

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Максимчик Полина Валентиновна

Стимуляция гибели опухолевых клеток воздействием на их энергетику

03.01.08 - Биоинженерия

03.01.04 - Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
д.б.н. Гогвадзе Владимир Георгиевич

Москва – 2018

Оглавление

Список сокращений	4
Введение	7
Апробация результатов исследования.....	11
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Гибель клеток и рак – антагонистические процессы	13
1.2. Особенности энергетики опухолевых клеток – зависимость от гликолиза	13
1.3. Вклад гликолиза и окислительного фосфорилирования в энергетику раковых клеток различной этиологии	16
1.4. Метаболизм глутамина и его роль в энергообеспечении клетки.....	17
1.5. АФК в опухолевых клетках.....	22
1.6. Гетерогенность метаболического профиля в разных опухолях	25
1.7. Роль митохондрии в гибели клеток	25
1.8. Два пути индукции апоптоза	28
1.9. Стабилизация митохондриальной мембраны в опухолевых клетках	33
1.10. Энергетика клетки как мишень противоопухолевой терапии.....	37
1.11. Использование митохондрий в качестве мишени для элиминации опухолевых клеток.....	42
1.12. Применение бетулиновой кислоты и ее аналогов в противоопухолевой терапии.....	47
2. Материалы и методы	51
2.1. Материалы	51
2.1.1. Буферные растворы.....	51
2.1.2. Химические реактивы	52
2.1.4. Антитела	53
2.1.5. Среды и растворы для работы с культурами клеток:	54
2.1.6. Наборы реактивов	54
2.1.7. Клеточные линии.....	55
2.1.8. Обработка клеток	55
2.2. Методы.....	55
2.2.1. Культивирование клеток.....	55
2.2.2. Пересадка клеток.....	55
2.2.3. Заморозка.....	56
2.2.4. Обработка индукторами апоптоза.....	56
2.2.5. Подготовка клеточных лизатов для Вестерн-блот анализа	56
2.2.6. Электрофорез белков в полиакриламидном геле по методу Лэммли.....	57
2.2.7. Измерение дыхания клеток на приборе Seahorse XF96.....	58

2.2.8. Фракционирование клеток.....	58
2.2.9. Анализ апоптоза по связыванию Аннексина V/FITC методом проточной цитофлуориметрии	59
2.2.10. Оценка популяции клеток subG1 методом проточной цитофлуориметрии ..	60
2.2.11. Анализ митохондриальных АФК с помощью красителя MitoSoxRed.....	60
2.2.12. Оценка уровня SH групп	61
2.2.13. Конфокальная микроскопия	61
2.2.14. Оценка каспазной активности	62
2.2.15. Измерение уровня АТФ	62
2.2.16. Трансфекция клеток и прижизненные наблюдения клеток.....	63
2.2.17. Статистическая обработка.....	63
3. Результаты	64
3.1. Подавление гликолитического пути и его последствия для апоптоза	64
3.2. Роль депривации глутамина в модуляции ответа клеток на терапевтические средства.....	73
3.3 Удаление глутамина модулирует активность каспазы-8.	77
3.4 Роль АФК в стимуляции апоптоза, индуцированного цисплатином и депривацией глутамина.....	78
3.5. Повышение эффективности бетулиновой кислоты (БК) вследствие ее селективного таргетирования в митохондриях.....	83
3.6. Использование наночастиц для доставки терапевтических средств к митохондриям	91
3.7. Ингибирование Р-гликопротеина стимулирует клеточную гибель в условиях, модулирующих гипоксию.	97
4. Обсуждение результатов	102
5. Заключение	110
6. Выводы.....	112
7. Список литературы	113

Список сокращений

АКТ – серин/треониновая киназа

АМРК-АМФ-активируемая протеинкиназа

АФК - активные формы кислорода

БК – бетулиновая кислота

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

Cis- цисплатин

2-DG – 2-дезоксиглюкоза

СССР- Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone

DCA - дихлорацетат

DISC (Death-Inducing Signaling Complex) – сигнальный комплекс, индуцирующий клеточную гибель

DOX – доксорубицин

DRP1 - Dynamin related protein 1

Еtop- этопозид

FADD (Fas-associated death domain) - домен, ассоциированный с доменом смерти

GAPDH – глицеральдегидфосфатдегидрогеназа

GLS – глутаминаза

GLUT – транспортер глюкозы

GS – гликогенсинтаза

GSK-3 – киназа гликоген синтазы 3

HIF-1 – hypoxia-inducible factor, индуцируемый гипоксией фактор

HK2 – гексокиназа2

HRE - hypoxia response element

IAP - ингибиторы апоптоза

α -KG – альфа-кетоглутарат

LC3 - Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3

LDHA – лактатдегидрогеназа

LIR - LC3-interacting region

LKB1 – серин/треониновая киназа 11

mTOR – механистическая мишень рапамицина (серин/треониновая киназа)

Mdivi-1 - mitochondrial division inhibitor 1

MDM2 - murine double minute, негативный регулятор p53

Mfn 1, 2 - митофузины 1 и 2

MYC - v-Мус вирусный миелоцитоматозис онкогенный гомолог

NAC (N-acetylcysteine) - ацетилцистеин, антиоксидант

NADH - Никотинамид Аденин Динуклеотид в восстановленная форма

PARP – полиАДФ-Рибоза полимеразы 1

TRAIL– лиганд, относящийся к семейству TNF, инициирующий апоптоз

PDH – пируватдегидрогеназа

PDK1 – киназа пируватдегидрогеназы, изоформа 1

PET (positron emission tomography) - позитронная эмиссионная томография

PHD – пролил гидроксилаза

P-gp – P-glycoprotein 1

PI3K - фосфоинозитол-3 киназа

PIK3 – фосфатидилинозитол 3-киназа

PINK1 - PTEN-induced putative kinase 1

PIP – фосфатидилинозитол фосфат

PKM2 – пируваткиназа, мышечного типа 2

Psi NPs - porous silicon nanoparticles

PTEN – фосфатаза и тензин гомолог

RTKs - тирозин-киназные рецепторы

TNF (tumor necrosis factor) - фактор некроза опухолей

TPP⁺ - трифенилфосфоний

VHL – опухолевый супрессор Гиппеля-Линдау

Введение

Одним из важнейших физиологических изменений, ведущих к возникновению опухолей является подавление апоптоза, наиболее изученной формы программируемой гибели клеток, ответственной за удаление из организма потенциально опасных или поврежденных клеток. Соответственно, стимуляция апоптоза с использованием различных методов биоинженерии и биохимии в раковых клетках является перспективной стратегией их элиминирования. Метаболические пути, лежащие в основе апоптоза подавлены в опухолевых клетках, что обусловлено особенностями их метаболизма. Так, обнаруженный Отто Варбургом гликолитический сдвиг, иными словами активация гликолиза даже в присутствии кислорода, приводит к подавлению активности митохондрий, что отражается на митохондриальном пути стимуляции апоптоза. Подавление гликолиза в опухолевых клетках может выступать перспективной мишенью в направлении стимуляции гибели клеток опухоли. С другой стороны, учитывая ключевую роль митохондрий в инициации апоптоза, можно предположить, что специфическое воздействие на эти органеллы с помощью методов биоинженерии, а именно синтеза производных противоопухолевого средства бетулиновой кислоты путем ее конъюгирования с молекулой трифенилфосфония, способное вызвать пермеабиллизацию внешней мембраны митохондрий (ПВММ), а также применение наночастиц для доставки цитотоксического препарата в клетки повысит эффективность терапии. Помимо глюкозы, широкий спектр опухолевых клеток зависит от глутамина, используемого в качестве как субстрата энергетике, так и регулятора окислительно-восстановительного статуса клетки. Регуляция метаболизма глутамина также может сенсibilизировать опухолевые клетки к действию широко применяемых терапевтических препаратов.

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что, воздействуя на энергетике митохондрий, можно значительно повысить эффективность

терапевтических препаратов, однако механизмы регуляции этих процессов не вполне изучены. Ответ на вопрос, в какой степени модуляция энергетики клетки будет способствовать элиминации клеток опухоли, является чрезвычайно важным для выработки эффективного направления противоопухолевой терапии, для поиска которого необходимо задействовать современные направления и возможности биоинженерии. Однако, выбирая стратегию борьбы с онкологическими заболеваниями, следует помнить, что раковые клетки обладают способностью удалять терапевтические препараты из клетки, задействовав белки множественной лекарственной устойчивости. Поэтому применение комплексного воздействия на опухолевые клетки, включающее наряду с традиционно применяемыми препаратами ингибиторы энергетики, стимуляторы окислительного стресса, ингибиторы белков-транспортеров, и изучение молекулярных основ ответа клеток с использованием биоинженерных методов, представляется оптимальным и перспективным. Подробное изучение причин неэффективности современных методов терапии опухолей является важной задачей, так как влияние на механизмы возникновения резистентности может значительно улучшить результаты терапии, а также способствовать поиску новых мишеней в борьбе с раковыми заболеваниями.

Цель исследования

Целью диссертационной работы является выявление роли энергетики опухолевых клеток в устойчивости к терапевтическим средствам, и выработка стратегии элиминации раковых клеток воздействием на механизмы энергообеспечения.

Задачи исследования

1. Выяснить последствия подавления гликолиза в модуляции ответа клеток на терапевтические препараты.

2. Провести оценку вклада глютаминолиза в ответ раковых клеток на терапевтическое воздействие.

3. Оценить преимущества таргетной доставки терапевтических средств к митохондриям с использованием как положительно заряженных ионов трифенилфосфония, так и наночастиц.

4. Выяснить вклад Р-гликопротеина в формирование ответа клеток на терапевтическое воздействие.

Научная новизна

Устойчивость опухолей к терапии часто обусловлена особенностями их метаболизма, поэтому, восстановление метаболических путей, характерных для неопухолевых клеток, может существенно повысить чувствительность раковых клеток к противоопухолевым препаратам. Подавление гликолиза и глютаминолиза вынуждает клетки стимулировать активность митохондрий, что способно запускать митохондриальный путь в индукции апоптоза. Новизна выполненного цикла исследований заключается в получении новых данных о возможностях стимулировать клеточную гибель, воздействуя на энергетику клетки, которые можно использовать для выработки стратегии борьбы со злокачественными образованиями.

В данной работе впервые представлены результаты исследования механизмов клеточной гибели при использовании адресной доставки цитотоксических препаратов с помощью кремниевых наночастиц.

Один из разделов посвящен изучению способов повышения эффективности противоопухолевых препаратов природного происхождения, которые представляют интерес для клиники из-за низкой цитотоксичности данных агентов для здоровых клеток. Данные работы отражают успешные эксперименты по использованию производных бетулиновой кислоты, полученных с помощью ее конъюгирования с катионом трифенилфосфонием.

Выяснение вопроса устойчивости опухолевых клеток к терапии, выявило важную роль Р-гликопротеина в формировании резистентности опухолей к цитотоксическим препаратам, используемым в клинике. Полученные данные указывают на перспективность подавления Р-гликопротеина для повышения эффективности комбинированной терапии.

Научная и практическая значимость работы

При выборе варианта противоопухолевой терапии следует учитывать особенности метаболизма опухолевых клеток в каждом конкретном случае. Результаты работы демонстрируют, что удаление глутамина либо подавление гликолиза в присутствии 2-дезоксиглюкозы изменяет клеточный ответ на терапевтические препараты, что представляет перспективное направление противоопухолевой терапии. Однако, как установлено нами, это следует делать осторожно, поскольку при неверном выборе противоопухолевого препарата последствия могут быть далеки от желаемых. Результаты, полученные в ходе выполнения проекта, позволят приблизиться к выработке стратегии, основанной на комбинированной терапии с использованием известных противоопухолевых цитотоксических агентов и непосредственного воздействия на энергетику опухолевых клеток.

Часть результатов работы посвящена изучению повышения эффективности противоопухолевой терапии с помощью адресной доставки лекарств в кремниевых наночастицах, обладающих низкой токсичностью для организма. Представленные результаты очень важны для будущих исследований по применению кремниевых наночастиц в клинике.

В данной работе были проведены исследования по использованию новых производных цитотоксических агентов, аналогов бетулиновой кислоты, воздействующих на митохондрии, и оценке их эффективности на культурах опухолевых клеток. Установлено, что полученные производные, будучи агентами митохондриальной направленности, обладают более

высокой цитотоксичностью по отношению к раковым клеткам по сравнению с бетулиновой кислотой, вызывая активацию митохондриального пути апоптоза.

Резистентность опухолей часто обусловлена особенностями метаболизма опухолевой клетки, например, возникновением условий гипоксии в опухоли, что ведет к активации транскрипционного фактора HIF1 α , который запускает множество сигнальных процессов, меняющих метаболизм клетки и повышающих ее устойчивость к терапии. В данной работе были проведены исследования роли белков множественной лекарственной резистентности, мишени HIF1 α . Полученные данные указывают на перспективность подавления Р-гликопротеина для повышения эффективности комбинированной терапии.

Данные, полученные в ходе выполнения настоящего исследования, были включены в педагогические программы на факультете фундаментальной медицины МГУ им. М.В. Ломоносова, войдя в курсы лекций: "Токсикология" и "Программируемая гибель клеток в медицине", а также в практический курс для слушателей образовательного центра "Сириус" "Молекулярное программирование клеток человека" (Сочи, 2017).

Апробация результатов исследования

Результаты диссертационного исследования суммированы в 4-х статьях, опубликованных в рецензируемых журналах и были представлены на международных конференциях: в устном докладе и постерной сессии на конференции ECDO (Saint Petersburg, Russia 2018) в устном докладе на конференции "Mitochondria, Apoptosis & Cancer" (MAC'17) (Блед, Словения, 2017), в постерных сессиях на конференции Porous Semiconductors - Science and Technology PSST (Ла Гранд-Мотт, Франция, 2018), 24-й конференции ECDO (Барселона, Испания, 2016), конференции "Mitochondria, Apoptosis & Cancer" (MAC'15) (Франкфурт, Германия, 2015). Результаты работы были

представлены на Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, Россия, 2017). Для выполнения проекта по тематике подавления гликолиза с целью повышения эффективности противоопухолевой терапии был выигран грант в конкурсе проектов 2018 г. фундаментальных научных исследований, выполняемых молодыми учеными (Мой первый грант), (код конкурса: «мол_а», номер: 18-315-00327 мол_а, «Клеточная энергетика – модулятор апоптоза в опухолевых клетках»). Апробация работы была проведена на совместном заседании кафедры биохимии и молекулярной медицины, НИЛ генных и клеточных технологий, НИЛ постгеномных технологий в медицине, НИЛ исследования механизмов апоптоза 5 июля 2018 г., протокол №1/7, а также на заседании научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В.Ломоносова 4 октября 2018 г., протокол №406.

Положения, выносимые на защиту

1. 2-Дезоксиглюкоза (2-ДГ) не только подавляет гликолиз, но и стимулирует стресс эндоплазматического ретикулума, способного приводить как к апоптозу, так и к аутофагии. Стимуляция аутофагии снижает токсический эффект противоопухолевого препарата.
2. Удаление из среды глутамин усиливает чувствительность клеток к индукции апоптоза цисплатином, но снижает гибель, индуцированную этопозидом.
3. Использование кремниевых наночастиц в качестве «транспортного средства» повышает эффективность цитотоксического эффекта противоопухолевого агента доксорубина.
4. Таргетирование к митохондриям стимула апоптоза, бетулиновой кислоты, позволяет существенно снизить дозы препарата, сохраняя тем самым здоровые клетки и снижая побочные эффекты терапии.
5. Подавление Р-гликопротеина снижает резистентность опухолевых клеток к индукции апоптоза, что повышает эффективность терапии.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Гибель клеток и рак – антагонистические процессы

Поддержание тканевого гомеостаза определяется тремя фундаментальными процессами клеточной биологии: пролиферацией, дифференциацией и программируемой гибелью клеток (ПГК). Нарушение координации этих процессов ведет к самым разнообразным заболеваниям. В частности, неконтролируемая стимуляция клеточной гибели может вызывать нейродегенеративные заболевания, такие как болезни Паркинсона, Альцгеймера и др. В то же время, подавление механизмов клеточной гибели может привести к развитию онкологических заболеваний. На сегодняшний день описано несколько форм ПГК – апоптоз, некроптоз, аутофагия, ферроптоз и др. Одна из наиболее изученных форм, апоптоз, представляет собой антагонистический процесс формированию злокачественных новообразований. Подавление механизмов апоптоза приводит к неспособности избавляться от потенциально опасных для организма клеток и обуславливает устойчивость опухолей к терапии, тогда как стимуляция апоптоза лежит в основе, как спонтанной регрессии опухолей, так и успешной их элиминации в процессе лечения.

1.2. Особенности энергетики опухолевых клеток – зависимость от гликолиза

Опухолевые клетки характеризуются рядом особенностей, отличающих их от нормальных клеток здорового организма. В статье 2000 года Hanahan and Weinberg определили шесть характерных физиологических изменений ведущих к образованию и развитию опухоли [1]. В их числе подавление апоптоза, игнорирование сигналов подавления роста, гиперактивация сигнальных механизмов пролиферации, индукция ангиогенеза, непрерывность репликации, активация процессов инвазии и метастазирования. В связи с выявлением новых, ранее неописанных форм гибели и установлением их роли в процессе канцерогенеза, авторы, спустя

десять лет в новой статье заменили термин "апоптоз" на "гибель клеток". Далее к описанным ранее шести особенностям злокачественных образований были добавлены еще четыре признака. К ним относятся: изменения клеточной энергетики, механизмы избегания иммунного надзора, нестабильность генома и мутации и опухоль-ассоциированное воспаление [2]. Изменение биоэнергетической составляющей метаболизма характеризуется повышением потребления глюкозы, стимуляцией гликолитического каскада и увеличением продукции лактата на фоне ослабления или отсутствия окислительного фосфорилирования (ОФ) даже в условиях физиологических концентраций кислорода [2–4]. Данный эффект носит название имени исследователя Отто Варбурга (эффект Варбурга), впервые описавшего данную особенность опухолевых клеток еще в 1956г. [5]. При изучении механизма упомянутого биоэнергетического фенотипа клеток Отто Варбургом была предложена гипотеза о нарушениях функционирования митохондрий в активно растущих опухолевых клетках как первопрочине опухолеобразования. Однако согласно современным исследованиям, митохондрии опухолевых клеток зачастую остаются неповрежденными, а низкий вклад органелл в энергетическую определяется снижением активности метаболических сигнальных путей, регулирующих митохондриальные процессы в клетке. В последующих работах было продемонстрировано, что вклад гликолиза в энергетическое обеспечение клетки варьирует в зависимости от этиологии злокачественного образования, и в некоторых видах раковых клеток в качестве источника АТФ преобладает ОФ, а не анаэробный путь распада глюкозы [4,6,7]. Конечно, возможны случаи подавления митохондриальной активности по причине повреждений в самих органеллах. Так, в клетках опухолей различной этиологии наблюдают уменьшение количества митохондриальной ДНК, подавление уровня транскрипции митохондриального генома или накопление геномных мутаций и делеций [8].

Согласно данным исследований энергетики опухолей вариабельность метаболического профиля встречается не только в клетках злокачественных образований разной этиологии, но также в пределах одного типа опухолей в зависимости от доступности субстратов, преимущественно используемых в различных физиологических условиях. Независимо от того, основана ли биоэнергетика опухолевой клетки на гликолизе или ОФ, в большинстве случаев раковые клетки поглощают значительно больше глюкозы, нежели клетки нормальных тканей. На этом основан метод диагностики злокачественных образований с помощью позитронно-эмиссионной томографии с использованием меченого радиоактивной меткой аналога глюкозы - 2-(18F)-флуоро-2-деокси-D-глюкозы [9].

Учитывая значительное повышение уровня гликолиза в энергетике большинства опухолей, подавление гликолитических путей представляет собой перспективное направление противораковой терапии. Так, еще Отто Варбургом была предложена идея, согласно которой облучение опухолевых клеток умеренными дозами ионизирующей радиации вызывало бы подавление функционирования митохондрий ниже порогового значения, необходимого для нормальной их жизнедеятельности. Для здоровых клеток критический порог не был бы преодолен вследствие изначально нормальной активности органелл [10].

Следует учесть, что производство АТФ является лишь одной из функций митохондрий. Так, митохондрии участвуют в регуляции гомеостаза кальция, отвечают за окислительно-восстановительный баланс клетки, продукцию активных форм кислорода (АФК) и, что очень важно, играют одну из ключевых ролей в реализации ПГК. В частности, такие события как, ПВММ и выход белков из межмембранного пространства митохондрий в цитозоль, являются точкой невозврата одной из форм ПГК – апоптоза. Учитывая центральную роль митохондрий в манифестации клеточной

гибели, данные органеллы выступают перспективной мишенью в терапии опухолей [11].

1.3. Вклад гликолиза и окислительного фосфорилирования в энергетику раковых клеток различной этиологии

Быстро пролиферирующие клетки опухоли легко оказываются в гипоксическом окружении, поскольку система кровеносных сосудов не способна адекватно снабжать такие клетки кислородом. Данные условия стимулируют в клетках усиление гликолитического пути снабжения АТФ. Тем не менее, как отмечалось выше, некоторые типы опухолей остаются в определенной степени зависимыми от ОФ. Так, было продемонстрировано, что в нормоксических условиях в клетках HeLa вклад ОФ в продукцию АТФ составляет 79%, тогда как в условиях гипоксии этот показатель снижается до 30% [12]. В качестве субстратов ОФ в основном используются пируват, глютамин, глицин, аланин, пролин и глютамат, а в качестве альтернативных источников могут использоваться жирные кислоты, кетоновые тела, короткоцепочные карбоновые кислоты, пропионат, ацетат и бутират [13,14].

Интенсивное функционирование митохондрий свидетельствует о наличии в опухолях активно функционирующих митохондриальных белков-ферментов (малик-фермент, глютаминаза и транспортер глютамина). Более того, активность малик-фермента в некоторых опухолях в 10-20 раз выше, чем в нормальных тканях [15]. Роль малик-фермента в опухолевых клетках до конца не определена, однако предполагается, что он необходим для удаления избытка малата в результате его превращения в пируват для последующего ОФ [16].

Как уже было сказано, недостаточная васкуляризация опухолей приводит не только к снижению уровня кислорода, но и питательных элементов в микроокружении. В клетках HeLa депривация глюкозы или ингибирование гликолиза йодацетатом приводили к переключению метаболизма на утилизацию глютамина, сопровождаемое резким снижением

продукции лактата [17]. Это демонстрирует способность опухолевых клеток к использованию альтернативных путей продукции энергии, таких как глютаминолиз, с целью приспособления клеток к лимитированию уровня глюкозы.

Исследования метаболизма опухолей демонстрируют, что количество глюкозы, поглощаемое опухолевыми клетками, значительно превышает энергетические затраты клетки. Вклад гликолитического АТФ целиком зависит от микроокружения клетки и варьирует в широких пределах (0.31%–64%) в зависимости от типа клеток/ткани и экспериментальных условий [18]. Большая часть потребляемой глюкозы расходуется на пополнение запаса липидов, для работы пентозофосфатного цикла и продукции рибозы, необходимой для синтеза нуклеотидов и сахаров, требуемых быстро пролиферирующими клетками. Исходя из этого, можно полагать, что основной функцией усиленного гликолиза в пролиферирующих клетках может быть поддержание уровня интермедиатов, необходимых для поддержания интенсивной клеточной пролиферации [19]. Следует подчеркнуть, что нет оснований применять данные механизмы регуляции метаболизма ко всем опухолям, т.к. для каждой характерны собственные комбинации регуляторных механизмов и различные степени усиления гликолиза или альтернативных энергетических путей.

1.4. Метаболизм глутамина и его роль в энергообеспечении клетки

На важную роль метаболизма глутамина в животных клетках указал еще Hans Krebs в 1935г, однако исследования нарушения регуляции глютаминолиза в развитии опухолей развивались довольно медленно [20]. Существует девять незаменимых аминокислот, которые не синтезируются в организме человека – изолейцин, лейцин, метионин, валин, фенилаланин, тирозин, гистидин, треонин и лизин. Пять заменимых аминокислот, аланин, аспартат, аспарагин, глутамат и серин, синтезируются в организме. Глутамин является условно незаменимой аминокислотой, а именно в

условиях катаболического стресса в послеоперационный период, в результате различных повреждений, в ответ на сепсис, когда потребление глутамина почками, желудочно-кишечным трактом и иммунной системой значительно повышается [21], синтез глутамина усиливается. Стимуляция метаболизма глутамина чрезвычайно важна для синтеза нуклеотидов и незаменимых аминокислот, и поддержания окислительно-восстановительного баланса клетки. Для ряда опухолей депривация глутамина ведет к клеточной гибели [22]. Глутамин является источником углерода и азота необходимых для поддержания биосинтеза, энергетики и клеточного гомеостаза здоровых и опухолевых клеток. Транспортёрами глутамина служат белки семейств SLC1, SLC6, SLC38 [23]. Среди них большое внимание уделяется SLC1A5 (ASCT2), который является мишенью онкогена *MYC*. Этот онкоген играет важную роль в опухолевой трансформации. Он способен усиливать снабжение клетки глутамином посредством стимуляции экспрессии транспортёров глутамина SLC5A1 и SLC7A1 (также известного как CAT1) [24]. Кроме того, *MYC* опосредованно стимулирует экспрессию глутаминазы-1, фермента первой реакции глутаминолиза, путем подавления ингибирующих ее экспрессию *microRNA-23A* и *microRNA-23B* [24],[25]. Экспрессия SLC1A5 повышена во многих опухолях. Для подавления доставки глутамина и ингибирования глутамин-зависимой активации mTOR используют агент L-γ-глутамил-p-нитроанилид [26]. Глутамин может удаляться из клетки различными антипортёрами в обмен на другие аминокислоты, например, транспортёром LAT1 в обмен на лейцин или транспортёром xCT в обмен на цистин [26,27].

В клетке митохондриальные глутаминазы превращают глутамин в глутамат и аммоний. Существуют две формы глутаминазы, GLS1 – почечная и GLS2 – печеночного типа. Основной путь поступления глутамата, образующегося из глутамина, в цикл Кребса опосредован реакциями дезаминирования. Глутамат превращается в α-кетоглутарат,

который в качестве субстрата цикла Кребса участвует в энергообеспечении клетки. Образование α -кетоглутарата происходит при участии фермента – глутамат дегидрогеназы. Глутамат дегидрогеназа кодируется генами *GLUD* (*GLUD1* - наиболее часто встречающаяся форма) [28]. Дезаминирование с участием *GLUD* является обратимым, однако в опухолях основной баланс реакции сдвинут в основном в направлении образования продукта α -кетоглутарата. *GLUD* регулируется различными пост-трансляционными и аллостерическими механизмами. Так, mTOR и лейцин аллостерически активируют *GLUD* через механизм подавления экспрессии SIRT4 [29,30]. АДФ активирует, а ГТФ, пальмитоил-КоА и SIRT-4-зависимое АДФ-рибозилирование инактивируют *GLUD*. Белок SIRT4 является НАД-зависимым ферментом, локализуется в митохондриях и закодирован генами семейства sirtuin, которые играют важную роль в регуляции метаболизма клеток. SIRT4 подавляет активность *GLUD* через механизм АДФ-рибозилирования. mTORC1 в свою очередь ингибирует SIRT4 через механизм протеасомной деградации CREB2 (cAMP response element binding-2). Уровень экспрессии SIRT4 снижен в различных опухолях [31].

Активация метаболизма глутамина имеет место и в условиях низкого содержания кислорода. В условиях гипоксии стабилизация транскрипционных факторов HIF1 α и HIF2 α ведет к усилению гликолиза. Энергетический субстрат глюкоза преимущественно превращается в лактат и меньше идет в цикл Кребса. В результате возникает компенсаторный механизм для поддержания активности цикла трикарбоновых кислот и митохондрий – имеет место усиление анаэробных реакций, в том числе усиление глутаминолиза и образование α -кетоглутарата [32]. К стабилизации HIF α также ведут мутации в *VHL* (Hippel-Lindau tumour suppressor), усиление трансляции через сигнальный путь mTOR и повышение концентрации глутамина, независимо от гипоксии [33,34]

Поскольку в ряде опухолей обнаруживают зависимость от глутамина, подавление его метаболизма можно было бы рассматривать как перспективную терапевтическую стратегию. Однако большинство агентов, мишенью которых выступает метаболизм глутамина, не подходят для применения в медицине, в связи с высокой токсичностью, или до сих пор проходят доклинические исследования. Тем не менее, исследования применения нескольких аллостерических ингибиторов GLS дали обнадеживающие результаты. Например, препарат BPTES (Bis-2-(5-phenylacetamido-1,3,4-thiadiazol-2-yl) ethyl sulfide) в доклинических исследованиях подавлял рост опухолевых клеток *in vitro* и на модели ксенографта *in vivo*, увеличивал продолжительность жизни мышей с генетически-индуцированными опухолями [32,35]. Препарат СВ-839 данной серии уже проходит клинические испытания. В доклинических исследованиях СВ-839 был эффективен против рака молочной железы с тройным негативным фенотипом и гематологических опухолей [36,37]. Опухоли, в которых преимущественно повышена активность GLS2, не отвечают на СВ-839 и BPTES. Таким образом, необходимо расширять спектр исследований природы резистентности глутамин-зависимых опухолей и искать новые пути борьбы с ними [38,39]. Так, перспективным считается использование в качестве мишени фермента пируват карбоксилазу. Фермент превращает пируват в оксалоацетат, что позволяет клеткам не зависеть от глутаминазы, и, как следствие, формирует резистентность опухолей к упомянутым агентам [40–42].

Ингибирование метаболизма глутамина рассматривают и в контексте комбинированной противоопухолевой терапии. В терапии применяют термин синтетическая летальность, когда сочетание определенных агентов, которые в применении по отдельности не дают результатов, в комбинировании значительно потенцируют эффективность лечения. Учитывая плеiotропную роль метаболизма глутамина в клетке, такие как продукция АТФ,

макромолекулярный синтез, активация mTOR и регуляция уровня АФК посредством поддержания необходимого уровня антиоксиданта глутатиона, использование его в качестве мишени представляет особенно перспективное направление [43,44]. Так, показало эффективность сочетание подавления экспрессии белков семейства Bcl-2, АКТ и MYC с ингибированием глутаминазы с помощью ВРТЕS. Эффективность терапии повышалась при комбинировании ингибитора глутаминазы СВ-839 с ингибитором белка Bcl-2, например АВТ-199 [45], комбинирование удаления глутамина из среды с активацией сигнального пути инсулиновых рецепторов с применением ретиноидов [46]. Проводятся исследования роли глутамина в энергетике метастазирующих опухолей, в результате чего было показано на клетках карциномы яичников и простаты, что мигрирующие клетки с усиленными механизмами инвазии намного более чувствительны к подавлению метаболизма глутамина [47]. В экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что подавление экспрессии глутаминазы препятствовало эпителиально-мезенхимальному переходу, ключевому событию в инвазии и метастазировании [48]. Ингибитор трансаминазы аминоксиуксусная кислота (АОК) представляет собой перспективный агент для применения в клинике. Так, АОК показала значительный цитотоксический эффект на клетках MYC-амплифицированной глиобластомы, однако не оказывала влияния на пролиферацию MYC-дефицитных клеток [48]. Для снижения уровня глутамина альтернативно можно использовать фенилбутират, который был допущен FDA для применения в лечении гипераммониемии у пациентов с острой печеночной недостаточностью или врожденными нарушениями цикла обмена мочевины. В крови фенилбутират разрушается с образованием фенилацетата, который взаимодействует с глутамином в реакции катализируемой ферментом фенилацетил Коэнзим А-глутамин ацетил трансферазой с образованием фенилацетилглутамина, который выводится из организма с мочой [49,50].

1.5. АФК в опухолевых клетках

Во многих опухолях различной этиологии отмечено повышение уровня АФК. АФК играют важную роль как для нормального функционирования клеток, так и в различных патологиях. В норме физиологический уровень АФК поддерживается на достаточно низком уровне. При этом АФК, в частности, H_2O_2 , участвуют в сигнальных путях, регулирующих клеточную пролиферацию и адаптацию клеток к метаболическому стрессу [51]. Так, АФК активируют сигнальные пути, зависящие от PI3K и MAPK/ERK, также транскрипционные факторы NF и NF-κB, играющие роль в инициации процесса онкогенеза [52–54].

Патологическое повышение уровня АФК ведет к инициации окислительного стресса, что вызывает повреждение важнейших макромолекул – ДНК, белков и липидов. Такие АФК как H_2O_2 обладают невысокой реактивностью по отношению к ДНК; основная доля повреждений при индукции окислительного стресса происходит из-за гидроксильных ионов $OH\cdot$ [54], образующихся в процессе распада перекиси водорода. $OH\cdot$ крайне активны в повреждении ДНК вследствие их высокой диффузионной способности, что вызывает окисление нуклеотидов ДНК, образование одно- и двухцепочечных разрывов в нитях ДНК [54]. При формировании ДНК-аддуктов активируются системы репарации оснований ДНК (BER - base excision repair) и NER (nuclear excision repair) [55]. При повышении уровня АФК выше нормальных физиологических показателей, когда клетка не справляется с окислительным стрессом и неспособна репарировать повреждения ДНК, активируются сигнальные пути JNK (c-Jun N-terminal kinase) и p38 MAPK, ведущие к инициации клеточной гибели. Однако возможна ситуация, когда не включается программа гибели, что ведет к инициации опухолевой трансформации [55,56].

Для защиты от окислительного стресса в опухолях активно функционируют системы удаления АФК. В данном процессе участвуют

молекулы-антиоксиданты (глутатион, флавоноиды, витамины А, С и Е), а также специфические ферменты антиоксидантной системы (например, супероксиддисмутаза, каталаза и др.) [56–58]. Источниками одного из главных восстановительных эквивалентов НАДФН служат пентозофосфатный путь, работа малик-фермента, изоцитратдегидрогеназа 1 и метаболизм одноуглеродных фрагментов. Среди механизмов усиления функционирования антиоксидантной системы необходимо упомянуть активацию транскрипционного фактора NRF2 (nuclear erythroid-derived 2 – related factor-2). Механизм активации NRF2 – диссоциация комплекса KEAP1-NRF2 с освобождением от KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1). При активации NRF2 индуцирует белки антиоксидантной системы – GPXs (глутатионпероксидаза) и TXN (тиоредоксин) и белки, вовлеченные в синтез глутатиона и импорт цистеина через цистеин-глутаматный антипортер. Также NRF2 регулирует активность ферментов синтеза NADPH и биосинтез серина. Таким образом, ингибирование NRF2 и подавление системы антиоксидантов приведёт к токсической концентрации АФК и гибели опухолевых клеток [59–61].

Различные сигнальные пути, активируемые АФК, и усиленное митохондриальное дыхание также необходимы для метастазирования опухолей [61,62]. Однако, когда опухолевые клетки открепляются от матрикса и резко повышается уровень АФК, который может привести к повреждениям клетки, необходима высокая активность антиоксидантной системы и усиление работы НАДФН-продуцирующих систем для осуществления миграции метастазирующих клеток [61,63]. Поэтому ингибирование функционирования антиоксидантной системы приведет к подавлению развития метастазов опухолей. Нарушение баланса окислительно-восстановительной системы также является перспективной мишенью воздействия на опухоли. Стимуляция окислительного стресса, либо подавление функционирования антиоксидантной системы будет

способствовать патологическому росту содержания АФК и гибели раковых клеток [64]. Следует отметить, что целый ряд противоопухолевых препаратов обладают способностью стимулировать окислительный стресс. Среди способов повышения уровня АФК и снижения уровня НАДФН рассматривают применение высоких доз витамина С. Витамин С поступает в клетку через натрий-зависимый транспортер витамина С, тогда как его окисленная форма дегидроаскорбат (ДНА) использует GLUT1 (транспортер глюкозы). Так как в крови витамин С окисляется, ДНА является основной формой, поступающей в клетку. В цитоплазме ДНА восстанавливается обратно до витамина С с окислением глутатиона GSH до GSSG НАДФН-зависимой глутатион-редуктазой, таким образом расходуется пул доступного НАДФН и снижается антиоксидантная емкость клетки, которая в итоге не справляется с окислительным стрессом и погибает. Применение витамина С эффективно в терапии колоректального рака с мутацией *KRAS* и высоким уровнем экспрессии GLUT1 [61,65]. На небольшой выборке пациентов витамин С в высокой дозировке в монотерапии и в комбинации с паклитакселом и карбоплатином не приводил к токсичным побочным эффектам [66]. Среди агентов, вызывающих снижение пула глутатиона и инициации окислительного стресса, в доклинических исследованиях проверяют эффективность ингибитора γ -глутамилцистеин синтетазы – бутионина-сульфоксимины. Учитывая строение глутатиона, молекула которого состоит из цистеина, глутамата и глицина, можно воздействовать на широкий спектр метаболических путей, задействованных в синтезе всех составляющих молекулы (использование ингибиторов глутаминазы, подавление поглощения клетками предшественника цистеина – цистина), и модулировать активность антиоксидантной системы с целью индукции окислительного стресса в опухолевых клетках.

1.6. Гетерогенность метаболического профиля в разных опухолях

Как отмечалось ранее, такие субстраты, как глюкоза и глютамин преимущественно используются быстро растущими опухолевыми клетками. Однако остается открытым вопрос, какой из этих двух (или других) окисляемых субстратов главным образом используется в усиленной клеточной пролиферации. В ряде случаев в гликолитических опухолях одновременно происходит и окисление глютамина [66]. Некоторые опухолевые клетки, такие как клетки HeLa, могут приспосабливать свой метаболизм в соответствии с доступностью внешних источников углерода: так, в отсутствие глюкозы в среде клетки HeLa активируют синтез *de novo* митохондриальной ДНК, что ведет к синтезу комплексов дыхательной цепи и фермента цитрат синтазы и усилению активности ОФ [67]. Клетки HeLa используют для продукции АТФ аэробное окисление как глюкозы, так и глютамина, что указывает на использование ими и гликолиза, и ОФ [7].

Можно заключить, что изменения характера энергетического снабжения клетки наблюдается на протяжении развития опухоли. Метаболомные исследования, проводимые *in vivo* позволяют высказать предположение о существовании постоянного биоэнергетического ремоделирования в опухолевых клетках соответственно размеру и темпу роста опухоли [68]. В поиске противоопухолевых препаратов следует учитывать механизмы снабжения АТФ опухолевых клеток в каждом конкретном случае.

1.7. Роль митохондрий в гибели клеток

В опухолях могут инициироваться разнообразные формы гибели клеток для их элиминации: апоптоз, некроз, аутофагия и др. Апоптоз является эволюционно консервативным и генетически регулируемым процессом, играющим важную роль в эмбриональном развитии и поддержании тканевого гомеостаза во взрослом организме [69]. Апоптоз может быть вовлечен как в спонтанное устранение потенциально

злокачественных клеток, так и в вызванную терапевтическими воздействиями регрессию опухоли. Соответственно, дефекты в программе апоптотической гибели могут способствовать развитию опухоли и резистентности к терапии. Апоптотическая клеточная смерть характеризуется рядом морфологических и биохимических особенностей, включая ПВММ, высвобождение из межмембранного пространства и транслокацию в цитозоль про-апоптотических белков [70].

Долгое время некроз считался формой нерегулируемой клеточной гибели. В отличие от апоптоза, для некроза характерно набухание клеток и органелл, разрушение плазматической мембраны, переваривание хроматина и гидролиз ДНК и, наконец, лизис клетки. Характерной особенностью некроза является существенное снижение уровня АТФ из-за митохондриального коллапса и, как следствие этого, нарушение внутриклеточного гомеостаза Ca^{2+} . Однако, недавние данные свидетельствуют о том, что в некоторых случаях некроз может быть регулируемым. Существует много примеров некроза, происходящего во время эмбриогенеза, восстановления ткани и, как составляющей, иммунного ответа. И некроз, и апоптоз могут быть вызваны как внутренними, так и внешними стимулами (например, цитокинами, ишемией с последующей реперфузией, облучением, разного рода патогенами) в одной и той же популяции клеток. Более того, оба процесса могут включать активацию сходных сигнальных путей, таких как рецепторы смерти, киназные каскады и пермеабиллизацию митохондрий и/или лизосом. Модуляция этих путей может вызвать переключение между апоптозом и некрозом [71]. Апоптоз и некроз часто могут инициироваться одним и тем же стимулом, хотя разные формы гибели требуют различные дозы либо интенсивности воздействия. В некоторых случаях антиапоптотические механизмы, включающие белки Bcl-2/Bcl-XL или белки теплового шока, эффективны при защите от обеих форм клеточной гибели. Одной из форм программируемого некроза (некроптоза)

является независимая от каспаз ПГК с некротической морфологией [72], которая, как было показано, зависит от АФК [73], необходимых для терапии опухолей, устойчивых к апоптозу [74].

Аутофагия - это регулируемый лизосомальный путь, вовлеченный в деградацию и рециркуляцию долгоживущих белков и органелл в клетках. Хотя механизмы клеточной гибели, вызываемой аутофагией, остаются неясными, все больше литературных данных свидетельствуют о вовлечении митохондрий в этот процесс [75]. Аутофагия может быть высокоэффективным индуктором клеточной гибели, вызванной облучением в клетках с подавленным апоптозом [76]. Роль аутофагии в прогрессировании опухоли и/или ее элиминации, однако, все еще неясна. Аутофагия может привести как к выживанию, так и к гибели клеток [77]. В раковых клетках с дефектами в программе апоптоза, аутофагия позволяет продлевать выживание, препятствует некрозу опухоли и воспалению, а также снизить повреждение генома в ответ на метаболический стресс [78]. С другой стороны, дефекты в аутофагии связаны со стимуляцией канцерогенеза [79], хотя механизм, лежащий в основе этого эффекта, еще не полностью определен. Несмотря на разногласия относительно роли аутофагии в канцерогенезе, этот способ клеточной смерти можно рассматривать как дополнительный (резервный) механизм элиминации клеток, когда другие механизмы не работают. Действительно, на модели рака легких было показано, что ингибирование каспаз, способно стимулировать аутофагию и усиливать эффект лучевой терапии [80]. Кроме того, эмбриональные фибробласты мышей с двойным нокаутом Вах/Вак, устойчивые к апоптозу, претерпевают неапоптотическую гибель с образованием аутофагосом/аутолизосом, при обработке этопозидом или стауроспорином [81].

Различные нарушения активности митохондрий, такие как высвобождение апоптогенных белков из межмембранного пространства,

потеря потенциала на митохондриальной мембране, стимуляция продукции ROS, ингибирование митохондриальных дыхательных комплексов и подавление синтеза АТФ вовлечены и, возможно, ответственны за различные проявления гибели клеток [82]. Таким образом, дестабилизация митохондрий может быть перспективным шагом в стимулировании гибели опухолевых клеток.

1.8. Два пути индукции апоптоза

Как отмечалось, помимо репрограммирования энергетики, важным характерным признаком злокачественных новообразований служит подавление процессов клеточной гибели, что ведет к накоплению потенциально опасных клеток, способных стимулировать развитие опухолей. В этом плане, стимуляция клеточной гибели может служить перспективной стратегией элиминации опухолевых клеток.

Существует несколько сигнальных путей, инициирующих апоптоз. Внешний (рецепторный) путь реализуется с участием мембранных рецепторных белков, цитоплазматическая часть которых представлена доменом смерти (death domain), содержащим около 80 аминокислотных остатков. Эти молекулы относят к семейству рецепторов TNF α . Известно 6 таких рецепторов: Fas-рецептор (APO-1/CD95/DR2), TNF-R1 (p55/CD120a/DR1), DR3, DR4, DR5, DR6. Все лиганды организованы в виде тримеров (Fas-лиганды), их взаимодействие с рецепторами приводит к тримеризации последних, что запускает сигнальный каскад. При этом домены смерти приобретают способность взаимодействовать с аналогичными доменами адапторных белков FADD (Fas-associated death domain), TRADD (TNF-receptor death domain) и RIP (receptor-interacting protein). FADD распознает домены смерти в составе прокаспазы-8 и, взаимодействуя с ними, вызывает активацию каспазы-8, одного из белков семейства каспаз – ключевых ферментов апоптоза. TRADD взаимодействует с внутриклеточным доменом TNF-R1 при связывании рецептора с лигандом

TNF α . TRADD необходим для рекрутирования TRAF2 (TNFR-associated factor 2) и RIP, без которых невозможна активация сигнального пути NF κ B и поддержания клеточного выживания. Формирующиеся в результате указанных взаимодействий молекулярные комплексы получили название DISC (Death-inducing signaling complex).

Помимо внешнего, существует так называемый внутренний или митохондриальный путь апоптоза. Пусковым событием внутреннего пути апоптоза служит выход цитохрома *c* и других белков, в частности, апоптоз-индуцирующего фактора (apoptosis-inducing factor, AIF), из межмембранного пространства митохондрий вследствие ПВММ.

Ведущую роль в ПВММ играет семейство белков Bcl-2. Первое упоминание о том, что гены и белки, задействованные в онкогенезе, могут участвовать в негативной регуляции клеточной гибели, было приведено в исследованиях, показывающих повышенную экспрессию белка Bcl-2 в результате хромосомной транслокации при В-клеточной лимфоме [83]. Семейство Bcl-2 (и ассоциированных с ним белков) содержащих как минимум один из четырех консервативных доменов Bcl-2 гомологии – BH1-BH4 - включает более 30 представителей. Они могут быть подразделены на три класса: 1) про-апоптотические белки «активаторы» (Bax, Bak и менее изученный Bok), которые в олигомерной форме формируют пору во внешней митохондриальной мембране, что ведет к выходу цитохрома *c* и активации каспаз; 2) антиапоптотические белки (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-W, Mcl-1, A1/BFL1 и Bcl-B), которые связывают про-апоптотические белки (в домене BH3), предотвращая их олигомеризацию и апоптоз; 3) белки, содержащие только один 26-аминокислотный домен BH3 (Bad, Bik, Hrk, Bid, Bim, Bmf, Noxa и Puma). Именно семейство «BH3-только» белков выполняет регуляторную роль, вытесняя антиапоптотические белки из комплекса с про-апоптотическими, что позволяет последним формировать пору. Селективность связывания и сродство антиапоптотических белков к про-

апоптотическим определяется гидрофобными и электростатическими взаимодействиями между доменом ВНЗ про-апоптотического белка и связывающей бороздкой, формируемой ВН1, ВН2 и ВН3 доменами, в структуре антиапоптотического партнера [84,85]. Все анти-апоптотические белки связывают Вах, тогда как Вак может связывать только Вc1-X_L и Мс1-1. Ноха связывается исключительно с Мс1-1 и А1, Ваd связывается только с Вc1-2, Вc1-X_L и Вc1-W, но не с Мс1-1 или А1, тогда как Vim, Puma и, возможно, tBid (truncated Bid, продукт расщепления белка Bid) могут связываться со всеми пятью антиапоптотическими белками. Из этого очевидно, что повышение экспрессии Vim или Puma приведет к активации гибели клетки, тогда как в случае Ваd и Ноха стимуляция апоптоза будет иметь место при одновременной экспрессии обоих белков [86].

Таким образом, баланс между про- и антиапоптотическими белками на внешней митохондриальной мембране критичен для инициации апоптоза, и диспропорция между этими белками в сторону увеличения анти-апоптотических факторов, является причиной подавления митохондриального пути апоптоза [87,88]. Действительно, для ряда опухолей показано повышенное содержание антиапоптотических белков и низкий уровень про-апоптотических. Одной из стратегий борьбы с раковыми клетками может служить устранение этого дисбаланса в пользу про-апоптотических белков, что приведет к стимуляции апоптоза [89].

После ПВММ цитохром *c* в цитозоле связывается с цитозольным белком АРАФ-1 (apoptotic protease activating factor-1), что в присутствии dАТФ либо АТФ вызывает конформационные изменения в белке. В результате АРАФ-1 соединяется с прокаспазой-9 и олигомеризуется с формированием гептамерной структуры – апоптосомы. Апоптосома служит платформой для прокаспазы-9, для активации которой необходима димеризация. Каспаза-9 расщепляет и активирует каспазы-3 и -7, которые отвечают за протеолиз многих белков клетки, часто используемых в качестве

маркеров при оценке апоптоза, к примеру поли(АДР-рибоза) полимераза [90]. Нарушения в любом из вышеупомянутых механизмов выражаются в неспособности организма выявлять и уничтожать нежелательные, потенциально опасные клетки, способные приводить к развитию опухолей, а также обуславливают устойчивость раковых клеток к терапии.

Внутренний и внешний пути инициации апоптоза могут пересекаться. Так, рецепторный механизм приводит к активации каспазы-8, одной из мишеней которой является цитоплазматический про-апоптотический белок Bid. Фрагмент белка Bid, tBid, способен вызывать олигомеризацию и встраивание другого про-апоптотического белка Bax и/или Bak во внешнюю митохондриальную мембрану, образуя поры, через которые происходит выход белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму.

Помимо цитохрома *c* и AIF при ПБММ выходят белки SMAC/DIABLO (second mitochondrial activator of apoptosis/direct IAP binding protein with low pI) и Omi/HtrA2, которые ингибируют антиапоптотические белки семейства IAPs, тем самым способствуя активации каспаз. Так, SMAC/DIABLO, в который входит IAP-связывающий мотив, отменяет ингибирование каспаз-3, -7 и -9 белком XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), разрушая комплексы IAP-каспаза. Механизм Omi/HtrA2 соответствует работе SMAC/DIABLO. Белок AIF (apoptosis-inducing factor) располагается в межмембранном пространстве, ассоциирован с внутренней митохондриальной мембраной и участвует в сборке комплекса I ЭТЦ митохондрий. Выйдя из митохондрий в результате частичного протеолиза, AIF способствует фрагментации ДНК [90]. При ПБММ выход AIF из митохондрий в цитозоль зависит от активности каспаз и кальпаинов, Ca^{2+} -активируемых цистеиновых протеаз. Еще один важный фермент – эндонуклеаза G. Она локализована в митохондриальном матриксе и после ПБММ принимает участие в фрагментации ДНК [90].

Активация ПВММ может вести к гибели клеток посредством механизма независимого от каспаз (в случае наличия белков ингибиторов каспаз и отсутствия факторов их активации, например, АРАФ-1) [91]. В данном случае для поддержания митохондриального потенциала АТФ-синтаза гидролизует запасы АТФ, что ведет к снижению ее уровня в клетке и стимуляции некротической гибели. Повышенная экспрессия гликолитического белка глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (GAPDH), который участвует в синтезе АТФ, может подавить упомянутый выше тип гибели опосредованный снижением уровня АТФ [92].

ПВММ может осуществляться и в результате так называемой индукции неспецифической проницаемости митохондриальной мембраны вследствие открытия неспецифической поры во внутренней мембране митохондрий (MPTP – mitochondrial permeability transition pore) [88]. Этот процесс происходит в ответ на аккумуляцию ионов Ca^{2+} митохондриями. Открытие поры сопровождается поступлением в митохондрии растворенных веществ и воды, что приводит к набуханию органелл. В результате набухания, внешняя митохондриальная мембрана, площадь которой существенно меньше площади внутренней, повреждается, и белки из межмембранного пространства выходят в цитоплазму. Согласно традиционной точке зрения, основными компонентами неспецифической поры являются зависимый от потенциала анионный канал (Voltage-dependent anion channel, VDAC), расположенный во внешней мембране, переносчик адениновых нуклеотидов (ANT) во внутренней мембране митохондрий, а также циклофилин D, растворимый белок матрикса, который располагается в местах контакта внутренней и внешней митохондриальных мембран. В мышцах с нокаутом по циклофилину D не образуются MPTP и ингибиторы циклофилина D подавляют формирование MPTP. В клетках, полученных из мышей с нокаутом по циклофилину D, подавлена клеточная гибель по типу некроза вследствие воздействия на клетки перекисью водорода или ишемии-

реперфузии миокарда. Однако, в данных клетках отсутствует резистентность к индукции апоптоза, из чего был сделан вывод, что МРТР не участвует в выходе цитохрома *c*. Известно, что оба механизма пермеабиллизации могут стимулироваться АФК. Противоопухолевый эффект многих препаратов (ионизирующее облучение, этопозид и производные мышьяка) основан на их способности стимулировать продукцию АФК [64].

Не исключено, что существует взаимосвязь между этими двумя путями ПВММ, однако механизмы этого взаимодействия плохо изучены. Так, открытие поры в изолированных митохондриях в присутствии рекомбинантного Вах, проходит быстрее [93]. Ранние работы показали, что Вах и Bcl-X_L могут взаимодействовать с VDAC, опосредуя выход цитохрома *c* из изолированных митохондрий [94,95]. В качестве другого партнера белков Bcl-2 и Вах называли ANT [61-63]. Подробный анализ взаимодействия белков семейства Bcl-2 и VDAC был дан в работе [64], в которой было показано, что лишь tBid способен взаимодействовать с VDAC и вызывать его закрытие [96].

1.9. Стабилизация митохондриальной мембраны в опухолевых клетках

Одним из последствий гликолитического сдвига является стабилизация внешней митохондриальной мембраны к пермеабиллизации. Митохондрии раковых клеток являются более резистентными по отношению к ПВММ, процесса, опосредующего механизм внутреннего пути апоптоза [97]. Связь между аэробным гликолизом и стабильностью митохондриальной мембраны к пермеабиллизации до конца неясна, но существуют различные объяснения этому явлению.

Как отмечалось выше, стабилизация HIF стимулирует экспрессию важного фермента гликолиза – гексокиназу (ГК). Гексокиназы I и II способны напрямую связываться с митохондриальной мембраной, в частности с зависимым от потенциала анионным каналом VDAC, тогда как ГК III не имеет гидрофобной N-концевой последовательности, необходимой

для связывания с мембраной митохондрии. В быстрорастущих опухолях преимущественно экспрессируется изоформа ГК II, за исключением опухолей мозга, в которых имеет место гиперэкспрессия ГК I. Взаимодействие гексокиназы с VDAC облегчает фосфорилирование глюкозы, благодаря возможности использования АТФ синтезированного митохондриями [98]. Как было показано ранее, закрытие VDAC вследствие удаления ростовых факторов вызывает клеточную гибель, тогда как поддержание канала в открытом состоянии предотвращает гибель клеток [99]. Антиапоптотический белок Bcl-XL, экспрессия которого повышена в опухолях, способен связываться с VDAC, препятствуя его закрытию. Механизм инициации апоптоза при закрытии VDAC до конца не изучен, но предполагается, что проницаемость VDAC для кальция выше в закрытом состоянии, чем в открытом [98]. Усиленное накопление кальция может служить триггером образования митохондриальной поры проницаемости (MPT), еще одного механизма ПВММ через открытие неспецифической поры во внутренней митохондриальной мембране.

Аналогичную роль регулятора состояния VDAC играет и ГК II, связывающаяся с каналом, предотвращая его закрытие. Кроме того, взаимодействие гексокиназы с VDAC приводит к занятию гексокиназой сайтов связывания про-апоптотических белков на внешней мембране, в частности tBid. Как было показано, единственным про-апоптотическим белком, способным связываться с VDAC является tBid, что приводит к закрытию канала [100]. Важность взаимодействия VDAC-ГКII подтверждают результаты исследований, в которых ослабление взаимодействия VDAC-ГКII приводило к усилению апоптоза. Так, в своих исследованиях Shulga et al использовали N-концевой пептид гексокиназы II длиной в 15 аминокислотных остатков, который конкурентно с полноразмерным белком связывался с VDAC. Инкубация клеток колоректального рака HCT116 с этим пептидом (N-ГК II) приводила к отделению гексокиназы от митохондрий.

Применение цисплатина совместно с пептидом N-ГК II приводило к синергическому усилению цитотоксического эффекта. Эти данные показывают, что высвобождение гексокиназы из комплекса с VDAC может повысить чувствительность клеток к действию терапевтических препаратов, усиливая их противоопухолевый эффект [101]. Напротив, непосредственное фосфорилирование ГК II белком Akt усиливает ее взаимодействие с VDAC. Следует также учесть, что ГК II может конкурировать с Bcl-XL за связывание с VDAC, что приводит к высвобождению данного антиапоптотического белка и облегчению его взаимодействия с про-апоптотическим белком Bax, предотвращая Bax-Bak взаимодействие и Bax-Bax олигомеризацию. Открепление ГК II при ее фосфорилировании киназой гликоген-синтазы 3β (GSK3β) повышает взаимодействие Bcl-XL с VDAC и появление свободного Bax, который будет взаимодействовать с Bax/Bak, формируя пору для выхода цитохрома c [102].

Связывание ГК I с VDAC также приводит к подавлению апоптоза, тогда как подавление экспрессии этого фермента с использованием siRNA либо клотримазола стимулировало апоптоз, вызванный TNF [103]. Таким образом, взаимодействие ГК I с VDAC может стабилизировать мембраны митохондрий, подавляя зависимые от митохондрий пути клеточной гибели. Это взаимодействие может быть усилено при гиперэкспрессии онкоспецифических изоферментов ГК или при активации пути Akt, стимулирующего взаимодействие ГК и VDAC [104]. Известно несколько изоформ VDAC со схожими кинетическими характеристиками, что указывает на то, что вклад VDAC в усиленное взаимодействие с ГК и усиление фосфорилирования глюкозы обусловлено разницей в количестве свободных сайтов связывания [105]. Наиболее часто экспрессирована и связана с ГК изоформа VDAC1, которая также используется другими белками, участвующими в регуляции апоптоза, для заякоривания на митохондриях.

Стабилизация митохондрий может регулироваться протениназой В (Akt). Снижение митохондриального дыхания увеличивает уровень NADH, который инактивирует гомолог фосфатазы и тензина (PTEN), в результате чего активируется Akt. Активация Akt подавляет выход цитохрома с из митохондрий и инициацию каскада апоптоза, при этом при инъекции в клетку цитохрома с, протеинкиназа Akt неспособна предотвратить апоптоз [106]. Из чего следует, что антиапоптотический эффект данной протеинкиназы работает до процесса ПВММ, а Akt вносит вклад в стабилизацию митохондриальной мембраны. Помимо этого, Akt ингибирует опосредованную p53 экспрессию Bax, что снижает вероятность ПВММ [107]. Активная форма Akt способна фосфорилировать про-апоптотический белок Bad, предотвращая его взаимодействие с внешней митохондриальной мембраной [108]. В дефосфорилированном состоянии Bad связывается с антиапоптотическими белками семейства Bcl-2, при фосфорилировании Bad формирует сайты связывания с 14-3-3 белками, что приводит в релокализации Bad в цитозоль и подавлению его про-апоптотической активности. Кроме того, фосфорилирование Bad изменяет его сродство к белкам Bcl-2. Это подтверждается тем, что мутанты Bad, функционирующие как конститутивно фосфорилированные, неспособны подавлять антиапоптотические белки Bcl-2 даже без 14-3-3 белков [109].

Активация PI3-K ведет к значительному накоплению Akt в митохондриях, при этом протеинкиназа локализуется не только на внешней митохондриальной мембране, но также в матриксе и внутренней митохондриальной мембране. Также было выяснено, что Akt способна предотвращать олигомеризацию Bax и вызывать транслокацию ГК II в митохондриальную мембрану, где она взаимодействует с VDAC, что также ингибирует ПВММ [110].

Таким образом, репрограммирование энергетики в опухолевых клетках способно вызывать подавление митохондриальных путей в апоптозе,

вследствие стабилизации митохондриальной мембраны к пермеабиллизации. Исходя из этого, в качестве стратегии элиминации опухолевых клеток можно назвать как стимуляцию митохондриальной активности, в результате подавления гликолитических и глютаминолитических путей, а также непосредственное воздействие на митохондрии с целью их дестабилизации.

1.10. Энергетика клетки как мишень противоопухолевой терапии

Преимущественное использование гликолиза для снабжения раковых клеток энергией позволило предположить, что подавление гликолиза будет содействовать подавлению пролиферации клеток и даже вызывать их гибель. 2-Дезоксиглюкоза (2-ДГ) представляет собой неметаболизируемый аналог глюкозы, поступающий в клетку через транспортеры гексоз [86,110]. 2-ДГ является конкурентным ингибитором фосфоглюкоизомеразы, а также подавляет активность гексокиназы в неконкурентном режиме. Несмотря на то, что в научной литературе в основном упоминают 2-ДГ как модулятор энергетического метаболизма, его основной эффект основан на воздействии на иные клеточные процессы. Так, 2-ДГ оказывает лишь умеренное воздействие на подавление продукции АТФ в клетках эукариот [112]. Существуют данные о противовирусных свойствах данного агента, а именно о воздействии 2-ДГ на гены вируса папилломавируса человека. Известно, что агент 2-фтордезоксиглюкоза, который является более мощным ингибитором гликолиза, не оказывает на опухолевые клетки токсического эффекта как его аналог 2-ДГ [113]. 2-ДГ подавляет клеточный рост не только вследствие ингибирования метаболизма глюкозы, но и воздействуя на процессы гликозилирования [114]. В дополнение к этому, 2-ДГ усиливает цитотоксические эффекты доксорубина и паклитакселя [115,116] и действует синергично с ингибиторами деацетилазы гистонов [117]. Так, положительные результаты исследования комбинированного действия 2-ДГ с антидиабетическим препаратом метформином позволяют надеяться на успех дальнейших клинических исследований [118].

Аналогичным свойством обладает 3-бромпируват (3-БП), синтетическое производное пирувата, обладающее алкилирующими свойствами. 3-БП ковалентно связывается с ГК II, что не только подавляет активность фермента, но и способствует диссоциации ГК от VDAC на внешней митохондриальной мембране, способствуя пермеабилзации митохондрий. Помимо этого, гибель клеток, индуцированная 3-БП, обусловлена быстрым падением уровня АТФ в клетке, что подавляет пролиферацию опухолевых клеток. Эти свойства делают 3-БП эффективным средством для элиминации опухолевых клеток [119,120]. В настоящее время как 2-ДГ, так и 3-БП проходят клинические испытания [121–123]. Известны данные успешных исследований комбинирования 3-БП с применяемыми в клинике противоопухолевыми препаратами. Так, 3-БП потенцировал эффект тамоксифена при обработке клеток рака груди [124]. Интересно отметить, что исследование механизмов устойчивости к 3-БП выявило продукт гена SLC16A1, транспортер монокарбоксилатов (monocarboxylate transporter, MCT1) в качестве главного определяющего фактора чувствительности к этому препарату [125]. MCT1 необходим для доставки 3-БП в опухолевые клетки. Уровень экспрессии этого белка может служить показателем чувствительности клеток к 3-БП. Более того, стимуляция экспрессии MCT1 позволяет повысить чувствительность клеток к этому терапевтическому агенту.

Снижение уровня АТФ вследствие подавления гликолиза в опухолевых клетках, в которых гликолиз является преимущественным механизмом энергоснабжения, имеет целый ряд последствий, способных инициировать клеточную гибель. Так, дефосфорилирование про-апоптотического белка Bad приводит к его активации, миграции Bax в митохондрии, ПВММ и инициации программы апоптоза с минимальным токсическим эффектом для нормальных клеток [126]. Падение уровня АТФ при обработке клеток 2-ДГ или в комбинации со средой без глюкозы стимулирует Fas-индуцируемый

апоптоз, определяемый по экстернализации фосфатидилсерина на внешней стороне плазматической мембраны клеток [127]. Разумеется, при падении уровня АТФ ниже порога, необходимого для выполнения программы апоптоза, клетки будут погибать по типу некроза.

В основном гликолитический путь продукции АТФ характерен для быстрорастущих опухолевых клеток, тогда как в медленно растущих клетках энергоснабжение поддерживается ОФ [18,128]. Следовательно, логично предположить, что применение ингибиторов гликолиза не всегда будет эффективным, и необходимо точно определять метаболический профиль опухоли перед выбором терапии. Подавление гликолиза будет наиболее эффективно в опухолях с нарушенным функционированием митохондрий. В противном случае, стимуляция митохондриального пути продукции АТФ приведет к компенсации нехватки АТФ, вызванной подавлением гликолиза и ослабит ответ опухолевых клеток при обработке противоопухолевыми препаратами. Например, в условиях ограничения уровня глюкозы клетки глиомы, преимущественно использующие гликолиз (так называемые гликолитические глиомы), могут переключаться с аэробного гликолиза на ОФ, с использованием в качестве источника АТФ других субстратов, такие как пируват и глутамин [129]. Этот механизм также наблюдали в клетках рака шейки матки, карциномы молочной железы и рака поджелудочной железы [4]. Кроме того, ещё в 1979 году, Reitzer с коллегами опубликовали результаты, демонстрирующие, что различные типы опухолевых клеток, в частности линия клеток HeLa, преимущественно потребляют глутамин как основной источник АТФ, а не глюкозу. Исходя из этого можно заключить, что гибель клеток можно стимулировать воздействием на метаболизм глутамина. Согласно данным исследований, апоптоз, вызванный депривацией глутамина, обусловлен именно истощением метаболитов цикла Кребса и механизм гибели клеток не связан с другими эффектами депривации глутамина, такими как нарушение синтеза клеточных белков,

глутатиона, нуклеотидов или изменением в окислительно-восстановительном балансе [41,130]. При этом, добавление двух интермедиатов цикла Кребса, пирувата и оксалоацетата, предотвращало клеточную гибель. Апоптоз, вызванный истощением интермедиатов цикла Кребса, обусловлен следующими главными функциями этого цикла: а) продукция восстановительных эквивалентов NADH и FADH для ОФ через восстановление окисленных предшественников NAD⁺ и FAD и б) обеспечение взаимосвязи клеточных метаболических сигнальных путей. Вероятно, модуляции баланса NADH/NAD⁺ и FADH₂/FAD могут влиять на регуляцию транскрипции генов [131] и ПВММ. Таким образом, глутамин поддерживает выживаемость клеток, не только обеспечивая важнейшие биосинтетические реакции в клетке, но также играя одну из ключевых ролей регулятора окислительно-восстановительных процессов при функционировании цикла Кребса [132,133]. Таким образом, субстраты цикла Кребса не только определяют адекватное энергообеспечение клетки, но и могут служить регуляторами процессов клеточной гибели [134].

Подавление гликолиза и глютаминолиза вынуждает клетки стимулировать активность митохондрий. Так, культивация клеток гепатомы HepG2 в условиях депривации глюкозы приводила к стимуляции митохондриального биогенеза и ОФ, сопровождавшихся повышением уровня митохондриальной ДНК, мРНК, соответствующих белков-продуктов и уровня митохондриального транскрипционного фактора A, а также двукратным увеличением экспрессии циклооксигеназы [135].

Как упоминалось ранее, гипоксия ведет к подавлению активности пролилгидроксилаз, которые обеспечивают связывание HIF с белком VHL и последующей протеасомной деградации транскрипционного фактора. Активация HIF в свою очередь ведет к стимуляции экспрессии киназы пируватдегидрогеназы (PDK), и, соответственно, ингибированию пируватдегидрогеназы (PDH), фермента реакции образования ацетил-КоА из

пирувата. Таким образом, подавление PDK будет стимулировать митохондриальную активность клеток. Дихлорацетат (ДХА) способен подавлять PDK, что приводит к реактивации пируватдегидрогеназы и стимуляции активности митохондрий, восстанавливая, тем самым, фенотип, характерный для нормальных клеток. Стимуляция митохондрий и ОФ при обработке клеток ДХА ведет к повышению продукции АФК. Это, в свою очередь, способно привести к повреждениям митохондрий и стимуляции апоптоза [136]. Неспособность митохондрий в отдельных типах опухолей быстро приспособиться к стимуляции ОФ может служить триггером апоптоза. Таким образом, ДХА можно рассматривать как потенциальный противоопухолевый препарат, действие которого направлено на модуляцию метаболизма опухолевых клеток [7]. Учитывая, что действие ДХА распространяется не только на опухолевые клетки, но и на метаболизм здоровых окружающих тканей, пока остается открытым вопрос о токсичности и побочных эффектах при применении данного препарата в клинике и, следовательно, необходимы дальнейшие исследования [136].

Помимо ДХА, липоевая кислота, обладающая антиоксидантными свойствами, подавляет активность киназы. Липоевая кислота способна конъюгировать с белками и является важным кофактором как пируватдегидрогеназного комплекса, так и компонента цикла Кребса, 2-оксоглутарат дегидрогеназы. В опухолевых клетках липоевая кислота может выступать в роли прооксиданта, индуцируя продукцию АФК, экспрессию p53 и стимуляцию каспазной активности [137]. Так, терапия некоторых видов опухолей липоевой кислотой вызывает окислительный стресс и инициирует апоптоз, вследствие ингибирования активности PDK. Можно рассматривать перспективу применения липоевой кислоты в противоопухолевой терапии, в частности, при комбинации с цитотоксическими агентами как доксорубицин или IL-2 и метоксипрогестероном [68].

1.11. Использование митохондрий в качестве мишени для элиминации опухолевых клеток.

Растет количество данных, подтверждающих необходимость нормального функционирования митохондрий для эффективного роста и развития опухолей, а, следовательно, в перспективе ОФ клеток может являться мишенью противоопухолевой терапии. Так, использование α -токоферил сукцината (α -tocopheryl succinate, α -TOS), производного витамина E, селективно вызывает апоптоз в опухолевых клетках, включая стимуляцию окислительного стресса. Механизм действия α -TOS обусловлен ингибированием комплекса II дыхательной цепи в результате взаимодействия агента с проксимальным и дистальным сайтами связывания убихинона [138], что ведет к утечке электронов и продукции супероксид радикала. Полученные результаты позволяют рассматривать комплекс II дыхательной цепи в качестве одной из мишеней для противоопухолевой терапии. Аналогичным образом ингибирование окисления сукцината комплексом II высокими дозами ацетона (1мМ) в клетках карциномы Эрлиха вызывает подавление митохондриальной активности в опухолях, не оказывая токсичного эффекта на митохондрии здоровых клеток [139]. Необходимо отметить, что α -TOS действует на широкий спектр мишеней. Помимо взаимодействия с сукцинатдегидрогеназой, α -TOS приводит к стимуляции поступления ионов Ca^{2+} в клетки, что вместе с АФК, в свою очередь, индуцирует неспецифическую проницаемость митохондриальной мембраны и клеточную гибель. Конъюгирование молекул α -TOS с положительно заряженными ионами трифенилфосфония (TPP^+), повышает накопление агента в митохондриях, в результате чего гибель клеток наступает при значительно более низких концентрациях препарата. Использование такого препарата митохондриальной направленности (MitoVES) подавляло пролиферацию опухолевых клеток, воздействуя на митохондриальную ДНК [140].

Одним из противоопухолевых препаратов, подавляющих гликолиз, является рассмотренный выше 3-БП, ингибитор гексокиназы. Являясь алкилирующим агентом, 3-БП способен вызывать гибель клеток, используя и иные механизмы. Данные последних лет показали, что в дополнение к подавлению гликолиза 3-БП оказывает влияние на работу митохондрий. В экспериментах с использованием клеток рака груди MDA-MB-231 было показано, что 3-БП стимулирует образование АФК, запуская тем самым митохондриальный путь апоптоза. Гибель клеток была опосредована снижением содержания антиапоптотического белка Mcl-1. Апоптоз, вызываемый 3-БП, сопровождался снижением содержания p-Akt. Это позволяет предположить, что снижение уровня Mcl-1 обусловлено PI3/Akt сигнальным каскадом [141]. Следует отметить, что в клетках гепатокарциномы HepG2 3-БП подавлял активность как комплекса II, так и комплекса I (в отсутствие глюкозы) дыхательной цепи митохондрий. Кроме того, 3-БП вызывал "разобщение" окисления и фосфорилирования, стимулируя нечувствительное к олигомицину потребление кислорода [142]. Противоопухолевый эффект 3-БП усиливался в условиях депривации глутамина, что авторы связывают со стабилизацией транспортера монокарбоксилатов [143].

Как уже было упомянуто, ПВММ является необратимым событием развития апоптоза. В последние годы появились синтетические аналоги белков, содержащих лишь один домен ВНЗ, так называемые ВНЗ-миметики. Одним из первых миметиков был АВТ737, способный вызывать гибель клеток, высвобождая Вах либо Вак из комплекса с анти-апоптотическими белками. Аналогичными свойствами обладает перорально применяемый аналог АВТ-263 (навитоклакс). Оба препарата в настоящее время проходят фазы I/II клинических исследований. Функционирование АВТ-737 более всего напоминает ВНЗ-только белок Bad. АВТ-737 и АВТ-263 связываются с высоким сродством ($IC_{50} < 10 \text{ нМ}$) с Bcl-2, Bcl-XL и Bcl-W, но не с Mcl-1 или

с А1, что сильно ограничивает цитотоксическое действие АВТ-737 (например, в случае клеток рака груди, высоко резистентных к АВТ-737). Поэтому для эффективной терапии данным ВНЗ-миметиком необходимо комбинированное подавление Мсl-1, что уже рассматривается в качестве перспективного направления в клинике. Таким образом, восприимчивость опухолевых клеток к АВТ-737 в качестве самостоятельного противоракового агента зависит от профиля экспрессируемых белков семейства Bcl-2. Так, клетки мелкоклеточной карциномы легких и различных видов лейкемии и лимфомы характеризуются высоким уровнем белков Bcl-2 и высокочувствительны к АВТ-737. Кроме того, при связывании АВТ-737 с белками Bcl-2, Bcl-XL и Bcl-W высвобождаются ВНЗ-только белки клеток, которые далее могут связывать и инактивировать другие анти-апоптотические белки, в том числе Мсl-1, с которым сам АВТ-737 не связывается [144].

Несмотря на установленный механизм действия ВНЗ-миметиков, как было продемонстрировано, некоторые из них вызывают гибель клеток и в отсутствие Вах и Вак что указывает на существование иных мишеней их действия [145]. Обатоклак, синтетическое производное из продигиозина, связывается со всеми антиапоптотическими белками, однако с низкой аффинностью (сравнимой со связыванием АВТ-737 с белком Мсl-1), и, как уже было упомянуто, наряду с клетками дикого типа убивает и клетки, не содержащие Вах и Вак. По-видимому, цитотоксическое действие обатоклакса обусловлено механизмом, либо независимым от каспаз, либо аутофагией, вследствие индукции стресса эндоплазматического ретикулаума или повышением экспрессии Noxa. Последнее ведет к диссоциации комплекса Мсl-1/Вак, что объясняет про-апоптотическое действие обатоклакса и его роль в сенситизации клеток к АВТ-737 [145,146].

Госсипол, полифенольный альдегид, выделенный из растений, долгое время использовался в клинике до выявления его работы «не» ВНЗ-миметика

(связывает Bcl-2, Bcl-XL и Mcl-1 с низкой аффинностью порядка мкмолей/л) [146]. Производные госсипола апогоссипол и апогоссиполон проходят доклинические исследования, тогда как бензоилсульфонид проходит фазу I/II. Эти соединения также только частично работают как ВНЗ-миметики.

Zhang и коллегами был обнаружен новый ВНЗ-миметик, S1, представленный как пан-ингибитор белков семейства Bcl-2. S1 связывался как с Mcl-1, так и с Bcl-2, диссоциируя комплексы Bax/Bcl-2 и Bak/Mcl-1 (эффект был зависимым от дозы и времени) и индуцировал зависимый от Bax/Bak апоптоз [147]. Однако Eastman с коллегами предположили, что S1 действует не как пан-ингибитор Bcl-2 белков, а приводит к повышению содержания ВНЗ-белка Noxa, который ингибирует Mcl-1 и вызывает его деградацию, тем самым делая опухоли чувствительными к цитотоксической терапии [148]. Кроме того, S1 стимулирует продукцию АФК, что ведет к индукции стресса эндоплазматического ретикулума. В работе Zhong и коллег было продемонстрировано, что S1-индуцированная гибель клеток может быть обусловлена также активацией аутофагии вследствие индукции эндоплазматического стресса и нарушением взаимодействия Bcl-1 с Bcl-2 [149,150]. Кроме того, Zhang и его коллегами были проведены работы по синтезу производных S1, цитотоксическое действие которых превышало активность S1 и новых ингибиторов Mcl-1 – 2-цианоацетамида и 2-гидроксиникотиннитрила [139].

В последнее время идентифицировано значительное количество других небольших молекул разных химических структур, обладающих активностью ВНЗ-миметиков, однако еще предстоит решить вопросы, касающиеся главных мишеней этих соединений (т.е. возможность активности «мнимого» ВНЗ-миметика) и возможности их применения в будущем в качестве противоопухолевых соединений (в силу некоторых физико-химических характеристик данных веществ). Кроме того, отсутствие исследований *in vivo* большинства вновь открытых и синтезированных ингибиторов Mcl-1 пока не

позволяет судить о возможностях их дальнейшего применения. Активность одного из новых ВНЗ-миметиков 072RB [152], приводила к снижению уровня антиапоптотических белков Bcl-XL и Mcl-1, однако не было установлено, обусловлено ли данное действие его непосредственным связыванием с этими белками [153].

Исследования воздействия на энергетику клетки для элиминирования опухоли, а также для снижения токсичности применяемых противоопухолевых препаратов в настоящее время интенсивно развиваются на различных этапах предклинических испытаний. Например, используя модели привитых опухолей (xenograft), выращенных в мышах после инъекции раковых клеток молочной железы, было показано, что комбинированное воздействия 2-DG и препаратов, использующих митохондрии в качестве мишени (Mito-CP и Mito-Q), вызвало значительную регрессию опухоли и отсутствие побочных эффектов в других органах [154]. Как показали недавние исследования, противодиабетический препарат метформин, способен вызывать гибель раковых клеток в культуре, а также подавлять рост привитых опухолей. Совместное применение метформина и 2-DG синергически стимулировало гибель клеток, причем обработка 2-DG позволяла значительно снизить концентрацию метформина [154,155]. Аналогичным образом оксамат, ингибитор лактатдегидрогеназы, значительно стимулировал вызванное ионизирующей радиацией подавление роста привитой мышам опухоли [156]. Подавление гликолиза с использованием 2-DG, не только стимулировало апоптоз, вызванный ВНЗ-миметиком АВТ-737 в клетках лимфомы, но и продлеvalo жизнь мышей с экспериментальной лимфомой. Таким образом, данные первой фазы клинических испытаний позволяют надеяться на успех выбранной стратегии противоопухолевой терапии.

1.12. Применение бетулиновой кислоты и ее аналогов в противоопухолевой терапии

Согласно данным управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration) около 40% терапевтических препаратов состоят из натуральных компонентов, или за основу синтеза взято строение молекул природного происхождения, среди них 74% соединений используется в противоопухолевой терапии. Среди преимуществ натуральных веществ их биологическая безвредность и, как правило, меньшая токсичность для здоровых клеток [157]. Пентациклические терпеноиды, класс молекул растительного происхождения со структурой из нескольких терпеновых единиц, обладают противоопухолевой, противовоспалительной и противовирусной активностями [158]. Среди данного класса молекул широкое применение в синтезе веществ нашли олеаноловая, бетулиновая и урсоловая кислоты с большим спектром действия в терапии. Бетулиновая кислота (БК) относится к типу лупановых производных пентациклических тритерпенов [159], и состоит из шести изопреновых единиц. БК впервые была идентифицирована и выделена из растения *Gratiola officinalis* L. Определённое количество БК находят и в представителях других классов растений (*Betula* spp., *Diospyros* spp., *Syzygium* spp., *Ziziphus* spp., *Paeonia* spp., *Sarracenia flava* L. и др. [160], однако основным способом получения большого количества кислоты является химический синтез с помощью реакции окисления вещества бетулина, содержание которого в природе намного выше (например, до 30% в коре березы) [161]. Впервые противоопухолевый эффект БК был обнаружен в 1995 г на клетках мелономы мышей с довольно низкими значениями IC_{50} 0,5-1,5 мкг/мл. Цитотоксический эффект БК продемонстрирован на различных опухолевых клетках *in vitro*, кроме того, БК подавляла рост опухолей различной этиологии *in vivo* с высоким терапевтическим индексом, сравнимым с используемыми в клинике препаратами [161]. Противоопухолевая

эффективность БК была продемонстрирована на клетках колоректального рака, рака молочной железы, яичников, рака головы и шеи, глиобластомы, хронического миелобластного лейкоза и меланомы человека со значением IC_{50} , варьирующим от 1 до 13 мкг/мл [162]. Известны многочисленные молекулярные мишени БК, воздействие на которые может стимулировать различные сигнальные пути апоптоза. БК способна стимулировать ПВММ, падение митохондриального потенциала, негативную регуляцию антиапоптотических белков семейства Bcl-2, выход про-апоптотических факторов из митохондрий, снижение фосфорилирования и транслокации в ядро STAT3 [163]. Помимо этого, существуют данные о механизме индукции клеточной гибели посредством регуляции p53 и подавления NF-κB сигнального пути [164,165]. Среди противоопухолевых свойств БК также отмечают подавление экспрессии белков множественной лекарственной устойчивости *in vitro* и *in vitro* при комбинации с цитотоксическими препаратами 5-фторурацилом и оксалиплатином [163,166]. Недавние данные демонстрируют возможности развития комбинированной противоопухолевой терапии с использованием БК в качестве хемосенсибилизатора к другим препаратам. В настоящее время широко используется химическая модификация молекулы бетулиновой кислоты с целью повышения цитотоксических свойств агента и параметров биодоступности. Так, окисление группы 3-ОН в молекуле БК повышает цитотоксичность, но снижает селективность молекулы; конъюгирование с амино- и гидроксильными группами в позиции С-28 повышает противоопухолевый эффект, а модификация С-20 не влияет на свойства БК [160]. Так как молекула БК слабо растворима в воде, что также снижает биодоступность агента, используют химическую модификацию С-3 гидроксильной группы, С-20 винильной группы и С-28 карбоксильной группы для повышения абсорбции молекулы в организме [160]. Таким образом, направление исследования путей повышения цитотоксических свойств агентов

растительного происхождения также является перспективным направлением развития противоопухолевой терапии.

1.13. Роль мембранных белков-транспортеров в формировании ответа раковых клеток на терапевтическое воздействие

Несмотря на появление все более сложных схем химиотерапии злокачественных новообразований, для многих типов опухолей не существует методов, обладающих высокой эффективностью. Наиболее значимым механизмом, обеспечивающим невосприимчивость опухолевых клеток к разного рода препаратам, является экспрессия мембранных белков-транспортеров, осуществляющих удаление препаратов из клетки. Немалую роль играют и иные механизмы выработки устойчивости раковых клеток к терапии, такие как уменьшение чувствительности к апоптотическим сигналам, альтернативные изменения в каскаде запуска клеточной гибели, детоксикация, активация механизмов репарации ДНК (в случае ДНК-атакующих агентов) и др. Подробное изучение причин неэффективности современных методов терапии опухолей является важной задачей, так как влияние на механизмы возникновения резистентности может значительно улучшить результаты терапии, а также способствовать разработке новых стратегий борьбы с раковыми заболеваниями [167].

Одним из наиболее распространенных механизмов устойчивости опухоли к терапии является экспрессия на поверхности клетки энергозависимого насоса, выкачивающего противоопухолевые препараты [168,169]. Самый известный из этой группы факторов множественной лекарственной устойчивости – Р-гликопротеин (P-gp), продукт гена *MDR1* у человека и *mdr1a* и *mdr1b* у мышей. Это был первый идентифицированный белок из семейства ABC (ATP-binding cassette). В геноме всех живых организмов закодированы белки этого семейства. Они не только осуществляют удаление лекарств из клетки, но и обеспечивают транспорт через плазматическую мембрану питательных и других необходимых для

поддержания жизни веществ [170]. Гликопротеин Р-gr широко экспрессирован во многих типах опухолей, в том числе в опухолях толстого и тонкого кишечника, опухолях печени, поджелудочной железы, опухолях гематопоэтического происхождения (миеломы, лимфомы, лейкозы), мочеполовой системы (опухоли почек, яичников, семенников), нейробластоме, фибросаркоме и др. Этот белок является одним из 48 известных АВС-транспортеров в организме человека. Данный фосфогликопротеин массой 170 кДа состоит из двух АТФ-связывающих кассет и двух трансмембранных областей. Он может распознавать и связывать множество гидрофобных субстратов – препаратов, используемых в химиотерапии рака, так и антиаритмических и противогистаминных средств. Подавляющее большинство солидных опухолей развивается в гипоксических условиях [170]. Как сказано выше, гипоксия стимулирует стабилизацию фактора HIF, ответственного за адаптацию клеток к гипоксическим условиям, в частности, за стимуляцию ангиогенеза, экспрессию ферментов гликолиза, подавление активности митохондрий [170]. Ранее нами было показано, что в условиях гипоксии значительно снижается чувствительность клеток рака прямой кишки HCT116 к таким терапевтическим средствам как цисплатин и доксорубин [170]. Учитывая, что HIF регулирует экспрессию Р-gr, можно предположить, что повышена резистентности клеток в гипоксических условиях в определенной степени обусловлена стабилизацией этого транспортера на плазматической мембране.

Обобщая приведенные данные, можно заключить, что резистентность клетки обусловлена множественными факторами, которые на разных уровнях повышают ее устойчивость к терапевтическому воздействию. Исходя из этого, сочетание ингибиторов энергетике с противоопухолевыми препаратами представляется перспективной стратегией борьбы с онкологическими заболеваниями. При написании раздела использованы материалы статьи автора диссертации [171,172].

2. Материалы и методы

2.1. Материалы

2.1.1. Буферные растворы:

Буфер для приготовления концентрирующего полиакриламидного геля: 1,5 М Tris-HCl pH 6,8

Буфер для приготовления разделяющего полиакриламидного геля: 1,5 М Tris-HCl pH 8,8

Буфер для денатурирующего электрофореза по Лэммли: 25 мМ Trис, 250 мМ глицин, 0,1% SDS

Буфер для нанесения образцов при электрофорезе по Лэммли: 50 мМ Trис-HCl буфер, pH 6,8, 1% SDS, 10% глицерин, 0,025% бромфеноловый синий

Буфер для переноса при проведении Вестерн-блот анализа: 25 мМ Trис, 192 мМ глицин, 20% этанол

Буфер PBS (Phosphate Buffered Saline): 1.7 мМ KH_2PO_4 , 5.2 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl.

Буфер PBST (Phosphate Buffered Saline Tween 20): 1.7 мМ KH_2PO_4 , 5.2 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl, 0,05% Tween 20

DPBS (натрий-фосфатный буфер в модификации Дульбекко) стерильный – ПанЭко, Россия

Раствор Версена стерильный – ПанЭко, Россия

Буфер TBST (Tris-Buffered Saline Tween-20): 137 мМ NaCl, 20 мМ Trис, 0.1% Tween-20, pH 7.6.

Буфер для фракционирования клеток: 150 мМ KCl, 1 мМ MgCl_2 , 5 мМ Trис, 0.5 мМ EGTA, 0.01% дигитонина

2.1.2. Химические реактивы

Реактив	Производитель
BSA (bovine serum albumin)	Boval BioSolutions
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	Sigma-Aldrich
DTT (dithiothreitol)	Thermo Fisher Scientific
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)	Amresco
HCl	Helicon
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Helicon
NaCl	Helicon
NaN ₃	Helicon
NP-40 (Nonidet P-40, octylphenoxypolyethoxyethanol)	Helicon
Precision Plus Protein™ Dual Color Standard	Bio-Rad
SDS (sodium dodecyl sulfate)	Amresco
TEMED (tetramethylethylenediamine)	Helicon
Triton-x100	Helicon
Tween-20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate)	Helicon
Акриламид 40%	Био-Rad
Бромфеноловый синий	Панэко
Глицерин	Helicon
Глицин	Helicon
Колцеид	Sigma-Aldrich
Метилен-бис-акриламид (N N') 2%	Био-Rad
Обезжиренное молоко	Sigma-Aldrich
Параформальдегид	Sigma-Aldrich
Персульфат аммония	Amresco

Трис	Helicon
Цисплатин	Тева
Этанол 95%	Helicon
Hoechst 33342	Thermo Fisher Scientific
Mitotracker Green FM	Thermo Fisher Scientific
VECTASHIELD Mounting	Vector Laboratories
DTNB	Thermo Fisher Scientific

2.1.3. Маркеры массы белка:

Precision Plus Protein™ Dual Color Standards 161-0374 – Bio-Rad

Biotinylated Protein Ladder Detection Pack #7727 – Cell Signalling

Флуоресцентные субстраты и красители:

Ac-DNLD-AMC - PeptaNova

Пропидий йодид – Molecular Probes

2.1.4. Антитела:

Целевой антиген	Источник	Производитель
Cytochrome <i>c</i>	Mouse	BD Biosciences 556433
Cleaved caspase-3	Rabbit	Cell Signalling 9661
PARP1(full 116кДа and cleaved 89кДа)	Rabbit	BD Transduction Lab 4C10-5
Cleaved PARP1 (89кДа)	Rabbit	Cell Signalling 5625
GAPDH	Rabbit	Cell Signalling 2118
Bip/Grp78	Rabbit	Cell Signalling 3177
LC3	Rabbit	MBL PM036
Bid	Mouse	BD Biosciences 611528
Bid(p15)	Rabbit	MBL AT-1001
Akt	9272	Cell Signalling 9272

p-Akt	Rabbit	Santa Cruz SC-7985
p53	Mouse	Santa Cruz SC-126
SDHA	Rabbit	Cell Signalling 5839S
Cleaved caspase-9	Rabbit	Cell Signalling 9505
Caspase-8	Rabbit	Cell Signalling 9496
FLIP	Rabbit	Предоставлено Prof. Inna N. Lavrik, Magdeburg University, Germany
HIF1 α	Rabbit	Cell Signalling 3716
MDR	Mouse	Sigma-Aldrich P7965

2.1.5. Среды и растворы для работы с культурами клеток:

Среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) с глутамином без пирувата – Gibco

Среда RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) без глутамин – Gibco

Раствор трипсина-ЭДТА 0,25% с солями Хенкса – ПанЭко, Россия

Сыворотка эмбриональная телячья, стандартизованная – ПанЭко, Россия

2.1.6. Наборы реактивов:

Набор для измерения концентрации белка BCA Protein Assay Kit – Thermo Scientific Pierce.

Набор хемилюминесцентных субстратов для пероксидазы хрена Novex® ECL Chemiluminescent Substrate Reagent Kit – Invitrogen'

Набор для оценки клеточной гибели методом проточной цитофлуориметрии с помощью окрашивания клеток препаратом аннексин V-FITC: аннексин-связывающий буфер (BD Biosciences), аннексин V-FITC (Invitrogen), пропидий йодид (BD Biosciences).

Набор для определения уровня АТФ, Adenosine 5'-triphosphate (ATP) Bioluminescent Assay Kit – Sigma-Aldrich.

2.1.7. Клеточные линии

В работе использовали следующие клеточные линии:

HCT116, RKO (колоректальный рак)

SK-N-BE(2), SH-SY5Y, TET21 (нейробластома)

MCF-7 (рак молочной железы)

2.1.8. Обработка клеток

2-Deoxyglucose	Sigma-Aldrich
Mannose	Sigma-Aldrich
Cisplatin	TEVA
Etoposide	TEVA
Doxorubicin	Sigma-Aldrich
Verapamil	Sigma-Aldrich
Bafilomycin A	Sigma-Aldrich
Rapamycin	Sigma-Aldrich

2.2. Методы

2.2.1. Культивирование клеток

Клетки выращивали в CO₂ инкубаторе (5% CO₂) при 37°C в среде DMEM (Gibco) или RPMI (Gibco), содержащей 10% телячьей сыворотки (Gibco), в присутствии антибиотиков (пенициллин, стрептомицин, 100 un/ml). Для экспериментов были взяты клетки в логарифмической фазе роста.

Для исследования влияния гипоксии на процессы клеточной гибели культивирование клеток проводили в гипоксическом CO₂ инкубаторе (New Brunswick Scientific Co., Inc, Edison, NJ, USA), позволяющим поддерживать концентрацию кислорода от 0.1%.

2.2.2. Пересадка клеток

Культуральную среду сливали, клетки на чашках промывали раствором Версена или DPBS, подогретого на водяной бане до 37°C. Добавляли раствор

трипсина-ЭДТА из расчета 0,5 мл на чашку 60 мм, 1 мл на чашку 100мм. Помещали в CO₂ инкубатор на 2-5 минут. Открепление клеток с поверхности пластика контролировали под инвертированным микроскопом. Действие трипсина останавливали добавлением культуральной среды, содержащей эмбриональную телячью сыворотку. Концентрация клеток подсчитывалась при помощи счетчика Beckman Z2 Coulter counter. Необходимое количество клеток равномерно распределялось в чашке с теплой средой, 3 мл среды на чашку 60 мм, 8 мл на чашку 100 мм.

2.2.3. Заморозка

Клетки снимались трипсином, количество подсчитывалось при помощи счетчика Z2 Coulter counter. Клетки осаждали центрифугированием при 100g, в течение 4 мин ресуспендировали (1 млн в 1 мл среды с дополнительным 5%-м содержанием эмбриональной телячьей сыворотки и 10% диметилсульфоксида (DMSO)) и переносили в криопробирки. Пробирки помещались в камере с изопропанолом при -70°C на ночь, после этого переносились в хранилище с жидким азотом.

2.2.4. Обработка индукторами апоптоза

Для добавления индукторов апоптоза брали чашки с 70-80% конфлюентности. Из чашки отбирали 1 мл среды, добавляли туда необходимый объем препарата и тщательно перемешивали. Растворенный в среде индуктор равномерно распределяли по чашке.

2.2.5. Подготовка клеточных лизатов для Вестерн-блот анализа

Снимали клетки трипсином, отбирали 1-2 млн клеток (подсчет клеток производили с помощью счетчика Beckman Coulter), центрифугировали при 1100g в течение 5 мин, два раза промывали холодным DPBS с последующим осаждением центрифугированием при 300g в течение 5 мин. Далее клетки лизировали на льду в течение 30 минут в RipA буфере (50 mM Трис-HCl, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.5% SDS, 1% NP-40, коктейль ингибиторов протеаз Complete (Roche), pH 7.4). Полученные лизаты переносили в пробирку

Eppendorf и оставляли при +4°C на 30 мин. После завершения инкубации лизаты центрифугировали при 15000g в течение 20 мин при температуре +4°C. Надосадочную жидкость переносили в новую пробирку. Определение концентрации белка производили на приборе Varioskan Flash Multimode Reader с помощью BCA Protein Assay Kit согласно протоколу производителя. Лизаты хранились при -20°C.

2.2.6. Электрофорез белков в полиакриламидном геле по методу Лэммли

Концентрирующий гель: 4% смесь ПАА и бисАА (30:0,2), 0,1% ДСН, 0,125М Трис HCl, pH6.8. Для полимеризации добавляли 10% ПСА (100 мкл на 10 мл геля) и 8 мкл TEMED. Разделяющий гель: 12% смесь ПАА и бисАА (30:0,2), 0,1% ДСН, 0,375М Трис HCl, pH8.8. Для полимеризации добавляли 10% ПСА (50 мкл на 10 мл геля) и 4 мкл TEMED. Электрофорез проводили при 100В в приборе Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System. Неокрашенный гель использовали для переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану. Перенос проводили при 100В в течение часа для одной мембраны, для одновременного переноса с двух мембран устанавливали условия 120В, 1,5 часа. После переноса мембраны помещали в 5%-й раствор обезжиренного молока для забивки неспецифических сайтов связывания с белком. Инкубацию проводили при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Раствор молока сливали и мембрану отмывали в буфере PBST два раза по 5 мин. Мембрану помещали в раствор с первичными антителами, которые растворяли в TBST буфере с добавлением 2,5% BSA в концентрации, рекомендуемой производителем. Инкубацию проводили в течение ночи при +4°C и постоянном перемешивании. На следующий день раствор антител собирали в пробирку, добавляли дополнительно 0,02% азида натрия и помещали на хранение при +4°C. Антитела затем использовали несколько раз. Мембрану отмывали в PBST буфере 5 раз по 5 мин. Добавляли раствор вторичных антител, которые растворялись в PBS, содержащий 2,5% обезжиренного молока.

Инкубировали в течение часа при комнатной температуре. Вторичные антитела сливали, мембрану отмывали 5 раз по 5 мин в PBST буфере и заливали смесью хемоллюминесцентных субстратов пероксидазы хрена на 1 мин. Регистрация хемиллюминесценции и анализ изображения проводили на приборе ChemiDoc™ XRS+System (Bio-Rad).

2.2.7. Измерение дыхания клеток на приборе Seahorse XF96

Для определения митохондриальной активности проводили измерение скорости потребления клетками кислорода, OCR (oxygen consumption rate). Клетки рассаживали в среде культивирования на 96-луночный планшет в количестве 12-15 тыс. клеток на лунку. Далее следовала необходимая индукция клеток в соответствии с планом эксперимента. В день измерения дыхания среда клеток заменялась на среду DMEM, не содержащую FBS. В процессе измерения к клеткам добавлялись различные модуляторы митохондриальной активности: олигомицин, для подавления АТФ-синтазы, протонофор CCCP, разобщитель окисления и фосфорилирования, использовали для сброса мембранного потенциала митохондрий и оценки максимальной митохондриальной активности. Ингибиторы комплексов ЭТЦ, ротенон (I комплекс) и антимицин (III комплекс), использовали для оценки немитохондриального потребления кислорода.

2.2.8. Фракционирование клеток

Для разделения цитозольной и мембранной фракций применяли мягкий детергент – дигитонин. Обработка клеток дигитонином в буферном растворе, близким по составу внутриклеточному, приводит к выходу цитозольных белков из клеток. Последующее центрифугирование дает возможность отделить цитозольные белки от белков, остающихся в митохондриях, ядрах и связанных с мембранами. Оценку проводили с использованием вестерн-блот анализа. Дигитонин встраивается в мембраны и формирует поры, связываясь с содержащимся в них холестерином и другими β -гидроксистеролами. Степень пермеабиллизации, таким образом, зависит от доступности мембраны

воздействию дигитонина и ее стерольному составу. При низких концентрациях дигитонина богатая холестерином плазматическая мембрана может быть пермеабелизована, без повреждения мембран внутриклеточных органелл. Метод позволяет оценить уровень цитохрома *c* отдельно в мембранной и цитоплазматической фракциях, как количественный показатель клеточной гибели в популяции клеток. Клетки снимали с чашек с помощью трипсина, подсчитывали концентрацию, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в буфере для фракционирования. Инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Оптимальная концентрация клеток составляет 1 млн. клеток на 100 мкл буфера. После инкубации пробирку легко встряхивали и центрифугировали при 14000g в течение 5 мин. Аккуратно отбирали 95 мкл надосадочной жидкости, осадок ресуспендировали в таком же количестве буфера. Концентрацию белка определяли с помощью набора BSA Protein Assay Kit (входящая в него щелочь лизирует остатки клеток). Пробы переносили в буфер Лэммли для последующего Вестерн-блот анализа. Для приготовления буфера готовили стоковый раствор дигитонина (0,05%) и необходимое количество добавляли непосредственно перед процедурой фракционирования до конечной концентрации 0,01%.

2.2.9. Анализ апоптоза по связыванию Аннексина V/FITC методом проточной цитофлуориметрии

Для оценки количества живых, апоптотических и некротических (или, так называемых, поздних апоптотических) клеток использовали метод основанный на двойном флуоресцентном окрашивании клеток Аннексином V-FITC и PI. Аннексин V специфично и с высокой афинностью связывается с фосфатидилсерином, который появляется на поверхности апоптотических и некротических клеток; PI проникает только в клетки с повреждённой мембраной. Апоптотические клетки окрашиваются только аннексином V/FITC, поскольку они сохраняют целостность мембраны на ранних стадиях

апоптоза; некротические клетки связываются с аннексином V/FITC и окрашиваются иодидом пропидия; клетки, не находящиеся в апоптозе, не связываются с меткой.

2.2.10. Оценка популяции клеток subG1 методом проточной цитофлуориметрии

Для количественной оценки клеточной гибели использовался метод определения фракции клеток в стадии subG1. При данном подходе в качестве флуорохрома использовался пропидий йодид, способный связываться с ДНК, что позволяет визуализировать характерную для апоптоза, так называемую subG1 популяцию клеток с количеством ДНК менее 2n. Клетки снимали трипсином, промывали холодным DPBS и добавляли ледяной спирт до 70% (для нарушения целостности мембраны) и фиксировали при -20°C в течение 16-24 часов. Перед измерением спирт удаляли, клетки ресуспендировали в DPBS с добавлением 50 мкг/мл пропидий йодида и 100 мкг/мл РНКазы А с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение 15 мин. Измерение проводили на проточном цитометре FACS Canto II (BD Biosciences), оснащенный программным обеспечением BD Bioscience (Becton Dickinson, San Jose, CA). В каждом образце анализировалось 10 тысяч клеток. Обработка полученных данных проводилась с помощью программного обеспечения FlowJo (FlowJo LLC).

2.2.11. Анализ митохондриальных АФК с помощью красителя MitoSoxRed

MitoSoxRed добавляли в чашку с клетками до конечной концентрации 200 нМ. Чашку помещали в инкубатор на 30 мин. при 37°C. Клетки снимали трипсином затем осаждали центрифугированием, среду сливали, осадок разводили в DPBS. После этого проводили цитометрию на приборе BD AccuriTM C6 или проводили оценку на конфокальном микроскопе Zeiss LSM 510 META.

2.2.12. Оценка уровня SH групп

Клетки снимали трипсином, центрифугировали 5 мин 1500g, ресуспендировали в буфере Tris (150mM, pH 8,2) и разделяли суспензию клеток на две группы для измерения общего уровня SH-групп и растворимой фракции. Для измерения общего уровня SH-групп к суспензии клеток добавляли 20 мкл DTNB (5,5'-dithio-bis-[2-nitrobenzoic acid]), растворенного в метаноле и 200 мкл буфера Tris (150mM), инкубировали 10 мин. Клетки центрифугировали 5 мин 13400 rpm и 150 мкл супернатанта переносили в 96 луночный планшет. Для измерения растворимой фракции SH групп, содержимое клеток было осаждено с использованием трихлоруксусной кислоты, далее отцентрифугировано 6500g 5мин и 50 мкл супернатанта перенесено в 96 луночный планшет. К нанесенным в планшет пробам добавляли смесь из 100 мкл Tris 0,5 M и 20 мкл DTNB и инкубировали 10мин, после чего измеряли абсорбцию при длине волны 412 нМ на спектрофотометре *VersaMax™*.

2.2.13. Конфокальная микроскопия

Для исследования морфологии опухолевых клеток, претерпевающих клеточную гибель использовали метод флуоресцентной окраски. Для окраски ядер клеток применяли Hoechst 33342 (Thermo Fisher Scientific), для митохондрий - Mitotracker Green FM (Thermo Fisher Scientific). Клетки выращивали на покровных стеклах в среде культивирования DMEM и индуцировали агентами при достижении 50-60% конfluence. Перед приготовлением препаратов клетки промывали PBS, фиксация проходила при комнатной температуре в 4% растворе параформальдегида в PBS с 50 mM MgCl₂, pH 7.4 в течение 15 мин, после фиксации клетки трижды промывали DPBS. Для пермеабиллизации клеточных мембран фиксированные клетки инкубировали с 0.2% Triton-x100 в DPBS в течение 10 мин при комнатной температуре. Препарат фиксировали VECTASHIELD Mounting (Vector Laboratories). Препараты анализировали с помощью конфокального

лазерного сканирующего микроскопа LSM 780 (Zeiss) с использованием 63x иммерсионного объектива.

2.2.14. Оценка каспазной активности

Оценка каспазной активности основана на расщеплении каспазой 3 пептидного субстрата, связанного с флуоресцентной меткой (Ac-DEVD-pNA). Клетки снимали с чашек трипсином, с расчетом, что на одно измерение необходимо 1-2 миллиона клеток, осаждали центрифугированием, промывали DPBS, затем к осадку добавляли 100 мкл DPBS. 2 мкл отбирали для измерения концентрации белка, из остального объема брали по 25 мкл для измерения каспазной активности и наносили в трех повторностях на 96-луночный планшет. После этого планшет держали при -4°C 1 час. Затем к каждой пробе добавляли по 50 мкл буфера для оценки каспазной активности содержащего ДТТ (5 mM), детергент NP-40 (0,01%) и флуоресцентный субстрат (50 мкМ) и сразу приступали к измерению активности на приборе Varioskan Flash Multimode Reader, предварительно установив температуру 37°C . Регистрация флуоресценции проводилась при длине волны возбуждения 380 нм и испускания 460 нм. Измерение проводили каждые 60 секунд в течение 30 мин.

2.2.15. Измерение уровня АТФ

Содержание АТФ оценивалось с помощью набора Adenosine 5'-triphosphate (АТФ) Bioluminescent Assay Kit (Sigma-Aldrich) по рекомендуемому производителем протоколу. Клетки собирали, отбирали 1 млн и лизировали с использованием АТФ releasing buffer (Sigma-Aldrich). К лизатам добавляли АТФ Assay Mix, содержащий люциферазу и люциферин (в соотношении 1:1 АТФ Assay Mix: АТФ releasing buffer). Пробы интенсивно перемешивали и немедленно помещали в спектрофотометр Zenyth-3100 Microplate Multimode Detector (Anthos) для измерения люминесценции.

2.2.16. Трансфекция клеток и прижизненные наблюдения клеток

Для проведения покадровой съемки клетки были рассажены на 12-луночный планшет. На следующий день проводилась трансфекция клеток (6 час) с использованием Lipofectamine LTX/Plus (Life Technologies). Для трансфекции использовали плазмиду pET28a-LC3-GFP (предоставлена проф. Фазоилом Атауллахановым). Клетки анализировали на микроскопе Nikon Eclipse Ti (Nikon, Japan), оснащенном объективом CFI PlanFluor DLL 10X/0.3 (Nikon), цифровой EMCCD камерой Andor iXon 897 (Andor Technology) и настольным клеточным CO₂-инкубатором (37°C). Для возбуждения флуоресценции GFP были использованы 488нм диодная лампа (CooLED pE-2 LED система освещения) и 465-499нм фильтр возбуждения. Детекция сигнала флуоресценции проводилась каждые 10 мин съемки в течение 24 час. Обработка результатов была проведена с использованием программы ImageJ software.

2.2.17. Статистическая обработка

Обсчет данных производился на основании повтора трех независимых экспериментов. Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение. Сравнение результатов проводилось с использованием U-критерия Манна — Уитни. Статистически значимыми результатами считались данные при $p < 0.05$.

3. Результаты

3.1. Подавление гликолитического пути и его последствия для апоптоза

Учитывая гликолитический характер энергоснабжения опухолевых клеток, представляется перспективной с целью элиминирования опухолевых клеток попытка подавить гликолиз, либо использовать традиционные противоопухолевые препараты в сочетании с ингибиторами различных звеньев гликолиза. С этой целью был использован неметаболизируемый аналог глюкозы – 2-дезоксиглюкоза (2-ДГ). Клетки различной этиологии инкубировали с противоопухолевыми препаратами как в присутствии, так и в отсутствии 2-ДГ. Оценку клеточной гибели, проводили, анализируя расщепление белка ПАРП, субстрата каспазы-3. В большинстве типов клеток, в частности, клетках нейробластомы SK-N-BE(2), TET21N и SH-SY5Y, а также колоректального рака RKO (Рис. 1А), 2-ДГ стимулировала гибель клеток, вызываемую цисплатином. Однако, в клетках HCT116, напротив, 2-ДГ подавляла апоптоз (Рис. 1Б). Степень подавления гибели клеток зависела от концентрации как цисплатина, так и 2-ДГ, но при всех используемых комбинациях происходило снижение клеточной гибели. В дополнение к анализу расщепления ПАРП была проведена оценка выхода цитохрома *c* в цитозоль (Рис. 1Г), активности каспазы-3 (Рис. 1В), а также экстернализации фосфатидилсерина после окраски аннексином V и пропидий йодидом (Рис. 2А). В клетках HCT116 2-ДГ снижала долю клеток, окрашенных аннексином, а также подавляла активность каспазы-3. В остальных клеточных линиях 2-ДГ повышала субпопуляцию клеток с экстернализацией фосфатидилсерина на плазматической мембране (Рис. 2Б).

Согласно данным проточной цитометрии обработка опухолевых клеток пан-каспазным ингибитором Q-VD-OPh приводила к снижению количества клеток, гибнущих как по типу апоптоза (квадрант Q4), так и по типу некроза (квадрант Q2). Действие Q-VD-OPh доказывает, что стимулирующий эффект

2-ДГ обусловлен индукцией апоптотической гибели опухолевых клеток, а наблюдаемый некроз является вторичным событием (Рис. 2А и Б).

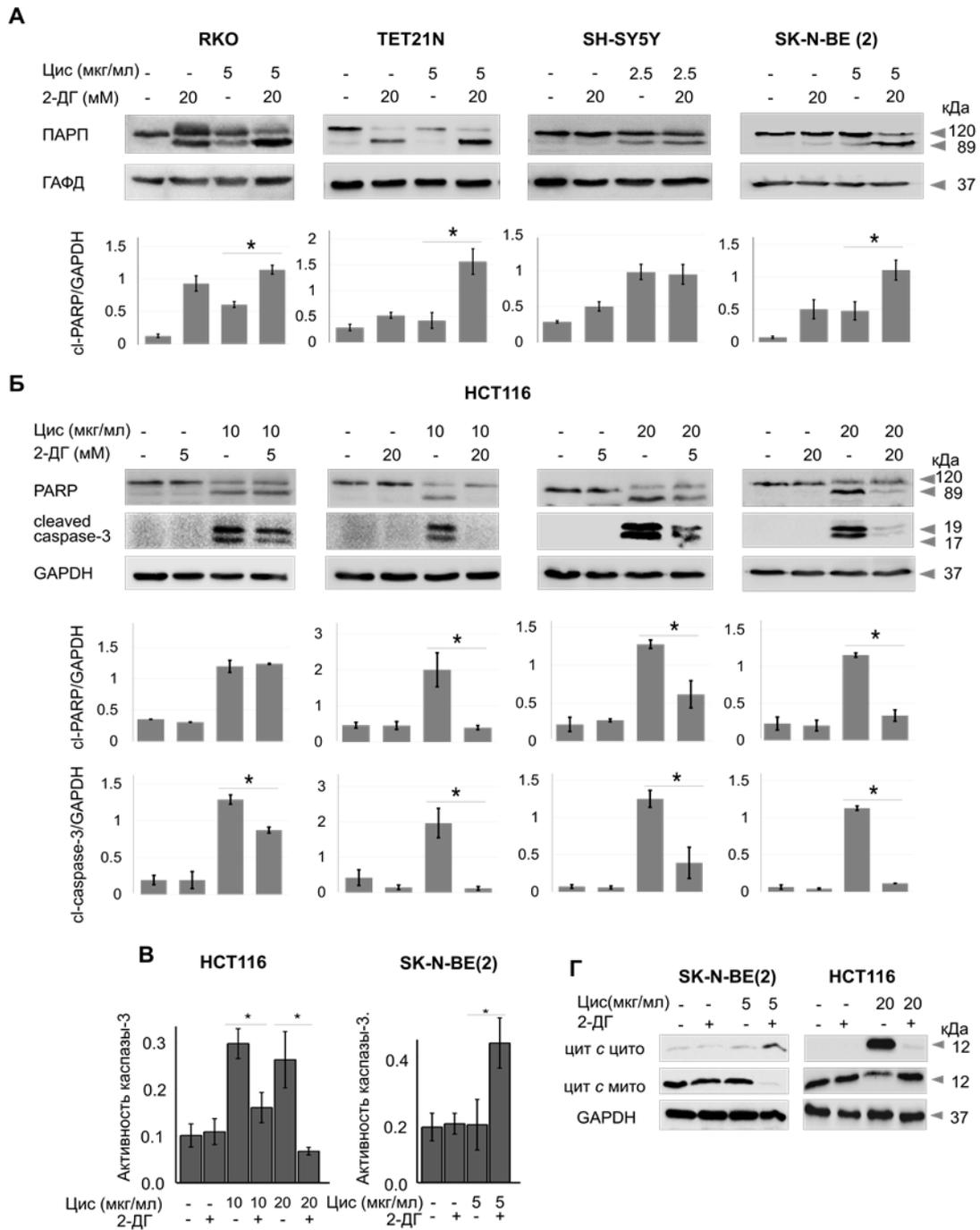


Рисунок 1. Оценка уровня гибели опухолевых клеток RKO, TET21N, SH-SY5Y и SK-N-BE(2), обработанных цисплатином (5 мкг/мл) в комбинации с 2-ДГ (20 мМ) методом вестерн-блот анализа маркеров апоптоза - расщепления ПАРП и каспазы-3 (инкубация 24 ч). Б) Сравнение уровня апоптоза в клетках HCT116 при обработке разными концентрациями цисплатина (10 мкг/мл и 20 мкг/мл) и 2-ДГ (5 и 20 мМ) методом вестерн-блот анализа; В) Оценка уровня гибели клеток SK-N-BE (2) и HCT116 методом измерения активности каспазы-3; Г) Оценка выхода цитохрома c в цитозоль в клетках SK-N-BE (2) и HCT116 методом вестерн-блот анализа.

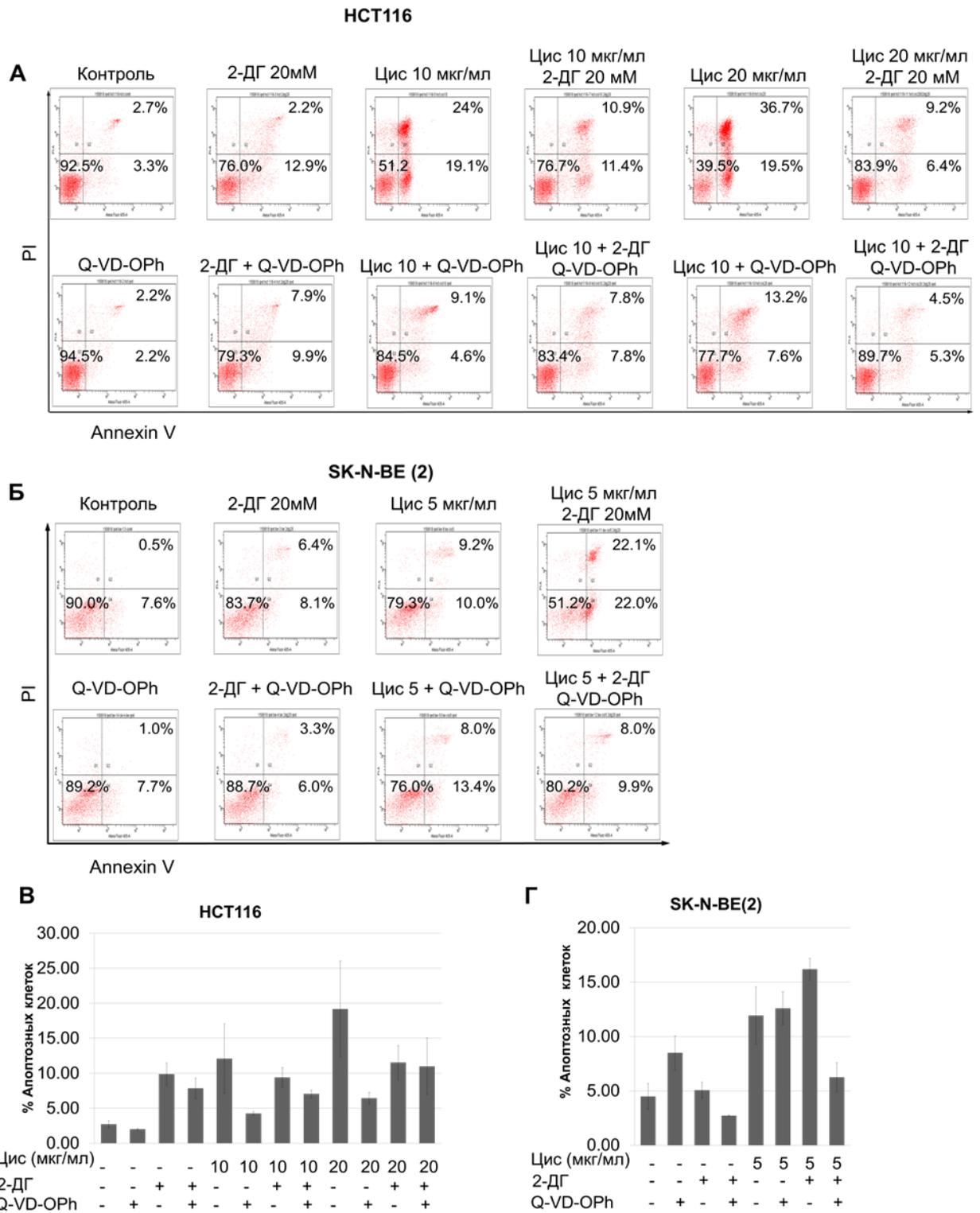


Рисунок 2. Оценка уровня гибели клеток SK-N-BE (2) (А) и НСТ116 (Б) методом проточной цитофлуориметрии при окраске аннексином V и пропидий йодидом под действием цисплатина в комбинации с 2-ДГ. В), Г) Результаты анализа гибели клеток представлены в виде гистограмм.

Известно, что инициация и развитие апоптоза чувствительны к содержанию АТФ в клетке. АТФ необходим для протекания многих биохимических реакций, участвующих в программе апоптоза. Умеренное падение уровня АТФ может стимулировать апоптоз, а его значительное снижение способно вызвать некроз [173,174]. Не исключено, что различия в ответе клеток на обработку 2-ДГ могут быть вызваны степенью зависимости опухолевых клеток от глюкозы, основного субстрата, необходимого для продукции АТФ. Для анализа энергоснабжения клеток, была проведена серия экспериментов по оценке скорости дыхания митохондрий (OCR – oxygen consumption rate) и продукции митохондриями АТФ в клетках НСТ116 и SK-N-BE(2). Обработка клеток 2-ДГ в концентрации 20 мМ вызывала падение OCR в клетках SK-N-BE(2) в большей степени, чем в клетках НСТ116. 2-ДГ вызывала падение и уровня АТФ: в клетках SK-N-BE(2) эффект снижения был выражен сильнее (60-80%), чем в клетках НСТ116 (25-30%) (Рис. 3Б). Комбинирование 2-ДГ с ингибитором АТФ-синтазы олигомицином вызывало дальнейшее падение АТФ в обеих клеточных линиях, что подтверждает компенсаторную роль митохондрий в поддержании энергетики клетки при подавлении гликолиза. Данный параметр, отражающий компенсацию уровня АТФ митохондриями, можно выразить в числовых значениях, вычитая значения уровня АТФ при обработке клеток обоими агентами из уровня АТФ, после обработки только 2-ДГ, что представлено на Рис. 3Б. Согласно расчётам, в клетках НСТ116 компенсация снижения АТФ митохондриями при подавлении гликолиза в несколько раз выше, чем в клетках SK-N-BE(2).

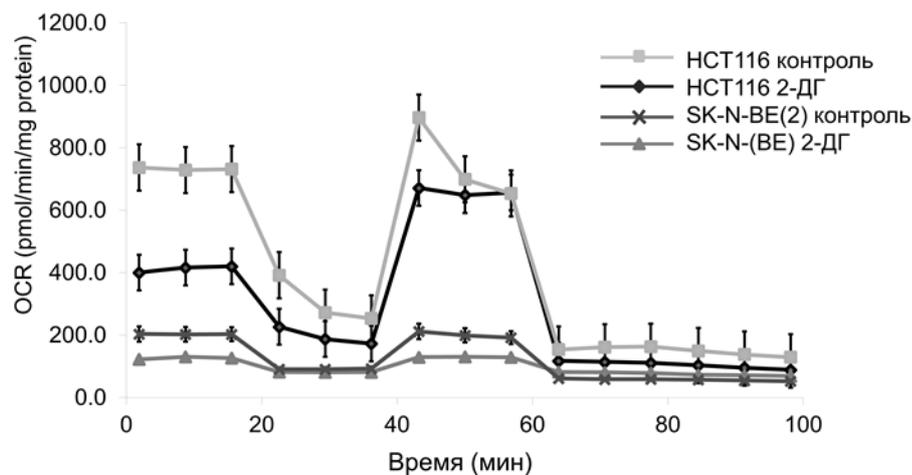
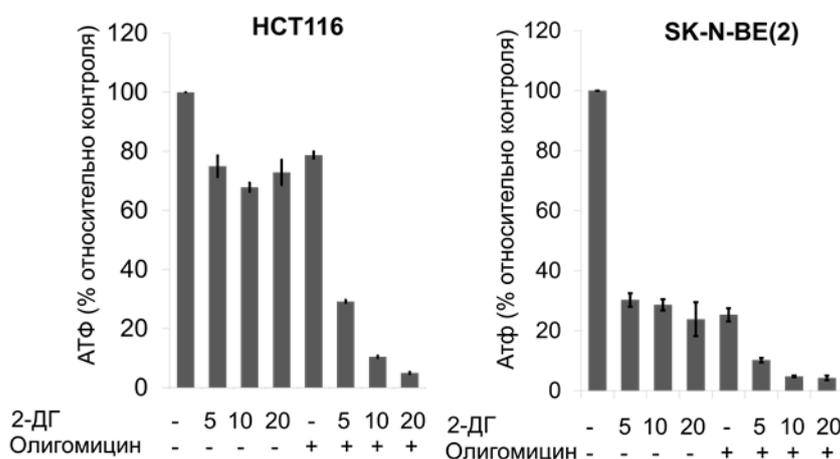
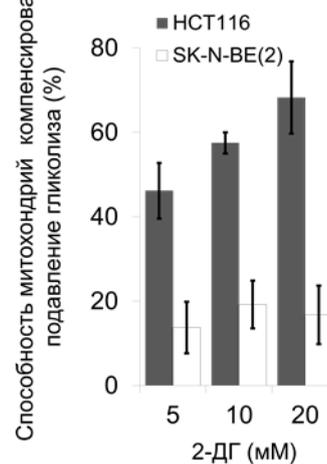
А**Б****В**

Рисунок 3. А) Оценка влияния 2-ДГ на потребление кислорода клетками HCT116 и SK-N-BE (2) проведенное на приборе Seahorse XF96, Б) Оценка влияния 2-ДГ на продукцию АТФ клетками методом измерения хемилюминесцентного сигнала в реакции люминол-люцифераза, 2-ДГ для подавления гликолитической составляющей продукции АТФ, олигомицин – для подавления митохондриальной продукции АТФ, В) Гистограмма результатов оценки компенсаторной роли митохондрий при подавлении продукции АТФ с помощью 2-ДГ.

Интересно отметить, что в клетках SK-N-BE(2) 2-ДГ сама по себе стимулировала апоптоз. Эффект зависел от концентрации 2-ДГ (Рис. 4А). В клетках НСТ116 при добавлении только 2-ДГ гибели не наблюдалось, что коррелирует с меньшей степенью падения АТФ в данных клетках при подавлении гликолиза (Рис. 3Б). Однако, вместо апоптоза, в клетках НСТ116 наблюдалась инициация аутофагии, детектируемой по появлению липидированной формы LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain) (Рис. 4А).

Как уже было упомянуто в литературном обзоре, помимо энергетики клетки 2-ДГ нарушает N-гликозилирование белков, что служит триггером инициации реакции несвернутых белков, и если клетка не справляется с нарушениями за этим следует индукция стресса эндоплазматического ретикулума (ЭПР) [175]. Обработка клеток 2-ДГ вызывала стресс ЭПР в клетках SK-N-BE(2) и, в большей степени, в клетках НСТ116, оцениваемого по накоплению белка GRP78/Bip, маркера данного процесса [176] (Рис. 4А). Индукция стресса ЭПР может привести к инициации как аутофагии, так и апоптоза, что наблюдалось в клетках SK-N-BE(2) и НСТ116, соответственно (Рис. 4А).

Стресс ЭПР, индуцированный 2-ДГ, можно подавить добавлением экзогенной маннозы, которая будет конкурентным образом предотвращать подавление гликозилирования. Действительно, как представлено на Рис. 4Б, манноза снижала вызванное 2-ДГ накопление GRP78/Bip. При этом в клетках SK-N-BE(2) добавление маннозы защищало от апоптоза, а в клетках НСТ116, манноза подавляла аутофагию (Рис. 4Б). Следует отметить, что 2-ДГ преимущественно вызывает апоптоз вследствие индукции стресса ЭПР, а не за счет подавления синтеза АТФ.

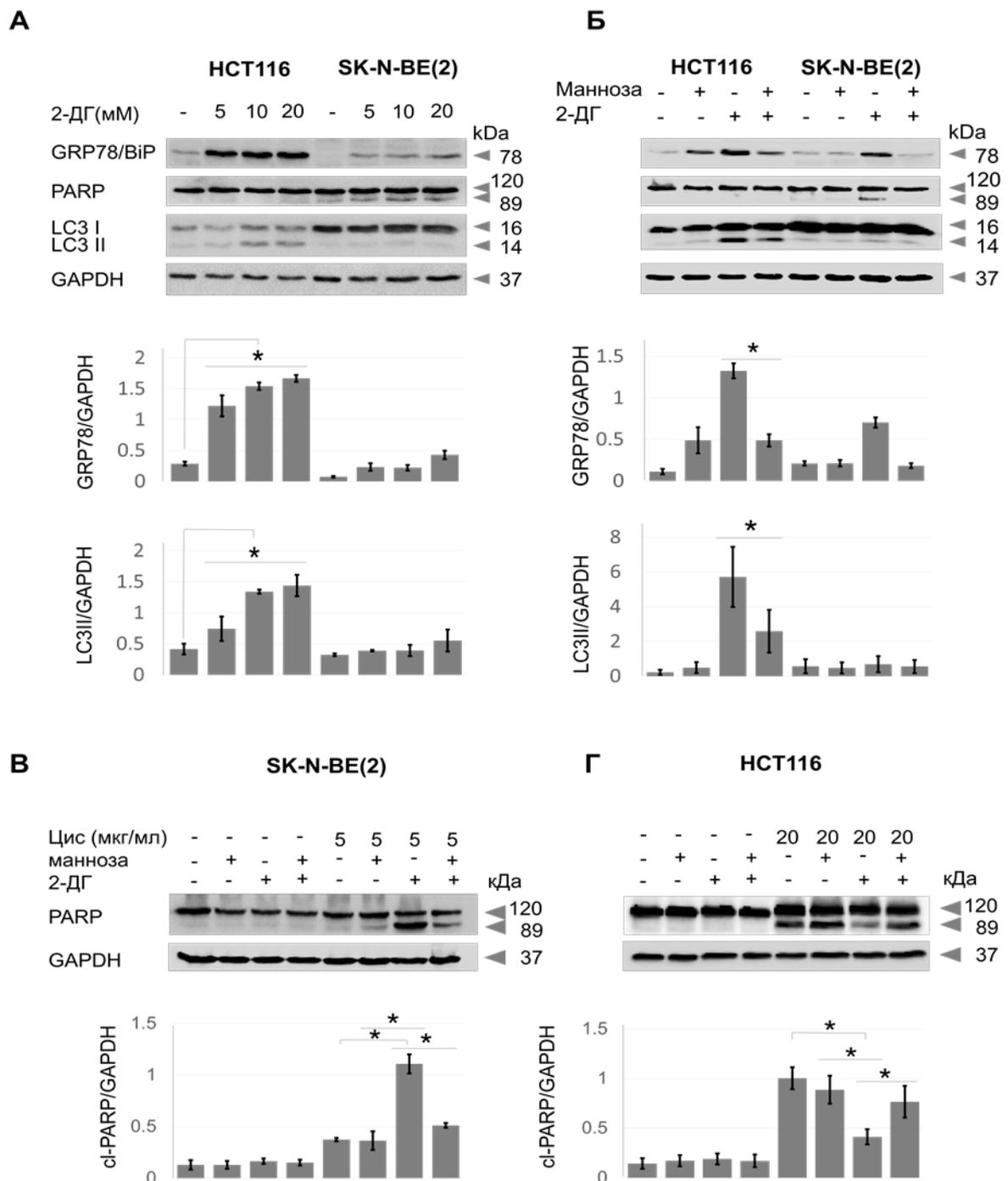


Рисунок 4. А) Оценка уровня апоптоза, стресса ЭПР и аутофагии методом вестерн-блот анализа соответствующих маркеров ПАРП (апоптоз), GRP78/BiP (стресс ЭПР), LC3I и LC3 II (аутофагия) при обработке клеток HCT116 и SK-N-BE(2) разными концентрациями 2-ДГ (5-20 мМ); Б) Оценка влияния подавления стресса ЭПР маннозой (10 мМ) на процессы апоптоза и аутофагии, вызванные обработкой 2-ДГ (20 мМ); Оценка влияния подавления индукции стресса ЭПР на чувствительность клеток к обработке цисплатином в комбинации с 2-ДГ клеток SK-N-BE(2) (В) и HCT116 (Г) методом вестерн-блот анализа расщепления ПАРП.

Как было продемонстрировано выше, 2-ДГ стимулировала вызываемый цисплатином апоптоз в клетках SK-N-BE(2), но подавляла гибель клеток в клетках НСТ116. Манноза, подавляя стресс ЭПР, соответственно предотвращала стимуляцию апоптоза, вызванную 2-ДГ, в обработанных цисплатином клетках SK-N-BE(2) (Рис. 4В). Апоптоз оценивали по накоплению фрагмента ПАРП. Обратный эффект наблюдали в клетках НСТ116, в которых манноза, подавляя аутофагию, напротив, усиливала вызываемый цисплатином апоптоз, сниженный в присутствии 2-ДГ (Рис. 4Г).

Учитывая, что инициация стресса ЭПР в клетках может привести как к апоптозу (SK-N-BE(2)), так и аутофагии (НСТ116), двум взаимосвязанным процессам, мы предположили, что модуляция уровня аутофагии в клетках может влиять на их чувствительность к терапии. Исходя из этого, следующая серия экспериментов была посвящена оценке роли аутофагии в ответе опухолевых клеток на комбинацию 2-ДГ с цисплатином. С этой целью была проведена оценка гибели клеток в условиях как подавления, так и стимуляции аутофагии. В качестве ингибитора и стимулятора аутофагии использовали бафиломицин и рапамицин, соответственно. Эффект бафиломицина основан на подавлении стадии слияния аутофагосом и лизосом. Рапамицин, в свою очередь, ингибирует Ser/Thr протеин-киназу mTOR, важного регулятора синтеза белков и клеточной энергетике.

В клетках НСТ116, в которых 2-ДГ защищала от гибели, ингибитор аутофагии бафиломицин обращал ингибирующее действие 2-ДГ и стимулировал апоптоз (Рис. 5В). Тогда как инициация аутофагии рапамицином в клетках SK-N-BE(2) снижала стимулирующий эффект 2-ДГ в клетках, обработанных цисплатином (Рис. 5Г).

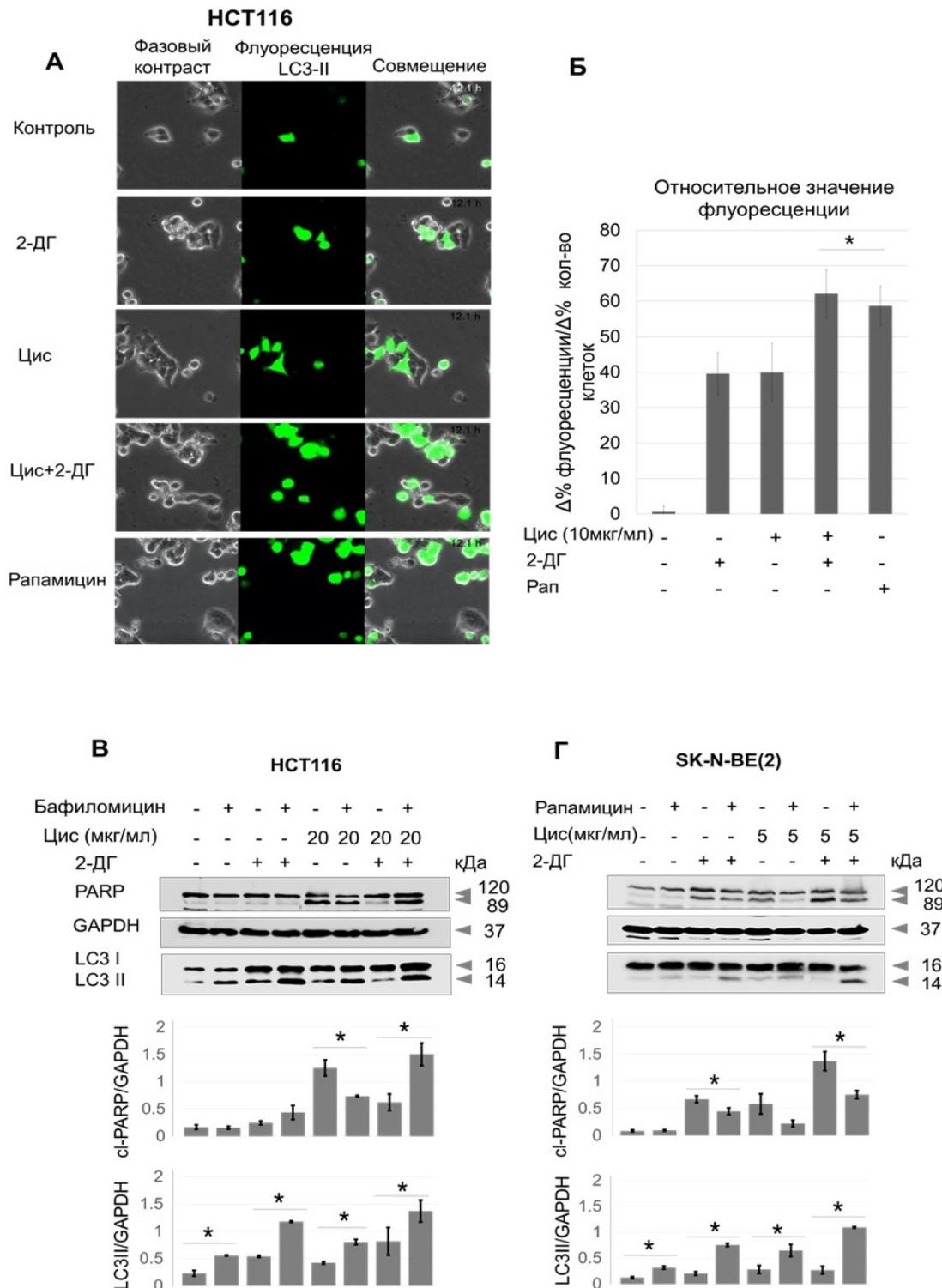


Рисунок 5. Оценка роли аутофагии в чувствительности клеток к обработке цисплатином в комбинации с 2-ДГ. Для активации и подавления аутофагии использовали рапамицин (200 нМ) и бафиломицин (100 нМ), соответственно. А) Оценка динамики активации аутофагии в клетках НСТ116, обработанных 2-ДГ и цисплатином с помощью метода конфокальной микроскопии (прижизненная съемка, время инкубации 24 ч). Б) Значения флуоресценции LC3 представлены в виде гистограммы; Оценка по расщеплению ПАПР апоптоза в клетках НСТ116 (В) и SK-N-BE(2), (Г) при модуляции аутофагии; в качестве контроля загрузки геля использовали GAPDH

Таким образом, ответ опухолевых клеток на терапию формируется сопутствующими процессами и в значительной степени зависит от чувствительности клеток к аутофагии и стрессу ЭПР.

3.2. Роль депривации глутамина в модуляции ответа клеток на терапевтические средства

Как отмечалось в обзоре литературы, выживание опухолевых клеток зависит помимо глюкозы и от глутамина. Это дает возможность использовать зависимость от глутамина в качестве мишени для их элиминации.

Для выяснения роли глутамина в чувствительности опухолевых клеток к воздействию гибели клеток Tet21N инициировали как этопозидом, так и цисплатином в присутствии и отсутствии глутамина в среде культивирования. Уровень гибели оценивали по расщеплению ПАРП, субстрата каспазы-3, и измерению каспазной активности. Удаление глутамина из культуральной среды стимулировало апоптоз, индуцированный цисплатином, но снижало гибель, вызванную этопозидом. Стимуляцию клеточной гибели наблюдали спустя 14, 24 и 48 ч инкубации с цисплатином в концентрациях 5 мкг/мл и 10 мкг/мл (Рис. 6). Эффект стимуляции апоптоза, вызванного цисплатином при удалении глутамина также наблюдали на клетках нейробластомы SH-SY5Y и колоректального рака HCT116 (Рис. 6). Следует подчеркнуть, что на всех упомянутых клеточных линиях удаление глутамина из среды усиливало гибель, вызванную цисплатином, но снижало апоптоз, индуцированный этопозидом.

Известно, что каспаза-3 может расщепляться как каспазой-8 (внешний путь стимуляции апоптоза), так и каспазой-9 (внутренний путь стимуляции апоптоза). Для выяснения механизмов активации каспазы-3 была проведена оценка процессинга каспаз-8 и -9. Как цисплатин, так и этопозид, вызывали процессинг каспазы-8. Удаление глутамина из среды стимулировало

расщепление каспазы-8, вызванное цисплатином, но подавляло при индукции апоптоза этопозидом (Рис. 6).

Каспаза-8 может расщеплять не только каспазу-3, но и про-апоптотический белок Bid семейства Bcl-2, стимулируя митохондриальный путь апоптоза. Как сказано выше при расщеплении образуется форма tBid, которая встраивается во внешнюю мембрану митохондрии и вызывает олигомеризацию Bax и Bak, способных формировать пору во внешней митохондриальной мембране, через которую в цитозоль выходят про-апоптотические факторы, включая цитохром *c*. В наших условиях, удаление глутамина снижало содержание расщепленной формы tBid при индукции апоптоза этопозидом, но увеличивало при стимуляции гибели клеток цисплатином, что коррелировало с изменением активности каспазы-8. Выйдя в цитозоль, цитохром *c* вместе с белками Araf-1 и про-каспазой-9 в присутствии dATФ или АТФ формирует апоптосому, служащую платформой для активации каспазы-9. Как и ожидалось, удаление глутамина подавляло процессинг каспазы-9, индуцированный этопозидом, но стимулировало процессинг, вызываемый цисплатином (Рис. 7). Полученные данные указывают на разнонаправленную модуляцию митохондриального пути апоптоза, вызываемого удалением глутамина из среды культивирования.

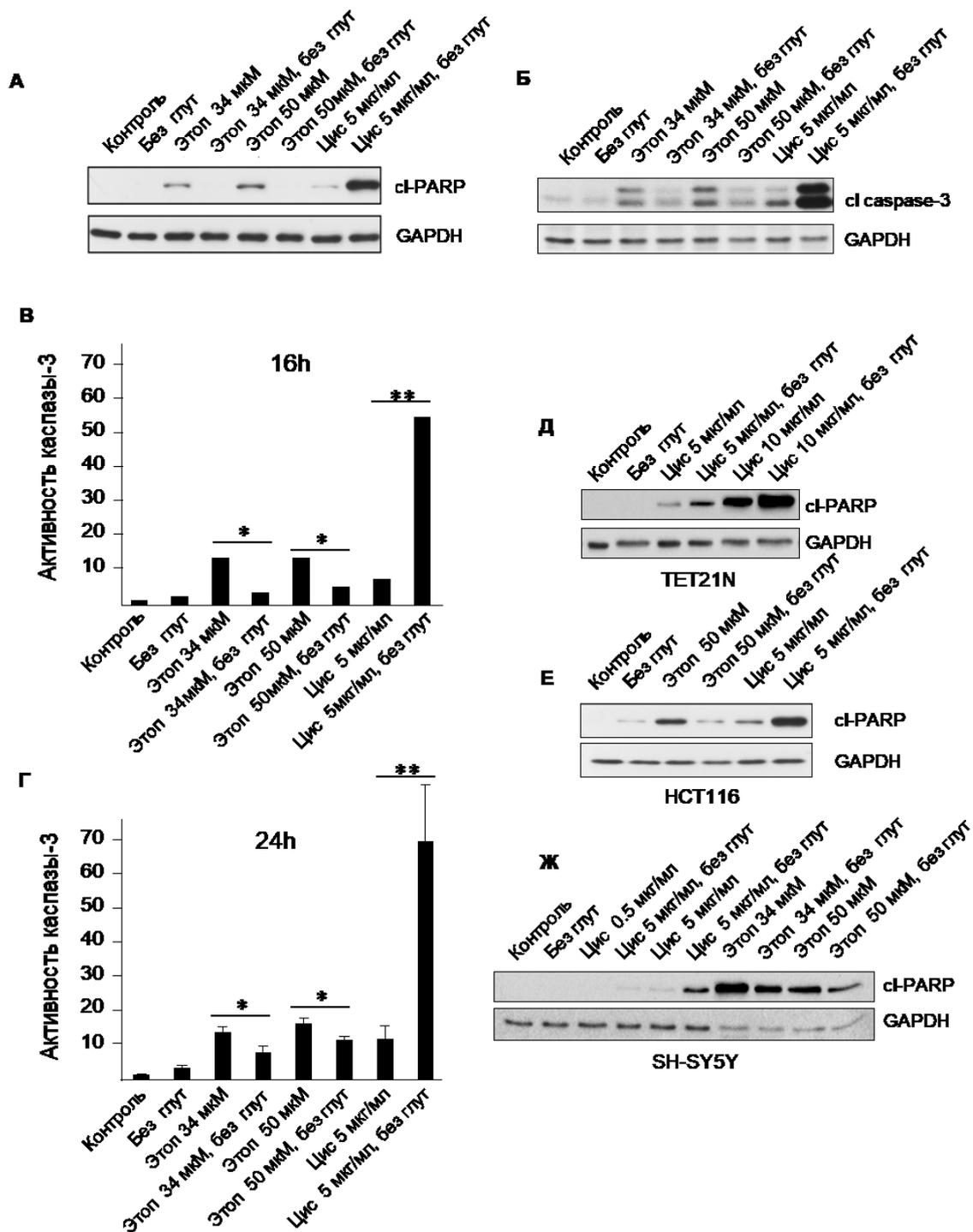


Рисунок 6. Оценка апоптоза в клетка TET21N, обработанных цисплатином и этопозидом (24 ч инкубации) в комбинировании с депривацией глутамина методами вестерн-блот анализа и измерения активности каспазы-3. А), Оценка расщепления PARP, Б), Оценка расщепления каспазы-3, В), Измерение каспазной активности, Г), Оценка расщепления PARP после обработки в течение 14 ч, Д), стимуляция активности каспазы-3 и расщепления PARP через 24 и 48 ч инкубации, Е, Ж) оценка расщепления PARP в клетках SH-SY5Y и HCT116; (в качестве контроля загрузки геля использовали GAPDH) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

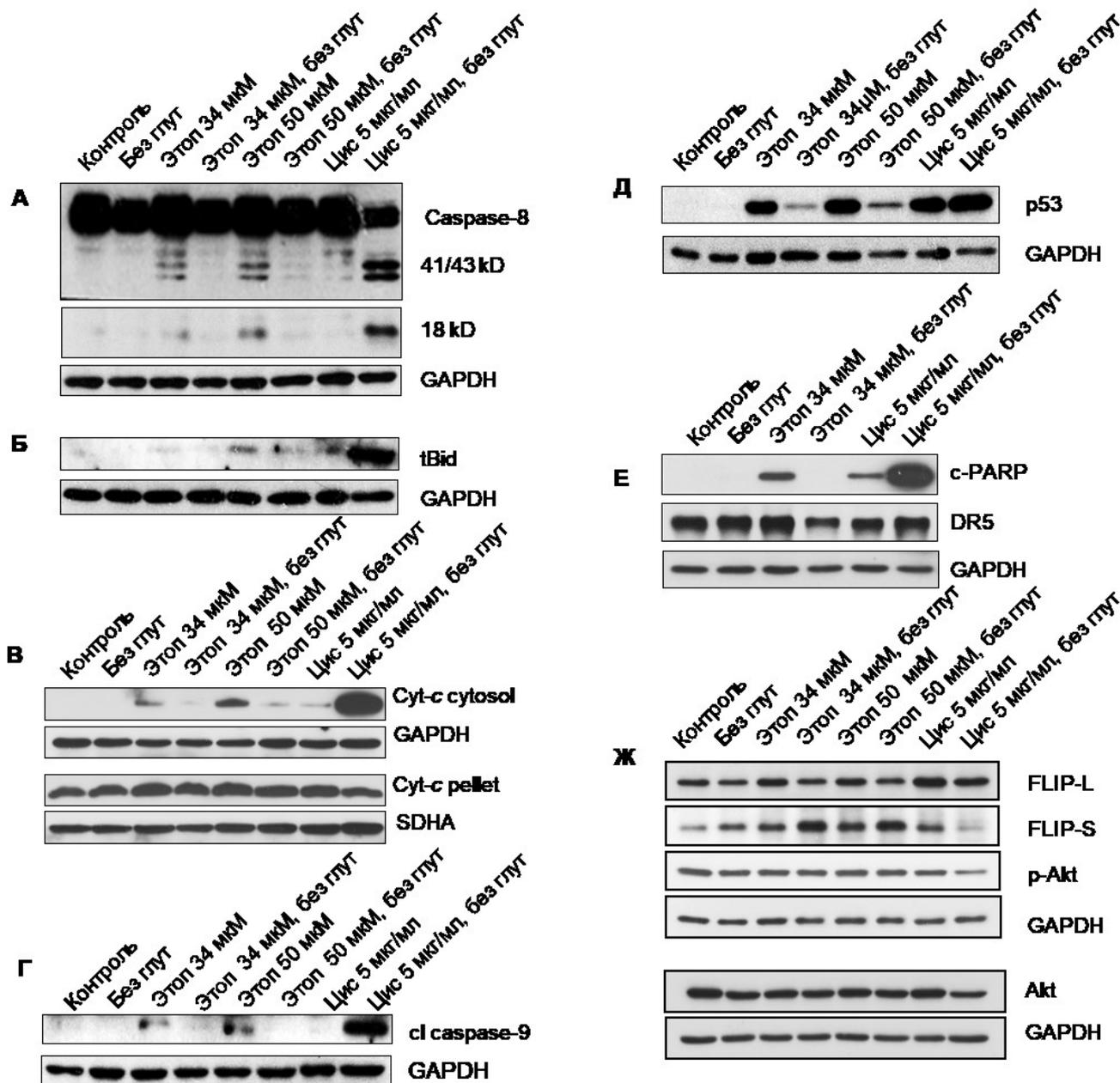


Рисунок 7. Исследование механизмов инициации апоптоза в клетках TET21N, обработанных цисплатином и этопозидом в комбинации с депривацией глутамин в процессе 24 ч инкубации. Данные вестерн-блот анализа. А) Оценка расщепления каспазы-8, Б) Оценка расщепления Bid, В) выход цитохрома *c* из митохондрий (метод фракционирования клеток на цитозоль и мембранную фракции), Г) расщепление каспазы-9, Д) экспрессия p53, Е) экспрессия DR5, Ж) экспрессия FLIP, Akt и p-Akt; в качестве контроля загрузки геля использовали GAPDH и SDHA

3.3 Удаление глутамина модулирует активность каспазы-8.

Каспаза-8 активируется при участии рецептора DR5/Fas/CD95/Apo-1. Гомоолигомеризация DR5 приводит к рекрутированию FADD (Fas-associated protein with Death Domain) и каспазы-8 для сборки комплекса DISC. Активацию DR5 вызывает транскрипционный фактор p53 в ответ на повреждение ДНК [176]. Оценка содержания p53 в клетках, обработанных как этопозидом, так и цисплатином, показала, что содержание p53 в ответ на удаление глутамина меняется по-разному – уровень p53 в клетках, обработанных этопозидом снижался, но в клетках, обработанных цисплатином содержание p53 даже несколько увеличилось (Рис. 7). Аналогичная тенденция изменения экспрессии была обнаружена для DR5 (Рис. 7).

По-видимому, небольшое изменение содержания рецептора DR5 при удалении глутамина вряд ли способно обусловить значительную активацию каспазы-8 в клетках, обработанных цисплатином. Известно, что активность каспазы-8 может регулироваться эндогенным ингибитором FLIP (FADD-like IL-1 β -converting enzyme-inhibitory protein). Поэтому, для исследования механизма активации каспазы-8, помимо оценки экспрессии DR5, был проведен анализ содержания данного ингибитора [176]. Существуют две изоформы белка – длинная структура FLIP-L и короткая FLIP-S, которая и способна ингибировать каспазу-8 [177]. Оценка уровня FLIP-S показала его корреляцию как со стимуляцией апоптоза, вызванного цисплатином, так и с ингибированием клеточной гибели при удалении глутамина из среды культивирования (Рис. 7).

Учитывая роль серин-протеиновой киназы Akt [178] в регуляции FLIP, была проведена оценка содержания этого фермента и его фосфорилированной (активированной) формы в клетках, обработанных цисплатином либо этопозидом, в присутствии и отсутствии глутамина. Удаление глутамина приводило к снижению содержания Akt и ее фос

фосфорилированной формы pAkt в клетках, обработанный цисплатином, что коррелировало со снижением уровня FLIP-S (Рис. 7).

3.4 Роль АФК в стимуляции апоптоза, индуцированного цисплатином и депривацией глутамина.

Одним из факторов, регулирующих сигнальный путь Akt являются АФК. Поскольку глутамин является предшественником антиоксиданта глутатиона, его удаление может приводить к значительным изменениям окислительно-восстановительного баланса клетки. Действительно, согласно результатам анализа концентрации сульфгидрильных групп (SH-групп) как свободных, так и связанных с белками, депривация глутамина приводила к существенному снижению их содержания (Рис. 8). Для того, чтобы определить, является ли стимуляция апоптоза, вызванного цисплатином, результатом снижения содержания глутатиона в клетке, в качестве положительного контроля использовали ингибитор его синтеза BSO (buthionine sulphoximine). В данном случае BSO выступает в роли миметика окислительного стресса. Поскольку обе используемые концентрации (200 мкМ и 500 мкМ) вызывали снижение уровня SH-групп, для дальнейшей работы использовали низкую концентрацию. BSO в концентрации 200 мкМ стимулировал апоптоз, индуцированный как цисплатином, так и этопозидом, оцениваемый по расщеплению PARP (Рис. 8). По-видимому, снижение содержание глутатиона в ответ на удаление глутамина способно объяснить стимуляцию апоптоза в ответ на действие цисплатина, однако, в случае с этопозидом, главную роль в регуляции ответа клетки играет подавление экспрессии p53.

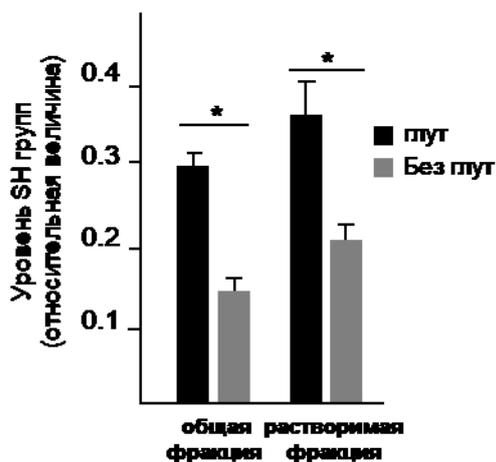
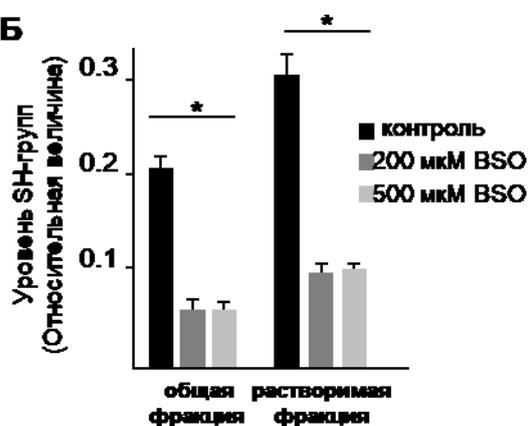
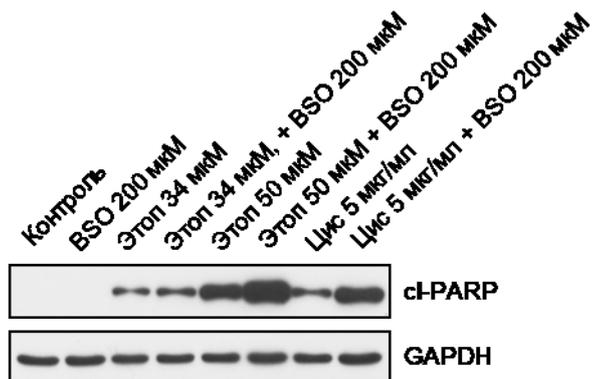
А**Б****В**

Рисунок 8. Роль уровня тиольных групп в ответе TET21N клеток на индукцию апоптоза. Анализ общей фракции и фракции растворенных SH групп. А) модуляция уровня SH групп при депривации глутамина, Б) при обработке ингибитором синтеза глутатиона BSO, В) оценка расщепления, маркера апоптоза PARP, при обработке клеток ингибитором BSO в комбинации с депривацией глутамина; в качестве контроля загрузки геля использовали GAPDH, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Учитывая важную роль АФК в регуляции сигнального пути Akt, был проведен анализ уровня АФК в клетках, обработанных цисплатином в присутствии либо отсутствии глутамина. Удаление глутамина из среды несколько повышало уровень АФК, оцениваемый с помощью сенсора супероксид радикала, генерируемого в митохондриях - MitoSox Red (Рис. 9). Оценку проводили как методами проточной цитометрии, так и конфокальной микроскопии. Обработка клеток цисплатином не увеличивала сколь-либо содержание АФК в клетках, однако удаление глутамина значительно усиливало окислительный стресс (Рис. 9). Напротив, при обработке клеток этопозидом удаление глутамина не стимулировало, а даже несколько снижало продукцию супероксид радикала. Участие АФК в стимуляции апоптоза, вызванного цисплатином, в условиях удаления глутамина было подтверждено в экспериментах с антиоксидантом NAC (N-acetylcysteine) в качестве негативного контроля. NAC подавлял как процессинг каспазы-8 в клетках, обработанных цисплатином после удаления глутамина, так и активность каспазы-3 (Рис. 9). В то же время, добавление NAC не оказывало сколь-либо значительного эффекта на апоптоз, индуцированный этопозидом. Таким образом, АФК играют ведущую роль в стимуляции апоптоза, вызываемого цисплатином при удалении глутамина.

Полученные результаты указывают на важную роль каспазы-8 в стимуляции апоптоза, в условиях депривации глутамина. Для подтверждения этого вывода была проведена серия экспериментов на клетках нейробластомы SK-N-BE(2), в которых подавлена экспрессия каспазы-8 вследствие метилирования гена *Casp8* [179,180] (Рис. 9).

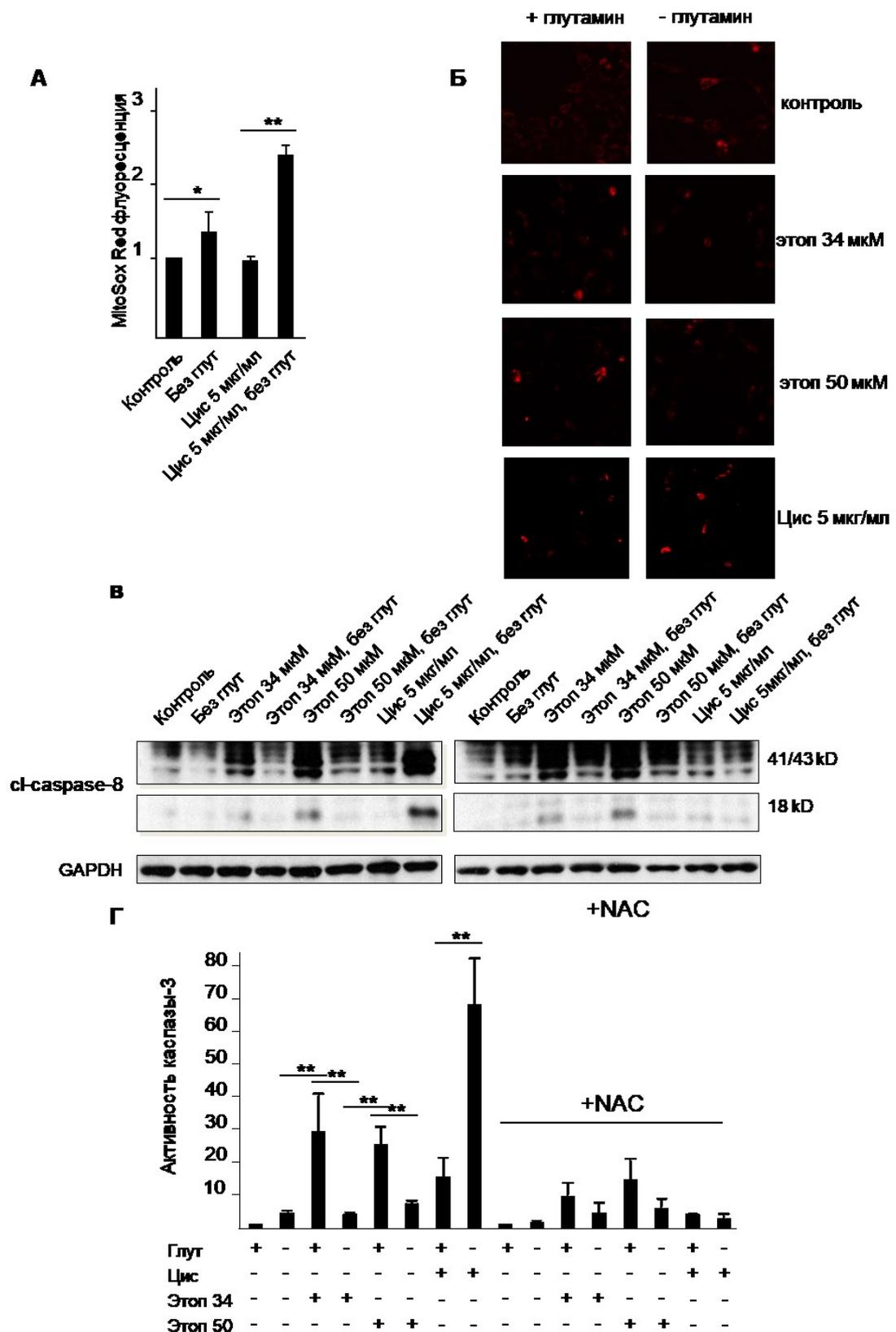


Рисунок 9. Роль АФК в индукции апоптоза при комбинировании цитотоксических агентов с депривацией глутамина. А) Оценка продукции OH^{\cdot} методом цитофлуориметрии и Б) методом конфокальной микроскопии после окраски MitoSoxTM Red; В) подавление расщепления каспазы-8 (вестерн-блот анализ) и Г) активности каспазы-3 при обработке клеток антиоксидантом N-ацетилцистеином (NAC), в качестве контроля загрузки геля использовали GAPDH, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Было проведено сравнение результатов измерения процессинга каспазы-8 и активности каспазы-3 с помощью вестерн-блот анализа и расщепления флуоресцентного субстрата, соответственно, в клетках SK-N-BE(2) и TET21N. В отличие от TET21N, в которых депривация глутамина и ее комбинирование с этопозидом и цисплатином приводили к процессингу каспазы-8 и активации каспазы-3, в клетках SK-N-BE(2), вследствие отсутствия каспазы-8, стимуляции апоптоза не наблюдалась.

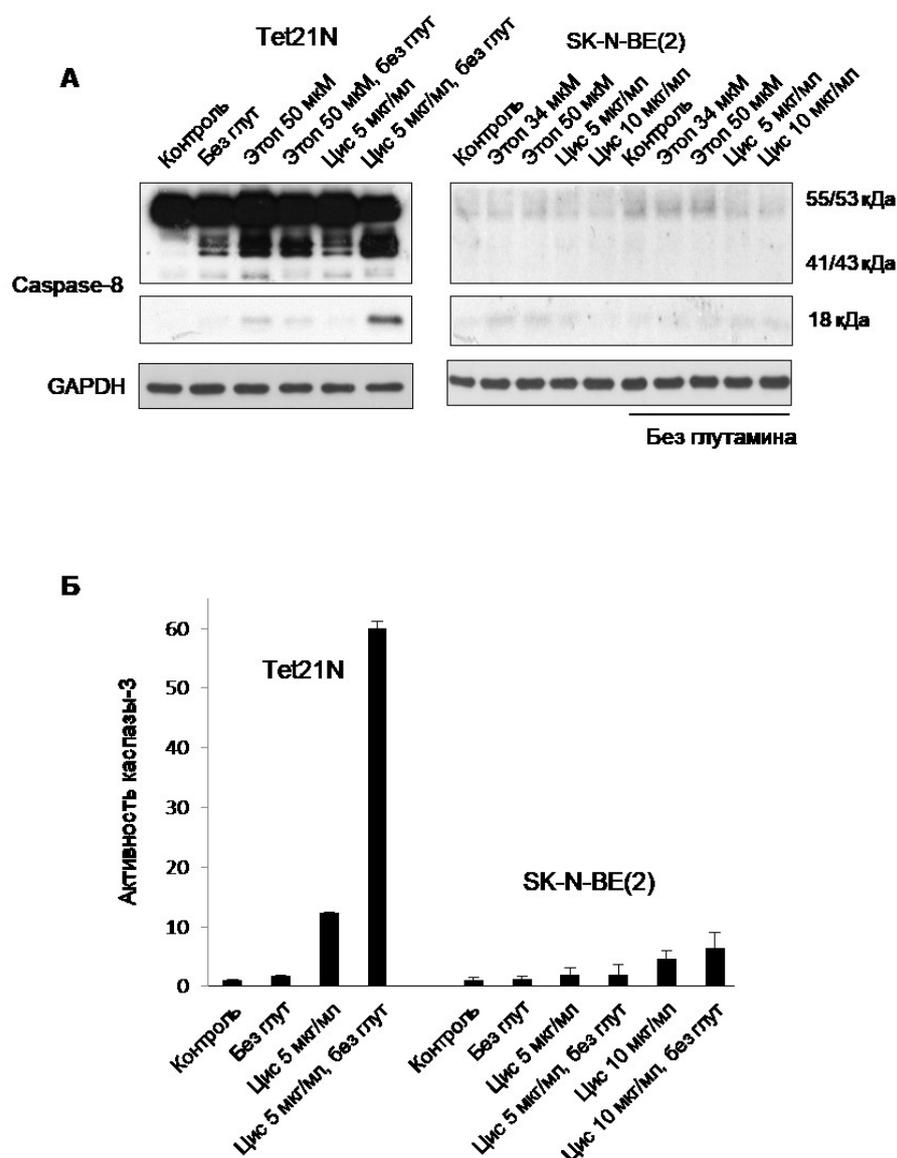


Рисунок 10. Данные сравнения индукции апоптоза в клетках TET21N, обработанных цисплатином и этопозидом в комбинировании с депривацией глутамина и на клетках SK-N-BE (2), в которых отсутствует каспаза-8. А) Оценка расщепления каспазы-8 методом вестерн блот анализа, Б) оценка активности каспазы-3, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

3.5. Повышение эффективности бетулиновой кислоты (БК) вследствие ее селективного таргетирования в митохондрии

Помимо воздействия на гликолиз либо глютаминолиз, перспективным направлением является непосредственное воздействие на митохондрии – органеллы, играющие ведущую роль в стимуляции клеточной гибели. Среди соединений митохондриальной направленности выделяют такие вещества как бетулин, БК и урсоловая кислота, которые стимулируют митохондриальный путь апоптоза в различных опухолевых клетках [160,181,182]. Так, известно, что БК вызывает апоптоз в клетках меланомы, карциномы легких, яичников и нейроэктодермальных опухолей через механизм индукции окислительного стресса [183,184]. Так, БК вызывает продукцию АФК, что ведет к ПВММ, выходу про-апоптотических белков (цитохрома *c*, Smac, AIF) в цитозоль и активации каспаз [185,186]. В экспериментах *in vitro* урсоловая кислота подавляла рост опухолевых клеток вследствие ингибирования сигнального пути STAT3 [187,188]. Механизм действия урсоловой кислоты также включает ингибирование репликации ДНК, стимуляцию продукции АФК и воздействие на баланс про- и анти-апоптотических белков [189,190].

Преимущество использования агентов производных из растений в терапии заключается в низкой токсичности препаратов для нормальных клеток, что было показано в экспериментах *in vivo* на модели ксенографта [190–192]. Однако, препятствием для применения тритерпеновых кислот в клинике является невысокая противоопухолевая эффективность, высокая гидрофобность и низкая растворимость в крови.

Эффективность БК и других противоопухолевых препаратов можно усилить, присоединив положительно заряженную молекулу TPP⁺. Благодаря положительному заряду, TPP⁺ способен накапливаться в митохондриях и, соответственно, транспортировать в эти органеллы препараты, стимулирующие митохондриальный путь апоптоза.

Группа TTP⁺ была присоединена к молекулам БК и урсоловой кислот в позиции С-28 углеродного скелета тритерпеноидов с образованием гидрофобной связи с n-бутил или гидрофильной с триэтиленгликолем. Кроме того, TTP⁺ был конъюгирован с дихлорацетатом, ингибитором киназы пируват дегидрокиназы PDK [193]. Ингибирование PDK стимулирует активность PDH, что усиливает окисление пирувата в митохондриях. Воздействие дихлорацетатом на клетки ведет к повышению активности митохондрий, снижению митохондриального потенциала, вследствие его расходования на синтез АТФ, и стимуляции продукции АФК в опухолевых клетках, не оказывая значительного эффекта на здоровые [194]. Ранее [195] на опухолях различной этиологии был показан синергичный цитотоксический эффект производных БК, конъюгированной с дихлорацетатом.

Для оценки действия производных БК и УК как индукторов клеточной гибели были использованы клеточные линии MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) и TET21N (нейробластома). Для сравнения были взяты нормальные клетки – спленоциты мышей. Анализ токсичности препаратов был проведен с помощью теста МТТ. Результаты представлены на рисунке 11 и в таблице 1.

Производное 9 обладало самым сильным цитотоксическим эффектом (IC_{50} 0,70-0,74 мкМ). Противоопухолевой активностью обладали и другие синтезированные TTP⁺ соли производные лупановых тритерпеноидов, конъюгированных с ацетатом или дихлорацетатом в позиции С-3, но агенты проявляли меньшую аффинность ($IC_{50} < 1$ мкМ). Так, для производных БК 6 и 7 на клетках MCF-7 IC_{50} составляла 0,80 и 0,85 мкМ, соответственно, для агентов 7, 10 и 15 на клетках TET21N IC_{50} составляла 0,98 мкМ, 0,95 мкМ и 0,81 мкМ, соответственно. Производные урсоловой и лупановой кислот, полученные конъюгированием TTP⁺ с дихлорацетатом, не обладали значительной противоопухолевой активностью в сравнении с исходными

молекулами тритерпеноидов. На клетках TET21N производное 9 обладало наибольшей эффективностью, далее по силе цитотоксического действия следуют агенты 7 и 10 (таблица 1). Производные, полученные конъюгированием с группами n-бутила и триэтиленгликоля, также не обладали повышенным цитотоксическим эффектом в сравнении с исходными молекулами. Необходимо отметить, что строение тритерпенового углеродного скелета влияет на противоопухолевую эффективность производных ТТР⁺. Так, отмечено что соли производных лупана обладали повышенной противоопухолевой эффективностью в сравнении с аналогичными производными (те же реакции конъюгирования) урсоловой кислоты. БК и производные, полученные конъюгированием БК и УК с дихлорацетатом (БК-DCA и УК-DCA, соответственно), обладали низким цитотоксическим эффектом в сравнении с производными ТТР⁺. Так, на клетках TET21N и MCF-7 данные агенты были неэффективны и параметр IC_{50} составлял 4,91 мкМ и 15,89 мкМ для БК-DCA и более 10 мкМ и 20 мкМ для УК-DCA, соответственно (таблица 1).

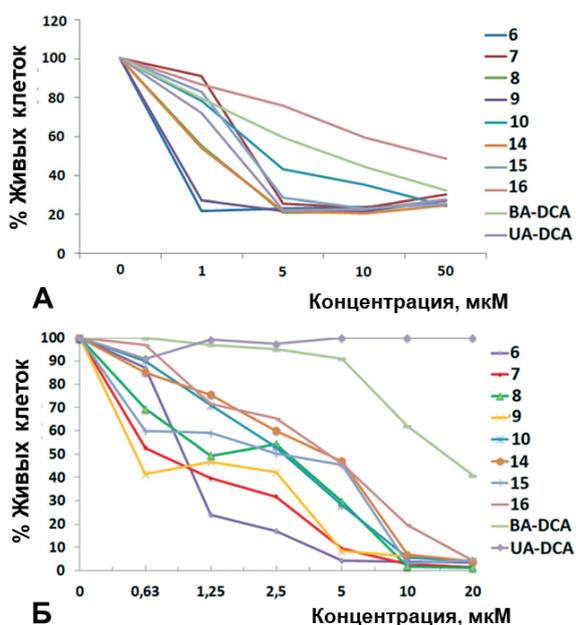


Рисунок 11. Оценка уровня клеточной гибели при обработке клеток TET21N и MCF-7 ТТР⁺-производными БК и урсоловой кислоты методом МТТ теста.

Учитывая это, для дальнейших экспериментов были выбраны производные БК 6-10, которые оказывали наибольший цитотоксический эффект из всего ряда синтезированных соединений.

Test compound	TET21N	MCF-7
6	1.26 ± 0.18	0.80 ± 0.08
7	0.98 ± 0.11	0.85 ± 0.09
8	1.28 ± 0.18	1.51 ± 0.13
9	0.74 ± 0.14	0.70 ± 0.11
10	0.95 ± 0.15	2.31 ± 0.09
14	4.4 ± 0.34	2.76 ± 0.21
15	0.81 ± 0.08	1.59 ± 0.11
16	1.18 ± 0.16	3.90 ± 0.06
BA-DCA	4.9 ± 0.2	15.89 ± 0.19
UA-DCA	>10	>20
BA	—	>25

Таблица 1. Значения IC_{50} для производных БК и урсоловой кислоты при обработке клеток TET21N и MCF-7.

Мишенью БК являются митохондрии. Для изучения механизмов действия синтезированных агентов была проведена серия экспериментов по оценке потребления кислорода клетками, обработанными БК и ее производными. Для оценки дыхания клеток использовали прибор Seahorse Analyzer XF (Рис. 12). В процессе измерения к клеткам добавлялись различные модуляторы митохондриальной активности: олигомицин, для подавления АТФ-синтазы, протонофор СССР, разобщитель окисления и фосфорилирования, использовали для сброса мембранного потенциала митохондрий и оценки максимальной митохондриальной активности. Ингибиторы комплексов ЭТЦ, ротенон (I комплекс) и антимицин (III комплекс), использовали для оценки немитохондриального потребления кислорода.

Как представлено на Рис. 12 для производных БК 7 и 9 наблюдали концентрационно-зависимый эффект подавления дыхания. Результаты

данного эксперимента подтверждают, что митохондрии являются мишенью воздействия производных ТТР⁺ солей БК.

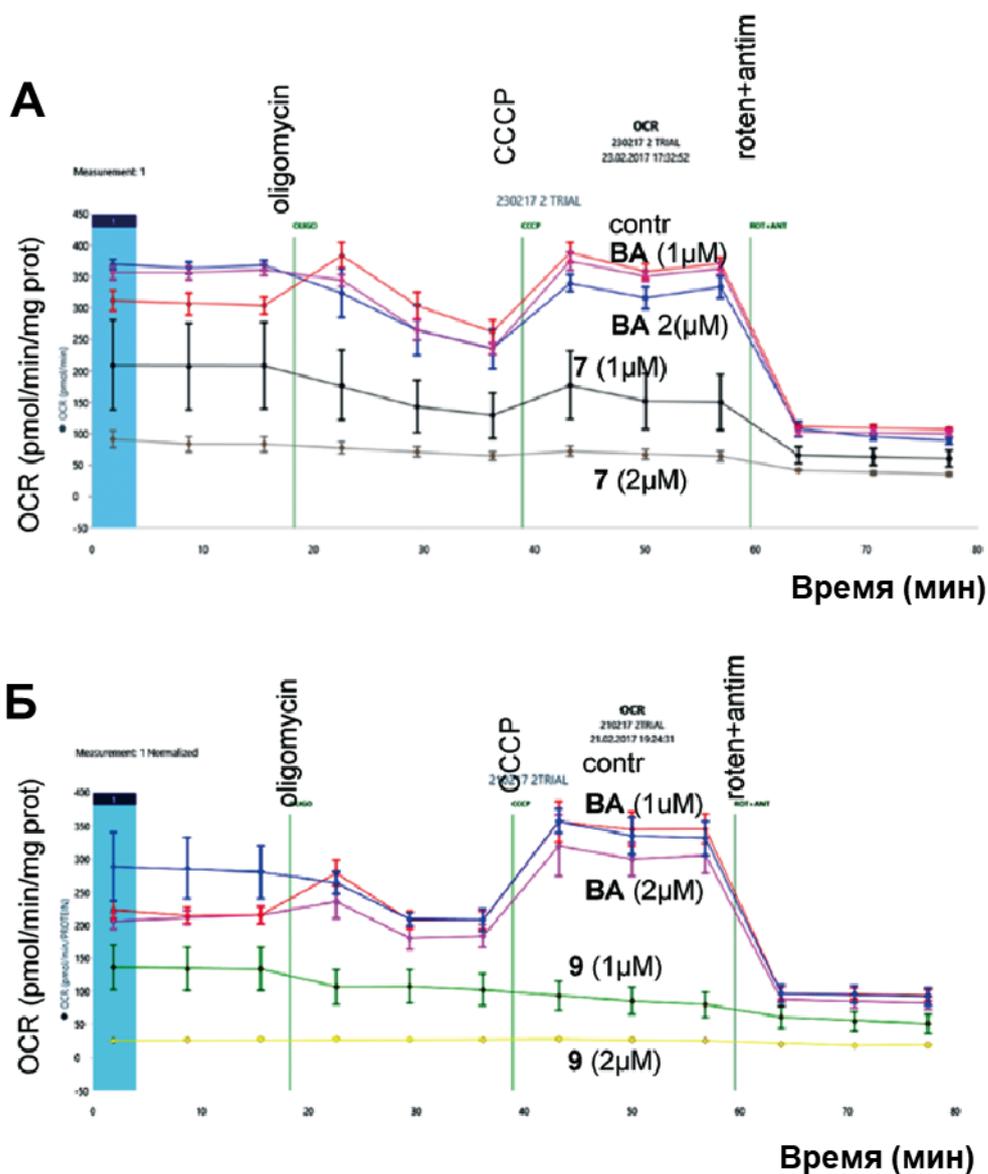


Рисунок 12. Оценка потребления кислорода (OCR-oxygen consumption rate) клетками HCT116 при обработке БК и ее производными (7 и 9), 24 ч инкубации

Для анализа противоопухолевой активности производных БК в первую очередь была проведена оценка уровня клеточной гибели, индуцированной воздействием немодифицированной БК. Для оценки апоптоза использовали такие параметры как расщепление ПАРП, субстрата каспазы-3. Используемые опухолевые клеточные линии проявили различную

чувствительность к БК (Рис. 13А); наиболее чувствительными оказались клетки ТЕТ21N. Для остальных клеток требовалась значительно более высокая концентрация агента. Согласно полученным результатам оценки эффективности БК, для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация, которая вызывала незначительный уровень клеточной гибели. Оценку эффективности синтезированных производных проводили по отношению к выбранной концентрации БК (т.к. целью являлось снизить концентрацию цитотоксического препарата, обладающего повышенным противоопухолевым эффектом).

Как уже отмечалось, стимуляция митохондриального пути апоптоза начинается с ПВММ и выходом в цитозоль цитохрома *c*. Для подтверждения того, что БК и ее производные вызывают апоптоз, а не иной тип клеточной гибели, были проведены эксперименты по оценке выхода цитохрома *c* из митохондрий после фракционирования клеток на мембранную и цитозольную фракции с последующим вестерн-блот анализом (Рис. 13Б). Согласно полученным результатам, конъюгаты БК с TTP⁺ были существенно эффективнее в сравнении с самой БК: в концентрации 3,5 мкМ БК не вызывала выход цитохрома *c*, тогда как обработка конъюгатом с TTP⁺ приводила к инициации апоптоза. Следующим шагом при оценке цитотоксичности препаратов был анализ каспазной активности. Эксперименты показали, что TTP⁺-производное БК под номером 9 значительно эффективнее в индукции апоптоза, чем БК (Рис. 13В). В дополнение к упомянутым методам, оценку апоптоза проводили, анализируя количество клеток со сниженным содержанием ДНК – популяция subG1 (Рис. 14). Согласно полученным результатам БК не вызывала гибель клеток НСТ116, тогда как обработка клеток ее производными TTP⁺ под номерами 6-9 приводила к индукции апоптоза, что видно по появлению пика subG1, соответствующего фрагментированной ДНК. Таким образом, с помощью ряда методов оценки цитотоксичности агентов нами было

продемонстрировано, что синтезированные производные БК, конъюгированные с ТТР⁺, обладают повышенным противоопухолевым эффектом в сравнении с исходной БК.

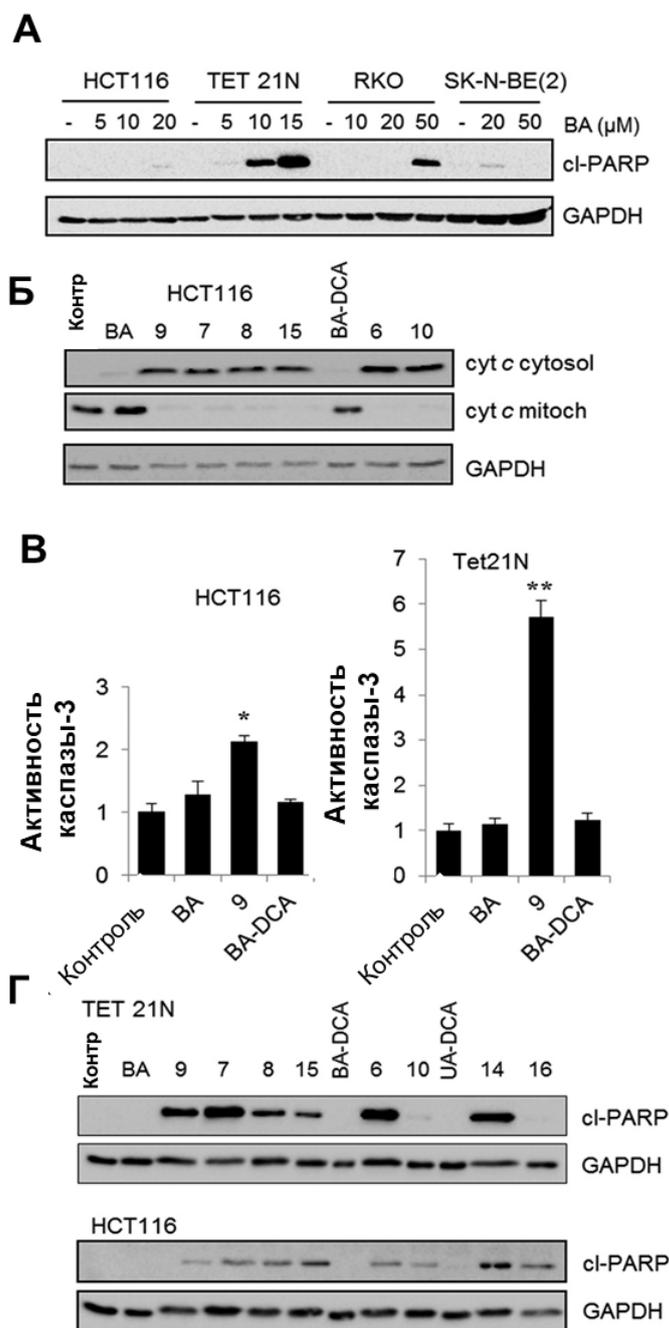


Рисунок 13. А) Оценка чувствительности опухолевых клеток линий HCT116, TET21N, RKO и SK-N-BE (2) к БК в концентрации 5 – 50 мкМ методом вестерн-блот анализа маркера апоптоза – расщепления ПАРП, Б) оценка выхода цитохрома *c* при обработке клеток HCT116 БК (3,5 мкМ) и ее аналогами (3,5 мкМ) методом фракционирования клеток с последующим вестерн-блот анализом цитозольной и мембранной фракций, В) оценка активности каспазы-3 в клетках HCT116 и TET21N при обработке БК, производным БК №9 и БК-DCA. В качестве контроля загрузки геля использовали GAPDH.

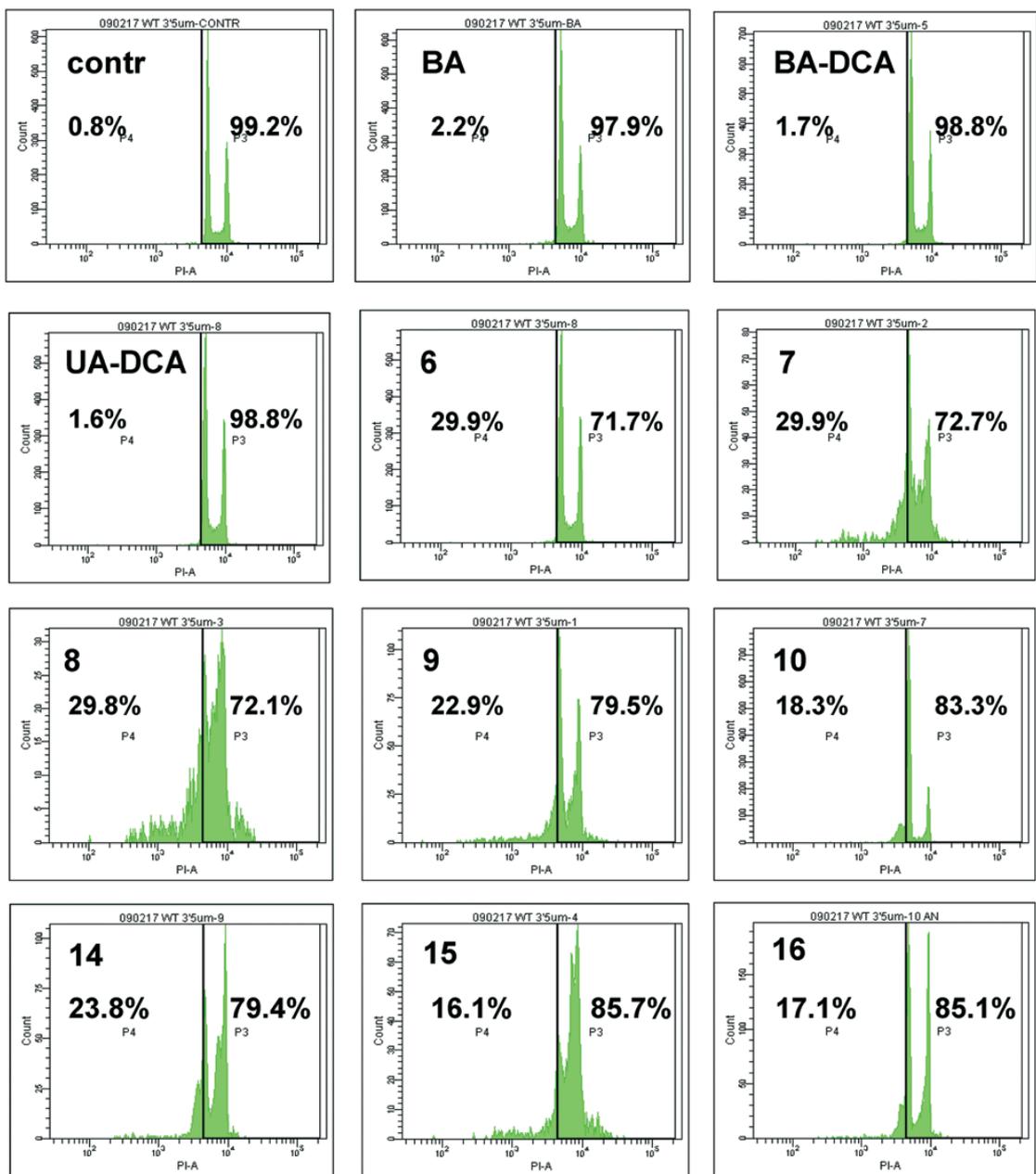


Рисунок 14. Оценка индукции клеточной гибели НСТ116 при обработке БК и ее производными методом проточной цитофлуориметрии по появлению субпопуляции subG1 (на гистограмме популяция P4).

3.6. Использование наночастиц для доставки терапевтических средств к митохондриям

Другим способом доставки терапевтических средств является доставка с использованием наночастиц. Наномедицина одно из самых быстроразвивающихся направлений в области нанобиотехнологий и их применения в медицине. Наночастицы могут быть синтезированы из различных материалов, и в зависимости от этого обладать соответствующими физико-химическими параметрами, такими как емкость для загрузки препарата [196–198], флуоресценция [199], парамагнетизм [200,201], чувствительность к фото- [202,203], ультразвуковому [204,205] и радиочастотному облучению [206] и др. Применение наночастиц с подобранными упомянутыми параметрами улучшает терапевтический индекс препарата, повышая эффективность и/или снижая токсичность. Применение наночастиц позволяет пролонгировать эффект агента в организме, также возможно использование дополнительных стимулов (облучение) для инициации выхода препарата из "контейнеров". Такая таргетная доставка должна обеспечивать повышение чувствительности клеток к агентам, а также должна дать возможность визуализации доставки в процессе терапии.

Необходимо учитывать, что таргетная доставка агентов с использованием наночастиц влияет на механизмы проникновения доставляемых молекул в клетку и их метаболизм, таким образом важно изучение механизмов цитотоксичности и инициации клеточной гибели при использовании наночастиц, синтезированных из различных материалов. Задачей данной работы служила проверка эффективности доставки препаратов с помощью биоразлагаемых кремниевых наночастиц PSi NPs (porous silicon nanoparticles).

В настоящей работе исследованы механизмы интернализации клетками наночастиц PSi NPs, загруженных цитотоксическим препаратом доксорубицином (DOX), и данные по распределению наночастиц в клетке.

Помимо изучения доставки препарата наночастицами целью работы также являлось исследование механизмов инициации и типа клеточной гибели в результате обработки наночастицами DOX-PSi NPs. Согласно оценке маркеров клеточной гибели, обработка пустыми наночастицами PSi NPs не вызывала цитотоксического эффекта до повышения концентрации частиц до 500 мкг/мл.

Для исследования механизмов инициации клеточной гибели при обработке наночастицами PSi NPs и наночастицами DOX-PSi NPs использовали клеточные линии колоректального рака RKO и HCT116. Степень загрузки наночастиц PSi NPs препаратом DOX составляла $48 \pm 3\%$. Достижение высокого значения степени загрузки обусловлено электростатическим взаимодействием между отрицательно заряженными порами наночастиц PSi NPs и положительно заряженными молекулами DOX при нейтральном pH растворителя. Загрузка частиц DOX повышала электрохимический потенциал наночастиц PSi NPs с -44 ± 8 мВ до -34 ± 7 мВ. Согласно данным оценки выхода DOX из частиц при физиологических значениях pH и температуры время полного освобождения препарата из наночастиц PSi NPs составляет 10 ч.

Как представлено на рисунке 15А нами не было обнаружено цитотоксических эффектов пустых наночастиц в концентрации от 50 мкг/мл до 500 мкг/мл. Оценка токсичности проводилась по появлению фракции клеток subG1 с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Обработка клеток HCT116 и RKO наночастицами Dox-PSi NPs, вызывала клеточную гибель, что соответствует появлению популяции subG1 (Рис. 15Б). Уровень клеточной гибели при обработке клеток наночастицами DOX-PSi NPs был выше, чем при обработке только DOX (Рис. 15Б). Таким образом, адресная доставка DOX с помощью наночастиц PSi NPs является более эффективной, чем обработка клеток свободным DOX. Так, инкубация клеток колоректального рака HCT116 с доксорубицином в концентрациях 1 мкМ и

2,5 мкМ вызывала появление 3,9% и 6,3% клеток в популяции subG1, соответственно. Тогда как обработка DOX загруженным в наночастицы PSi NPs повышала уровень популяции subG1 до 7,4% и 9,0%, соответственно. Аналогичную картину наблюдали на клетках колоректального рака RKO – инкубация с свободным DOX в концентрации 1 мкМ и 2,5 мкМ вызывала появление 2,7% и 8,6% популяции subG1, тогда как обработка клеток наночастицами DOX-PSi NPs (в той же концентрации DOX) увеличивала процент популяции subG1 до 12,7% и 18,1%, соответственно (Рис. 15Б). При повышении концентрации свободного DOX и загруженного в наночастицы до 5 мкМ популяция subG1 незначительно повышалась с 12,7% до 13,1% для НСТ116 и резко снижалась с 28,1% до 10,5% для клеток RKO, что может быть следствием инициации процесса первичного или вторичного некроза (Рис. 15В).

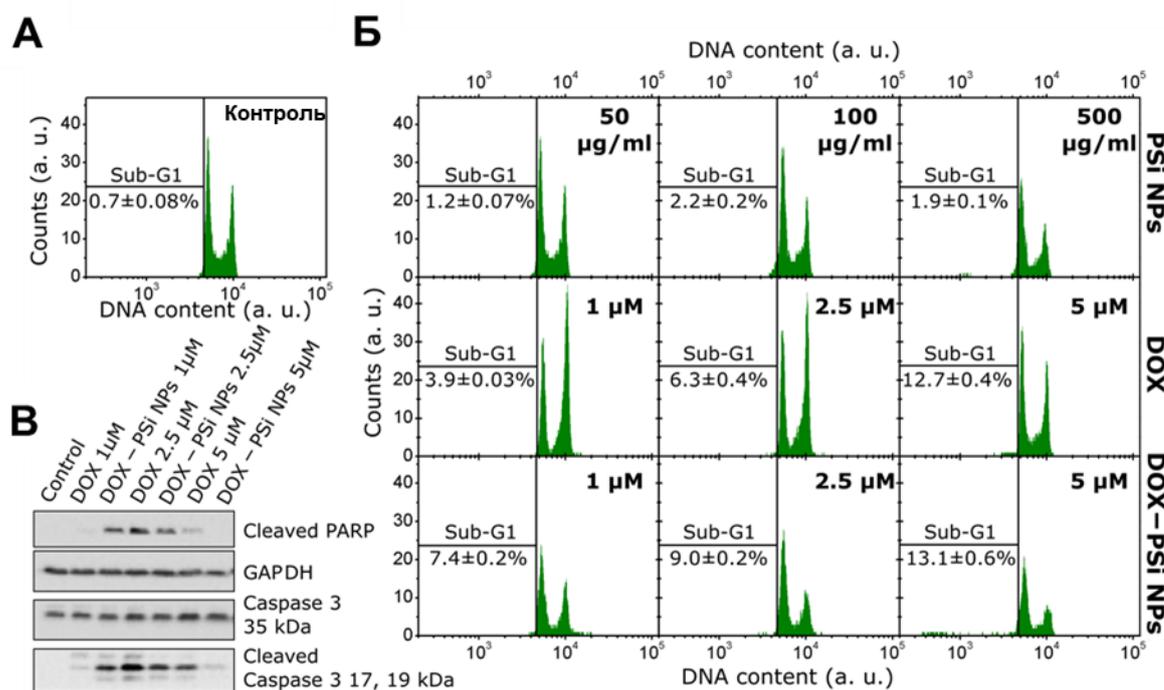


Рисунок 15. Оценка уровня клеточной гибели при обработке клеток НСТ116 наночастицами PSi NPs и наночастицами DOX-PSi NPs. А, Б) анализ клеточной гибели методом проточной цитофлуориметрии в клетках НСТ116, обработанных пустыми наночастицами PSi NPs, наночастицами DOX-PSi NPs и свободным DOX. В), Оценка расщепления каспазы-3 и ее субстрата ПАРП в клетках НСТ116 с помощью вестерн-блот анализа

Целью следующей серии экспериментов было определение типа клеточной гибели, вызываемой наночастицами DOX-PSi NPs. Аналогично результатам анализа subG1, данные оценки клеточной гибели методом вестерн-блот анализа продемонстрировали, что обработка клеток наночастицами DOX-PSi NPs вызывает клеточную гибель эффективнее, чем свободный DOX в той же концентрации. В клетках колоректального рака HCT116, RKO и неробластомы SH-SY5Y обработка DOX и наночастицами DOX-PSi NPs вызывала расщепление каспазы-3 и ее субстрата ПАРП, которые являются маркерами апоптоза (Рис. 15). Как представлено на Рис. 15 обработка клеток наночастицами DOX-PSi NPs в концентрации DOX 1 мкМ усиливала цитотоксический эффект препарата в сравнении с обработкой чистым DOX. Повышение концентрации свободного и загруженного в частицы DOX до 2,5 мкМ и 5 мкМ при обработке клеток приводило к снижению уровня маркеров апоптоза, что свидетельствует об инциации вторичного апоптоза или первичного некроза (Рис. 15).

Согласно данным сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Рис. 16), морфология необработанных клеток HCT116 соответствовала сглаженной поверхности клеточной мембраны с многочисленными псевдоподиями. После 12 ч инкубации с DOX 1 мкМ и 5 мкМ клетки сжимались и уменьшались в размере. Обработка клеток наночастицами DOX-PSi NPs приводила к появлению характерной морфологии апоптоза – сокращению и образованию выпячиваний (blebbing) (в основе процесса лежит актин-миозиновое сокращение, которое приводит к выпячиванию везикул на поверхности клеток). На Рис. 16А также видно скопление наночастиц вокруг клеток. Согласно данным СЭМ, обработка клеток наночастицами DOX-PSi NPs в концентрации 5 мкМ приводила к разрушению плазматической мембраны клеток и накоплению агрегатов наночастиц в данных областях.

Данные окраски клеток ядерным красителем Hoechst 33342 и митохондриальным MitoTracker Green с последующим анализом на флуоресцентном микроскопе представлены на рисунке 16Б. Для необработанных цитотоксическим агентом клеток НСТ116 характерна точечная окраска митохондриальной сети. В условиях инкубации с DOX и наночастицами DOX-PSi NPs вместо равномерной сети появлялась неструктурированная агрегация органелл, что соответствует инициации апоптоза.

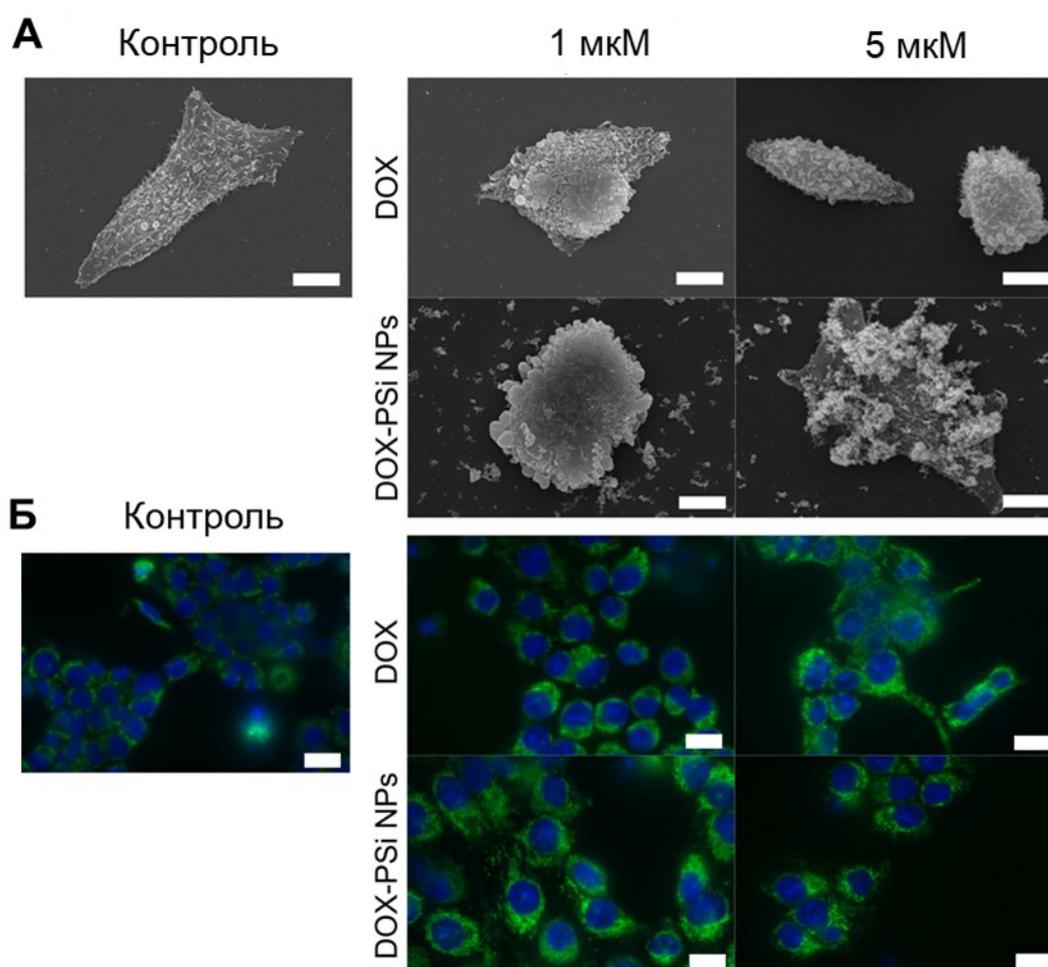


Рисунок 16. Анализ морфологии клеток НСТ116, обработанных DOX и наночастицами DOX-PSi NPs с помощью методик СЭМ и флуоресцентной микроскопии А) Фотографии СЭМ клеток НСТ116 контрольной группы и обработанных DOX и наночастицами DOX-PSi NPs; масштаб 10 мкм, Б) Окрашивание митохондрий MitoTracker Green FM (зеленый) и ядер Hoechst 33342 (синий) и визуализация на флуоресцентном микроскопе, масштаб 25мкм

В дальнейшей серии экспериментов был проведен анализ изменений ультраструктурной организации клеток НСТ116 при обработке агентом и наночастицами с помощью методики трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) (Рис. 17). Агрегаты наночастиц, размер которых варьирует от 50 до 800 нм, были отчётливо видны как вокруг клеток, так и внутри цитоплазмы. Обработка клеток наночастицами DOX-PSi NPs в течение 12 ч привела к появлению типичной морфологии апоптоза – к блеббингу клеток, как указано на рисунке 17 (отмечено стрелками).

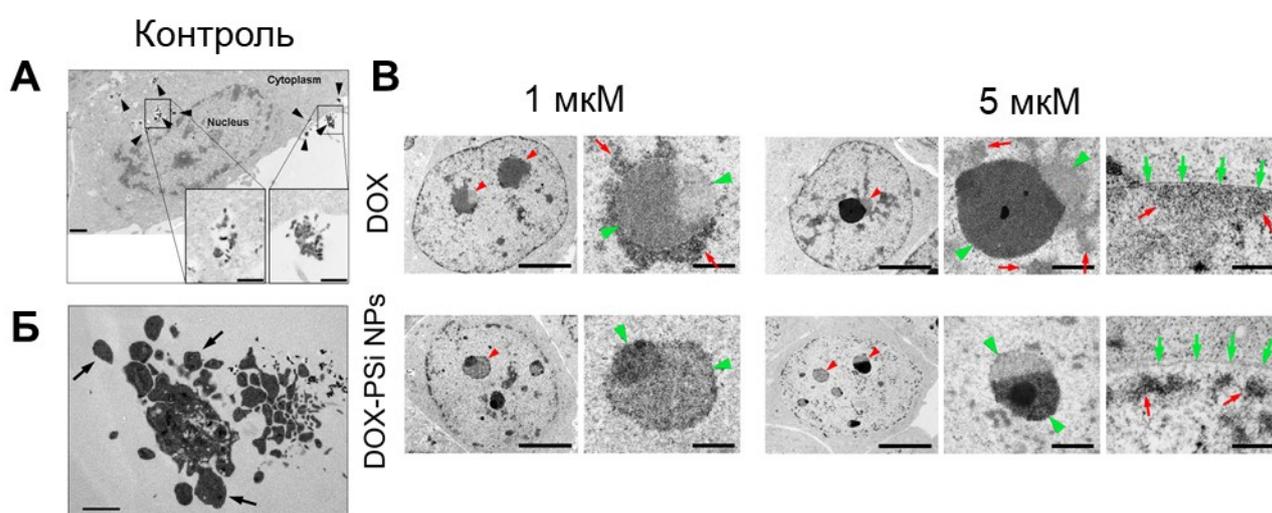


Рисунок 17. Анализ морфологии клеток НСТ116, обработанных DOX и наночастицами DOX-PSi NPs методом ТЭМ. А), Общий вид клеток НСТ116 обработанных наночастицами DOX-PSi NPs, агрегаты наночастиц DOX-PSi NPs детектированы как в цитоплазме клеток (левая панель), так и вокруг клеток (правая панель), масштабная метка 2 мкМ and 1 мкМ, Б), появление характерных морфологических признаков апоптоза в клетках, обработанных наночастицами DOX-PSi NPs (12 ч инкубации), морфология блеббинга указана стрелками, масштаб 4мкМ, В) Анализ ультраструктуры клеток НСТ116, обработанных DOX и наночастицами DOX-PSi NPs, участки конденсированного хроматина отмечены красными стрелками, сегрегация компонентов ядра отмечена зелеными треугольниками, ядерная мембрана отмечена зелеными стрелками; масштаб 5 мкМ (панель справа) и 1 мкМ (панель слева).

На рисунке 17 представлены снимки ТЭМ ультраструктурной организации клеток НСТ116, обработанных DOX и наночастицами DOX-PSi NPs. Так, в ядрах контрольных необработанных клеток присутствуют фибриллярные центры с волокнистыми компонентами и гранулярными включениями, что соответствует высокой транскрипционной активности в клетках. Обработка клеток DOX в концентрации 1 мкМ вызывала

значительную конденсацию хроматина и сегрегацию ядерных компонентов (Рис. 17, левая панель). Данные морфологической характеристики соответствуют подавлению транскрипционной активности [207]. Обработка клеток наночастицами DOX-PSi NPs в концентрации 1 мкМ DOX приводила к усилению конденсации хроматина, что представлено на рисунке 17 (правая панель). При повышении концентрации DOX, свободного или загруженного в PSi NPs до 5 мкМ мы наблюдали аналогичное усиление конденсации хроматина. Инкубация клеток с наночастицами DOX-PSi NPs оказалась более эффективной, чем со свободным DOX.

Полученные данные демонстрируют, что обработка опухолевых клеток различной этиологии наночастицами DOX-PSi NPs приводила к инициации их гибели и обладала большей эффективностью в сравнении с обработкой свободным DOX. Согласно данным вестерн-блот анализа и микроскопии (флуоресцентная микроскопия, СЭМ, ТЭМ) обработка клеток приводила к программируемой гибели по типу апоптоза.

3.7. Ингибирование Р-гликопротеина стимулирует клеточную гибель в условиях, модулирующих гипоксию

Успешная терапия опухолей зависит не только от выбора средства и стратегии администрирования, но и от способности клетки избавляться от терапевтических соединений. Существует целый ряд транспортеров. Один из которых, р-гликопротеин (P-gp), или белок множественной лекарственной устойчивости 1 (multidrug resistance protein 1 (MDR1), обеспечивает перенос многих веществ, таких как липиды, стероиды, пептиды, билирубин и др., через мембрану клетки. Этот переносчик усиленно экспрессируется в гипоксических условиях, что, по всей вероятности, вносит вклад в устойчивость клеток опухоли к терапии [206]. Известно, что подавляющее большинство солидных опухолей развивается в гипоксических условиях [206]. Гипоксия стимулирует стабилизацию фактора HIF, ответственного за

адаптацию клеток к гипоксическим условиям, в частности, за стимуляцию ангиогенеза, экспрессию ферментов гликолиза, подавление активности митохондрий [208]. Ранее нами было показано, что в условиях гипоксии значительно снижается чувствительность клеток рака прямой кишки HCT116 к таким терапевтическим средствам как цисплатин и доксорубин [209]. В этой части диссертационной работы мы исследовали механизмы вовлечения Р-gp в устойчивость клеток к действию доксорубина в гипоксических условиях.

В работе использовали клетки колоректального рака HCT116, культивируемые в среде DMEM с добавкой антибиотиков пенициллина/стрептомицина и эмбриональной бычьей сыворотки. Состояние гипоксии модулировали добавкой в суспензию клеток дефероксамина (ДФО) в концентрации 100 мкМ. Апоптоз стимулировали доксорубином в концентрации 1 мкМ и оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии по появлению клеток с количеством ДНК меньше 2n (фракция subG1). Анализ экспрессии про-апоптотических белков проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану. Накопление доксорубина в клетках оценивали по величине собственной флуоресценции с помощью проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии.

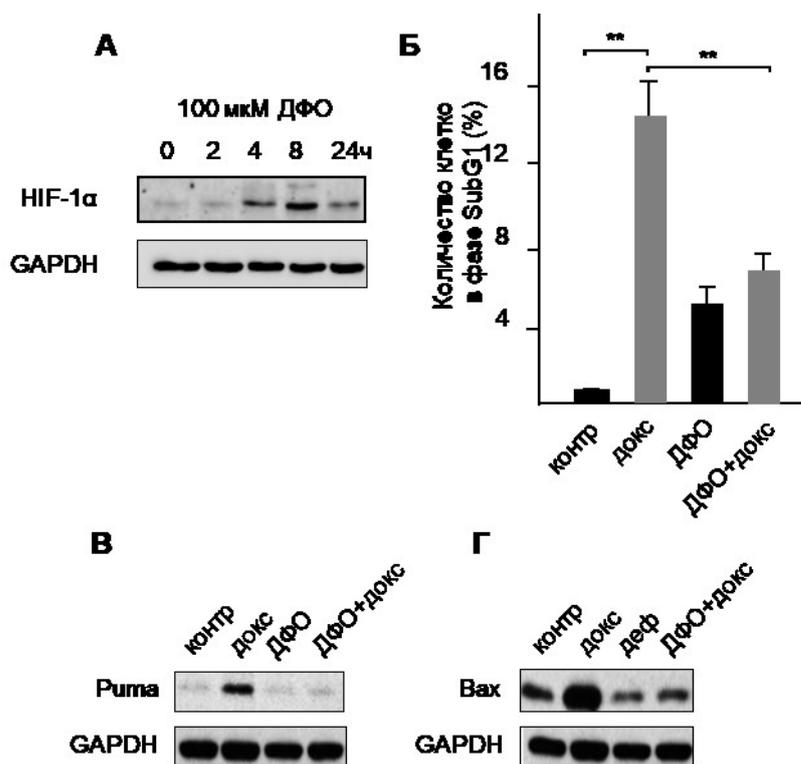


Рисунок 18. А) Оценка экспрессии HIF1α при обработке клеток ДФО, (Б) Оценка уровня клеточной гибели при обработке клеток ДФО и доксорубицином методом цитофлуориметрии subG1, В) оценка экспрессии про-апоптотических белков Puma (В) и Bax (Г); в качестве контроля загрузки геля использовали GAPDH, $M \pm m$, $n = 5$, $**p < 0.01$

Инкубация клеток НСТ116 с ДФО стимулировала стабилизацию субъединицы HIF1α. Наибольший уровень HIF1α был зарегистрирован спустя 8 ч инкубации, после чего он несколько снижался к 24 ч (Рис. 18А). Доксорубицин стимулировал апоптоз, оцениваемый по количеству клеток в субпопуляции subG1 (Рис. 18Б). ДФО вызывал появление небольшого количества апоптотических клеток, однако он ингибировал апоптоз, индуцированный доксорубицином. Аналогичное подавление апоптоза мы обнаружили при оценке содержания про-апоптотических белков Puma (Рис. 18В) и Bax (Рис. 18Г), экспрессия которых существенно снижалась в условиях индукции гипоксии.

Поскольку доксорубицин обладает собственной флуоресценцией, его концентрацию в клетке можно оценить по ее интенсивности. Как видно из Рис. 2А, накопление клетками доксорубицина зависело от концентрации препарата и от времени его инкубации (левый фрагмент Рис. 19А). На

фрагменте рисунка 2 справа представлены значения флуоресценции. Инкубация с ДФО снижала содержание доксорубина в клетке (Рис. 19Б). Ингибирование Р-гр верапамилом отменяло снижение содержания доксорубина и значительно повышало его внутриклеточный уровень. На Рис. 19А и Б (справа) представлены численные значения наблюдаемых изменений.

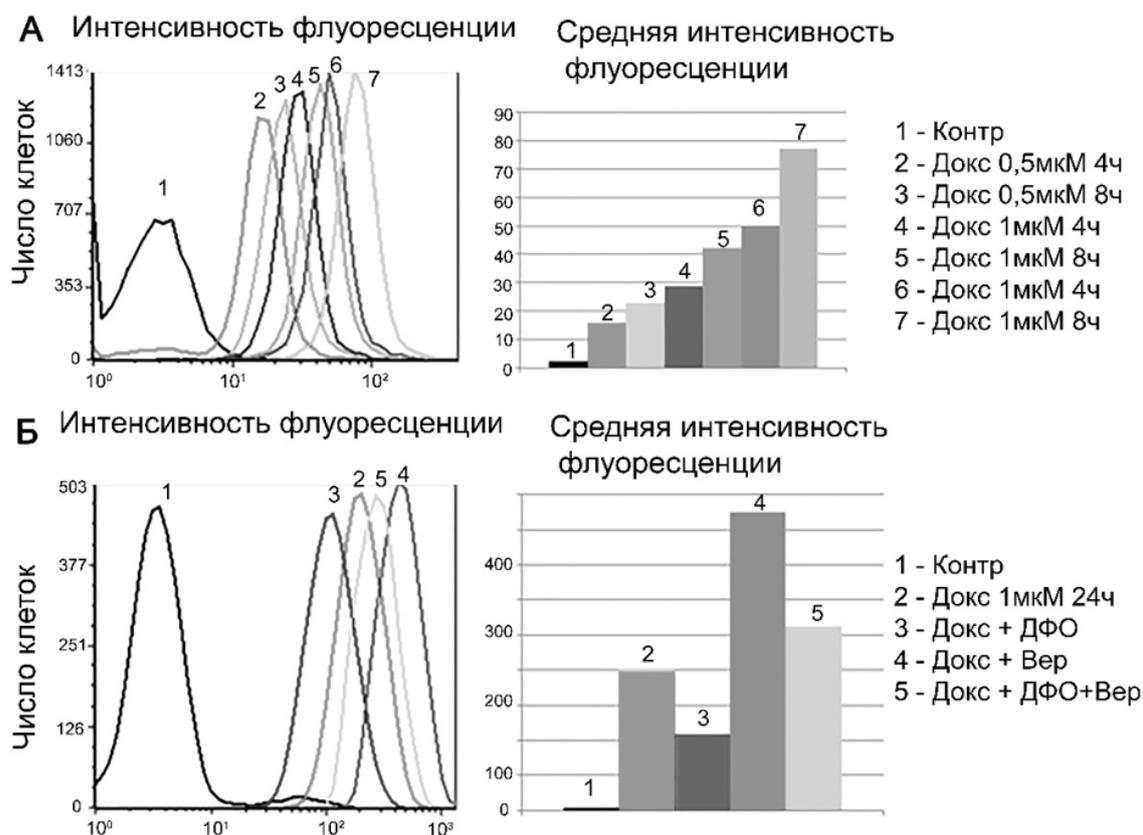


Рисунок 19. А) Оценка накопления доксорубина в клетке по интенсивности его флуоресценции в клетках НСТ 116, обработанных доксорубином в конц 0.5 мкМ и 1 мкМ при разных часах инкубации, Б) Оценка влияния ДФО (100 мкМ) и верапамила (40 мкМ) на содержание доксорубина в клетках НСТ116, обработанных 1 мкМ доксорубином (инкубация 24 ч). Концентрация ДФО 100 мкМ, верапамила 40 мкМ.

Аналогичная оценка проведена с использованием конфокального микроскопа (Рис. 20А). Результаты подтверждают способность ингибиторов Р-гр нивелировать вызванное ДФО снижение аккумуляции доксорубина. На рисунке 20Б приводится количественная обработка полученных данных.

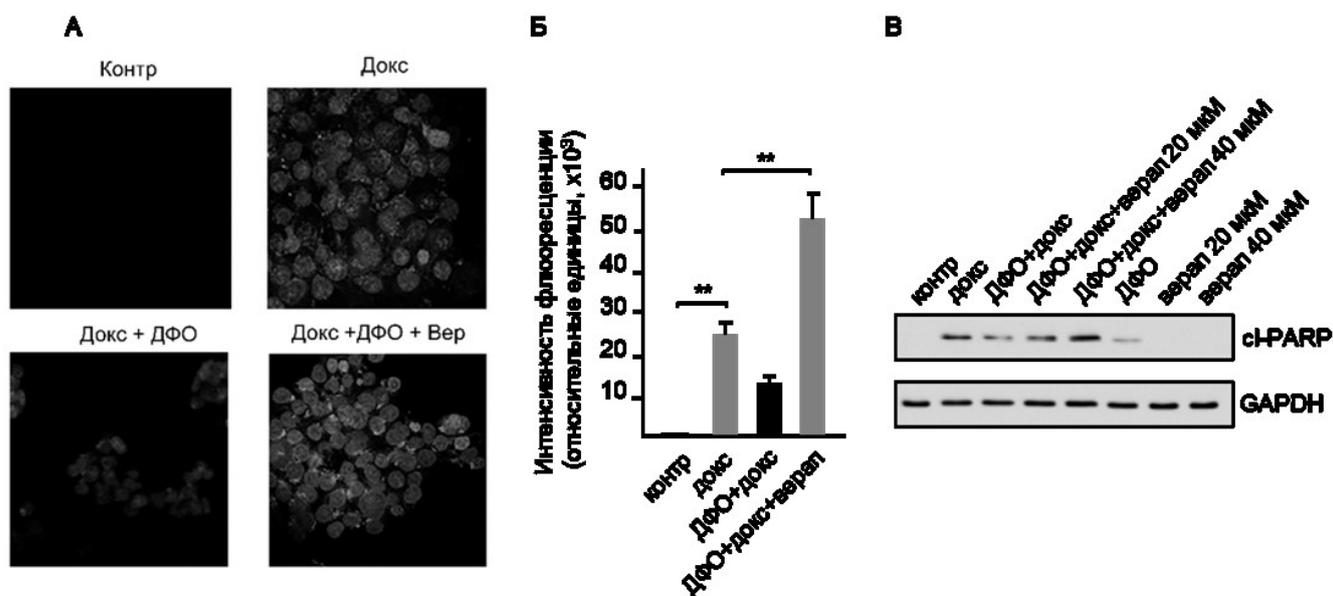


Рисунок 20. А) Оценка накопления доксорубина в клетках, обработанных ДФО и верапамилом методом конфокальной микроскопии, Б) Количественная оценка данных конфокальной микроскопии, В) Оценка расщепления ПАРП при обработке клеток доксорубином и ДФО в комбинировании с верапамилом методом вестерн-блот анализа

Таким образом, активация NF- κ B сопровождается снижением накопления доксорубина в клетке. Этот процесс блокируется верапамилом, что указывает на участие в нем ABC-транспортера P-gp.

Для выяснения вопроса, приводит ли предотвращение удаления доксорубина из опухолевой клетки к стимуляции клеточной гибели, была проведена оценка апоптоза в клетках НСТ116 в присутствии доксорубина в сочетании с ДФО и верапамилом. О гибели клеток судили по расщеплению ПАРП (Рис. 20В). Анализ проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Как видно из рисунка, доксорубин стимулирует появление продукта расщепления ПАРП, что подавлялось в присутствии 100 мкМ ДФО. Верапамил в концентрации 20 мкМ подавлял апоптоз; при использовании верапамила в концентрации 40 мкМ этот эффект был выражен еще сильнее. При этом верапамил сам по себе не вызывал расщепления ПАРП. Таким образом, подавление откачивания доксорубина и последующее его накопление в клетке, приводило к стимуляции гибели клеток. При написании раздела использованы материалы статьи автора диссертации [172].

4. Обсуждение результатов

Данные, представленные в диссертационной работе, убедительно показывают, что, используя различные подходы воздействия на энергетику клеток, можно модулировать их ответ на действие терапевтических препаратов. Тем не менее, несмотря на успехи исследования в этой области, проблема требует дальнейшего тщательного изучения.

Перспективным направлением развития противоопухолевой терапии является комбинирование цитотоксических препаратов с модуляторами метаболизма клеток. Известны многочисленные исследования новых ингибиторов гликолиза с целью повысить эффективность терапии опухолей с соответствующим метаболическим профилем. Однако результаты данной диссертационной работы продемонстрировали гетерогенность ответа опухолевых клеток различной этиологии.

Воздействие 2-ДГ вызывало апоптоз в клетках нейробластомы SK-N-BE(2) и усиливало клеточную гибель, вызванную цисплатином. Однако в клетках НСТ116 2-ДГ не вызывала клеточную смерть и, напротив, подавляла апоптоз, индуцированный цисплатином. При сравнении энергетики опухолей было выявлено, что клетки SK-N-BE(2) значительно чувствительнее к подавлению продукции АТФ 2-ДГ, чем клетки НСТ116, а дыхание клеток НСТ116 значительно превышало дыхание клеток нейробластомы. В обеих линиях 2-ДГ вызывала стресс ЭПР вследствие нарушения N-гликозилирования белков. Добавление маннозы, ингибитора ЭПР-стресса, подавляло апоптоз в клетках SK-N-BE(2), вызываемый 2-ДГ, из чего следует, что стимуляция клеточной гибели является следствием индукции стресса ЭПР. В клетках НСТ116 индукция стресса ЭПР при воздействии 2-ДГ приводила к аутофагии (оцениваемой по накоплению второй формы белка LC3-II). Добавление маннозы, отменяло защиту клеток НСТ116 от апоптоза. Данные о роли аутофагии были подтверждены с использованием ингибитора бафиломицина, который предотвращал защиту 2-ДГ в клетках НСТ116 и

активатора аутофагии, рапамицина, который подавлял апоптоз, вызванный цисплатином и 2-ДГ в клетках SK-N-BE(2).

Стимуляция стресса ЭПР и аутофагии ведет к подавлению апоптоза. Аналогичный ответ мы наблюдали на клетках HCT116. Механизм, ответственный за подавление апоптоза в результате стимуляции стресса ЭПР, изучен недостаточно. Так, одна из гипотез заключается в том, что белок теплового шока p27 участвует в защите клеток при индукции реакции несвернутых белков через активацию аутофагии [210]. Не исключено, что стресс ЭПР приводит к усилению экспорта транскрипционного фактора p53 из ядра или усилению зависимости от NF-κB сигнального пути [211,212]. Помимо эффекта 2-ДГ на инициацию стресса ЭПР, необходимо отметить эффект одного цисплатина на данные сигнальные пути аутофагии и стресса ЭПР. Так, на нескольких клеточных линиях было показано, что цисплатин ведет к накоплению Bip (клетки меланомы человека [213]). Однако, в нашей работе в обеих клеточных линиях HCT116 и SK-N-BE(2) цисплатин не влиял на уровень Bip, а в комбинации с ингибитором гликолиза даже приводил к снижению накопления маркера, вызванного 2-ДГ.

Полученные данные позволяют заключить, что чувствительность клетки к обработке ингибиторами энергетики зависит не только от метаболического профиля, но и активности других сигнальных путей, таких как аутофагия и стресс ЭПР. Таким образом, сочетанное действие традиционно применяемых противоопухолевых препаратов вместе с модуляторами клеточной энергетики и аутофагии может служить эффективной стратегией элиминирования опухолевых клеток. Данные полученные в процессе выполнения диссертационной работы демонстрируют тесную связь между процессами клеточной гибели, стресса ЭПР и аутофагии. В зависимости от экспериментальных условий, подавление гликолиза может вызвать разнонаправленные последствия. Митохондрии играют первостепенную роль в регуляции и координации взаимоотношений между ними.

Как известно, ряд опухолевых клеток обнаруживают зависимость от глутамина. Наряду с глюкозой эта аминокислота не только является источником энергии, но контролирует окислительно-восстановительный потенциал клетки. Метаболизм глутамина играет важную роль в поддержании роста опухолевых клеток, что делает его перспективной мишенью терапии злокачественных образований [214,215]. Подавление метаболизма глутамина потенциально способно не только нарушить энергообеспечение клетки, но и, вследствие снижения содержания глутатиона, стимулировать губительный для клетки окислительный стресс. Тем не менее, как было продемонстрировано в работе, вследствие многообразия метаболических процессов, вовлеченных в реализацию гибели клетки, последствия депривации глутамина могут быть различными в зависимости от природы терапевтического средства. Так на клетках опухолей различной этиологии, нейробластомы, колоректального рака, удаление глутамина из среды культивирования усиливало апоптоз, индуцированный цисплатином, но снижало цитотоксический эффект этопозида. Эти результаты указывают на то, что этопозид и цисплатин активируют различные пути инициации апоптоза.

При стимуляции апоптоза этопозидом и цисплатином повышалась экспрессия p53 (Рис. 7). Активация транскрипционного фактора p53 приводит к запуску клеточной гибели используя различные механизмы. Так, одной из мишеней p53 является DR5, задействованный в активации каспазы-8. Результаты, представленные на рисунке 7, отражают корреляцию между активацией p53, DR5 и каспазой-8. Удаление глутамина из среды снижало уровень экспрессии p53 и подавляло содержание DR5 (Рис. 7). Как следствие, подавление каспазы-8 приводило к меньшему расщеплению Bid, снижало ПВММ и апоптоз. Связь между глутаминолизом и экспрессией p53 остается мало изученной, однако известно, что пероральный приём глутамина стимулирует экспрессию p53 [216,217], тогда как депривация глутамина подавляет экспрессию p53, индуцированную онкогеном *MYC* [218].

Известна ведущая роль p53 в инициации апоптоза. Помимо регуляции уровня DR5 p53 активирует экспрессию продуктов про-апоптотических генов, вовлечённых в ПВММ, таких как ВНЗ-только белки Bid [219], Noxa, Puma и Bax. Наряду с функцией транскрипционной регуляции [220] p53 напрямую активирует Bax [221] или формирует комплекс с анти-апоптотическими белками Bcl-X1 или Bcl-2, что ведет к ПВММ и выходу цитохрома *c*. В любом случае, подавление экспрессии p53 приведет к стабилизации митохондриальной мембраны к пермеабилзации и подавлению апоптоза. Известно, что большая часть опухолей, в которых экспрессия p53 подавлена или ген мутирован, резистентны к индукторам апоптоза. Таким образом, подавление экспрессии p53 вследствие депривации глутамина может объяснить подавление апоптоза при комбинировании с этопозидом.

В экспериментах с цисплатином изъятие глутамина повышало уровень экспрессии p53 и DR5 (Рис. 7). Однако это не объясняет весь механизм активации каспазы-8 (Рис. 7). Необходимо учитывать, что глутамин является предшественником антиоксиданта глутатиона, значит, удаление данного субстрата приведет к снижению антиоксидантной емкости клетки и увеличению уровня АФК. Действительно, удаление глутамина или непосредственное подавление синтеза глутатиона стимулировало апоптоз. Известно, что цисплатин, помимо повреждений ДНК, способен стимулировать образование АФК, что в обычных условиях контролируется антиоксидантной системой митохондрий. В присутствии глутамина в клетках, обработанных цисплатином сколь либо существенного образования АФК не наблюдалось, но удаление глутамина приводило к мощному окислительному стрессу (Рис. 9).

АФК воздействуют на многие белки, одна из их мишеней – протеинкиназа Akt. Дефосфорилирование Akt остатка Ser-473, вызванное АФК, стимулировало апоптоз в клетках NB4. Так, в наших экспериментах на клетках TET21N было продемонстрировано, что удаление глутамина в

комбинировании с цисплатином снижало уровень экспрессии Akt и p-Akt (Рис. 7). Одной из мишеней Akt является FLIP, ингибитор каспазы-8, представляющий собой укороченную форму каспазы-8, не обладающую активностью, которая может конкурировать с каспазой-8 за FADD. Короткая форма FLIP-S ингибирует сборку DISC комплекса и апоптоз, индуцированный TRAIL. Содержание FLIP-S в клетке обратно коррелирует с чувствительностью клеток к TRAIL (лиганд DR5). Активация или подавление Akt вызывала соответственно повышение или снижение уровня c-FLIP в клетке. Согласно полученным данным, изъятие глутамина из среды усиливало цитотоксический эффект цисплатина посредством усиления продукции АФК, что, в свою очередь, вызывало снижение экспрессии Akt и p-Akt. Это приводило к снижению уровня FLIP-S в клетке и усилению активации каспазы-8. Таким образом, два механизма, усиление экспрессии DR5 и снижение содержания ингибитора FLIP-S, совместно активируют каспазу-8 и инициируют митохондриальный путь апоптоза при комбинировании цисплатина с депривацией глутамина (Рис. 9).

Важность каспазы-8 в инициации апоптоза в данной модели подтверждается использованием клеточной линии SK-N-BE(2), в которой подавлена экспрессия каспазы-8. Действительно, в линии SK-N-BE(2) депривация глутамина не приводила к усилению апоптоза, индуцированного цисплатином. Таким образом, комбинирование цисплатина и этопозиды с депривацией глутамина задействует разные механизмы активации апоптоза, что приводит к отличиям в эффективности воздействия. Так, в случае с применением этопозиды, комбинирование препарата с депривацией глутамина подавляло экспрессию p53, что вызывало снижение экспрессии DR5 (Рис. 7). В результате снижалась активация каспазы-8 и расщепление Bid, что вело к стабилизации митохондриальной мембраны и подавляло выход цитохрома *c* (Рис. 7). В случае с цисплатином наблюдалась иная картина, депривация глутамина приводила к повышению АФК, подавлению FLIP-S через Akt, повышению экспрессии DR5 и, как следствие, стимуляции

каспазы-8 (Рис. 9).

Таким образом, модуляция метаболизма глутамина может повышать эффективность цитотоксических препаратов, как было продемонстрировано на экспериментах с цисплатином. Успешная комбинированная терапия позволит снизить концентрацию агентов, общую токсичность и побочные эффекты для организма. Однако, при выборе препаратов для комбинирования с депривацией глутамина необходимо учитывать гетерогенность сигнальных путей инициации апоптоза и возможность проявления иного эффекта. Так, депривация глутамина снижала эффективность этопозида и повышала резистентность опухолей к терапии. Полученные данные демонстрируют перспективу модуляции метаболизма глутамина в комбинировании с цитотоксическими препаратами для повышения эффективности терапии. Однако, требуются дальнейшие исследования механизмов инициации клеточной гибели при применении данной терапии. Полученные данные будут полезны для будущих доклинических исследований, целью которых является снижение концентрации противоопухолевых препаратов и побочных эффектов терапии. Поиск новых стратегий в регуляции метаболизма глутамина, как применение новых ингибиторов глутаминазы, транспортеров глутамина или ингибиторов ферментов реакции образования α -кетоглутарата, представляет собой перспективное направление для развития комбинированной терапии.

Несмотря на то, что активность митохондрий в большинстве опухолевых клеток подавлена, тем не менее эти органеллы являются активными участниками процессов клеточной гибели и целенаправленное воздействие на митохондрии способно вызывать их дестабилизацию и высвобождение про-апоптотических факторов. Существует целый ряд соединений, действие которых существенно увеличивается, в случае непосредственной их доставки к митохондриям. Так производное альфа-токоферола и сукцината, альфа-токоферилсукцинат, становится значительно эффективнее после конъюгации с TRP⁺. В этом случае гибель клеток

наступает при концентрации соединения в несколько раз ниже исходного альфа-токоферилсукцината. В данной диссертационной работе проведено исследования про-апоптотического действия БК конъюгированной с TRP⁺. БК, соединение, известное своей способностью вызывать клеточную гибель, воздействуя на митохондрии. Конъюгация с TRP⁺ позволяет существенно снизить действующую концентрацию препарата, тем самым устраняя побочные, немитохондриальные его эффекты. После конъюгации активность препарата возросла в несколько раз по сравнению с немодифицированной кислотой.

Следует, однако, отметить, что опухолевые клетки обладают способностью избавляться от нежелательных соединений, способных вызвать их гибель. Белки-транспортёры, локализованные на плазматической мембране, успешно справляются с поступающими в клетку терапевтическими препаратами, выкачивая их из клетки [167]. Полученные в диссертационной работе данные показывают, что в условиях, моделирующих гипоксию, зачастую сопровождающую рост опухоли, активация транскрипционного фактора NF-1 α запускает процесс, приводящий к подавлению накопления доксорубина в клетке. Этот процесс блокируется верапамилом, что указывает на участие в этом процессе ABC-транспортёра P-gp. Как известно, P-gp способен эффективно удалять противоопухолевые препараты, в частности доксорубин, из клеток. Обработка клеток ингибитором P-gp верапамилом предотвращала удаление доксорубина и существенно стимулировала клеточную гибель. Полученные в диссертационной работе данные позволяют рассматривать гликопротеин P-gp в качестве одной из мишеней для стимуляции терапевтической активности препаратов, что, несомненно, будет способствовать эффективной элиминации опухолевых клеток при использовании терапевтических концентраций противоопухолевых средств.

При написании раздела использованы материалы статьи автора диссертации [172].

Еще одно подтверждение эффективности таргетной доставки препаратов было получено в экспериментах с использованием кремниевых наночастиц, нагруженных цитотоксическим препаратом доксорубицином. Обработка клеток пустыми наночастицами в концентрации до 500 мкг/мл не вызывала токсических эффектов. Период биodeградации кремниевых наночастиц составлял 2 недели. Размер пор составляет 15 ± 5 нм, толщина поверхности частиц 5-10 нм. Пористая структура кремниевых наночастиц размера 70 нм позволяет загружать доксорубицин в высоком процентном содержании. Согласно данным, полученным с применением рамановской спектроскопии, наночастицы PSi NPs проникают в клетки в течение 12 ч, а время выхода доксорубицина из PSi NPs наночастиц составляло 12-24 ч. Обработка опухолевых клеток различной этиологии (колоректальный рак HCT116, RKO и нейробластома SH-SY5Y) наночастицами DOX-PSi NPs была эффективнее в сравнении с обработкой свободным DOX. При нагрузке наночастицами PSi NPs доксорубицином в концентрации до 2,5 мкМ клетки погибали по типу апоптоза. Повышение концентрации DOX в наночастицах до 5 мкМ приводило к некрозу клеток согласно оценке популяции клеток subG1, анализа вестерн-блот, электронной и флуоресцентной микроскопии. Вследствие того, что эксперименты были выполнены на клеточных культурах, в данной модели не рассматривался процесс фагоцитоза клеток и остается открытым вопрос о природе некроза, как первичного или вторичного, сменяющего апоптоз. Представленные результаты обладают высокой ценностью для будущих исследований применения кремниевых наночастиц в адресной доставке лекарств в противоопухолевой терапии.

5. Заключение

Обобщая данные, полученные в диссертационной работе, следует отметить, что стимуляция гибели опухолевых клеток под действием терапевтических препаратов, может достигаться воздействием на различные мишени, вовлеченные в поддержание энергетики клетки. В первую очередь, подавление гликолиза может существенно снизить резистентность клеток к терапии, при этом надо тщательно продумать схемы и подходы подобного воздействия. Как было показано в настоящей работе, не учитывая характерные метаболические особенности опухолевых клеток, можно получить неэффективный результат терапии.

Немаловажную роль играет депривация другого энергетического субстрата – глутамина. Однако и в этом случае важно учитывать природу терапевтического воздействия. Согласно полученным в работе данным, депривация глутамина способна стимулировать терапевтический эффект цисплатина, но при этом снижать эффект этопозида.

Непосредственно воздействие на митохондрии с целью их дестабилизации и стимуляции выхода про-апоптотических факторов – является эффективным способом стимуляции гибели клеток. При этом непосредственная доставка митохондриям терапевтических соединений, способных вызывать их дестабилизацию и выход про-апоптотических факторов, существенно улучшит терапевтический эффект и позволит снизить неспецифическое воздействие лекарственных соединений. Как показано в работе, это достигается как использованием конъюгации положительно заряженного тетрафенилфосфония с известным терапевтическим средством митохондриальной направленности – БК, а также кремниевых наночастиц, загруженных доксорубицином. В обоих случаях подобные процедуры существенно повышали эффективность терапии. В случае с БК, ее конъюгированные производные в несколько раз усиливали гибель клеток по сравнению с исходным препаратом. В случае же использования наночастиц гибель клеток, вызываемая загруженными цитотоксическим препаратом

наночастицами, значительно превосходила результат действия свободного доксорубицина.

Таким образом, совокупность полученных в настоящем исследовании данных позволяет заключить, что, используя различные подходы воздействия на энергетику митохондрий и методы доставки препаратов, можно модулировать ответ опухолевых клеток на действие терапевтических препаратов. Необходимо подчеркнуть, что выбор подходов зависит от типа опухоли, ее метаболического профиля, а также цитостатического вещества. Однако, для внедрения в клинику полученных результатов потребуются дополнительные исследования как *in vitro*, так и *in vivo*.

6. Выводы:

1. Обработка опухолевых клеток TET21N, SH-SY5Y, SK-N-BE(2) и RKO ингибитором гликолиза 2-ДГ усиливает апоптоз, индуцированный цисплатином, но подавляет его в клетках HCT116.

2. Удаление глутамина из среды стимулирует цитотоксический эффект цисплатина в клетках нейробластомы TET21N, но подавляет апоптоз, индуцированный этопозидом.

3. Конъюгация препарата БК с TPP⁺ позволяет существенно снизить действующую концентрацию препарата, тем самым устраняя побочные, немитохондриальные его эффекты. Эффективность производных БК возрастала в несколько раз по сравнению с немодифицированной кислотой.

4. Обработка опухолевых клеток различной этиологии (колоректальный рак HCT116, RKO и нейробластома SH-SY5Y) наночастицами DOX-PSi NPs была эффективнее в сравнении с обработкой свободным DOX. При нагрузке наночастиц PSi NPs доксорубином в концентрации до 2,5 мкМ клетки погибали по типу апоптоза. Повышение концентрации DOX в наночастицах до 5 мкМ приводило к некрозу.

5. Активация транскрипционного фактора HIF-1 α запускает процесс, приводящий к подавлению накопления доксорубина в клетке. Обработка клеток ингибитором верапамилом P-gr предотвращала удаление доксорубина и существенно стимулировала клеточную гибель. Полученные в диссертационной работе данные позволяют рассматривать гликопротеин P-gr в качестве одной из мишеней для стимуляции терапевтической активности препаратов, что, несомненно, будет способствовать эффективной элиминации опухолевых клеток при использовании терапевтических концентраций противоопухолевых средств.

7. Список литературы

1. Hanahan D., Weinberg R.A. The hallmarks of cancer. // *Cell*. 2000. Vol. 100, № 1. P. 57–70.
2. Hanahan D., Weinberg R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation // *Cell*. 2011. Vol. 144, № 5. P. 646–674.
3. Lunt S., Heiden M. Vander. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation // *Annu. Rev. cell ...* 2011.
4. Tennant D. a et al. Metabolic transformation in cancer. // *Carcinogenesis*. 2009. Vol. 30, № 8. P. 1269–1280.
5. WARBURG O. On the origin of cancer cells. // *Science*. 1956. Vol. 123, № 3191. P. 309–314.
6. Funes J.M. et al. Transformation of human mesenchymal stem cells increases their dependency on oxidative phosphorylation for energy production. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2007. Vol. 104, № 15. P. 6223–6228.
7. Moreno-Sánchez R. et al. Energy metabolism in tumor cells. // *FEBS J.* 2007. Vol. 274, № 6. P. 1393–1418.
8. Kroemer G. Mitochondria in cancer. // *Oncogene*. 2006. Vol. 25, № 34. P. 4630–4632.
9. Gallamini A., Zwarthoed C., Borra A. Positron Emission Tomography (PET) in Oncology. // *Cancers (Basel)*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), 2014. Vol. 6, № 4. P. 1821–1889.
10. WARBURG O. On the origin of cancer cells. // *Science*. 1956. Vol. 123, № 3191. P. 309–314.
11. Orrenius S., Nicotera P., Zhivotovsky B. Cell death mechanisms and their implications in toxicology // *Toxicol. Sci.* 2011. Vol. 119, № 1. P. 3–19.
12. Rodríguez-Enríquez S. et al. Oxidative phosphorylation is impaired by prolonged hypoxia in breast and possibly in cervix carcinoma. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010. Vol. 42, № 10. P. 1744–1751.
13. Barbosa I. a et al. Mitochondrial remodeling in cancer metabolism and survival: potential for new therapies. // *Biochim. Biophys. Acta. Elsevier B.V.*, 2012. Vol. 1826, № 1. P. 238–254.
14. Ralph S.J. et al. Bioenergetic pathways in tumor mitochondria as targets for cancer therapy and the importance of the ROS-induced apoptotic trigger. // *Mol. Aspects Med. Elsevier Ltd*, 2010. Vol. 31, № 1. P. 29–59.
15. Moreadith R., Lehninger A. Purification, kinetic behavior, and regulation of NAD(P)⁺ malic enzyme of tumor mitochondria // *J Biol Chem*. 1984. Vol. 259. P. 6222–6227.
16. Mandella R., Sauer L. The mitochondrial malic enzymes. I. Submitochondrial localization and purification and properties of the

- NAD(P)⁺-dependent enzyme from adrenal cortex. // *J Biol Chem.* 1975. Vol. 250. P. 5877–5884.
17. Brand R.M., Lyons R.H., Midgley a R. Understanding the dynamics of cellular responsiveness to modifications of metabolic substrates in perfusion. // *J. Cell. Physiol.* 1994. Vol. 160, № 1. P. 10–16.
 18. Zu X.L., Guppy M. Cancer metabolism: facts, fantasy, and fiction // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. Vol. 313, № 3. P. 459–465.
 19. Gorlach A., Acker H. pO₂- and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells. // *Biochim Biophys Acta.* 1994. Vol. 1227. P. 105– 112.
 20. Krebs H.A. Metabolism of amino-acids: Deamination of amino-acids. // *Biochem. J.* Portland Press Ltd, 1935. Vol. 29, № 7. P. 1620–1644.
 21. Lacey J.M., Wilmore D.W. Is glutamine a conditionally essential amino acid? // *Nutr. Rev.* 1990. Vol. 48, № 8. P. 297–309.
 22. Yuneva M. et al. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells. // *J. Cell Biol.* The Rockefeller University Press, 2007. Vol. 178, № 1. P. 93–105.
 23. Bhutia Y.D., Ganapathy V. Glutamine transporters in mammalian cells and their functions in physiology and cancer. // *Biochim. Biophys. Acta.* NIH Public Access, 2016. Vol. 1863, № 10. P. 2531–2539.
 24. Gao P. et al. c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism // *Nature.* 2009. Vol. 458, № 7239. P. 762–765.
 25. Wise D.R. et al. Myc regulates a transcriptional program that stimulates mitochondrial glutaminolysis and leads to glutamine addiction // *PNAS.* 2008. Vol. 105. P. 18782–18787.
 26. Nicklin P. et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. // *Cell.* NIH Public Access, 2009. Vol. 136, № 3. P. 521–534.
 27. Wise D.R., Thompson C.B. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. // *Trends Biochem. Sci.* NIH Public Access, 2010. Vol. 35, № 8. P. 427–433.
 28. DeBerardinis R.J. et al. Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* National Academy of Sciences, 2007. Vol. 104, № 49. P. 19345–19350.
 29. Li M. et al. The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase // *Arch. Biochem. Biophys.* 2012. Vol. 519, № 2. P. 69–80.
 30. Sancak Y. et al. The Rag GTPases Bind Raptor and Mediate Amino Acid Signaling to mTORC1 // *Science* (80-.). 2008. Vol. 320, № 5882. P. 1496–

- 1501.
31. Csibi A. et al. The mTORC1 Pathway Stimulates Glutamine Metabolism and Cell Proliferation by Repressing SIRT4 // *Cell*. 2013. Vol. 153, № 4. P. 840–854.
 32. Le A. et al. Glucose-Independent Glutamine Metabolism via TCA Cycling for Proliferation and Survival in B Cells // *Cell Metab.* 2012. Vol. 15, № 1. P. 110–121.
 33. Semenza G.L. Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine // *Cell*. 2012. Vol. 148, № 3. P. 399–408.
 34. Keith B., Johnson R.S., Simon M.C. HIF1 α and HIF2 α : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression // *Nat. Rev. Cancer*. 2012. Vol. 12, № 1. P. 9–22.
 35. Xiang Y. et al. Targeted inhibition of tumor-specific glutaminase diminishes cell-autonomous tumorigenesis // *J. Clin. Invest.* 2015. Vol. 125, № 6. P. 2293–2306.
 36. Jacque N. et al. Targeting glutaminolysis has antileukemic activity in acute myeloid leukemia and synergizes with BCL-2 inhibition // *Blood*. 2015. Vol. 126, № 11. P. 1346–1356.
 37. Gross M.I. et al. Antitumor Activity of the Glutaminase Inhibitor CB-839 in Triple-Negative Breast Cancer // *Mol. Cancer Ther.* 2014. Vol. 13, № 4. P. 890–901.
 38. Xiang L. et al. Knock-down of glutaminase 2 expression decreases glutathione, NADH, and sensitizes cervical cancer to ionizing radiation // *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 2013. Vol. 1833, № 12. P. 2996–3005.
 39. Velletri T. et al. GLS2 is transcriptionally regulated by p73 and contributes to neuronal differentiation // *Cell Cycle*. 2015. Vol. 14, № 10. P. 1611–1612.
 40. Kung H.-N., Marks J.R., Chi J.-T. Glutamine Synthetase Is a Genetic Determinant of Cell Type-Specific Glutamine Independence in Breast Epithelia // *PLoS Genet.* / ed. Vander Heiden M.G. 2011. Vol. 7, № 8. P. e1002229.
 41. Yuneva M.O. et al. The Metabolic Profile of Tumors Depends on Both the Responsible Genetic Lesion and Tissue Type // *Cell Metab.* 2012. Vol. 15, № 2. P. 157–170.
 42. Bott A.J. et al. Oncogenic Myc Induces Expression of Glutamine Synthetase through Promoter Demethylation // *Cell Metab.* 2015. Vol. 22, № 6. P. 1068–1077.
 43. Reid M.A. et al. The B55 α Subunit of PP2A Drives a p53-Dependent Metabolic Adaptation to Glutamine Deprivation // *Mol. Cell*. 2013. Vol. 50, № 2. P. 200–211.

44. Chen L., Cui H. Targeting Glutamine Induces Apoptosis: A Cancer Therapy Approach // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16, № 9. P. 22830–22855.
45. Thompson R.M. et al. Glutaminase inhibitor CB-839 synergizes with carfilzomib in resistant multiple myeloma cells // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 22. P. 35863–35876.
46. Qing G. et al. ATF4 Regulates MYC-Mediated Neuroblastoma Cell Death upon Glutamine Deprivation // *Cancer Cell.* 2012. Vol. 22, № 5. P. 631–644.
47. Yang L. et al. Metabolic shifts toward glutamine regulate tumor growth, invasion and bioenergetics in ovarian cancer. // *Mol. Syst. Biol.* 2014. Vol. 10. P. 728.
48. Lee S.Y. et al. Dlx-2 and glutaminase upregulate epithelial-mesenchymal transition and glycolytic switch // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, № 7. P. 7925–7939.
49. Enns G.M. et al. Survival after Treatment with Phenylacetate and Benzoate for Urea-Cycle Disorders // *N. Engl. J. Med.* 2007. Vol. 356, № 22. P. 2282–2292.
50. Thibault A. et al. Phase I study of phenylacetate administered twice daily to patients with cancer. // *Cancer.* 1995. Vol. 75, № 12. P. 2932–2938.
51. Finkel T. From Sulfenylation to Sulfhydration: What a Thiolate Needs to Tolerate // *Sci. Signal.* 2012. Vol. 5, № 215. P. pe10-pe10.
52. Cheung E.C. et al. Opposing effects of TIGAR- and RAC1-derived ROS on Wnt-driven proliferation in the mouse intestine // *Genes Dev.* 2016. Vol. 30, № 1. P. 52–63.
53. Irani K. et al. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts. // *Science.* 1997. Vol. 275, № 5306. P. 1649–1652.
54. Chandel N.S. et al. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. Vol. 95, № 20. P. 11715–11720.
55. Mitra S. et al. Complexities of the DNA base excision repair pathway for repair of oxidative DNA damage. // *Environ. Mol. Mutagen.* 2001. Vol. 38, № 2–3. P. 180–190.
56. Maximchik P. V et al. Cellular Energetics as a Target for Tumor Cell Elimination. // *Biochem. Biokhimiia.* 2016. Vol. 81, № 2. P. 65–79.
57. Copin J.C., Gasche Y., Chan P.H. Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase does not prevent neonatal lethality in mutant mice that lack manganese superoxide dismutase. // *Free Radic. Biol. Med.* 2000. Vol. 28, № 10. P. 1571–1576.
58. Litwin J.A. et al. Immunocytochemical localization of peroxisomal enzymes in human liver biopsies. // *Am. J. Pathol.* 1987. Vol. 128, № 1. P. 141–150.

59. DeNicola G.M. et al. Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis // *Nature*. 2011. Vol. 475, № 7354. P. 106–109.
60. Garama D.J. et al. A Synthetic Lethal Interaction between Glutathione Synthesis and Mitochondrial Reactive Oxygen Species Provides a Tumor-Specific Vulnerability Dependent on STAT3 // *Mol. Cell. Biol.* 2015. Vol. 35, № 21. P. 3646–3656.
61. DeBerardinis R.J., Chandel N.S. Fundamentals of cancer metabolism. // *Sci. Adv.* American Association for the Advancement of Science, 2016. Vol. 2, № 5. P. e1600200.
62. LeBleu V.S. et al. PGC-1 α mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis // *Nat. Cell Biol.* 2014. Vol. 16, № 10. P. 992–1003.
63. Piskounova E. et al. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells // *Nature*. 2015. Vol. 527, № 7577. P. 186–191.
64. Gorrini C., Harris I.S., Mak T.W. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013. Vol. 12, № 12. P. 931–947.
65. Chen Q. et al. Pharmacologic doses of ascorbate act as a prooxidant and decrease growth of aggressive tumor xenografts in mice // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105, № 32. P. 11105–11109.
66. Ma Y. et al. High-Dose Parenteral Ascorbate Enhanced Chemosensitivity of Ovarian Cancer and Reduced Toxicity of Chemotherapy // *Sci. Transl. Med.* 2014. Vol. 6, № 222. P. 222ra18-222ra18.
67. Rossignol R., Gilkerson R., Aggeler R. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells // *Cancer Res.* 2004. P. 985–993.
68. Jose C., Bellance N., Rossignol R. Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? // *Biochim. Biophys. Acta (BBA)*- Elsevier B.V., 2011. Vol. 1807, № 6. P. 552–561.
69. Schroeder T. et al. Spatial heterogeneity and oxygen dependence of glucose consumption in R3230Ac and fibrosarcomas of the Fischer 344 rat. // *Cancer Res.* 2005. Vol. 65. P. 5163–5171.
70. Mason M. et al. Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding to cytochrome c oxidase. // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. Vol. 103. P. 708–713.
71. Gnaiger E. et al. Mitochondrial oxygen affinity, respiratory flux control and excess capacity of cytochrome c oxidase. // *J Exp Biol.* 1998. Vol. 201. P. 1129–1139.
72. Pecina P. et al. Decreased affinity for oxygen of cytochromec oxidase in

- Leigh syndrome caused by SURF1 mutations. // *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004. Vol. 287. P. C1384–C1388.
73. Matoba S. et al. P53 Regulates Mitochondrial Respiration. // *Science*. 2006. Vol. 312, № 5780. P. 1650–1653.
 74. Pollard P.J., Wortham N.C., Tomlinson I.P.M. The TCA cycle and tumorigenesis: the examples of fumarate hydratase and succinate dehydrogenase. // *Ann. Med.* 2003. Vol. 35, № 8. P. 632–639.
 75. Robey I.F. et al. Hypoxia-Inducible Factor-1 α and the Glycolytic Phenotype in Tumors // *Neoplasia*. 2005. Vol. 7, № 4. P. 324–330.
 76. Yeunga S.J., Pand J., Leec M.-H. Review Roles of p53, Myc and HIF-1 in Regulating Glycolysis – the Seventh Hallmark of Cancer // *Cell. Mol. Life Sci*. 2008. Vol. 65. P. 3981–3999.
 77. Shaw R.J. Glucose metabolism and cancer // *Curr. Opin. Cell Biol*. 2006. Vol. 18. P. 598–608.
 78. Parlo R., Coleman P. Enhanced rate of citrate export from cholesterol-rich hepatoma mitochondria. The truncated Krebs cycle and other metabolic ramifications of mitochondrial membrane cholesterol. // *J Biol Chem*. 1984. Vol. 259. P. 9997–10003.
 79. Briscoe D. et al. Acetoacetate metabolism in AS-30D hepatoma cells // *Mol Cell Biochem*. 1994. Vol. 136. P. 131–137.
 80. Dietzen D., Davis E. Oxidation of pyruvate, malate, citrate, and cytosolic reducing equivalents by AS-30D hepatoma mitochondria // *Arch Biochem Biophys*. 1993. Vol. 305. P. 91–102.
 81. Schmitt S. et al. Why to compare absolute numbers of mitochondria // *Mitochondrion*. 2014. Vol. 19 Pt A. P. 113–2.
 82. LaNoue K. et al. Defects in anion and electron transport in Morris hepatoma mitochondria // *Horm. Cancer*. 1974. P. 131–167.
 83. Tsujimoto Y., Ikegaki N., Croce C.M. Characterization of the protein product of bcl-2, the gene involved in human follicular lymphoma // *Oncogene*. 1987.
 84. Belmar J., Fesik S.W. Small molecule Mcl-1 inhibitors for the treatment of cancer // *Pharmacol. Ther. Elsevier B.V.*, 2014. P. 1–9.
 85. Moldoveanu T. et al. Many players in BCL-2 family affairs // *Trends Biochem Sci*. 2014. Vol. 39. P. 101–111.
 86. Chen L. et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. // *Mol Cell*. 2005. Vol. 17, № 3. P. 393–403.
 87. Biasutto L. et al. Mitochondrially targeted anti-cancer agents. // *Mitochondrion. Mitochondria Research Society*, 2010. Vol. 10, № 6. P. 670–681.

88. Gogvadze V., Orrenius S., Zhivotovsky B. Mitochondria in cancer cells: what is so special about them? // *Trends Cell Biol.* 2008. Vol. 18, № March. P. 165–173.
89. Hartman M., Czyz M. Pro-apoptotic Activity of BH3-only Proteins and BH3 Mimetics: from Theory to Potential Cancer Therapy // *Anticancer Agents Med Chem.* 2012. Vol. 12, № 8. P. 966–981.
90. Danial N.N., Korsmeyer S.J. Cell death: critical control points. // *Cell.* 2004. Vol. 116, № 2. P. 205–219.
91. De Bont R., van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. // *Mutagenesis.* 2004. Vol. 19, № 3. P. 169–185.
92. Reed J.C., Green D.R. Apoptosis: Physiology and pathology // *Apoptosis: Physiology and Pathology.* 2011. 1-454 p.
93. Gogvadze V. et al. Cytochrome c Release Occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent Mechanisms That Are Regulated by Bax // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 22. P. 19066–19071.
94. Armstrong J.S. The role of the mitochondrial permeability transition in cell death // *Mitochondrion.* 2006. Vol. 6, № 5. P. 225–234.
95. Narita M. et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998. Vol. 95, № 25. P. 14681–14686.
96. Kluck R.M. et al. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. // *Science.* 1997. Vol. 275, № 5303. P. 1132–1136.
97. Green D.R., Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. // *Science.* 2004. Vol. 305, № 5684. P. 626–629.
98. Tan W., Colombini M. VDAC closure increases calcium ion flux. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2007. Vol. 1768, № 10. P. 2510–2515.
99. Vander Heiden M.G. et al. Bcl-xL promotes the open configuration of the voltage-dependent anion channel and metabolite passage through the outer mitochondrial membrane. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 22. P. 19414–19419.
100. Rostovtseva T.K. et al. Bid, but not Bax, regulates VDAC channels. // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 14. P. 13575–13583.
101. Shulga N., Wilson-Smith R., Pastorino J.G. Hexokinase II detachment from the mitochondria potentiates cisplatin induced cytotoxicity through a caspase-2 dependent mechanism. // *Cell Cycle.* 2009. Vol. 8, № 20. P. 3355–3364.
102. Pastorino J.G., Hoek J.B. Regulation of hexokinase binding to VDAC. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2008. Vol. 40, № 3. P. 171–182.

103. Breitenbach M. et al. voltage-Dependent Anion Channel 1 As an emerging Drug Target for Novel Anti-Cancer Therapeutics // *Front. Oncol.* 2017. Vol. 7, № 7. P. 1543389–154.
104. Robey R.B., Hay N. Mitochondrial hexokinases, novel mediators of the antiapoptotic effects of growth factors and Akt. // *Oncogene.* 2006. Vol. 25, № 34. P. 4683–4696.
105. Mathupala S.P., Ko Y.H., Pedersen P.L. Hexokinase II: cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria. // *Oncogene.* 2006. Vol. 25, № 34. P. 4777–4786.
106. Kennedy S.G. et al. Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. // *Mol. Cell. Biol.* 1999. Vol. 19, № 8. P. 5800–5810.
107. Yamaguchi A. et al. Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 7. P. 5256–5264.
108. del Peso L. et al. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. // *Science.* 1997. Vol. 278, № 5338. P. 687–689.
109. Franke T.F. et al. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. // *Oncogene.* 2003. Vol. 22, № 56. P. 8983–8998.
110. Gogvadze V., Zhivotovsky B., Orrenius S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. // *Mol. Aspects Med.* 2010. Vol. 31, № 1. P. 60–74.
111. Ralser M. et al. A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2008. Vol. 105, № 46. P. 17807–17811.
112. Schulz T.J. et al. Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress // *Cell Metab.* 2007. Vol. 6, № 4. P. 280–293.
113. Kurtoglu M., Maher J.C., Lampidis T.J. Differential Toxic Mechanisms of 2-Deoxy-D-Glucose *versus* 2-Fluorodeoxy-D -Glucose in Hypoxic and Normoxic Tumor Cells // *Antioxid. Redox Signal.* 2007. Vol. 9, № 9. P. 1383–1390.
114. Kurtoglu M. et al. Under normoxia, 2-deoxy-D-glucose elicits cell death in select tumor types not by inhibition of glycolysis but by interfering with N-linked glycosylation // *Mol. Cancer Ther.* 2007. Vol. 6, № 11. P. 3049–3058.
115. Ahmad I. et al. 2DG enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin // *Open Life Sci. SP Versita,* 2010. Vol. 5, № 6. P. 739–748.
116. Maschek G. et al. 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. // *Cancer Res.* 2004. Vol. 64, № 1. P. 31–34.

117. Egler V. et al. Histone deacetylase inhibition and blockade of the glycolytic pathway synergistically induce glioblastoma cell death. // *Clin. Cancer Res. American Association for Cancer Research*, 2008. Vol. 14, № 10. P. 3132–3140.
118. Vander Heiden M.G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens // *Nat. Rev. Drug Discov. Nature Publishing Group*, 2011. Vol. 10, № 9. P. 671–684.
119. Mathupala S., Ko Y., Pedersen P. Hexokinase II: Cancer's double-edged sword acting as both facilitator and gatekeeper of malignancy when bound to mitochondria // *Oncogene*. 2012. Vol. 25, № 34. P. 4777–4786.
120. Neuzil J. et al. Classification of mitocans, anti-cancer drugs acting on mitochondria // *Mitochondrion. Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society*, 2013. Vol. 13. P. 199–208.
121. Loar P. et al. Inhibition of glycolysis enhances cisplatin-induced apoptosis in ovarian cancer cells // *Am. J. Obstet. Gynecol. Elsevier Inc.*, 2010. Vol. 202, № 4. P. 371.e1-8.
122. Maher J.C., Krishan A., Lampidis T.J. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2004. Vol. 53, № 2. P. 116–122.
123. Sullivan E.J. et al. Targeting cisplatin - resistant human tumor cells with metabolic inhibitors // *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014. Vol. 73. P. 417–427.
124. Pedersen P.L. 3-bromopyruvate (3BP) a fast acting, promising, powerful, specific, and effective “small molecule” anti-cancer agent taken from labside to bedside: introduction to a special issue // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2012. Vol. 44, № 1. P. 1–6.
125. Birsoy K. et al. MCT1-mediated transport of a toxic molecule is an effective strategy for targeting glycolytic tumors Kivanc // *Changes*. 2012. Vol. 29, № 6. P. 997–1003.
126. Xu R., Pelicano H., Zhou Y. Inhibition of Glycolysis in Cancer Cells : A Novel Strategy to Overcome Drug Resistance Associated with Mitochondrial Respiratory Defect and Hypoxia. 2005. Vol. 65(2). P. 613–621.
127. Ralph S.J. et al. Mitocans: mitochondrial targeted anti-cancer drugs as improved therapies and related patent documents. // *Recent Pat. Anticancer. Drug Discov.* 2006. Vol. 1. P. 327–346.
128. Dang C. V., Semenza G.L. Oncogenic alterations of metabolism. // *Trends Biochem. Sci.* 1999. Vol. 24, № 2. P. 68–72.
129. Solaini G., Sgarbi G., Baracca A. Oxidative phosphorylation in cancer cells. // *Biochim. Biophys. Acta. Elsevier B.V.*, 2011. Vol. 1807, № 6. P. 534–542.

130. Fuchs B.C., Bode B.P. Stressing out over survival: glutamine as an apoptotic modulator. // *J. Surg. Res.* 2006. Vol. 131, № 1. P. 26–40.
131. Ladurner A.G. Rheostat control of gene expression by metabolites. // *Mol. Cell.* 2006. Vol. 24, № 1. P. 1–11.
132. Baggetto L.G. Deviant energetic metabolism of glycolytic cancer cells. // *Biochimie.* 1992. Vol. 74, № 11. P. 959–974.
133. Newsholme P. et al. Glutamine and glutamate?their central role in cell metabolism and function // *Cell Biochem. Funct.* 2003. Vol. 21, № 1. P. 1–9.
134. Kruspig B., Zhivotovsky B., Gogvadze V. Mitochondrial substrates in cancer: Drivers or passengers? // *Mitochondrion.* 2014. Vol. 19, Part A. P. 8–19.
135. Smolková K. et al. Waves of gene regulation suppress and then restore oxidative phosphorylation in cancer cells. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2011. Vol. 43, № 7. P. 950–968.
136. Cai P. et al. Immuno- and Hepato-Toxicity of Dichloroacetic Acid in MRL+/+ and B6C3F1 Mice // 2007. Vol. 4, № 2. P. 107–115.
137. Simbula G. et al. Increased ROS generation and p53 activation in alpha-lipoic acid-induced apoptosis of hepatoma cells // *Apoptosis.* 2007. Vol. 12, № 1. P. 113–123.
138. Dong L. et al. α -Tocopheryl succinate induces apoptosis by targeting ubiquinone-binding sites in mitochondrial respiratory complex II // *Oncogene.* 2008. Vol. 27, № 31. P. 4324–4335.
139. Baggetto L., Testa-Parussini R. Role of acetoin on the regulation of intermediate metabolism of Ehrlich ascites tumor mitochondria: its contribution to membrane cholesterol enrichment modifying passive proton permeability // *Arch Biochem Biophys.* 1990. Vol. 283(2). P. 241–248.
140. Truksa J. et al. Mitochondrially Targeted Vitamin E Succinate Modulates Expression of Mitochondrial DNA Transcripts and Mitochondrial Biogenesis // *Antioxid. Redox Signal.* 2015. Vol. 22, № 11. P. 883–900.
141. Liu Z. et al. 3-Bromopyruvate induces apoptosis in breast cancer cells by downregulating Mcl-1 through the PI3K/Akt signaling pathway // *Anticancer Drugs.* 2014. Vol. 25, № (4). P. 447–455.
142. Pereira da Silva A.P. et al. Inhibition of energy-producing pathways of HepG2 cells by 3-bromopyruvate. // *Biochem. J.* 2009. Vol. 417, № 3. P. 717–726.
143. Cardaci S. et al. Glutamine deprivation enhances antitumor activity of 3-bromopyruvate through the stabilization of monocarboxylate transporter-1 // *Cancer Res.* 2012. Vol. 72, № 17. P. 4526–4536.
144. Fulda S. Targeting mitochondria for cancer therapy // *Nat. Publ. Gr. Nature Publishing Group,* 2010. Vol. 9, № 6. P. 447–464.

145. Delft M.F. Van et al. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized // *Cancer Cell*. 2006. Vol. 10, № 5. P. 389–399.
146. Billard C. BH3 mimetics: status of the field and new developments. // *Mol. Cancer Ther.* 2013. Vol. 12. P. 1691–1700.
147. Zhang Z. et al. A novel BH3 mimetic S1 potently induces Bax/Bak-dependent apoptosis by targeting both Bcl-2 and Mcl-1 // *Int. J. Cancer*. 2011. Vol. 128, № 7. P. 1724–1735.
148. Soderquist R. et al. The putative BH3 mimetic S1 sensitizes leukemia to ABT-737 by increasing reactive oxygen species, inducing endoplasmic reticulum stress, and upregulating the BH3-only protein NOXA. // *Apoptosis*. 2013. Vol. 19. P. 201–209.
149. Zhong J. et al. The BH3 mimetic S1 induces autophagy through ER stress and disruption of Bcl-2/Beclin 1 interaction in human glioma U251 cells // *Cancer Lett.* 2012. Vol. 323, № 2. P. 180–187.
150. Song T. et al. 3-Thiomorpholin-8-oxo-8H-acenaphtho [1,2-b] pyrrole-9-carbonitrile (S1) derivatives as pan-Bcl-2-inhibitors of Bcl-2, Bcl-xL and Mcl-1 // *Bioorg Med Chem*. 2013. № 21. P. 11–20.
151. Ponassi R. et al. A novel Bim-BH3-derived Bcl-XL inhibitor: Biochemical characterization, in vitro, in vivo and ex-vivo anti-leukemic activity // *Cell Cycle*. 2008. Vol. 7, № 20. P. 3211–3224.
152. Ghiotto F. et al. Apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells induced by a novel BH3 peptidomimetic. // *Cancer Biol. Ther.* 2009. Vol. 8, № 3. P. 263–271.
153. Cheng G. et al. Mitochondria targeted drugs synergize with 2-deoxyglucose to trigger breast cancer cell death // *Cancer Res*. 2012. Vol. 72(10). P. 2634–2644.
154. Sahra I. Ben et al. Targeting cancer cell metabolism: The combination of metformin and 2-deoxyglucose induces p53-dependent apoptosis in prostate cancer cells // *Cancer Res*. 2010. Vol. 70, № 6. P. 2465–2475.
155. Hou X. et al. Combination of 2-deoxy d -glucose and metformin for synergistic inhibition of non-small cell lung cancer: A reactive oxygen species and P-p38 mediated mechanism // *Biomed. Pharmacother.* 2016. Vol. 84. P. 1575–1584.
156. Zhai X. et al. Inhibition of LDH-A by oxamate induces G2/M arrest, apoptosis and increases radiosensitivity in nasopharyngeal carcinoma cells // *Oncol. Rep.* 2013. Vol. 30, № 6. P. 2983–2991.
157. Seca A.M.L., Pinto D.C.G.A. Plant Secondary Metabolites as Anticancer Agents: Successes in Clinical Trials and Therapeutic Application. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. Vol. 19, № 1. P. 263.

158. Xiao S. et al. Recent progress in the antiviral activity and mechanism study of pentacyclic triterpenoids and their derivatives. // *Med. Res. Rev.* 2018. Vol. 38, № 3. P. 951–976.
159. Ma L. et al. Effect of traditional Chinese medicine combined with Western therapy on primary hepatic carcinoma: a systematic review with meta-analysis. // *Front. Med.* 2017. Vol. 11, № 2. P. 191–202.
160. Ali-Seyed M. et al. Betulinic Acid: Recent Advances in Chemical Modifications, Effective Delivery, and Molecular Mechanisms of a Promising Anticancer Therapy. // *Chem. Biol. Drug Des.* 2016. Vol. 87, № 4. P. 517–536.
161. Yeo J., Jeon Y. Effects of stellate ganglion block on sedation as assessed by bispectral index in normal healthy volunteers. // *Pain Physician.* Vol. 18, № 2. P. 173–178.
162. Zhang D.-M. et al. Betulinic Acid and its Derivatives as Potential Antitumor Agents. // *Med. Res. Rev.* 2015. Vol. 35, № 6. P. 1127–1155.
163. Luo R. et al. Multiple molecular targets in breast cancer therapy by betulinic acid. // *Biomed. Pharmacother.* 2016. Vol. 84. P. 1321–1330.
164. Shankar E. et al. Betulinic Acid-Mediated Apoptosis in Human Prostate Cancer Cells Involves p53 and Nuclear Factor-Kappa B (NF- κ B) Pathways. // *Molecules.* 2017. Vol. 22, № 2. P. 264.
165. Nakamura A., Osonoi T., Terauchi Y. Relationship between urinary sodium excretion and pioglitazone-induced edema. // *J. Diabetes Investig.* 2010. Vol. 1, № 5. P. 208–211.
166. Jung G.-R. et al. Effect of betulinic acid on anticancer drug-resistant colon cancer cells. // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 2007. Vol. 101, № 4. P. 277–285.
167. Lippert T.H., Ruoff H.-J., Volm M. Resistance in malignant tumors: can resistance assays optimize cytostatic chemotherapy? // *Pharmacology.* 2008. Vol. 81, № 3. P. 196–203.
168. Lippert T.H., Ruoff H.-J., Volm M. Resistance in Malignant Tumors: Can Resistance Assays Optimize Cytostatic Chemotherapy? // *Pharmacology.* 2008. Vol. 81, № 3. P. 196–203.
169. Pan S.-T. et al. Molecular mechanisms for tumour resistance to chemotherapy // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2016. Vol. 43, № 8. P. 723–737.
170. Theodoulou F.L., Kerr I.D. ABC transporter research: going strong 40 years on. // *Biochem. Soc. Trans.* 2015. Vol. 43, № 5. P. 1033–1040.
171. Maximchik P. V. et al. Cellular energetics as a target for tumor cell elimination // *Biochem.* 2016. Vol. 81, № 2. P. 65–79.
172. Vdovin A.S. et al. Inhibition of P-glycoprotein stimulates cell death under

- Hypoxia-mimicking conditions // Dokl. Biochem. Biophys. 2017. Vol. 472, № 1. P. 27–30.
173. Richter C. et al. Control of apoptosis by the cellular ATP level. // FEBS Lett. 1996. Vol. 378, № 2. P. 107–110.
174. Tsujimoto Y. Apoptosis and necrosis: Intracellular ATP level as a determinant for cell death modes // Cell Death Differ. 1997. Vol. 4, № 6. P. 429–434.
175. Kurtoglu M., Maher J.C., Lampidis T.J. Differential Toxic Mechanisms of 2-Deoxy-D-Glucose *versus* 2-Fluorodeoxy-D -Glucose in Hypoxic and Normoxic Tumor Cells // Antioxid. Redox Signal. 2007. Vol. 9, № 9. P. 1383–1390.
176. Lee A.S. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress // Methods. 2005. Vol. 35, № 4. P. 373–381.
177. Hinshaw-Makepeace J. et al. c-FLIPS reduces activation of caspase and NF- κ B pathways and decreases T cell survival // Eur. J. Immunol. 2008. Vol. 38, № 1. P. 54–63.
178. Panka D.J. et al. Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt Activity Regulates c-FLIP Expression in Tumor Cells // J. Biol. Chem. 2001. Vol. 276, № 10. P. 6893–6896.
179. Harada K. et al. Deregulation of caspase 8 and 10 expression in pediatric tumors and cell lines. // Cancer Res. 2002. Vol. 62, № 20. P. 5897–5901.
180. Johnsen J.I. et al. Synergistic induction of apoptosis in neuroblastoma cells using a combination of cytostatic drugs with interferon-gamma and TRAIL. // Int. J. Oncol. 2004. Vol. 25, № 6. P. 1849–1857.
181. Cichewicz R.H., Kouzi S.A. Chemistry, biological activity, and chemotherapeutic potential of betulinic acid for the prevention and treatment of cancer and HIV infection. // Med. Res. Rev. 2004. Vol. 24, № 1. P. 90–114.
182. Mukherjee R. et al. Betulinic acid derivatives as anticancer agents: structure activity relationship. // Anticancer. Agents Med. Chem. 2006. Vol. 6, № 3. P. 271–279.
183. Fulda S., Galluzzi L., Kroemer G. Targeting mitochondria for cancer therapy. // Nat. Rev. Drug Discov. 2010. Vol. 9, № 6. P. 447–464.
184. Tan Y., Yu R., Pezzuto J.M. Betulinic acid-induced programmed cell death in human melanoma cells involves mitogen-activated protein kinase activation. // Clin. Cancer Res. 2003. Vol. 9, № 7. P. 2866–2875.
185. Fulda S., Kroemer G. Targeting mitochondrial apoptosis by betulinic acid in human cancers. // Drug Discov. Today. 2009. Vol. 14, № 17–18. P. 885–890.
186. Fulda S., Kroemer G. Mitochondria as therapeutic targets for the treatment of malignant disease. // Antioxid. Redox Signal. 2011. Vol. 15, № 12. P. 2937–

- 2949.
187. Pathak A.K. et al. Ursolic Acid Inhibits STAT3 Activation Pathway Leading to Suppression of Proliferation and Chemosensitization of Human Multiple Myeloma Cells // *Mol. Cancer Res.* 2007. Vol. 5, № 9. P. 943–955.
 188. Shishodia S. et al. Ursolic acid inhibits nuclear factor-kappaB activation induced by carcinogenic agents through suppression of IkappaBalpha kinase and p65 phosphorylation: correlation with down-regulation of cyclooxygenase 2, matrix metalloproteinase 9, and cyclin D1. // *Cancer Res.* 2003. Vol. 63, № 15. P. 4375–4383.
 189. Chen H. et al. Evolution in medicinal chemistry of ursolic acid derivatives as anticancer agents // *Eur. J. Med. Chem.* 2015. Vol. 92. P. 648–655.
 190. Shanmugam M.K. et al. Ursolic acid in cancer prevention and treatment: Molecular targets, pharmacokinetics and clinical studies // *Biochem. Pharmacol.* 2013. Vol. 85, № 11. P. 1579–1587.
 191. Zuco V. et al. Selective cytotoxicity of betulinic acid on tumor cell lines, but not on normal cells. // *Cancer Lett.* 2002. Vol. 175, № 1. P. 17–25.
 192. Damle A.A., Pawar Y.P., Narkar A.A. Anticancer activity of betulinic acid on MCF-7 tumors in nude mice. // *Indian J. Exp. Biol.* 2013. Vol. 51, № 7. P. 485–491.
 193. Kankotia S., Stacpoole P.W. Dichloroacetate and cancer: New home for an orphan drug? // *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer.* 2014. Vol. 1846, № 2. P. 617–629.
 194. Zhang S.-L. et al. Development of pyruvate dehydrogenase kinase inhibitors in medicinal chemistry with particular emphasis as anticancer agents // *Drug Discov. Today.* 2015. Vol. 20, № 9. P. 1112–1119.
 195. Saha S., Ghosh M., Dutta S.K. A potent tumoricidal co-drug ‘Bet-CA’ - an ester derivative of betulinic acid and dichloroacetate selectively and synergistically kills cancer cells // *Sci. Rep.* 2015. Vol. 5, № 1. P. 7762.
 196. Kamaly N. et al. Degradable Controlled-Release Polymers and Polymeric Nanoparticles: Mechanisms of Controlling Drug Release // *Chem. Rev.* 2016. Vol. 116, № 4. P. 2602–2663.
 197. Park J.-H. et al. Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for in vivo applications // *Nat. Mater.* 2009. Vol. 8, № 4. P. 331–336.
 198. Shi J. et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities // *Nat. Rev. Cancer.* 2017. Vol. 17, № 1. P. 20–37.
 199. Sun L.-D., Wang Y.-F., Yan C.-H. Paradigms and Challenges for Bioapplication of Rare Earth Upconversion Luminescent Nanoparticles: Small Size and Tunable Emission/Excitation Spectra // *Acc. Chem. Res.* 2014. Vol. 47, № 4. P. 1001–1009.
 200. Lee J.-H. et al. Artificially engineered magnetic nanoparticles for ultra-

- sensitive molecular imaging // *Nat. Med.* 2007. Vol. 13, № 1. P. 95–99.
201. Lee S.H. et al. Paramagnetic inorganic nanoparticles as T_1 MRI contrast agents // *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology*. 2014. Vol. 6, № 2. P. 196–209.
 202. Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy // *Biochem. J.* 2016. Vol. 473, № 4. P. 347–364.
 203. Cheng Y. et al. Perfluorocarbon nanoparticles enhance reactive oxygen levels and tumour growth inhibition in photodynamic therapy // *Nat. Commun.* 2015. Vol. 6, № 1. P. 8785.
 204. Hirschberg H., Madsen S.J. Synergistic efficacy of ultrasound, sonosensitizers and chemotherapy: a review // *Ther. Deliv.* 2017. Vol. 8, № 5. P. 331–342.
 205. Miller A. et al. La Crosse viral infection in hospitalized pediatric patients in Western North Carolina. // *Hosp. Pediatr.* 2012. Vol. 2, № 4. P. 235–242.
 206. Tamarov K.P. et al. Radio frequency radiation-induced hyperthermia using Si nanoparticle-based sensitizers for mild cancer therapy // *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2015. Vol. 4, № 1. P. 7034.
 207. Shav-Tal Y. et al. Dynamic sorting of nuclear components into distinct nucleolar caps during transcriptional inhibition. // *Mol. Biol. Cell.* 2005. Vol. 16, № 5. P. 2395–2413.
 208. Semenza G.L. Oxygen homeostasis // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2010. Vol. 2, № 3. P. 336–361.
 209. Kulikov A. V. et al. Targeting mitochondria by α -tocopheryl succinate overcomes hypoxia-mediated tumor cell resistance to treatment // *Cell. Mol. Life Sci.* 2014. Vol. 71, № 12. P. 2325–2333.
 210. Chen R. et al. Unfolded protein response suppresses cisplatin-induced apoptosis via autophagy regulation in human hepatocellular carcinoma cells. // *Folia Biol. (Praha)*. 2011. Vol. 57, № 3. P. 87–95.
 211. Zhang L.-J. et al. Tunicamycin suppresses cisplatin-induced HepG2 cell apoptosis via enhancing p53 protein nuclear export // *Mol. Cell. Biochem.* 2009. Vol. 327, № 1–2. P. 171–182.
 212. Yan M. et al. Activation of unfolded protein response protects osteosarcoma cells from cisplatin-induced apoptosis through NF- κ B pathway. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2015. Vol. 8, № 9. P. 10204–10215.
 213. Mandic A. et al. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, № 11. P. 9100–9106.
 214. Wang J.-B. et al. Targeting mitochondrial glutaminase activity inhibits oncogenic transformation. // *Cancer Cell.* 2010. Vol. 18, № 3. P. 207–219.

215. Chakrabarti G. et al. Targeting glutamine metabolism sensitizes pancreatic cancer to PARP-driven metabolic catastrophe induced by β -lapachone // *Cancer Metab.* 2015. Vol. 3, № 1. P. 12.
216. Kim M.H., Kim H. Oncogenes and tumor suppressors regulate glutamine metabolism in cancer cells. // *J. cancer Prev.* 2013. Vol. 18, № 3. P. 221–226.
217. Todorova V.K. et al. Modulation of p53 and c-myc in DMBA-induced mammary tumors by oral glutamine. // *Nutr. Cancer.* 2006. Vol. 54, № 2. P. 263–273.
218. Yuneva M. et al. Deficiency in glutamine but not glucose induces MYC-dependent apoptosis in human cells // *J. Cell Biol.* 2007. Vol. 178, № 1. P. 93–105.
219. Sax J.K. et al. BID regulation by p53 contributes to chemosensitivity. // *Nat. Cell Biol.* 2002. Vol. 4, № 11. P. 842–849.
220. Perfettini J.-L., Kroemer R.T., Kroemer G. Fatal liaisons of p53 with Bax and Bak. // *Nat. Cell Biol.* 2004. Vol. 6, № 5. P. 386–388.
221. Chipuk J.E. et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. // *Science.* 2004. Vol. 303, № 5660. P. 1010–1014.