циклофосфамидом в отношении асцитной формой гепатомы мыши ГА1

Поскольку и циклофосфамид, и RL2 были эффективны в отношении подкожно трансплантированной опухоли ГА1, но не вызывали полной супрессии опухолевого роста, было важно проверить терапевтический эффект комбинации этих препаратов. Клетки опухоли гепатомы ГА1 были трансплантированы внутрибрюшинно мышам А/Ж, терапию проводили согласно схеме (Рис. 33).

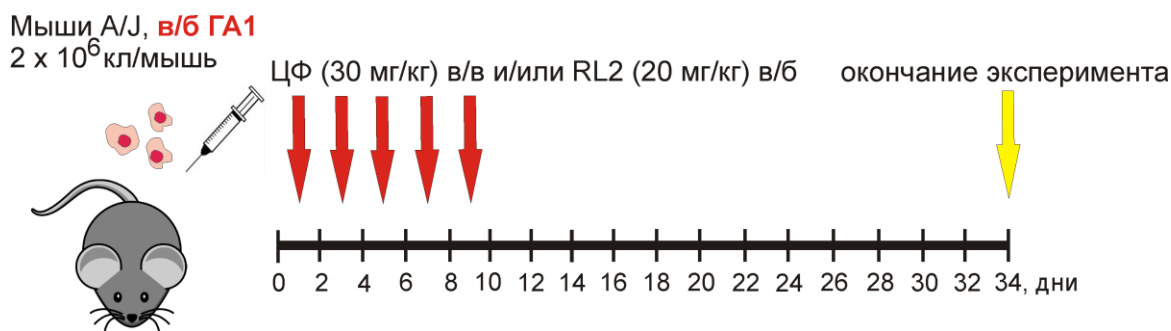


Рис. 33. Схема трансплантации опухолевых клеток и введения циклофосфида, RL2 или физ. раствора мышам. Мышам линии А/Ј возраста 6 – 8 недель трансплантировали внутрибрюшинно клетки гепатомы мыши ГА1. Животные получали внутрибрюшинные инъекции RL2 (20 мг/кг), внутривенные инъекции ЦФ (30 мг/кг) или комбинацию препаратов.

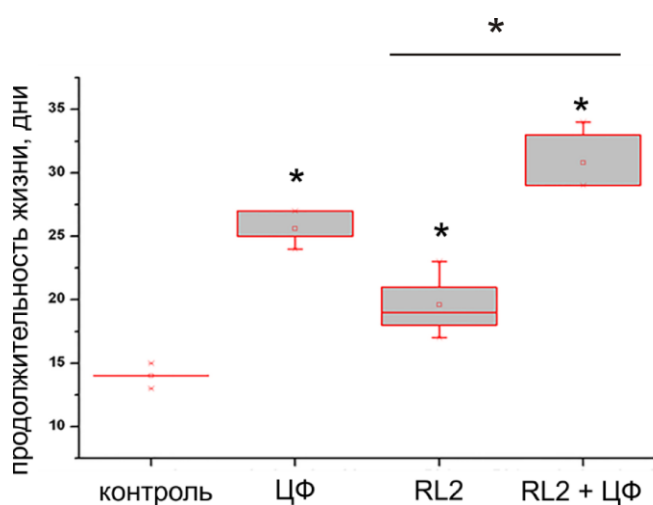


Рис. 34. Выживаемость мышей А/Ј с трансплантированными внутрибрюшинно клетками опухоли ГА1. *- различие между экспериментальной и контрольной группой считали достоверными $p < 0.05$. Статистический анализ различия между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Данные представлены как среднее значение \pm SD

Было показано, что средняя продолжительность жизни животных, получавших инъекции RL2, была достоверно выше, чем у животных контрольной группы, получавших внутрибрюшинные инъекции физиологического раствора, и составила 18 ± 3 и 14 ± 1 дней, соответственно (Рис. 34). Инъекции циклофосфида значительно увеличивали продолжительность жизни мышей-опухоленосителей и составила в среднем 26 ± 2 дней, а наибольшая продолжительность жизни была отмечена в группе животных, получавших комбинированную терапию циклофосфамидом и RL2 и составила в среднем 31 ± 3 день. Полученные данные свидетельствуют в пользу того, что комбинация RL2 и циклофосфида ведет к увеличению продолжительности жизни животных-опухоленосителей по сравнению с моно-режимом.

3.3.6. Анализ активности аналога лактапина RL2 в отношении аденокарциномы молочной железы человека

Исследование в отношении подкожных ксенографтов опухолей человека входит в перечень обязательных доклинических исследований противоопухолевого препарата. Для того, чтобы исследовать противоопухолевую активность RL2 в отношении опухолей, сформированных раковыми клетками человека, использовали ксенографты рака молочной железы. Поскольку опухолевые клетки MDA-MB-231 были высокочувствительные к аналогу RL2 *in vitro*, эта линия была использована для анализа противоопухолевой активности RL2 *in vivo*.

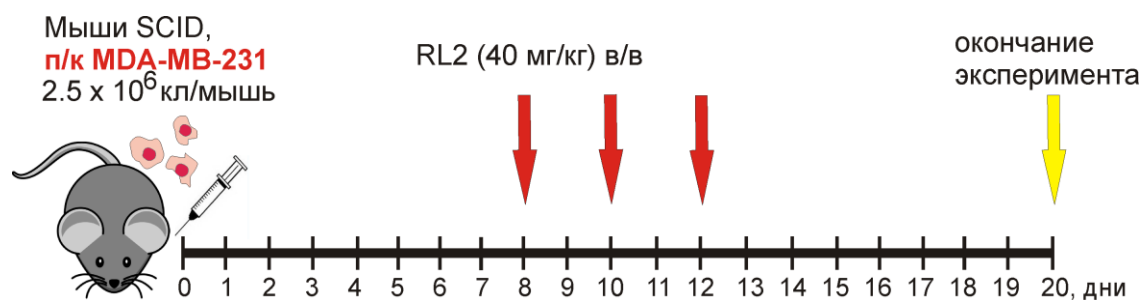


Рис. 35. Схема терапии опухоли MDA-MB-231 препаратом RL2. Мышам линии SCID возрастом 6 – 8 недель трансплантировали подкожно клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231. По достижении опухолью объема 100 мм³ животные получали внутривенные инъекции RL2 (40 мг/кг) или внутривенные инъекции физ. раствора.

Суспензию клеток MDA-MB-231 в матрикеле трансплантировали подкожно мышам линии SCID и проводили терапию согласно схеме (Рис. 35). Объем опухоли измеряли каждые 5 дней, что позволило оценить динамику роста опухоли (Рис. 36 А). Доза препарата и режим введения подбирали согласно терапевтической схеме, описанной ранее [233]. В группе мышей, получавших инъекции RL2 средний вес опухоли составил 51±3 мг, а в контрольной группе – 90±16 мг (p<0.05) (Рис. 36 В).

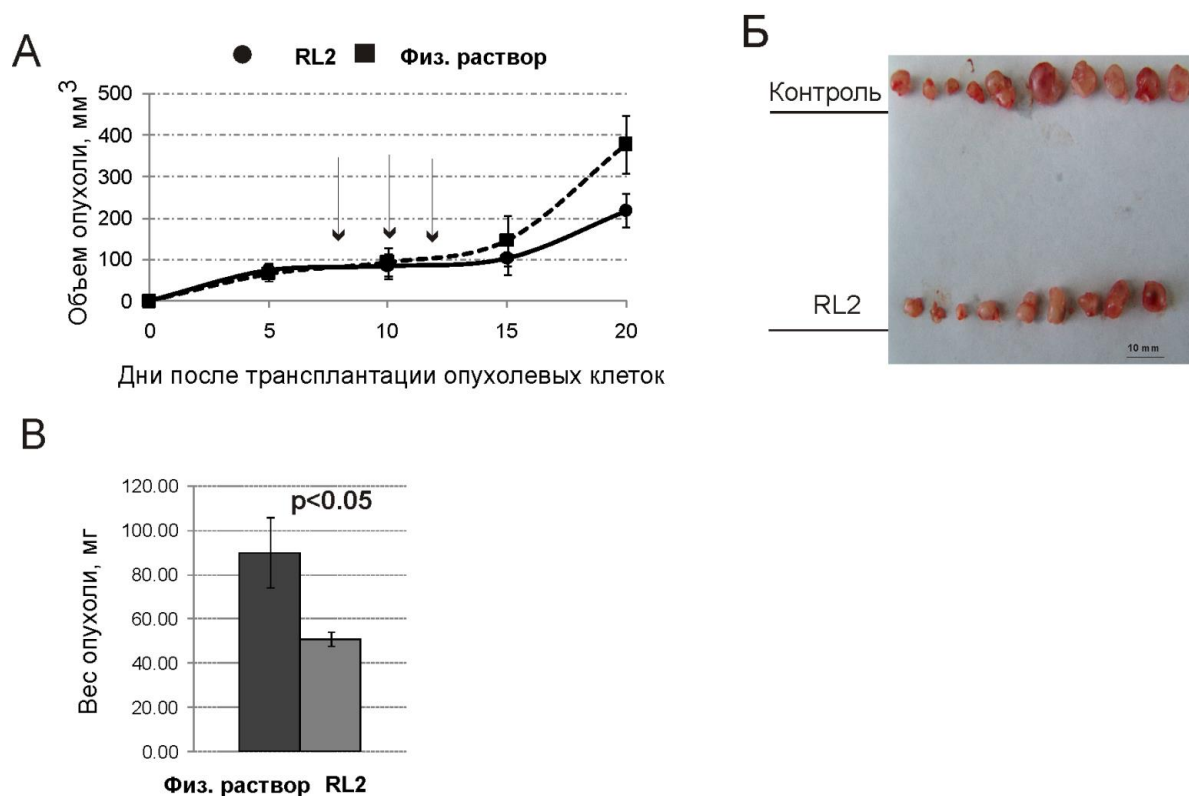


Рис. 36. Влияние RL2 на рост опухоли MDA-MB-231 *in vivo*. **А.** Динамика изменения объема опухоли. Стрелками отмечены дни введения RL2 или физ. раствора. **Б.** Извлеченные опухоли. **В.** Средний вес опухолей в финальной точке эксперимента. Статистический анализ различия размеров опухолей между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, при $p < 0.05$ различия считали достоверными. Данные представлены как среднее значение \pm SD.

Таким образом, торможение роста опухоли в группе мышей, получавшей инъекции RL2 составило 43%. Можно отметить, что при подкожном типе трансплантации опухолевых клеток и внутривенных инъекциях эффективность RL2 была схожей для опухоли ГА1 и MDA-MB-231.

3.3.7. Анализ противоопухолевой активности препарата RL2 в комбинации с хлорокином в отношении опухоли RLS с фенотипом лекарственной устойчивости

Известно, что хлорокин обладает низкой общей токсичностью для животных и его можно использовать для внутрибрюшинного введения на мышинных моделях. Поскольку в исследованиях *in vitro* было показано повышение цитотоксической активности при комбинированной обработке опухолевых клеток хлорокином и RL2, эта комбинация была

выбрана для экспериментов *in vivo*. Противоопухолевую активность исследовали на опухоли с фенотипом лекарственной устойчивости – лимфосаркоме мыши RLS. Суспензию клеток RLS трансплантировали внутримышечно в заднюю лапу мышей линии СВА и через 8 дней начинали курс лечения согласно схеме (Рис. 37).

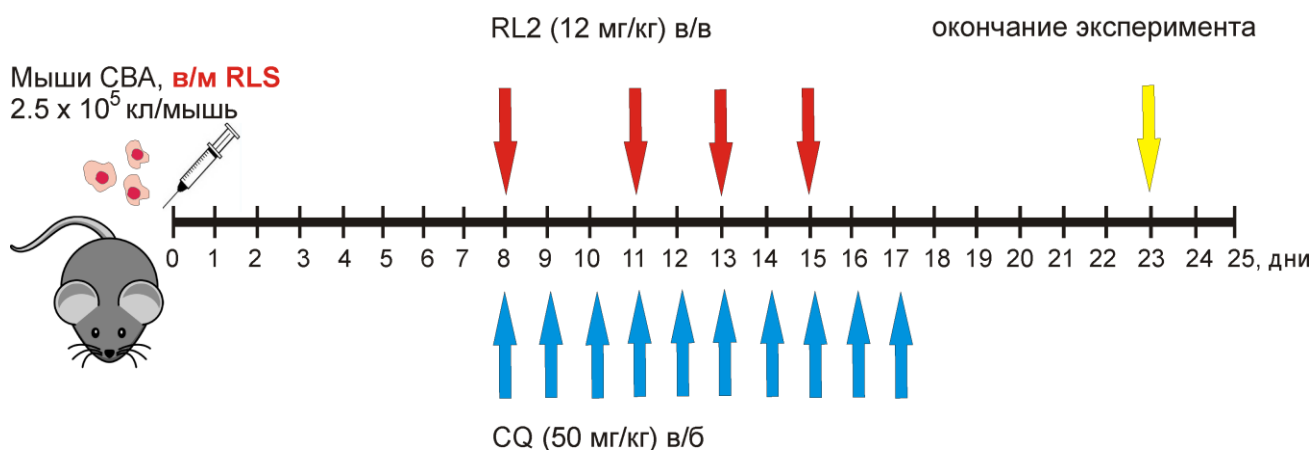


Рис. 37. Схема терапии опухоли RLS препаратами RL2 и CQ. Мышам линии СВА возраста 8 – 9 недель трансплантировали в/м клетки лимфосаркомы RLS. Животные получали в/в инъекции RL2 (12 мг/кг), в/б инъекции CQ (50 мг/кг) и комбинацию RL2 и CQ в соответствующем режиме. Контрольные животные получали в/в введение физ. раствора.

При анализе роста опухоли с фенотипом лекарственной устойчивости показано, что лечение RL2 не приводило к уменьшению размера опухоли по сравнению с животными контрольной группы (Рис. 38 А). Торможение роста опухоли наблюдали в группах, получавших CQ и CQ с RL2. Сравнение продолжительности жизни животных показало, что только в группе мышей, получавших комбинированную терапию RL2 и CQ продолжительность жизни была достоверно выше (Рис. 38 Б).

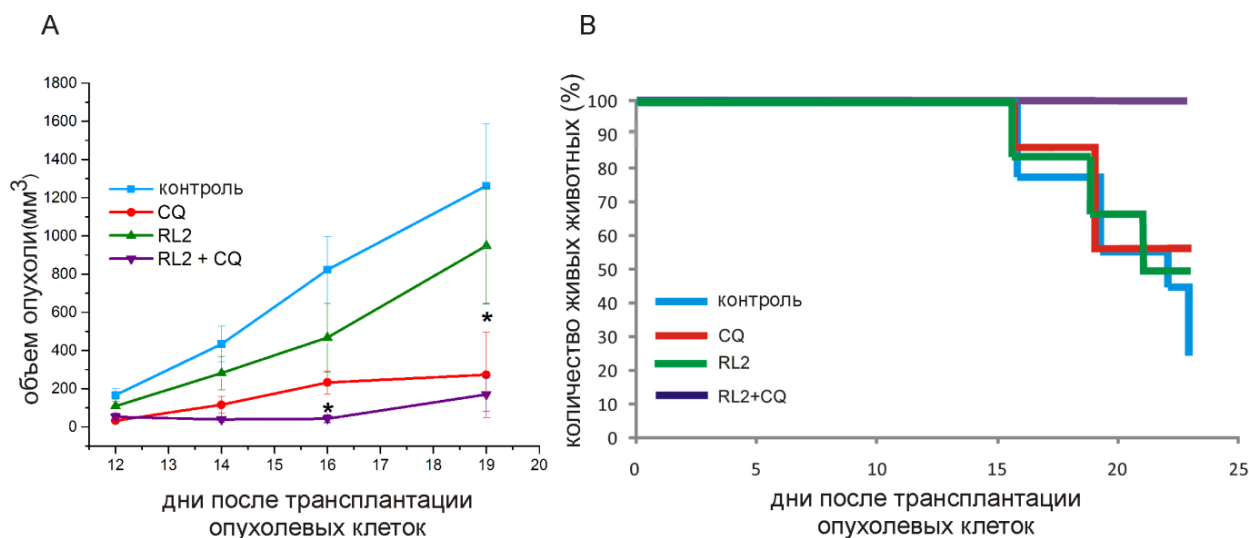


Рис. 38. Чувствительность опухоли RLS к RL2, CQ и комбинированной терапии. **А.** Динамика изменения объема опухоли. **Б.** Средняя продолжительность жизни экспериментальных мышей. Статистический анализ различия размеров опухолей между группами проводили с использованием t-критерия Стьюдента, при $p < 0.05$ различия считали достоверными. Данные представлены как среднее значение \pm SD.

Таким образом, показано, что комбинация RL2 и CQ не ведет к достоверному усилению супрессии роста опухоли, но увеличивает продолжительность жизни животных-опухоленосителей. Можно заключить, что RL2 с CQ является перспективной комбинацией при терапии онкозаболеваний.

3.3.8. Анализ наработки нейтрализующих антител в сыворотке крови мышей, получавших инъекции препарата RL2

Поскольку лактаптин является белком, его инъекции могут приводить к наработке нейтрализующих антител, что может снижать эффект при терапии. Так, например, известно, что эффективность терапии TNF- α зависит от параллельного приема иммуносупрессорных препаратов, подавляющих синтез нейтрализующих TNF- α антител.

Анализ динамики выработки антител к аналогу лактапина RL2 проводили на модели иммунокомпетентных мышей линии C57BL/6 и иммунодефицитных мышей линии SCID, применяя различные схемы введения препарата. Методом ИФА определяли титр антител в сыворотке экспериментальных животных, получавших внутривенные или внутрибрюшинные инъекции RL2 при однократном и трехкратном введении. Из данных, представленных в таблице 10, видно, что уровень продукции анти-RL2-антител при однократном введении практически не отличался при различных путях введения белка: внутривенном и внутрибрюшинном введениях. Трехкратная инъекция RL2 приводила к достоверному

увеличению уровня анти-RL2-антител в крови животных по сравнению с однократным введением. При трехкратном внутривенном введении RL2 иммунодефицитным мышам SCID анти-RL2-антитела в крови животных выявлены не были. Максимальное значение анти-RL2 антител, около 71 нг/мл, зарегистрировано в сыворотке крови животных, получавших курс из трех внутрибрюшинных инъекций через 14 суток после начала курса введения.

Таблица 10. Продукция анти-RL2-IgG в сыворотке крови мышей при различных режимах введения*

Тип и кратность инъекций		Время после введения препарата RL2, сут			
		0	7	10	14
<i>Мыши C57BL/6</i>		Концентрация антител, нг/мл			
в/в	1	18.26 ±	23.28 ± 10.12	20.90 ± 9.92	66.32 ± 20.31
	3		-	59.12 ± 15.05	-
в/б	1	9.22	-	18.26 ± 9.53	53.20 ± 19.07
	3		52.99 ± 18.90	-	71.80 ± 21.77
<i>Мыши SCID</i>					
в/в	3	14.13 ± 1.43	-	20.79 ± 4.30	-

*Концентрация антител представлена среднее значение трех независимых экспериментов. Мышам линий C57BL/6 (8–10 недель) и SCID (6–8 недель) вводили раствор RL2 (40–80 мг/кг) в объеме 0.5 мл в/в или в/б. Забор крови осуществляли через 7–14 сут после введения препарата, готовили сыворотку и проводили ИФА, как описано в разделе «Экспериментальная часть».

3.4. Аналоги лактапина, экспрессируемые в эукариотических клетках

Создание новых противораковых препаратов на основе селективных индукторов апоптоза, способных подавлять рост опухоли без повреждения здоровых клеток организма, является актуальной задачей молекулярной медицины, поэтому поиск путей повышения цитотоксической активности RL2 также является задачей исследования. Поскольку при экспрессии в эукариотических системах белки подвергаются специфическому процессингу, модификациям и фолдингу, важно было получить аналоги лактапина, синтезируемые в эукариотической системе экспрессии. Эукариотические системы экспрессии позволяют получать секретлируемые формы белков, что является относительным преимуществом, поскольку позволяет в скрининговом режиме исследовать цитотоксическую активность секретированных белков без стадии выделения. За основу при конструировании аналога лактапина для экспрессии в эукариотических клетках была взята последовательность аналога лактапина RL2.

На основе лентивирусного вектора серии рCDH сотрудниками ИМКБ СО РАН были созданы конструкции рEL1 и рEL2, которые обеспечивают стабильную интеграцию кассет, кодирующих секретлируемые формы аналогов лактапина EL1 и EL2, отличающиеся лидерными пептидными последовательностями. Структура плазмид рEL1 и рEL2 отличается структурой участка ДНК, кодирующего сигнальные последовательности. В плазмиде рEL1 эта последовательность кодирует сигнальный пептид люциферазы *Gaussia princeps* (GlucSP, MGVKVLFALICIAVAEAKPT) и глициновый спейсер (G), отщепляющиеся при экспорте во внеклеточное пространство от последовательностей лактапина (Рис. 39), в плазмиде рEL2 — сигнальный пептид каппа-цепи иммуноглобулина мыши (mIlgkSP, METDTLLLWVLLLWVPGST). При этом, после отщепления сигнального пептида, производимые этими плазмидами аналоги лактапина RL2 являются абсолютно идентичными и соответствуют первичной последовательности белка RL2, а отличаются только сигнальные пептиды в про-белке.

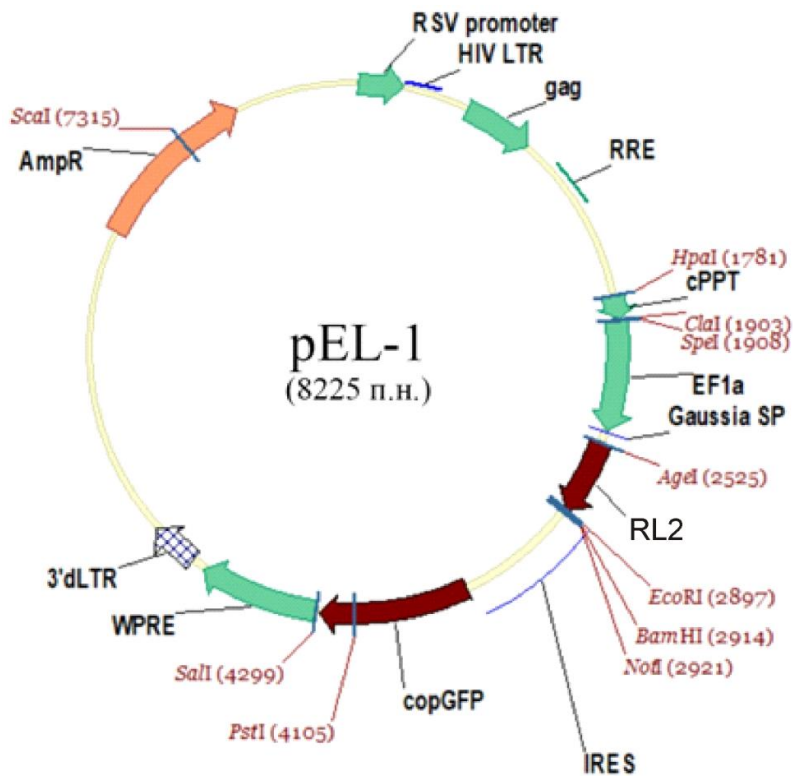


Рис. 39. Структура лентивирусной конструкции pEL-1 для экспрессии секретируемой формы аналога лактапина. EF1a — промотор гена EF1a человека, GaussiaSP – лидерный пептид люциферазы *Gaussia princeps*, IRES – внутренний сайт посадки рибосомы вируса энцефаломиокардита, copGFP – зеленый флуоресцентный белок копеподы *Pontellina plumata*, RSV- гибридный промотор, HIV LTR – длинный концевой повтор ВИЧ-1, gag – укороченная последовательность гена gag ВИЧ-1, RRE – REV-связывающий элемент ВИЧ-1, WPRE – регуляторный элемент вируса гепатита сурков, 3'dLTR – усеченный длинный концевой повтор ВИЧ-1, Amp^R - ген устойчивости к ампицилину. Структура плазмиды pEL-2 идентична pEL-1 за исключением района, кодирующего лидерный пептид: METDTLLLWVLLLWVPGSTG (pEL-2, mlgk) против MGVKVLFALICIAVAEAKPTG (pEL-1, GaussiaSP).

3.4.1. Анализ продукции рекомбинантных аналогов лактапина в клетках HEK293T

Для исследования продукции аналогов лактапина EL1 и EL2 была выбрана линия клеток почки эмбриона человека HEK293T, которые трансфицировали плазмидами pEL1 и pEL2; клетки растили до состояния монослоя и отбирали образцы среды. Для контроля проводили трансфекцию клеток HEK293T вектором pCDH-EF1a-MCS-IRES-copGFP

(SystemBiosciences, США), не содержащим последовательность лактапина. Образцы среды анализировали методом Вестерн блота с применением моноклональных IgG мыши к лактапину. Обнаружено, что в образцах кондиционированной ростовой среды клеток НЕК293Т, трансфицированных плазмидами рEL1 и рEL2, моноклональные антитела к RL2 выявляют единственную полосу, которая соответствует расчетной массе рекомбинантных аналогов лактапина EL1 и EL2 - 14 кДа (Рис. 40). Под термином «кондиционированная среда» подразумевали культуральную среду от трансфицированных клеток НЕК293Т в логарифмической фазе роста, не содеожашую клеток-продуцентов. Таким образом, была подтверждена секреция белков EL1 и EL2 клетками НЕК293Т.

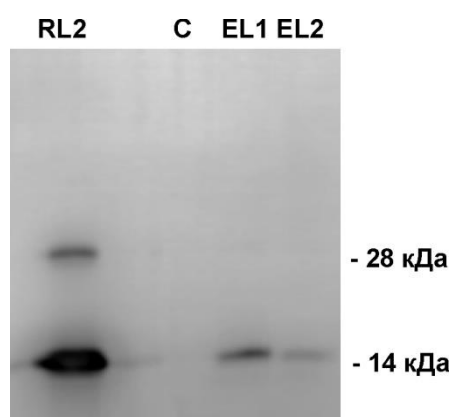


Рис. 40. Анализ рекомбинантных аналогов лактапина в кондиционированной среде клеток НЕК293Т методом Вестерн блот. Аналог лактапина RL2 был использован в качестве положительного контроля; С – кондиционированная среда клеток НЕК293Т, трансфицированных вектором рCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP; EL1 и EL2 – кондиционированная среда клеток, трансфицированных плазмидами рEL1 и рEL2, соответственно.

Для того чтобы количественно оценить содержание целевых рекомбинантных белков в кондиционированной среде, был проведен двухцентровой иммуноферментный анализ (Рис. 41). Образцы с известными концентрациями белка RL2 были использованы для построения калибровочной кривой. Обнаружено, что концентрация рекомбинантного лактапина EL1 в культуральной среде составляла 510 ± 25 нг/мл, а EL2 – 420 ± 17 нг/мл.

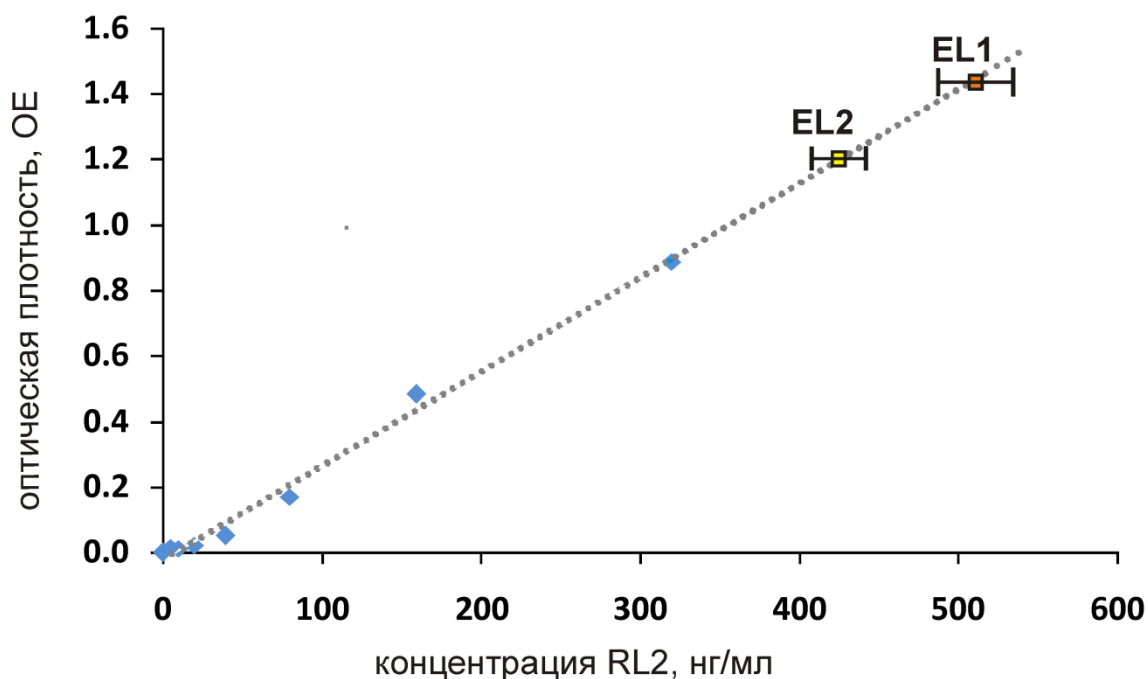


Рис. 41. Определение концентрации EL1 и EL2 в кондиционированной среде методом ИФА. Оптическую плотность измеряли при $\lambda=450$ нм, референсная волна $\lambda=620$ нм. OE – оптические единицы. Данные представлены как среднее значение \pm SD.

3.4.2. Сравнение цитотоксической активности рекомбинантных аналогов лактапина RL2 и EL1

Ранее было показано, что IC₅₀ RL2 для чувствительных опухолевых клеточных линий в среднем составляет 250 ± 50 мкг/мл [205; 234]. Учитывая данные по содержанию белков EL1 и EL2 в кондиционированной среде, можно видеть, что концентрация EL1 и EL2 ниже концентрации, вызывающей гибель 50% клеток (IC₅₀) для RL2 приблизительно в 500 раз. Поскольку концентрация EL1 в среде была выше, чем концентрация EL2, именно EL1 был выбран для оценки цитотоксической активности. Для анализа цитотоксической активности кондиционированной среды, содержащей аналог лактапина EL1, были выбраны линии опухолевых клеток человека различного гистологического происхождения: аденокарцинома молочной железы MDA-MB-231, аденокарцинома простаты PC3 и глиобластомы T98G, U343, U251 и U87MG. К исследуемым клеточным культурам добавляли различное количество кондиционированной среды от клеток-продуцентов. В качестве контроля использовали кондиционированную среду от клеток HEK293T, трансфицированных вектором pCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP. Такой контроль позволял учитывать возможный цитотоксический эффект векторной ДНК.

Поскольку к клеткам добавляли кондиционированную среду, а не выделенный белок, количество белка EL1, добавляемого в лунки, было ограничено объемом кондиционированной среды, и не превышало 150 мкл. Вследствие этого, максимальной исследуемой дозой EL1 была доза 375 нг/мл. На основании данных МТТ-теста были построены гистограммы зависимости жизнеспособности клеток от концентрации EL1 (Рис. 42). Данные, представленные на Рис. 42 свидетельствуют о выраженной цитотоксической активности кондиционированной среды, содержащей EL1 в отношении всех исследованных опухолевых клеточных линий. Наиболее чувствительной клеточной линией была линия глиобластомы человека U251. Можно видеть, что сравнимое снижение жизнеспособности исследуемых клеток вызывало добавление среды с нанограммовым количеством белка EL1 и микрограммовое количество белка RL2. Сравнимой с EL1 цитотоксической активностью обладал природный лактаптин, выделенный из молока человека, для которого значение IC50 составляло 500 нг/мл [1]. Последовательность EL1 содержит два остатка серина – S102 и S116, которые могут подвергаться фосфорилированию клеточными киназами для активации про-апоптотической активности. Такое фосфорилирование характерно для эукариотических систем экспрессии и может быть возможным объяснением высокой активности EL1. Таким образом, секретируемый аналог лактапина EL1 может быть использован для создания более цитотоксически активных препаратов. Так, например, секреция лактапина EL1 цитотоксическими CAR T- и NK-клетками может усиливать цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток с низкой представленностью опухолевых антигенов, к которым имеют рецепторы эти T- и NK-клетки. Известно, что к-казеин является компонентом гранул цитотоксических T-клеток у мышей [235], поэтому усиление T-клеток лактапином, продуктом протеолиза к-казеина выглядит обоснованным. Кроме того, секретируемая форма EL1 может быть использована для конструирования рекомбинантных вирусов осповакцины для усиления про-апоптотического эффекта.

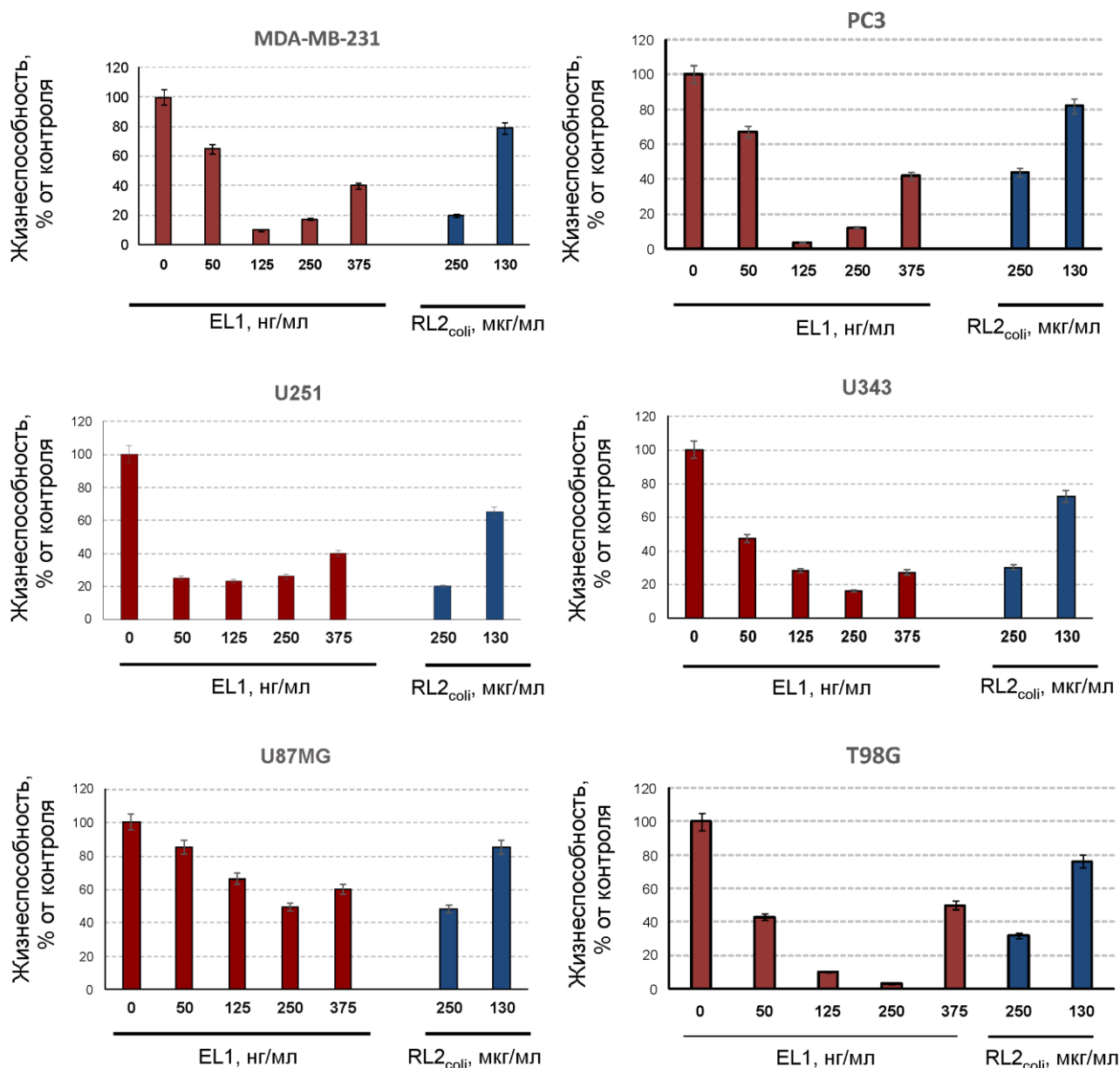


Рис. 42. Влияние рекомбинантного аналога лактапина EL1 на жизнеспособность опухолевых клеток человека. Клетки инкубировали с кондиционированной средой, содержащей EL1 в концентрации 50 – 375 нг/мл в течение 48 часов. Данные жизнеспособности представлены как относительное значение (%) по сравнению с контрольными клетками, обработанными культуральной средой IMDM от клеток НЕК293Т, трансфицированных вектором не несущим последовательность, кодирующую лактапин. Данные представлены, как среднее значение трех независимых экспериментов \pm SD.

Таким образом, показано, что аналог лактапина EL1 в составе культуральной среды клеток НЕК293Т, оказывает большее цитотоксическое действие на опухолевые клетки человека, чем аналог лактапина RL2, продуцируемый клетками *E. coli*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые проведено комплексное изучение цитотоксической и противоопухолевой активности аналога лактапина RL2. Впервые показано, что препарат RL2 эффективен в отношении опухолей различной локализации – внутрибрюшинной, подкожной, внутримышечной и внутривенной.

Детальное исследование механизма клеточной гибели позволяет выявлять препараты – партнеры, основываясь на особенностях механизма, выявленных для определенного препарата. В данной работе впервые показано, что препарат рекомбинантного лактапина RL2 при попадании в опухолевую клетку параллельно с апоптозом на ранних этапах инкубации активирует аутофагию, которая способствует выживанию опухолевой клетки, но результирующим эффектом обработки опухолевых клеток препаратом RL2 является клеточная гибель по пути апоптоза. На основе совокупности данных по динамике молекулярных маркеров апоптоза и аутофагии в клетках, обработанных RL2, предложена модель, учитывающая вклад указанных процессов в индукцию гибели клетки. Показано, что клеточную гибель под действием RL2 можно усилить, используя модуляторы аутофагии – ингибиторы хлорокин (CQ) и Ku55933 и индуктор аутофагии рапамицин. RL2-зависимая гибель опухолевых клеток в присутствии ингибиторов аутофагии обусловлена апоптозом, а в присутствии индуктора аутофагии клетка гибнет по пути аутофагии. На основании данных *in vitro* выбран препарат – партнер для исследования комбинированной терапии с RL2 *in vivo* – ингибитор аутофагии хлорокин. На мышах-опухоленосителях показано, что комбинированная терапия RL2 и CQ увеличивает продолжительность жизни мышей по сравнению с монорежимом использования этих препаратов.

Учитывая положительные результаты экспериментов по подавлению роста опухолей у мышей препаратом RL2, был сконструирован аналог лактапина EL1, представляющий собой аналог лактапина, продуцируемый в секретируемой форме в эукариотических клетках-продуцентах. Автором диссертации показано, что аналог EL1 обладает цитотоксической активностью, значительно превышающей активность RL2, которая сопоставима с активностью природного лактапина из молока человека. Полученные результаты делают возможным создание генно-инженерных конструкций, обеспечивающих продукцию лактапина в эукариотических клетках, резистентных к его про-апоптотическому действию. В перспективе, такие конструкции можно будет использовать в иммунотерапии рака для “армирования” иммунных клеток человека с целью усиления их цитотоксической активности.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что рекомбинантный аналог лактапина RL2, продуцируемый в клетках *E.coli*, индуцирует апоптоз клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, обусловленный негативной регуляцией убиквитинлигазы MDM2, позитивной регуляцией про-апоптотического белка BAX, негативной регуляцией антиапоптотического белка Bcl-2 и несогласованной активацией генов каскада NF- κ B.
2. Рекомбинантный аналог лактапина RL2 индуцирует аутофагию в опухолевых клетках, что подтверждено образованием специфических для аутофагии ультраструктур клетки – фагофоров, аутофаголизосом и мультивезикулярных телец, а также изменением ключевых белковых маркеров аутофагии: процессингом белка LC3, негативной регуляцией белка p62 и позитивной регуляцией белка ATG5.
3. При исследовании цитотоксической активности аналога лактапина RL2 в комбинации с модуляторами аутофагии в отношении опухолевых клеток человека показано, что ингибиторы аутофагии хлорокин, Ku 55933 и индуктор аутофагии рапамицин усиливают цитотоксическое действие рекомбинантного аналога лактапина RL2 в синергетическом режиме.
4. Показано, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 оказывает противоопухолевое действие в отношении опухолевых моделей различной локализации у мышей: подкожной, внутримышечной и внутрибрюшинной при суммарной дозе препарата RL2 40 – 240 мг/кг.
5. Показано, что индекс торможения роста опухоли при терапии комбинацией препаратов - рекомбинантным аналогом лактапина RL2 и химиопрепаратов – хлорокина и циклофосфида выше, чем индекс ТРО для моно-терапии этими препаратами.
6. Показано, что рекомбинантный аналог лактапина EL1, продуцируемый эукариотическими клетками, обладает цитотоксической активностью в отношении широкого спектра культур клеток опухолей человека в диапазоне концентраций 50-375 нг/мл.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Koval O.A., **Tkachenko A.V. (Bagamanshina A.V.)**, Fomin A.S., Semenov D.V., Nushtaeva A.A., Kuligina E.V., Zavjalov E.L., Richter V.A. Lactaptin induces p53-independent cell death associated with features of apoptosis and autophagy and delays growth of breast cancer cells in mouse xenografts. // PLOS ONE. – 2014. – V. 9. – N. 4. – P. e93921.
2. **Ткаченко А.В. (Bagamanshina A.V.)**, Троицкая О.С., Семенов Д.В., Дмитриенко Е.В., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Коваль О.А. Активация иммунной системы рекомбинантным аналогом противоопухолевого белка лактаптина. // Молекулярная биология. - 2017. – V. 51. – N. 5. – P. 787-796.
3. Коваль О.А., Волкова О.Ю., Горчаков А.А., Кулемзин С.В., **Ткаченко А.В. (Багаманшина А.В.)**, Нуштаева А.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Таранин А.В. Сравнительный анализ активности лактаптина, полученного в про- и эукариотических системах экспрессии. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – V. 21. – N. 7. – P. 764-769.
4. **Bagamanshina A.V.**, Troitskaya O.S., Nushtaeva A.A., Yunusova A.Yu., Starykovych M.O., Kuligina E.V., Kit Yu.Ya., Richter M., Wohlfromm F., Kahne T., Lavrik I.N., Richter V.A., Koval O.A. Cytotoxic and Antitumor Activity of Lactaptin in Combination with Autophagy Inducers and Inhibitors. // BioMed Research International. – 2019. – V. 2019. – P. ID 4087160.
5. Патент РФ № 2683221. 26.03.2019. Коваль О.А., Волкова О.Ю., Горчаков А.А., Кулемзин С.В., **Ткаченко А.В. (Багаманшина А.В.)**, Нуштаева А.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Таранин А.В. Рекомбинантный пептид EL1, обладающий цитотоксической активностью по отношению к раковым клеткам человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Некипелая В. В., Семенов Д.В., Потапенко М.О., Кулигина Е.В., и др. Лактаптин □ Белок Человеческого Молока, Индуцирующий Апоптоз Клеток Аденокарциномы Mcf-7 // Доклады Академии Наук. - 2008. - Т. 419. - № 2 . - С. 268–271.
2. Коваль О.А., Фомин А.С., Бабкина И.Н., и др. Генно-инженерные аналоги потенциального противоопухолевого пептида лактаптина // Genetically Engineered Analogs of Potentially Anti-Tumor Peptide – Lactaptin. - 2010.
3. Фомин А.С. Апоптоз раковых клеток человека, индуцируемый рекомбинантным аналогом лактаптина // дисс. к.х.н. - 2012.
4. Tyagi A., Tuknait A., Anand P., и др. CancerPPD: a database of anticancer peptides and proteins // Nucleic Acids Res. - 2015. - V. 43. - № Database issue . - P. D837-843.
5. Protein Targeting Compounds: Prediction, Selection and Activity of Specific Inhibitors // под ред. T. Böldicke. Cham: Springer International Publishing, 2016.
6. Floros T., Tarhini A.A. Anticancer Cytokines: Biology and Clinical Effects of IFN- α 2, IL-2, IL-15, IL-21, and IL-12 // Semin. Oncol. - 2015. - V. 42. - № 4 . - P. 539–548.
7. Abdel-Wahab N., Alshawa A., Suarez-Almazor M.E. Adverse Events in Cancer Immunotherapy // Adv. Exp. Med. Biol. - 2017. - V. 995 . - P. 155–174.
8. Nakashima H., Miyake K., Clark C.R., и др. Potent antitumor effects of combination therapy with IFNs and monocytes in mouse models of established human ovarian and melanoma tumors // Cancer Immunol. Immunother. CII. - 2012. - V. 61. - № 7 . - P. 1081–1092.
9. Borden E.C. Review: Milstein Award lecture: interferons and cancer: where from here? // J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res. - 2005. - V. 25. - № 9 . - P. 511–527.
10. Talpaz M., Mercer J., Hehlmann R. The interferon-alpha revival in CML // Ann. Hematol. - 2015. - V. 94 Suppl 2 . - P. 195-207.
11. Mahajan B., Kaur S. Interferons // Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol. - 2015. - V. 81 . - P. 51–5.
12. Steen H.C., Gamero A.M. Interferon-lambda as a potential therapeutic agent in cancer treatment // J. Interferon Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interferon Cytokine Res. - 2010. - V. 30. - № 8 . - P. 597–602.
13. Doherty M.R., Cheon H., Junk D.J., и др. Interferon-beta represses cancer stem cell properties in triple-negative breast cancer // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. - 2017. - V. 114. - № 52 . - P. 13792–13797.
14. Lykhova A.A., Kudryavets Y.I., Stokovska L.I., и др. Suppression of proliferation, tumorigenicity and metastasis of lung cancer cells after their transduction by interferon-beta gene in baculovirus vector // Cytokine. - 2015. - V. 71. - № 2 . - P. 318–326.

15. Kloke O., Wandl U., Opalka B., и др. A prospective randomized comparison of single-agent interferon (IFN)-alpha with the combination of IFN-alpha and low-dose IFN-gamma in chronic myelogenous leukaemia // *Eur. J. Haematol.* - 1992. - V. 48. - № 2 . - P. 93–98.
16. Kurzrock R., Talpaz M., Kantarjian H., и др. Therapy of chronic myelogenous leukemia with recombinant interferon-gamma // *Blood.* - 1987. - V. 70. - № 4 . - P. 943–947.
17. Miller C.H.T., Maher S.G., Young H.A. Clinical Use of Interferon-gamma // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* - 2009. - V. 1182 . - P. 69–79.
18. Meager A., Visvalingam K., Dilger P., и др. Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons // *Cytokine.* - 2005. - V. 31. - № 2 . - P. 109–118.
19. Zhou Z., Hamming O.J., Ank N., и др. Type III interferon (IFN) induces a type I IFN-like response in a restricted subset of cells through signaling pathways involving both the Jak-STAT pathway and the mitogen-activated protein kinases // *J. Virol.* - 2007. - V. 81. - № 14 . - P. 7749–7758.
20. Kotenko S.V., Gallagher G., Baurin V.V., и др. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex // *Nat. Immunol.* - 2003. - V. 4. - № 1 . - P. 69–77.
21. Li W., Lewis-Antes A., Huang J., и др. Regulation of apoptosis by type III interferons // *Cell Prolif.* - 2008. - V. 41. - № 6 . - P. 960–979.
22. Brand S., Beigel F., Olszak T., и др. IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* - 2005. - V. 289. - № 5 . - P. G960-968.
23. Ank N., West H., Bartholdy C., и др. Lambda interferon (IFN-lambda), a type III IFN, is induced by viruses and IFNs and displays potent antiviral activity against select virus infections in vivo // *J. Virol.* - 2006. - V. 80. - № 9 . - P. 4501–4509.
24. Marcello T., Grakoui A., Barba-Spaeth G., и др. Interferons alpha and lambda inhibit hepatitis C virus replication with distinct signal transduction and gene regulation kinetics // *Gastroenterology.* - 2006. - V. 131. - № 6 . - P. 1887–1898.
25. Zitzmann K., Brand S., Baehs S., и др. Novel interferon-lambdas induce antiproliferative effects in neuroendocrine tumor cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2006. - V. 344. - № 4 . - P. 1334–1341.
26. Hong S.-H., Cho O., Kim K., и др. Effect of interferon-lambda on replication of hepatitis B virus in human hepatoma cells // *Virus Res.* - 2007. - V. 126. - № 1–2 . - P. 245–249.
27. Maher S.G., Sheikh F., Scarzello A.J., и др. IFNalpha and IFNlambda differ in their antiproliferative effects and duration of JAK/STAT signaling activity // *Cancer Biol. Ther.* - 2008. - V. 7. - № 7 . - P. 1109–1115.
28. Guenterberg K.D., Grignol V.P., Raig E.T., и др. Interleukin-29 binds to melanoma cells inducing Jak-STAT signal transduction and apoptosis // *Mol. Cancer Ther.* - 2010. - V. 9. - № 2 . - P. 510–520.

29. Li Q., Kawamura K., Ma G., и др. Interferon-lambda induces G1 phase arrest or apoptosis in oesophageal carcinoma cells and produces anti-tumour effects in combination with anti-cancer agents // *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990. - 2010. - V. 46. - № 1 . - P. 180–190.
30. Sato A., Ohtsuki M., Hata M., и др. Antitumor activity of IFN-lambda in murine tumor models // *J. Immunol. Baltim. Md* 1950. - 2006. - V. 176. - № 12 . - P. 7686–7694.
31. Manoukian G., Hagemeister F. Denileukin diftitox: a novel immunotoxin // *Expert Opin. Biol. Ther.* - 2009. - V. 9. - № 11 . - P. 1445–1451.
32. Klein C., Waldhauer I., Nicolini V.G., и др. Cergutuzumab amunaleukin (CEA-IL2v), a CEA-targeted IL-2 variant-based immunocytokine for combination cancer immunotherapy: Overcoming limitations of aldesleukin and conventional IL-2-based immunocytokines // *Oncoimmunology.* - 2017. - V. 6. - № 3 . - P. e1277306.
33. Walczak H. TNF and ubiquitin at the crossroads of gene activation, cell death, inflammation, and cancer // *Immunol. Rev.* - 2011. - V. 244. - № 1 . - P. 9–28.
34. Oettgen H.F., Carswell E.A., Kassel R.L., и др. Endotoxin-induced tumor necrosis factor // *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer.* - 1980. - V. 75 . - P. 207–212.
35. Lejeune F.J., Rüegg C. Recombinant human tumor necrosis factor: an efficient agent for cancer treatment // *Bull. Cancer (Paris).* - 2006. - V. 93. - № 8 . - P. E90-100.
36. Bemelmans M.H.A., Tits L.J.H. van, Buurman W.A. Tumor Necrosis Factor: Function, Release and Clearance // *Crit. Rev. Immunol.* - 2017. - V. 37. - № 2–6 . - P. 249–259.
37. Ashkenazi A., Dixit V.M. Death receptors: signaling and modulation // *Science.* - 1998. - V. 281. - № 5381 . - P. 1305–1308.
38. Horssen R. van, Ten Hagen T.L.M., Eggermont A.M.M. TNF-alpha in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility // *The Oncologist.* - 2006. - V. 11. - № 4 . - P. 397–408.
39. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis // *Semin. Oncol.* - 2002. - V. 29. - № 6 Suppl 16 . - P. 15–18.
40. Takada H., Chen N.-J., Mirtsos C., и др. Role of SODD in regulation of tumor necrosis factor responses // *Mol. Cell. Biol.* - 2003. - V. 23. - № 11 . - P. 4026–4033.
41. Rath P.C., Aggarwal B.B. TNF-induced signaling in apoptosis // *J. Clin. Immunol.* - 1999. - V. 19. - № 6 . - P. 350–364.
42. Hellwig C.T., Rehm M. TRAIL signaling and synergy mechanisms used in TRAIL-based combination therapies // *Mol. Cancer Ther.* - 2012. - V. 11. - № 1 . - P. 3–13.
43. Natoli G., Costanzo A., Moretti F., и др. Tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 signaling downstream of TNF receptor-associated factor 2. Nuclear factor kappaB (NFkappaB)-inducing kinase requirement for activation of activating protein 1 and NFkappaB but not of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase // *J. Biol. Chem.* - 1997. - V. 272. - № 42 . - P. 26079–26082.

44. Allen J.E., Krigsfeld G., Mayes P.A., и др. Dual inactivation of Akt and ERK by TIC10 signals Foxo3a nuclear translocation, TRAIL gene induction, and potent antitumor effects // *Sci. Transl. Med.* - 2013. - V. 5. - № 171 . - P. 171ra17.
45. Lavrik I., Golks A., Krammer P.H. Death receptor signaling // *J. Cell Sci.* - 2005. - V. 118. - № Pt 2 . - P. 265–267.
46. Locksley R.M., Killeen N., Lenardo M.J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology // *Cell.* - 2001. - V. 104. - № 4 . - P. 487–501.
47. Maksimovic-Ivanic D., Stosic-Grujicic S., Nicoletti F., и др. Resistance to TRAIL and how to surmount it // *Immunol. Res.* - 2012. - V. 52. - № 1–2 . - P. 157–168.
48. Stuckey D.W., Shah K. TRAIL on trial: preclinical advances in cancer therapy // *Trends Mol. Med.* - 2013. - V. 19. - № 11 . - P. 685–694.
49. Wang S. The promise of cancer therapeutics targeting the TNF-related apoptosis-inducing ligand and TRAIL receptor pathway // *Oncogene.* - 2008. - V. 27. - № 48 . - P. 6207–6215.
50. Ozören N., Inohara N., Núñez G. A putative role for human BFK in DNA damage-induced apoptosis // *Biotechnol. J.* - 2009. - V. 4. - № 7 . - P. 1046–1054.
51. Dimberg L.Y., Anderson C.K., Camidge R., и др. On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics // *Oncogene.* - 2013. - V. 32. - № 11 . - P. 1341–1350.
52. Allen J.E., Krigsfeld G., Patel L., и др. Identification of TRAIL-inducing compounds highlights small molecule ONC201/TIC10 as a unique anti-cancer agent that activates the TRAIL pathway // *Mol. Cancer.* - 2015. - V. 14 . - P. 99.
53. Miguel D. de, Lemke J., Anel A., и др. Onto better TRAILs for cancer treatment // *Cell Death Differ.* - 2016. - V. 23. - № 5 . - P. 733–747.
54. Jiang H.H., Kim T.H., Lee S., и др. PEGylated TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) for effective tumor combination therapy // *Biomaterials.* - 2011. - V. 32. - № 33 . - P. 8529–8537.
55. Guo L., Fan L., Ren J., и др. A novel combination of TRAIL and doxorubicin enhances antitumor effect based on passive tumor-targeting of liposomes // *Nanotechnology.* - 2011. - V. 22. - № 26 . - P. 265105.
56. Guo L., Fan L., Pang Z., и др. TRAIL and doxorubicin combination enhances anti-glioblastoma effect based on passive tumor targeting of liposomes // *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* - 2011. - V. 154. - № 1 . - P. 93–102.
57. Bae S., Ma K., Kim T.H., и др. Doxorubicin-loaded human serum albumin nanoparticles surface-modified with TNF-related apoptosis-inducing ligand and transferrin for targeting multiple tumor types // *Biomaterials.* - 2012. - V. 33. - № 5 . - P. 1536–1546.
58. Håkansson A., Zhivotovsky B., Orrenius S., и др. Apoptosis induced by a human milk protein. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1995. - V. 92. - № 17 . - P. 8064–8068.
59. Frislev H.S., Boye T.L., Nylandsted J., и др. Lipotides kill cancer cells by disrupting the plasma membrane // *Sci. Rep.* - 2017. - V. 7. - № 1 . - P. 1–12.

60. Ho J.C.S., Nadeem A., Rydström A., и др. Targeting of nucleotide-binding proteins by HAMLET--a conserved tumor cell death mechanism // *Oncogene*. - 2016. - V. 35. - № 7 . - P. 897–907.
61. Puthia M., Storm P., Nadeem A., и др. Prevention and treatment of colon cancer by peroral administration of HAMLET (human α -lactalbumin made lethal to tumour cells) // *Gut*. - 2014. - V. 63. - № 1 . - P. 131–142.
62. Mossberg A.-K., Hou Y., Svensson M., и др. HAMLET treatment delays bladder cancer development // *J. Urol*. - 2010. - V. 183. - № 4 . - P. 1590–1597.
63. Fischer W., Gustafsson L., Mossberg A.-K., и др. Human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis-like mechanism and prolongs survival // *Cancer Res*. - 2004. - V. 64. - № 6 . - P. 2105–2112.
64. Gustafsson L., Leijonhufvud I., Aronsson A., и др. Treatment of skin papillomas with topical alpha-lactalbumin-oleic acid // *N. Engl. J. Med*. - 2004. - V. 350. - № 26 . - P. 2663–2672.
65. Mossberg A.-K., Wullt B., Gustafsson L., и др. Bladder cancers respond to intravesical instillation of HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells) // *Int. J. Cancer*. - 2007. - V. 121. - № 6 . - P. 1352–1359.
66. Ho J.C.S., Nadeem A., Svanborg C. HAMLET - A protein-lipid complex with broad tumoricidal activity // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. - 2017. - V. 482. - № 3 . - P. 454–458.
67. Breydo L., Almeshdar H.A., El-Fakharany E.M., и др. Not all AMLETs are made equal: complexes of cow and camel α -lactalbumin with oleic acid show different structure and stability // *J. Biomol. Struct. Dyn*. - 2018. - V. 36. - № 16 . - P. 4405–4412.
68. Delgado Y., Morales-Cruz M., Figueroa C.M., и др. The cytotoxicity of BAMLET complexes is due to oleic acid and independent of the α -lactalbumin component // *FEBS Open Bio*. - 2015. - V. 5 . - P. 397–404.
69. Rath E.M., Cheng Y.Y., Pinese M., и др. BAMLET kills chemotherapy-resistant mesothelioma cells, holding oleic acid in an activated cytotoxic state // *PloS One*. - 2018. - V. 13. - № 8 . - P. e0203003.
70. Noteborn M.H., Boer G.F. de, Roozelaar D.J. van, и др. Characterization of cloned chicken anemia virus DNA that contains all elements for the infectious replication cycle // *J. Virol*. - 1991. - V. 65. - № 6 . - P. 3131–3139.
71. Backendorf C., Noteborn M.H.M. Apoptin towards safe and efficient anticancer therapies // *Adv. Exp. Med. Biol*. - 2014. - V. 818 . - P. 39–59.
72. Backendorf C., Visser A.E., Boer A.G. de, и др. Apoptin: therapeutic potential of an early sensor of carcinogenic transformation // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*. - 2008. - V. 48 . - P. 143–169.
73. Tavassoli M., Guelen L., Luxon B.A., и др. Apoptin: specific killer of tumor cells? // *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death*. - 2005. - V. 10. - № 4 . - P. 717–724.
74. Лежнин Ю.Н., Кравченко Ю.Е., Фролова Е.И., и др. ОнкоВокРичеРкие белки в проВивораковой Веррапии: механизмы дейРВвия // *Молекулярная Биология*. - 2015. - V. 49. - № 2 . - P. 264–278.

75. Hou Z., Mao J., Lu Y., и др. rApoptin induces apoptosis in human breast cancer cells via phosphorylation of Nur77 and Akt // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 2018. - V. 498. - № 1 . - P. 221–227.
76. Moll U.M., Marchenko N., Zhang X.-K. p53 and Nur77/TR3 - transcription factors that directly target mitochondria for cell death induction // *Oncogene.* - 2006. - V. 25. - № 34 . - P. 4725–4743.
77. Tsai S.-C., Lu C.-C., Lee C.-Y., и др. AKT serine/threonine protein kinase modulates bufalin-triggered intrinsic pathway of apoptosis in CAL 27 human oral cancer cells // *Int. J. Oncol.* - 2012. - V. 41. - № 5 . - P. 1683–1692.
78. Lian H., Jin N., Li X., и др. Induction of an effective anti-tumor immune response and tumor regression by combined administration of IL-18 and Apoptin // *Cancer Immunol. Immunother. CII.* - 2007. - V. 56. - № 2 . - P. 181–192.
79. Los M., Panigrahi S., Rashedi I., и др. Apoptin, a tumor-selective killer // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2009. - V. 1793. - № 8 . - P. 1335–1342.
80. Keating M.J., Flinn I., Jain V., и др. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study // *Blood.* - 2002. - V. 99. - № 10 . - P. 3554–3561.
81. Marcus R., Imrie K., Belch A., и др. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma // *Blood.* - 2005. - V. 105. - № 4 . - P. 1417–1423.
82. Ghilmini M., Schmitz S.-F.H., Cogliatti S.B., и др. Prolonged treatment with rituximab in patients with follicular lymphoma significantly increases event-free survival and response duration compared with the standard weekly x 4 schedule // *Blood.* - 2004. - V. 103. - № 12 . - P. 4416–4423.
83. Coiffier B., Lepage E., Briere J., и др. CHOP chemotherapy plus rituximab compared with CHOP alone in elderly patients with diffuse large-B-cell lymphoma // *N. Engl. J. Med.* - 2002. - V. 346. - № 4 . - P. 235–242.
84. Byrd J.C., Peterson B.L., Morrison V.A., и др. Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712) // *Blood.* - 2003. - V. 101. - № 1 . - P. 6–14.
85. Romond E.H., Perez E.A., Bryant J., и др. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer // *N. Engl. J. Med.* - 2005. - V. 353. - № 16 . - P. 1673–1684.
86. Hudis C.A. Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice // *N. Engl. J. Med.* - 2007. - V. 357. - № 1 . - P. 39–51.
87. Vogel C.L., Cobleigh M.A., Tripathy D., и др. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2002. - V. 20. - № 3 . - P. 719–726.
88. Viani G.A., Afonso S.L., Stefano E.J., и др. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials // *BMC Cancer.* - 2007. - V. 7 . - P. 153.

89. Suter T.M., Procter M., Veldhuisen D.J. van, и др. Trastuzumab-associated cardiac adverse effects in the herceptin adjuvant trial // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2007. - V. 25. - № 25 . - P. 3859–3865.
90. Schaller G., Fuchs I., Gonsch T., и др. Phase II study of capecitabine plus trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2 overexpressing metastatic breast cancer pretreated with anthracyclines or taxanes // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2007. - V. 25. - № 22 . - P. 3246–3250.
91. Sato N., Sano M., Tabei T., и др. Combination docetaxel and trastuzumab treatment for patients with HER-2-overexpressing metastatic breast cancer: a multicenter, phase-II study // *Breast Cancer Tokyo Jpn.* - 2006. - V. 13. - № 2 . - P. 166–171.
92. Hussain M.H.A., MacVicar G.R., Petrylak D.P., и др. Trastuzumab, paclitaxel, carboplatin, and gemcitabine in advanced human epidermal growth factor receptor-2/neu-positive urothelial carcinoma: results of a multicenter phase II National Cancer Institute trial // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2007. - V. 25. - № 16 . - P. 2218–2224.
93. Burstein H.J., Keshaviah A., Baron A.D., и др. Trastuzumab plus vinorelbine or taxane chemotherapy for HER2-overexpressing metastatic breast cancer: the trastuzumab and vinorelbine or taxane study // *Cancer.* - 2007. - V. 110. - № 5 . - P. 965–972.
94. Belkacémi Y., Gligorov J., Ozsahin M., и др. Concurrent trastuzumab with adjuvant radiotherapy in HER2-positive breast cancer patients: acute toxicity analyses from the French multicentric study // *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* - 2008. - V. 19. - № 6 . - P. 1110–1116.
95. Baselga J., Carbonell X., Castañeda-Soto N.-J., и др. Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2005. - V. 23. - № 10 . - P. 2162–2171.
96. Arnould L., Arveux P., Couturier J., и др. Pathologic complete response to trastuzumab-based neoadjuvant therapy is related to the level of HER-2 amplification // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* - 2007. - V. 13. - № 21 . - P. 6404–6409.
97. Sandler A., Gray R., Perry M.C., и др. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer // *N. Engl. J. Med.* - 2006. - V. 355. - № 24 . - P. 2542–2550.
98. Giantonio B.J., Catalano P.J., Meropol N.J., и др. Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200 // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2007. - V. 25. - № 12 . - P. 1539–1544.
99. Kabbinavar F.F., Hurwitz H.I., Yi J., и др. Addition of bevacizumab to fluorouracil-based first-line treatment of metastatic colorectal cancer: pooled analysis of cohorts of older patients from two randomized clinical trials // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2009. - V. 27. - № 2 . - P. 199–205.
100. Grothey A., Sugrue M.M., Purdie D.M., и др. Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE) // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2008. - V. 26. - № 33 . - P. 5326–5334.

101. Fuchs C.S., Marshall J., Mitchell E., и др. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2007. - V. 25. - № 30. - P. 4779–4786.
102. Herbst R.S., O'Neill V.J., Fehrenbacher L., и др. Phase II study of efficacy and safety of bevacizumab in combination with chemotherapy or erlotinib compared with chemotherapy alone for treatment of recurrent or refractory non small-cell lung cancer // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2007. - V. 25. - № 30. - P. 4743–4750.
103. Rini B.I., Halabi S., Rosenberg J.E., и др. Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206 // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2008. - V. 26. - № 33. - P. 5422–5428.
104. Bukowski R.M., Kabbinavar F.F., Figlin R.A., и др. Randomized phase II study of erlotinib combined with bevacizumab compared with bevacizumab alone in metastatic renal cell cancer // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2007. - V. 25. - № 29. - P. 4536–4541.
105. Thienelt C.D., Bunn P.A., Hanna N., и др. Multicenter phase I/II study of cetuximab with paclitaxel and carboplatin in untreated patients with stage IV non-small-cell lung cancer // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2005. - V. 23. - № 34. - P. 8786–8793.
106. Modi S., D'Andrea G., Norton L., и др. A phase I study of cetuximab/paclitaxel in patients with advanced-stage breast cancer // *Clin. Breast Cancer.* - 2006. - V. 7. - № 3. - P. 270–277.
107. Hofheinz R.-D., Horisberger K., Woernle C., и др. Phase I trial of cetuximab in combination with capecitabine, weekly irinotecan, and radiotherapy as neoadjuvant therapy for rectal cancer // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* - 2006. - V. 66. - № 5. - P. 1384–1390.
108. Curran D., Giralt J., Harari P.M., и др. Quality of life in head and neck cancer patients after treatment with high-dose radiotherapy alone or in combination with cetuximab // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2007. - V. 25. - № 16. - P. 2191–2197.
109. Burtneß B., Goldwasser M.A., Flood W., и др. Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2005. - V. 23. - № 34. - P. 8646–8654.
110. Bourhis J., Rivera F., Mesia R., и др. Phase I/II study of cetuximab in combination with cisplatin or carboplatin and fluorouracil in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2006. - V. 24. - № 18. - P. 2866–2872.
111. Bonner J.A., Harari P.M., Giralt J., и др. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck // *N. Engl. J. Med.* - 2006. - V. 354. - № 6. - P. 567–578.
112. Belani C.P., Schreeder M.T., Steis R.G., и др. Cetuximab in combination with carboplatin and docetaxel for patients with metastatic or advanced-stage nonsmall cell lung cancer: a multicenter phase 2 study // *Cancer.* - 2008. - V. 113. - № 9. - P. 2512–2517.
113. Van Cutsem E., Peeters M., Siena S., и др. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory

- metastatic colorectal cancer // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2007. - V. 25. - № 13 . - P. 1658–1664.
114. Hecht J.R., Patnaik A., Berlin J., и др. Panitumumab monotherapy in patients with previously treated metastatic colorectal cancer // *Cancer.* - 2007. - V. 110. - № 5 . - P. 980–988.
115. Hecht J.R., Mitchell E., Chidiac T., и др. A randomized phase IIIB trial of chemotherapy, bevacizumab, and panitumumab compared with chemotherapy and bevacizumab alone for metastatic colorectal cancer // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2009. - V. 27. - № 5 . - P. 672–680.
116. Seiden M.V., Burris H.A., Matulonis U., и др. A phase II trial of EMD72000 (matuzumab), a humanized anti-EGFR monoclonal antibody, in patients with platinum-resistant ovarian and primary peritoneal malignancies // *Gynecol. Oncol.* - 2007. - V. 104. - № 3 . - P. 727–731.
117. Boland W.K., Bebb G. Nimotuzumab: a novel anti-EGFR monoclonal antibody that retains anti-EGFR activity while minimizing skin toxicity // *Expert Opin. Biol. Ther.* - 2009. - V. 9. - № 9 . - P. 1199–1206.
118. Berek J.S., Taylor P.T., Nicodemus C.F. CA125 velocity at relapse is a highly significant predictor of survival post relapse: results of a 5-year follow-up survey to a randomized placebo-controlled study of maintenance oregovomab immunotherapy in advanced ovarian cancer // *J. Immunother. Hagerstown Md* 1997. - 2008. - V. 31. - № 2 . - P. 207–214.
119. Berek J.S., Taylor P.T., Gordon A., и др. Randomized, placebo-controlled study of oregovomab for consolidation of clinical remission in patients with advanced ovarian cancer // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2004. - V. 22. - № 17 . - P. 3507–3516.
120. Herbst R.S., Davies A.M., Natale R.B., и др. Efficacy and safety of single-agent pertuzumab, a human epidermal receptor dimerization inhibitor, in patients with non small cell lung cancer // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* - 2007. - V. 13. - № 20 . - P. 6175–6181.
121. Gordon M.S., Matei D., Aghajanian C., и др. Clinical activity of pertuzumab (rhuMAb 2C4), a HER dimerization inhibitor, in advanced ovarian cancer: potential predictive relationship with tumor HER2 activation status // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2006. - V. 24. - № 26 . - P. 4324–4332.
122. Agus D.B., Sweeney C.J., Morris M.J., и др. Efficacy and safety of single-agent pertuzumab (rhuMAb 2C4), a human epidermal growth factor receptor dimerization inhibitor, in castration-resistant prostate cancer after progression from taxane-based therapy // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2007. - V. 25. - № 6 . - P. 675–681.
123. Weber J.S., O'Day S., Urba W., и др. Phase I/II study of ipilimumab for patients with metastatic melanoma // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2008. - V. 26. - № 36 . - P. 5950–5956.
124. Weber J. Review: anti-CTLA-4 antibody ipilimumab: case studies of clinical response and immune-related adverse events // *The Oncologist.* - 2007. - V. 12. - № 7 . - P. 864–872.
125. Issell B.F., Crooke S.T. Maytansine // *Cancer Treat. Rev.* - 1978. - V. 5. - № 4 . - P. 199–207.
126. Ma B., Ma Q., Wang H., и др. Clinical efficacy and safety of T-DM1 for patients with HER2-positive breast cancer // *OncoTargets Ther.* - 2016. - V. 9 . - P. 959–976.

127. Singh A.P., Shah D.K. Application of a PK-PD Modeling and Simulation-Based Strategy for Clinical Translation of Antibody-Drug Conjugates: a Case Study with Trastuzumab Emtansine (T-DM1) // *AAPS J.* - 2017. - V. 19. - № 4. - P. 1054–1070.
128. Pondé N., Aftimos P., Piccart M. Antibody-Drug Conjugates in Breast Cancer: a Comprehensive Review // *Curr. Treat. Options Oncol.* - 2019. - V. 20. - № 5. - P. 37.
129. Suzuki R., Rao P., Sasaguri S. Current status and future of target-based therapeutics // *Curr. Cancer Drug Targets.* - 2007. - V. 7. - № 3. - P. 273–284.
130. Yeung K., Li M., Carlson J.J. Using Performance-Based Risk-Sharing Arrangements to Address Uncertainty in Indication-Based Pricing // *J. Manag. Care Spec. Pharm.* - 2017. - V. 23. - № 10. - P. 1010–1015.
131. Jacob J.A., Salmani J.M.M., Jiang Z., и др. Autophagy: An overview and its roles in cancer and obesity // *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* - 2017. - V. 468. - P. 85–89.
132. Ma J.-F., Huang Y., Chen S.-D., и др. Immunohistochemical evidence for macroautophagy in neurones and endothelial cells in Alzheimer's disease // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* - 2010. - V. 36. - № 4. - P. 312–319.
133. Maiuri M.C., Ciriollo A., Kroemer G. Crosstalk between apoptosis and autophagy within the Beclin 1 interactome // *EMBO J.* - 2010. - V. 29. - № 3. - P. 515–516.
134. Honda S., Arakawa S., Nishida Y., и др. Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes // *Nat. Commun.* - 2014. - V. 5. - P. 4004.
135. Kang R., Zeh H.J., Lotze M.T., и др. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis // *Cell Death Differ.* - 2011. - V. 18. - № 4. - P. 571–580.
136. Fu L., Cheng Y., Liu B. Beclin-1: autophagic regulator and therapeutic target in cancer // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 2013. - V. 45. - № 5. - P. 921–924.
137. Lu K., Psakhye I., Jentsch S. A new class of ubiquitin-Atg8 receptors involved in selective autophagy and polyQ protein clearance // *Autophagy.* - 2015. - V. 10. - № 12. - P. 2381–2382.
138. Lamark T., Svenning S., Johansen T. Regulation of selective autophagy: the p62/SQSTM1 paradigm // *Essays Biochem.* - 2017. - V. 61. - № 6. - P. 609–624.
139. Menon M.B., Dhamija S. Beclin 1 Phosphorylation - at the Center of Autophagy Regulation // *Front. Cell Dev. Biol.* - 2018. - V. 6. - P. 137.
140. Kaushal G.P., Shah S.V. Autophagy in Acute Kidney Injury // *Kidney Int.* - 2016. - V. 89. - № 4. - P. 779–791.
141. Carew J.S., Kelly K.R., Nawrocki S.T. Autophagy as a target for cancer therapy: new developments // *Cancer Manag. Res.* - 2012. - V. 4. - P. 357–365.
142. Maxfield F.R. Role of endosomes and lysosomes in human disease // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* - 2014. - V. 6. - № 5. - P. a016931.
143. Zhu Y., Zhao L., Liu L., и др. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis // *Protein Cell.* - 2010. - V. 1. - № 5. - P. 468–477.

144. Qi P., He Z., Zhang L., и др. Rottlerin-induced autophagy leads to apoptosis in bladder cancer cells // *Oncol. Lett.* - 2016. - V. 12. - № 6 . - P. 4577–4583.
145. Swamipillai A.L., Salomoni P., Short S.C. The Role of Autophagy in Clinical Practice // *Clin. Oncol.* - 2012. - V. 24. - № 6 . - P. 387–395.
146. Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E. Role of autophagy in cancer // *Nat. Rev. Cancer.* - 2007. - V. 7. - № 12 . - P. 961–967.
147. Shibutani S.T., Saitoh T., Nowag H., и др. Autophagy and autophagy-related proteins in the immune system // *Nat. Immunol.* - 2015. - V. 16. - № 10 . - P. 1014–1024.
148. Viry E., Noman M.Z., Arakelian T., и др. Hijacker of the Antitumor Immune Response: Autophagy Is Showing Its Worst Facet // *Front. Oncol.* - 2016. - V. 6 . - P. 246.
149. Rao S., Tortola L., Perlot T., и др. A dual role for autophagy in a murine model of lung cancer // *Nat. Commun.* - 2014. - V. 5 . - P. 3056.
150. Martinet W., De Meyer G.R.Y. Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential // *Circ. Res.* - 2009. - V. 104. - № 3 . - P. 304–317.
151. Petibone D.M., Majeed W., Casciano D.A. Autophagy function and its relationship to pathology, clinical applications, drug metabolism and toxicity // *J. Appl. Toxicol. JAT.* - 2017. - V. 37. - № 1 . - P. 23–37.
152. Morel E., Mehrpour M., Botti J., и др. Autophagy: A Druggable Process // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 2017. - V. 57 . - P. 375–398.
153. Gil J., Pesz K.A., Sasiadek M.M. May autophagy be a novel biomarker and antitumor target in colorectal cancer? // *Biomark. Med.* - 2016. - V. 10. - № 10 . - P. 1081–1094.
154. Pallichankandy S., Rahman A., Thayyullathil F., и др. ROS-dependent activation of autophagy is a critical mechanism for the induction of anti-glioma effect of sanguinarine // *Free Radic. Biol. Med.* - 2015. - V. 89 . - P. 708–720.
155. Galadari S., Rahman A., Pallichankandy S., и др. Reactive oxygen species and cancer paradox: To promote or to suppress? // *Free Radic. Biol. Med.* - 2017. - V. 104 . - P. 144–164.
156. Thayyullathil F., Rahman A., Pallichankandy S., и др. ROS-dependent prostate apoptosis response-4 (Par-4) up-regulation and ceramide generation are the prime signaling events associated with curcumin-induced autophagic cell death in human malignant glioma // *FEBS Open Bio.* - 2014. - V. 4 . - P. 763–776.
157. Shi T.-T., Yu X.-X., Yan L.-J., и др. Research progress of hydroxychloroquine and autophagy inhibitors on cancer // *Cancer Chemother. Pharmacol.* - 2017. - V. 79. - № 2 . - P. 287–294.
158. Li J., Yang D., Wang W., и др. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances IL-24-induced apoptosis in human oral squamous cell carcinoma cells // *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR.* - 2015. - V. 34 . - P. 97.
159. Wang X., Zhou G., Liu C., и др. Acanthopanax versus 3-Methyladenine Ameliorates Sodium Taurocholate-Induced Severe Acute Pancreatitis by Inhibiting the Autophagic Pathway in Rats // *Mediators Inflamm.* - 2016. - V. 2016 . - P. 8369704.

160. Wu Y., Wang X., Guo H., и др. Synthesis and screening of 3-MA derivatives for autophagy inhibitors // *Autophagy*. - 2013. - V. 9. - № 4 . - P. 595–603.
161. Pasquier B. Autophagy inhibitors // *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*. - 2016. - V. 73. - № 5 . - P. 985–1001.
162. Zhang R., Wang R., Chen Q., и др. Inhibition of autophagy using 3-methyladenine increases cisplatin-induced apoptosis by increasing endoplasmic reticulum stress in U251 human glioma cells // *Mol. Med. Rep.* - 2015. - V. 12. - № 2 . - P. 1727–1732.
163. Howells L.M., Sale S., Sriramareddy S.N., и др. Curcumin ameliorates oxaliplatin-induced chemoresistance in HCT116 colorectal cancer cells in vitro and in vivo // *Int. J. Cancer*. - 2011. - V. 129. - № 2 . - P. 476–486.
164. Tan S., Peng X., Peng W., и др. Enhancement of oxaliplatin-induced cell apoptosis and tumor suppression by 3-methyladenine in colon cancer // *Oncol. Lett.* - 2015. - V. 9. - № 5 . - P. 2056–2062.
165. Tapodi A., Bogнар Z., Szabo C., и др. PARP inhibition induces Akt-mediated cytoprotective effects through the formation of a mitochondria-targeted phospho-ATM-NEMO-Akt-mTOR signalosome // *Biochem. Pharmacol.* - 2019. - V. 162 . - P. 98–108.
166. Bertacchini J., Heidari N., Mediani L., и др. Targeting PI3K/AKT/mTOR network for treatment of leukemia // *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*. - 2015. - V. 72. - № 12 . - P. 2337–2347.
167. Li Y., Yang D.-Q. The ATM inhibitor KU-55933 suppresses cell proliferation and induces apoptosis by blocking Akt in cancer cells with overactivated Akt // *Mol. Cancer Ther.* - 2010. - V. 9. - № 1 . - P. 113–125.
168. Brenner A.K., Andersson Tvedt T.H., Bruserud Ø. The Complexity of Targeting PI3K-Akt-mTOR Signalling in Human Acute Myeloid Leukaemia: The Importance of Leukemic Cell Heterogeneity, Neighbouring Mesenchymal Stem Cells and Immunocompetent Cells // *Mol. Basel Switz.* - 2016. - V. 21. - № 11.
169. Alexander A., Cai S.-L., Kim J., и др. ATM signals to TSC2 in the cytoplasm to regulate mTORC1 in response to ROS // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2010. - V. 107. - № 9 . - P. 4153–4158.
170. Hamed Y., Sharifi-Sarasiabi K., Dehghan F., и др. Molecular Epidemiology of *P. vivax* in Iran: High Diversity and Complex Sub-Structure Using Neutral Markers, but No Evidence of Y976F Mutation at *pvm-dr1* // *PloS One*. - 2016. - V. 11. - № 11 . - P. e0166124.
171. Faway E., Musset L., Pelleau S., и др. Plasmodium vivax multidrug resistance-1 gene polymorphism in French Guiana // *Malar. J.* - 2016. - V. 15. - № 1 . - P. 540.
172. Fitch C.D. Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quinoline drugs // *Life Sci.* - 2004. - V. 74. - № 16 . - P. 1957–1972.
173. Pascolo S. Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies // *Eur. J. Pharmacol.* - 2016. - V. 771 . - P. 139–144.
174. AlKadi H.O. Antimalarial drug toxicity: a review // *Chemotherapy*. - 2007. - V. 53. - № 6 . - P. 385–391.

175. White E. Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer // *Nat. Rev. Cancer.* - 2012. - V. 12. - № 6 . - P. 401–410.
176. Rabinowitz J.D., White E. Autophagy and metabolism // *Science.* - 2010. - V. 330. - № 6009 . - P. 1344–1348.
177. Poole B., Ohkuma S. Effect of weak bases on the intralysosomal pH in mouse peritoneal macrophages // *J. Cell Biol.* - 1981. - V. 90. - № 3 . - P. 665–669.
178. Amaravadi R.K., Yu D., Lum J.J., и др. Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma // *J. Clin. Invest.* - 2007. - V. 117. - № 2 . - P. 326–336.
179. Bellmunt J., Maase H. von der, Mead G.M., и др. Randomized phase III study comparing paclitaxel/cisplatin/gemcitabine and gemcitabine/cisplatin in patients with locally advanced or metastatic urothelial cancer without prior systemic therapy: EORTC Intergroup Study 30987 // *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* - 2012. - V. 30. - № 10 . - P. 1107–1113.
180. Galluzzi L., Senovilla L., Vitale I., и др. Molecular mechanisms of cisplatin resistance // *Oncogene.* - 2012. - V. 31. - № 15 . - P. 1869–1883.
181. Drayton R.M., Catto J.W.F. Molecular mechanisms of cisplatin resistance in bladder cancer // *Expert Rev. Anticancer Ther.* - 2012. - V. 12. - № 2 . - P. 271–281.
182. Hsin I.-L., Wang S.-C., Li J.-R., и др. Immunomodulatory proteins FIP-gts and chloroquine induce caspase-independent cell death via autophagy for resensitizing cisplatin-resistant urothelial cancer cells // *Phytomedicine Int. J. Phytother. Phytopharm.* - 2016. - V. 23. - № 13 . - P. 1566–1573.
183. Liberti M.V., Locasale J.W. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? // *Trends Biochem. Sci.* - 2016. - V. 41. - № 3 . - P. 211–218.
184. Wang L., Wang J., Xiong H., и др. Co-targeting hexokinase 2-mediated Warburg effect and ULK1-dependent autophagy suppresses tumor growth of PTEN- and TP53-deficiency-driven castration-resistant prostate cancer // *EBioMedicine.* - 2016. - V. 7 . - P. 50–61.
185. Jarauta V., Jaime P., Gonzalo O., и др. Inhibition of autophagy with chloroquine potentiates carfilzomib-induced apoptosis in myeloma cells in vitro and in vivo // *Cancer Lett.* - 2016. - V. 382. - № 1 . - P. 1–10.
186. Fukuda T., Oda K., Wada-Hiraike O., и др. Autophagy inhibition augments resveratrol-induced apoptosis in Ishikawa endometrial cancer cells // *Oncol. Lett.* - 2016. - V. 12. - № 4 . - P. 2560–2566.
187. Liang X., De Vera M.E., Buchser W.J., и др. Inhibiting systemic autophagy during interleukin 2 immunotherapy promotes long-term tumor regression // *Cancer Res.* - 2012. - V. 72. - № 11 . - P. 2791–2801.
188. Hu Y.-L., DeLay M., Jahangiri A., и др. Hypoxia-induced autophagy promotes tumor cell survival and adaptation to antiangiogenic treatment in glioblastoma // *Cancer Res.* - 2012. - V. 72. - № 7 . - P. 1773–1783.
189. Hagihara N., Walbridge S., Olson A.W., и др. Vascular protection by chloroquine during brain tumor therapy with Tf-CRM107 // *Cancer Res.* - 2000. - V. 60. - № 2 . - P. 230–234.

190. Chi K.-H., Wang Y.-S., Huang Y.-C., и др. Simultaneous activation and inhibition of autophagy sensitizes cancer cells to chemotherapy // *Oncotarget*. - 2016. - V. 7. - № 36. - P. 58075–58088.
191. Ren H., Guo H., Thakur A., и др. Blockade efficacy of MEK/ERK-dependent autophagy enhances PI3K/Akt inhibitor NVP-BKM120's therapeutic effectiveness in lung cancer cells // *Oncotarget*. - 2016. - V. 7. - № 41. - P. 67277–67287.
192. Grasso S., Pereira G.J.S., Palmeira-Dos-Santos C., и др. Autophagy regulates Selumetinib (AZD6244) induced-apoptosis in colorectal cancer cells // *Eur. J. Med. Chem.* - 2016. - V. 122. - P. 611–618.
193. Byun S., Lee E., Lee K.W. Therapeutic Implications of Autophagy Inducers in Immunological Disorders, Infection, and Cancer // *Int. J. Mol. Sci.* - 2017. - V. 18. - № 9.
194. Russo M., Russo G.L. Autophagy inducers in cancer // *Biochem. Pharmacol.* - 2018. - V. 153. - P. 51–61.
195. Li J., Kim S.G., Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects // *Cell Metab.* - 2014. - V. 19. - № 3. - P. 373–379.
196. Коваль О.А., Волкова О.Ю., Горчаков А.А., и др. Рекомбинантный пептид EL1, обладающий цитотоксической активностью по отношению к раковым клеткам человека // . - 2019.
197. Schlegel R.A., Williamson P. Phosphatidylserine, a death knell // *Cell Death Differ.* - 2001. - V. 8. - № 6. - P. 551–563.
198. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death // *Toxicol. Pathol.* - 2007. - V. 35. - № 4. - P. 495–516.
199. Brentnall M., Rodriguez-Menocal L., De Guevara R.L., и др. Caspase-9, caspase-3 and caspase-7 have distinct roles during intrinsic apoptosis // *BMC Cell Biol.* - 2013. - V. 14. - P. 32.
200. Nag S., Qin J., Srivenugopal K.S., и др. The MDM2-p53 pathway revisited // *J. Biomed. Res.* - 2013. - V. 27. - № 4. - P. 254–271.
201. Moll U.M., Petrenko O. The MDM2-p53 interaction // *Mol. Cancer Res. MCR.* - 2003. - V. 1. - № 14. - P. 1001–1008.
202. Chipuk J.E., Moldoveanu T., Llambi F., и др. The BCL-2 family reunion // *Mol. Cell.* - 2010. - V. 37. - № 3. - P. 299–310.
203. Upreti M., Chu R., Galitovskaya E., и др. Key role for Bak activation and Bak-Bax interaction in the apoptotic response to vinblastine // *Mol. Cancer Ther.* - 2008. - V. 7. - № 7. - P. 2224–2232.
204. Guo S., Messmer-Blust A.F., Wu J., и др. Role of A20 in cIAP-2 protection against tumor necrosis factor α (TNF- α)-mediated apoptosis in endothelial cells // *Int. J. Mol. Sci.* - 2014. - V. 15. - № 3. - P. 3816–3833.
205. Koval O.A., Sakaeva G.R., Fomin A.S., и др. Sensitivity of endometrial cancer cells from primary human tumor samples to new potential anticancer peptide lactaptin // *J. Cancer Res. Ther.* - 2015. - V. 11. - № 2. - P. 345–351.

206. Kim S.-W., Ramasamy K., Bouamar H., и др. MicroRNAs miR-125a and miR-125b constitutively activate the NF- κ B pathway by targeting the tumor necrosis factor alpha-induced protein 3 (TNFAIP3, A20) // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 2012. - V. 109. - № 20 . - P. 7865–7870.
207. Verstrepen L., Verhelst K., Loo G. van, и др. Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3) // *Biochem. Pharmacol.* - 2010. - V. 80. - № 12 . - P. 2009–2020.
208. Klionsky D.J., Abeliovich H., Agostinis P., и др. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes // *Autophagy.* - 2008. - V. 4. - № 2 . - P. 151–175.
209. Datta S., Choudhury D., Das A., и др. Autophagy inhibition with chloroquine reverts paclitaxel resistance and attenuates metastatic potential in human nonsmall lung adenocarcinoma A549 cells via ROS mediated modulation of β -catenin pathway // *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death.* - 2019. - V. 24. - № 5–6 . - P. 414–433.
210. Kabeya Y., Mizushima N., Ueno T., и др. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing // *EMBO J.* - 2000. - V. 19. - № 21 . - P. 5720–5728.
211. Klionsky D.J., Codogno P., Cuervo A.M., и др. A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes // *Autophagy.* - 2010. - V. 6. - № 4 . - P. 438–448.
212. Toton E., Lisiak N., Sawicka P., и др. Beclin-1 and its role as a target for anticancer therapy // *J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc.* - 2014. - V. 65. - № 4 . - P. 459–467.
213. Walczak M., Martens S. Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation // *Autophagy.* - 2013. - V. 9. - № 3 . - P. 424–425.
214. Solomon V.R., Lee H. Chloroquine and its analogs: a new promise of an old drug for effective and safe cancer therapies // *Eur. J. Pharmacol.* - 2009. - V. 625. - № 1–3 . - P. 220–233.
215. Chou T.-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies // *Pharmacol. Rev.* - 2006. - V. 58. - № 3 . - P. 621–681.
216. Farkas T., Daugaard M., Jäättelä M. Identification of small molecule inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase and autophagy // *J. Biol. Chem.* - 2011. - V. 286. - № 45 . - P. 38904–38912.
217. Hong R., Ma F., Zhang W., и др. 53BP1 depletion causes PARP inhibitor resistance in ATM-deficient breast cancer cells // *BMC Cancer.* - 2016. - V. 16. - № 1 . - P. 725.
218. Lin C.-S., Wang Y.-C., Huang J.-L., и др. Autophagy and reactive oxygen species modulate cytotoxicity induced by suppression of ATM kinase activity in head and neck cancer cells // *Oral Oncol.* - 2012. - V. 48. - № 11 . - P. 1152–1158.
219. Pickard R.D., Spencer B.H., McFarland A.J., и др. Paradoxical effects of the autophagy inhibitor 3-methyladenine on docetaxel-induced toxicity in PC-3 and LNCaP prostate cancer cells // *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* - 2015. - V. 388. - № 7 . - P. 793–799.
220. Tseng H.-C., Liu W.-S., Tyan Y.-S., и др. Sensitizing effect of 3-methyladenine on radiation-induced cytotoxicity in radio-resistant HepG2 cells in vitro and in tumor xenografts // *Chem. Biol. Interact.* - 2011. - V. 192. - № 3 . - P. 201–208.

221. Liang S., Jin J., Lin B., и др. Rapamycin Induces Autophagy and Reduces the Apoptosis of Podocytes Under a Stimulated Condition of Immunoglobulin A Nephropathy // *Kidney Blood Press. Res.* - 2017. - V. 42. - № 1 . - P. 177–187.
222. Galluzzi L., Morselli E., Kepp O., и др. Evaluation of rapamycin-induced cell death // *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ. - 2012. - V. 821 . - P. 125–169.
223. Repnik U., Stoka V., Turk V., и др. Lysosomes and lysosomal cathepsins in cell death // *Biochim. Biophys. Acta.* - 2012. - V. 1824. - № 1 . - P. 22–33.
224. Chen S., Dong H., Yang S., и др. Cathepsins in digestive cancers // *Oncotarget.* - 2017. - V. 8. - № 25 . - P. 41690–41700.
225. Zhang C., Zhang M., Song S. Cathepsin D enhances breast cancer invasion and metastasis through promoting hepsin ubiquitin-proteasome degradation // *Cancer Lett.* - 2018. - V. 438 . - P. 105–115.
226. Aufschneider A., Kohler V., Büttner S. Taking out the garbage: cathepsin D and calcineurin in neurodegeneration // *Neural Regen. Res.* - 2017. - V. 12. - № 11 . - P. 1776–1779.
227. Araki T., Hayashi M., Saruta T. Anion-exchange blocker enhances cytoplasmic vacuole formation and cell death in serum-deprived mouse kidney epithelial cells in mice // *Cell Biol. Int.* - 2006. - V. 30. - № 1 . - P. 93–100.
228. Chwastek J., Jantas D., Lasoń W. The ATM kinase inhibitor KU-55933 provides neuroprotection against hydrogen peroxide-induced cell damage via a γ H2AX/p-p53/caspase-3-independent mechanism: Inhibition of calpain and cathepsin D // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* - 2017. - V. 87 . - P. 38–53.
229. Thrasher P.R., Scofield S.L.C., Dalal S., и др. Ataxia telangiectasia mutated kinase deficiency impairs the autophagic response early during myocardial infarction // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* - 2018. - V. 315. - № 1 . - P. H48–H57.
230. Circu M., Cardelli J., Barr M.P., и др. Modulating lysosomal function through lysosome membrane permeabilization or autophagy suppression restores sensitivity to cisplatin in refractory non-small-cell lung cancer cells // *PloS One.* - 2017. - V. 12. - № 9 . - P. e0184922.
231. Emadi A., Jones R.J., Brodsky R.A. Cyclophosphamide and cancer: golden anniversary // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* - 2009. - V. 6. - № 11 . - P. 638–647.
232. Kaledin V.I., Nikolin V.P., Galyamova M.R., и др. High apoptosis-inducing and antitumor activities of the products of biological but not chemical cyclophosphamide activation // *Dokl. Biol. Sci. Proc. Acad. Sci. USSR Biol. Sci. Sect.* - 2002. - V. 386 . - P. 426–429.
233. Koval O.A., Fomin A.S., Kaledin V.I., и др. A novel pro-apoptotic effector lactaptin inhibits tumor growth in mice models // *Biochimie.* - 2012. - V. 94. - № 12 . - P. 2467–2474.
234. Koval O.A., Tkachenko A.V., Fomin A.S., и др. Lactaptin induces p53-independent cell death associated with features of apoptosis and autophagy and delays growth of breast cancer cells in mouse xenografts // *PloS One.* - 2014. - V. 9. - № 4 . - P. e93921.
235. Grusby M.J., Mitchell S.C., Nabavi N., и др. Casein expression in cytotoxic T lymphocytes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* - 1990. - V. 87. - № 17 . - P. 6897–6901.