

О ВЗАИМОСВЯЗИ АУТОФАГИИ И АПОПТОЗА В ГИБЕЛИ КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО A549, ИНДУЦИРОВАННОЙ CD437

А.А. Вартамян, Д.А. Хоченков, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Амалия Арташевна Вартамян zhivotov57@mail.ru

Введение. Синтетический ретиноид CD437, агонист γ -рецептора ретиноевой кислоты (RAR γ), не только останавливает клеточный цикл, но и, в отличие от ретиноевой кислоты, индуцирует в опухолевых клетках RAR γ -независимый апоптоз посредством уникального механизма, не зависящего от пути, опосредованного рецепторами ретиноевой кислоты.

Цель исследования — изучение взаимосвязи между апоптозом и аутофагией в CD437-индуцированной гибели клетки.

Материалы и методы. В работе были использованы: 2D-культивирование клеток карциномы легкого A549, иммуноцитохимия, проточная цитофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия.

Результаты. CD437 в диапазоне концентраций от 0,2 до 5,0 мкМ увеличивал количество PI-положительных клеток в культуре карциномы легкого A549. При концентрациях, близких к IC₅₀, ретиноид снижал популяцию клеток в G2/M-фазе клеточного цикла и останавливал клеточный цикл в S-фазе. CD437 дозозависимо увеличивал количество апоптотических клеток в присутствии нецитотоксических концентраций вортманнина, необратимого ингибитора антистрессовой киназы PI-3K, и LY 294002, обратимого ингибитора. CD437 также активировал формирование аутофагосом, наблюдалось дозозависимое повышение интенсивности флуоресценции монодансилкадаверина, маркера аутофагии. Однако избирательного накопления LC-3B с возрастанием концентрации CD437 (0,1–5,0 мкМ) в клетках не наблюдалось, что позволяет сделать предположение об ингибировании слияния аутофагических вакуолей и лизосом. zVAD-fmk, необратимый ингибитор каспаз, не восстанавливал аутофагию в клетках A549, и уровень LC-3B существенно не менялся при увеличении концентрации CD437, что указывало на участие CD437 в слиянии аутофагосомы с лизосомой. При инкубировании клеток с нецитотоксическими концентрациями хлорокина, ингибитора терминальной стадии аутофагии, при концентрациях CD437, близких к IC₅₀, живых клеток практически не оставалось. Аддитивный эффект CD437 и хлорокина в индукции гибели клеток A549 предполагает, что CD437 участвует в слиянии аутофагосом и лизосом, необходимом для завершения катаболизма аутофагического материала.

Заключение. Полученные нами данные указывают на отмену CD437 цитопротекторной функции аутофагии и запуск апоптоза, что позволяет поднять вопрос о комбинированной терапии CD437 с цитотоксическими препаратами в лечении карциномы легкого.

Ключевые слова: CD437, апоптоз, аутофагия, PI-3K-киназа, zVAD-fmk

Для цитирования: Вартамян А.А., Хоченков Д.А., Кособокова Е.Н., Косоруков В.С. О взаимосвязи аутофагии и апоптоза в гибели клеток карциномы легкого A549, индуцированной CD437. Российский биотерапевтический журнал 2020;19(4):65–73.

DOI: 10.17650/1726-9784-2020-19-4-65-73



CROSSTALK BETWEEN AUTOPHAGY AND APOPTOSIS IN CD437-INDUCED A549 LUNG CARCINOMA CELL DEATH

A.A. Vartanian, D.A. Khochenkov, E.N. Kosobokova, V.S. Kosorukov

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of the Russian Federation;
24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Introduction. Synthetic retinoids CD437, an agonist of the gamma retinoic acid receptor (RAR γ), not only induces growth arrest, but in contrast to retinoid acid, it also induces RAR γ -independent apoptosis in many tumor cells through a unique mechanism that is independent of the retinoic acid receptor-mediated pathway.

The aim of the study was to study the relationship between apoptosis and autophagy in CD437-induced cell death.

Materials and methods. In this study we used 2D-culturing of lung carcinoma cells A549, immunocytochemistry, flow cytometry and fluorescence microscopy.

Results. CD437 at concentrations between 0.2 and 5.0 μ M increased the number of PI-positive cells in A549 lung cancer cells. The retinoid at concentrations close to IC₅₀ reduced the cell population in the G2/M-phase and arrest cell cycle in the S-phase. CD437 dose-dependent

increased the number of apoptotic cells in the presence of non-cytotoxic concentrations of wortmanin, an irreversible inhibitor of anti-stress kinase PI-3K, and LY 200192, a reversible inhibitor. CD437 also activated the biogenesis of autophagosomes, and there was a dose-dependent increase in the fluorescence intensity of monodansilkadaverine, a marker of autophagy. However, accumulation of LC-3B was not observed with an increase of CD437 concentration from 0.1 to 5.0 μM suggesting that the fusion between autophagic vacuoles and lysosomes was inhibited. zVAD-fmk, an irreversible caspase inhibitor, did not restore autophagy in A549 cells, and LC-3B levels did not change significantly with the increasing of CD437 concentration, indicating that CD437 was involved in autophagosome-lysosome fusion. When cells grew with non-cytotoxic concentrations of chlorokine, a late stage autophagy inhibitor, there were virtually no living cells at CD437 concentrations close to IC_{50} . The additive effect of CD437 and chlorokine in inducing A549 cell death confirms that CD437 involved in fusion between autophagosomes and lysosomes required for final catabolism of autophagic material.

Conclusions. The data obtained indicate that CD437 induced a failure of cytoprotective function of autophagy and apoptosis, that raise the question of combined therapy of CD437 with cytotoxic drugs in the treatment of lung carcinoma

Key words: CD437, apoptosis, autophagy, PI-3K-kinase, zVAD-fmk

For citation: Vartanian A.A., Khochenkov D.A., Kosobokova E.N., Kosorukov V.S. Crosstalk between autophagy and apoptosis in CD437-induced A549 lung carcinoma cell death. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal* = Russian Journal of Biotherapy 2020;19(4): 65–73. (In Russ.).

Введение

Термин «ретиноиды», обозначающий семейство природных и синтетических аналогов витамина А, был введен в практику в середине 1970-х годов [1]. Фактически это была 1-я фармакологическая группа, которая обратила на себя внимание в качестве средства профилактики рака [2]. Основанием послужили наблюдения, указывающие на то, что дефицит витамина А индуцирует развитие эпителиальных дисплазий, и что здоровые ткани, предраковые состояния эпителия и эпителиальные опухоли по-разному реагируют на производные витамина А [3]. Начался поиск наиболее эффективной модификации витамина А, способной показать наилучший клинический ответ. В последние годы внимание исследователей все больше привлекает ретиноид CD437, который избирательно связывается с γ -рецептором ретиноевой кислоты (RAR γ) и трансактивирует рецептор, запускающая дифференцировку клеток [4]. Этот ретиноид также индуцирует апоптоз в различных типах опухолевых клеток с помощью механизма, независимого от пути, опосредованного RAR γ [5]. Его противоопухолевая активность была подтверждена на моделях ксенотрансплантатов животных, демонстрируя высокий потенциал для профилактики и/или лечения рака [6].

Современная цитотоксическая терапия опухоли направлена на уничтожение опухолевых клеток путем индукции в них программированной клеточной гибели 1-го типа — апоптоза. Однако атака на геном опухолевой клетки часто не дает нужной эффективности. Наиболее серьезным препятствием к повышению эффективности химиотерапии опухолей остается лекарственная устойчивость. Одной из широко обсуждаемых в последние годы причин резистентности к апоптозу является активация аутофагии — процесса, при котором эндогенные макромолекулы клетки доставляются внутрь ее лизосом и подвергаются

в них деградации [7]. Опухолевая клетка использует аутофагию для преодоления неблагоприятных условий или нехватки питательных веществ и энергии. Аутофагия в таких условиях становится альтернативным источником субстратов и энергии в опухолевой клетке. На ранних стадиях опухолевой трансформации клетки аутофагия проявляет цитопротекторный эффект, способствуя утилизации опухолеассоциированных сигнальных белков для поддержания внутриклеточного гомеостаза. На поздних стадиях заболевания, при гипоксии, лучевой терапии или действии цитотоксических противоопухолевых препаратов аутофагия используется опухолевой клеткой как механизм выживания и может стать причиной лекарственной устойчивости и быстрой прогрессии опухоли [8].

Существование нескольких типов гибели в одной клетке позволяет допустить, что метаболические пути различных форм клеточной гибели могут встречаться, и конечная судьба клетки будет зависеть от уровня неблагоприятного воздействия. **Цель** настоящего исследования — изучение функциональных связей между апоптозом и аутофагией в гибели клетки, индуцированной CD437. Полученный нами экспериментальный материал позволяет предположить, что CD437, блокируя слияние аутофагосомы с лизосомой, отменяет цитопротекторную функцию аутофагии и запускает апоптоз.

Материалы и методы

Материалы

Набор для флуоресцентной окраски клеток Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit (№ 88-8005-72) был приобретен у ThermoFisher Scientific (США). Ретиноид CD437 и монодансилкадаверин (MDC) (#D4008) приобретены у Sigma-Aldrich Corporation (США). Антитела к LC-3B (ab51520) получены от Abcam (США). Вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцеина

изотиоцианатом (goat anti-rabbit IgG — козы анти-кроличьи иммуноглобулины класса G, № STAT121F), получены от AbD Serotec (Великобритания). zVAD-fmk приобретен у BD Pharmingen (Bedford, Massachusetts, США). Вортманнин (WM), LY 200192 (LY) и хлорокин (CQ) любезно предоставлены Рябой О.О. (ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России).

Культивирование клеток

В работе были использованы клетки аденокарциномы легкого A549 (ATCC® CCL-185™). Клетки культивировали в полной питательной среде RPMI-1640 (Gibco, Великобритания), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, США); 2 мМ/мл глутамин (ПанЭко, Россия), 10 ед/мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия) при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры каждые 2–3 сут с использованием раствора Версена (ПанЭко, Россия).

Определение апоптоза методом проточной цитометрии

Клеточные линии высаживали по 2×10^5 клеток в дуплетах на 6-луночные планшеты в полной питательной среде. Через 24 ч к клеткам добавляли WM (1,0 мкМ), CQ (20 мкМ) или LY (5 мкМ), инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, затем вносили CD437 (0,1–5,0 мкМ) и оставляли клетки на 24 ч.

Для окрашивания клеток на ранний и поздний апоптоз использовали коммерческий набор Annexin-V FITC Apoptosis Kit. После инкубации клеток с препаратами их центрифугировали, осадок ресуспендировали в 100 мкл аннексинсвязывающего буфера, добавляли раствор, содержащий пропидий йодид и аннексин V. Клетки инкубировали при комнатной температуре, в темноте, в течение 15 мин, далее добавляли 400 мкл аннексин-связывающего буфера для остановки реакции. Анализ данных (не менее 10 тыс. событий) проводили на проточном цитофлуориметре ACEA NovoCyte (США) с использованием программного обеспечения NovoExpress. Длина волны для зеленой флуоресценции (FITC) устанавливалась в канале FL1 (515–545 нм), для красной (PE) флуоресценции — в канале FL2 (563–607 нм). Данные получали в логарифмическом измерении для обоих каналов FL1 и FL2 (FITC и PE соответственно).

Анализ клеточного цикла

После инкубации с препаратами клетки промывали и снимали с чашек Петри раствором Версена. Осадок клеток ресуспендировали в 400 мкл буфера, содержащего 50 мкг/мл пропидия йодида (Vecton

Dickinson, США), инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Флуоресценцию пропидия йодида измеряли на проточном цитометре ACEA NovoCyte, а распределение клеток по G1/G0-, S- и G2/M-фазам клеточного цикла анализировали путем определения относительного содержания ДНК в клетках с использованием программного обеспечения ModFit 3.2 software.

Анализ течения аутофагии

Клетки карциномы легкого A549 (3×10^4 клеток/лунка) высаживали на 24-луночные планшеты. После адгезии к клеткам добавляли 20 мкМ CQ, или 5 мкМ LY, или 1 мкМ WM, или ДМСО как контроль в эквиволярном количестве и инкубировали в течение 24 ч. Утром среду замещали на свежую и добавляли 0,05 ммоль MDC в RPMI-1640 без сыворотки, инкубировали 20–30 мин при 37 °C в CO₂-инкубаторе. Далее клетки 3 раза промывали ледяным натрий-фосфатным буфером и немедленно определяли флуоресценцию на клеточном анализаторе In Cell Analyzer 6000 с использованием программного обеспечения In Cell Investigator (GE Healthcare, США).

Определение экспрессии LC-3B

Клетки A549 (3×10^5 клеток/лунка) высаживали на 8-луночный планшет. После адгезии к клеткам добавляли 0,2 или 3 мкМ CD437 или ДМСО как контроль в эквиволярном количестве и инкубировали клетки в течение следующих 24 ч. Далее после фиксации клеток в системе этанол–ацетон ингибировали неспецифическое связывание в 5 % растворе бычьего сывороточного альбумина и инкубировали клетки в течение 18 ч при 4 °C с поликлональными кроличьими антителами LC-3B (1 : 2000) (Abcam, США). Затем клетки промывали дважды в фосфатно-солевом буфере по 5 мин и инкубировали со вторичными антикроличьими антителами, меченными флуорохромом AlexaFluor® 488 нм (Life Technologies, США), а затем с Хекстом 33258 (ПанЭко, Россия). Клетки заключали под покровные стекла с использованием полимерной среды Fluorescent mounting medium (Dako, Дания). Колокализацию пункта белка LC-3B на мембранах лизосом и интенсивность флуоресценции LC-3B анализировали на In Cell Analyzer 6000 при помощи программного обеспечения In Cell Investigator.

Статистический анализ

Все эксперименты выполняли 3 раза независимо друг от друга. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Все статистические анализы проведены с использованием программного обеспечения GraphPad 5.0.

Результаты и обсуждение

Синтетический ретиноид 6-[3-(1-адамантил)-4-гидроксифенил]-2-нафталинкарбоновая кислота (CD437) является агонистом RAR γ . Многочисленные эффекты этого соединения и очевидные специфические реакции клеток на этот ретиноид затрудняют выявление общей биохимической основы механизма его действия. Одним из первых был описан эффект этого ретиноида в качестве RAR γ -агониста, приводящий к остановке клеточного цикла и дифференцировке клеток, не вызывая гибели клетки [9]. Недавно в опухолевых клетках был обнаружен другой эффект CD437 – p53-независимое повреждение ДНК [10]. CD437-опосредованное повреждение ДНК объясняет, почему большинство клеток, независимо от их чувствительности к ретиноевой кислоте, отвечают на CD437. Это также объясняет дивергентный генетический ответ на CD437. С другой стороны, p53-независимое повреждение ДНК сочетает несколько путей гибели клетки. Полученный нами экспериментальный материал указывает на то, что CD437 способствует накоплению аутофагических вакуолей, нагруженных для утилизации эндогенных компонентов клетки, однако слияния их с лизосомой не происходит: отменяется цитопротекторная функция аутофагии и активируется апоптотическая гибель клетки.

Цитотоксичность CD437 на клетках A549 была изучена в МТТ-тесте. Антипролиферативная активность препарата оценивалась по величине IC₅₀. При инкубировании клеток A549 в диапазоне концентраций CD437 от 0,1 до 10 мкМ в течение 24 ч наблюдалось ингибирование роста клеток на 30–80 %, IC₅₀

равнялась 3 мкМ. Дозозависимое снижение количества живых клеток можно объяснить как гибелью клеток (например, апоптозом), так и арестом клеточного цикла. При инкубировании клеток с 0,1–3 мкМ CD437 в течение 24 ч наблюдалось снижение популяции клеток в G2/M-фазе клеточного цикла и накопление их в G1/S-фазе. На рис. 1 представлены результаты исследований концентрации 2 мкМ CD437. Наблюдается накопление клеток в S-фазе клеточного цикла (от 20 % в контроле до 42 %). Полученные нами результаты согласуются с данными литературы о способности CD437 останавливать пролиферацию опухолевых клеток в S-фазе [11]. Мы также отметили, что после воздействия CD437 опухолевые клетки претерпевали морфологические изменения, характерные для апоптоза, такие как сморщивание клеток в объеме из-за потери воды, выраженная конденсация хроматина и округление ядер, ошаривание и открепление от пластика (данные не приводятся). Метод проточной цитофлуориметрии позволил дать количественную характеристику этому процессу. Доля клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК, являющаяся критерием интенсивности апоптоза, увеличивалась с повышением концентрации CD437 и достигала 42 ± 2 % к 24 ч инкубирования с 5 мкМ CD437 (рис. 2). Количество апоптотических клеток в контроле не превышало 6–8 %, что соответствовало уровню спонтанного апоптоза. Полученные нами данные о способности CD437 индуцировать апоптоз в опухолевых клетках согласуются с литературными [12].

Любое неблагоприятное воздействие воспринимается клеткой как стресс. Ответом является активация антистрессовой программы клетки, которая

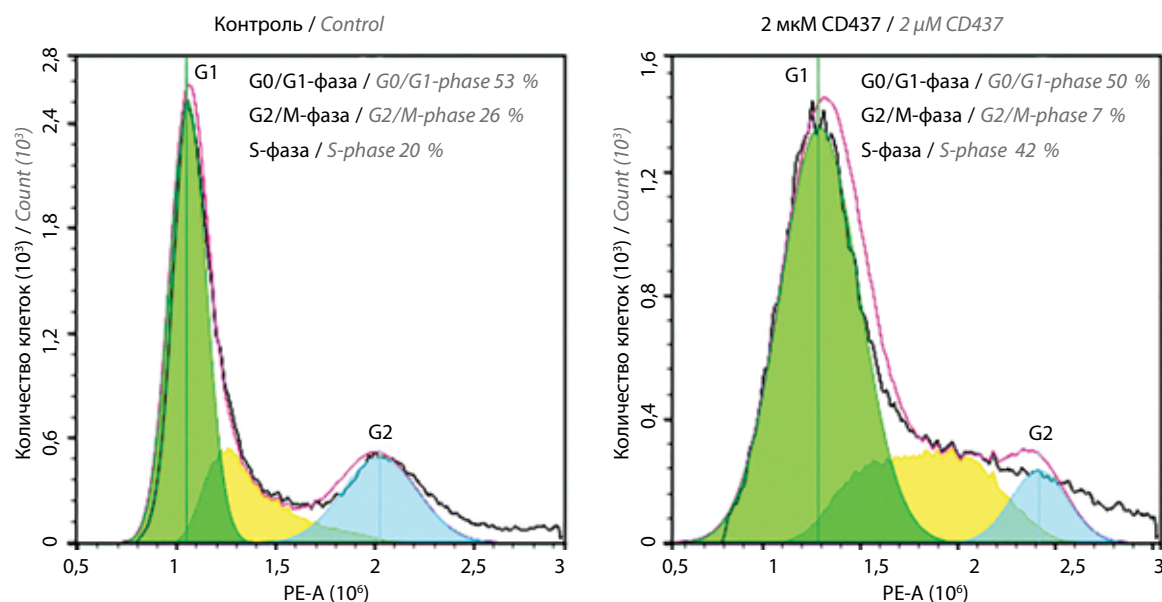


Рис. 1. Влияние CD437 на арест клеточного цикла клеток линии A549. Под воздействием CD437 наблюдается накопление клеток в S-фазе
Fig. 1. The involvement of CD437 in cell cycle arrest. Under the condition of CD437 treatment accumulation of cells in S-phase is visible

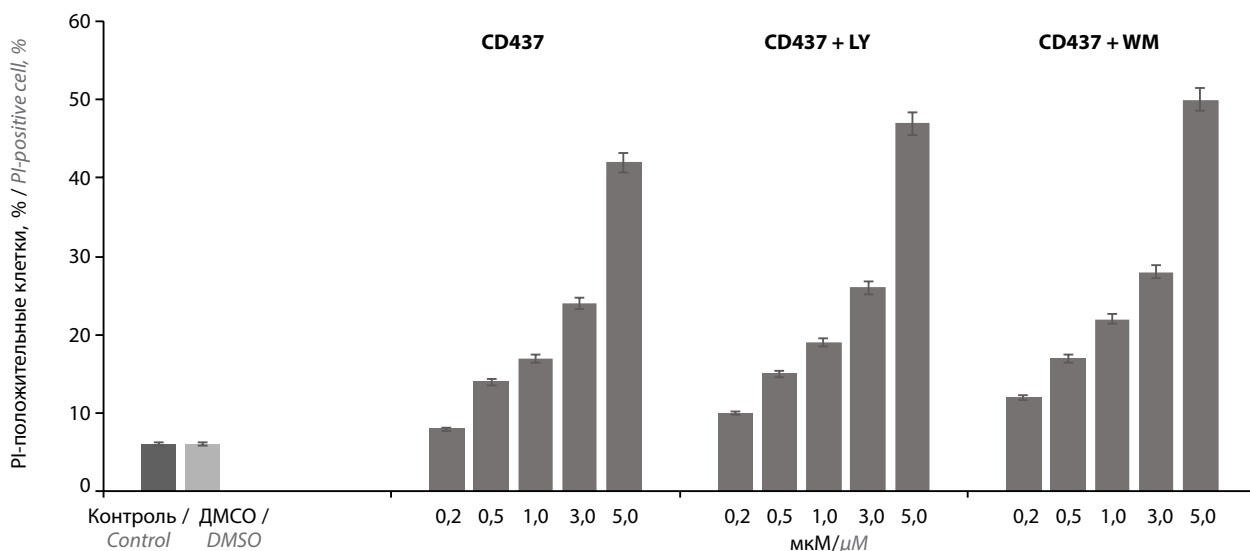


Рис. 2. Влияние CD437 (0,2–5 мкМ) на пролиферацию клеток A549

Fig. 2. The influence of CD437 (0.2–5 μM) on A549 cells proliferation

находится под контролем фосфатидил-инозитол-3-киназы (PI-3K). PI-3K-сигнальный путь сегодня рассматривается как один из универсальных сигнальных путей, контролирующих ключевые функции клеток. Этот белок получает и интегрирует сигналы от факторов роста и многочисленных биомолекул, определяющих доступность аминокислот, уровень энергии и гипоксии в клетке [13]. Активация PI-3K сопровождается повышением экспрессии мезенхимальных белков, репрессии E-кадгерина и усиленной миграцией опухолевых клеток [14]. Под контролем PI-3K также находятся: передача антиапоптотического сигнала в клетке, метаболизм глюкозы, устойчивость к повреждающим воздействиям, блокада TGF-β-сигнального пути, что определяет ведущую роль этого фермента в регуляции роста и выживаемости злокачественной опухоли [15]. Разумным было бы предположить участие PI-3K-сигнального пути в CD437-индуцированной гибели клетки. В предварительных экспериментах при инкубировании клеток A549 с препаратами в диапазоне концентраций от 0,001 до 1 мМ были определены нецитотоксические концентрации необратимого (WM) и обратимого (LY294002) ингибиторов PI-3K. Влияние ингибиторов антистрессовой киназы на цитотоксичность CD437 исследовали предварительной инкубацией клеток в течение 1 ч с нецитотоксическими концентрациями LY294002 (5 мкМ) или WM (1 мкМ), после чего добавляли CD437 (0,1–5 мкМ), культивировали клетки в течение 24 ч и определяли количество PI-положительных клеток. Такая схема эксперимента позволяла исключить влияние токсичности ингибиторов на гибель клетки, индуцированной CD437. Оба ингибитора усиливали цитотоксический эффект

CD437 (см. рис. 2), приводя к увеличению гибели клеток A549 в среднем на 14–16 %. Необратимый ингибитор киназы усиливал цитотоксический эффект CD437 в большей степени. Полученные результаты подтвердили нашу гипотезу: антистрессовая программа клетки вносит свой вклад в гибель клеток, индуцированную CD437.

В нескольких независимых исследованиях последних лет было показано, что ингибиторы PI-3K блокируют аутофагию на стадии инициации, препятствуя образованию аутофагосом, двумембранных липидных образований, которые изолируют подлежащий уничтожению материал и расщепляют его в аутолизосоме [16]. Целью следующей части работы было подтверждение или опровержение вовлечения аутофагии в цитотоксический эффект CD437. В качестве индикатора формирования аутофагосом мы использовали окрашивание клеток MDC, флуоресцентным агентом, который избирательно взаимодействует с липидами мембран аутофагосом [17]. Как следует из рис. 3, CD437 дозозависимо повышал биогенез аутофагосом.

Конечным пунктом утилизируемого материала при процессе аутофагии является лизосома, и ингибирование функций лизосом (например, ацидификация или ферментативная деградация) способствует блокированию аутолизосом. Маркером активной аутофагии является экспрессия LC-3B. Активация аутофагии сопровождается протеолитическим расщеплением белка LC-3 (Atg8) в изоформу LC-3A. Его конъюгация с фосфатидилэтаноламином приводит к образованию LC-3B-изоформы, которая и встраивается в мембрану аутофагосомы. В процессе формирования аутофагосомы участвует только LC-3B-изоформа

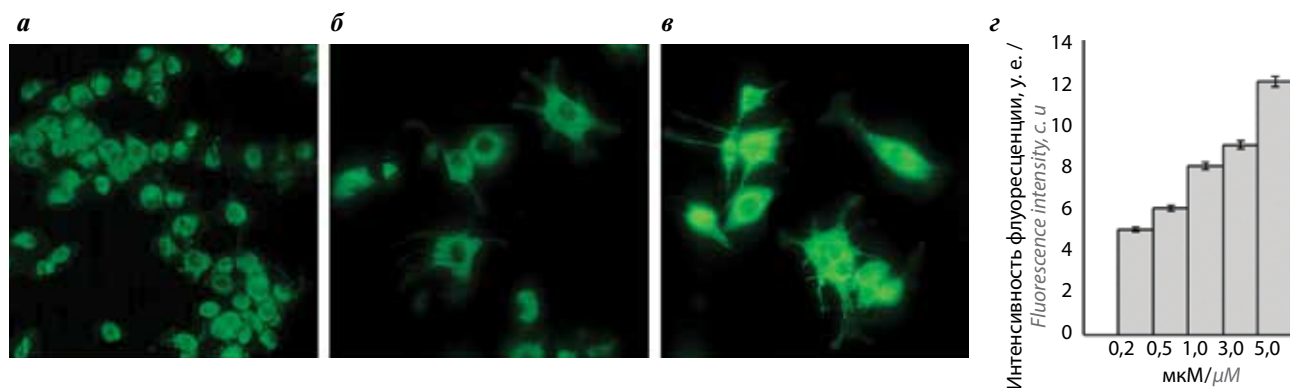


Рис. 3. Влияние CD437 на активацию аутофагии в клетках A549 (иммунофлуоресцентное окрашивание клеток монодансилкадаверином): а – контроль; б – 0,2 мкМ CD437; в – 3 мкМ CD437. ×200. Количественная характеристика процесса ($p < 0,05$) (z)

Fig. 3. CD437 activated autophagy in A549 cells (immunofluorescent staining for monodansylcadaverine): а – control; б – 0.2 μM CD437; в – 3 μM CD437. ×200. Quantitative characteristics of the process ($p < 0.05$) (z)

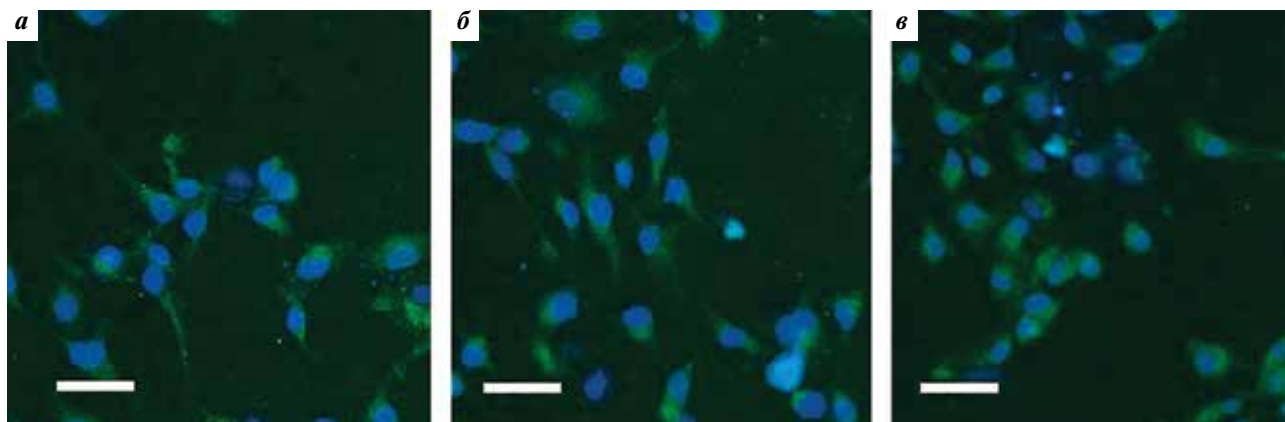


Рис. 4. Влияние CD437 на активацию аутофагии в клетках A549 (экспрессия LC-3B): а – контроль; б – 0,2 мкМ CD437; в – 3 мкМ CD437. × 200

Fig. 4. CD437 activated autophagy in A549 cells (LC-3B expression): а – control; б – 0.2 μM CD437; в – 3 μM CD437. × 200

белка [18]. Согласно литературным данным, клетки карциномы легкого A549 имеют низкий базальный уровень экспрессии данного белка, но инкубирование клеток с цитотоксическим агентом в концентрациях, приближающихся к IC_{50} , приводит к заметному повышению экспрессии белка LC-3B в опухолевой клетке [19]. На рис. 4а, б, в представлено иммуноцитохимическое окрашивание клеток A549 на экспрессию LC-3B. Можно видеть, что стимуляция аутофагии 3 мкМ CD437 существенно не влияет на экспрессию LC-3B.

Полученные нами результаты указывают на то, что CD437, по всей видимости, вовлекается в слияние аутофагосомы с лизосомой. Для подтверждения участия CD437 в активации аутофагии мы ингибировали апоптоз в клетках A549, ожидая активации аутофагии: каспазо-зависимое расщепление Beclin 1 и Atg3 было показано несколько лет назад [20]. В качестве ингибитора апоптоза мы выбрали панкаспазный ингибитор, zVAD-fmk, который не влияет на изменение трансмембранного потенциала митохондрий

и высвобождение цитохрома с, инициирующего формирование апоптосомы и активацию каспазы-3. zVAD-fmk необратимо связывается с активным центром каспаз, блокируя расщепление таргетных белков. В условиях ингибирования апоптоза 50 мкМ zVAD-fmk 3,0 мкМ CD437 не влияли на накопление аутофагосом (рис. 5а, б, в), это указывало на то, что аутофагическая вакуолизация происходит раньше и не зависит от апоптотического процесса. В условиях блокирования апоптоза уровень LC-3B при стимуляции аутофагии 1–3 мкМ CD437 практически не отличался от его экспрессии в контрольных клетках (рис. 5г, д, е), что подтверждало участие CD437 в блокировании формирования аутолизосом. Таким образом, блокирование апоптоза в клетках, которые росли с CD437, не активирует аутофагию.

Другим подтверждением участия CD437 в биогенезе аутолизосом явился аддитивный эффект CD437 и антималярийного препарата CQ – ингибитора терминальной стадии аутофагии [21]. Известно, что CQ накапливается в эндолизосомном компартменте,

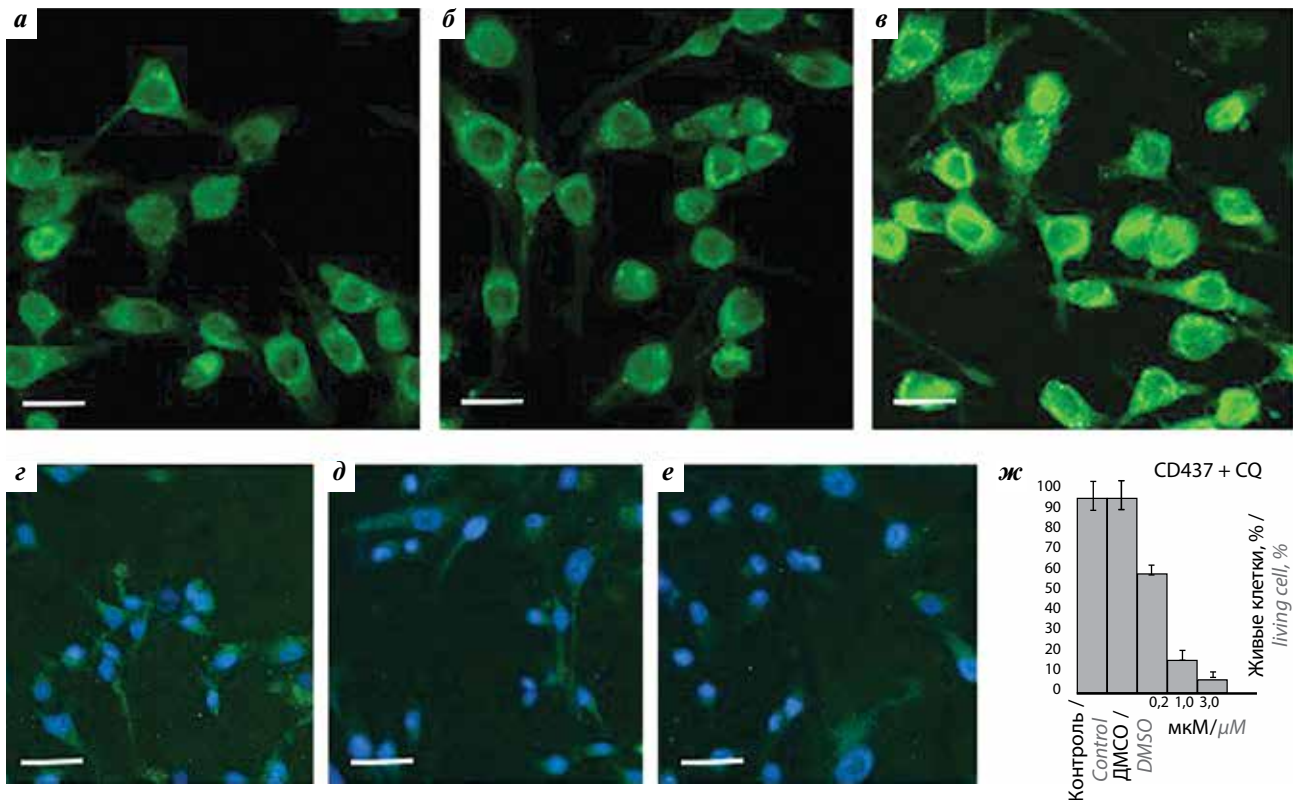


Рис. 5. CD437 блокирует слияние аутофagosомы с лизосомой: а – интенсивность флуоресценции монодансилкадаверина (MDC) в контрольных клетках; б – интенсивность флуоресценции MDC в присутствии 50 μM zVAD-fmk; в – интенсивность флуоресценции MDC в присутствии 50 μM zVAD-fmk и 3 μM CD437; г – экспрессия LC-3B в контрольных клетках; д, е – экспрессия LC-3B в присутствии 1 и 3 μM CD437 в условиях блокирования апоптоза 50 μM zVAD-fmk; ж – влияние 20 μM хлорокина (CQ), ингибитора терминальной фазы аутофагии, на гибель клеток A549, индуцированную CD437 (0,2–3,0 μM). $\times 200$

Fig. 5. CD437 disrupted autophagosome-lysosome fusion: а – immunofluorescent staining for monodansilkadaverine (MDC) of control cells; б – Immunofluorescent staining for MDC cells grown in the presence of 50 μM zVAD-fmk; в – immunofluorescent staining for MDC cells grown in the presence of 50 μM zVAD-fmk and 3 μM CD437; г – LC-3B expression in control cells; д, е – LC-3B expression in cells grown in the presence of 1 and 3 μM CD437 under conditions of apoptosis inhibition by 50 μM zVAD-fmk; ж – effect of 20 μM chloroquine (CQ), inhibitor of terminal phase of autophagy, on CD437-induced A549 cell death. $\times 200$

способствуя деацидификации лизосом и нарушая ферментативные лизосомальные функции. При воздействии на клетки 3 μM CD437 в присутствии нецитотоксических концентраций CQ (20 μM) живых клеток практически не оставалось (рис. 5ж). По всей видимости, CD437 и CQ действуют на разные мишени в слиянии аутофagosомы с лизосомой или CD437 является ингибитором других лизосомо-опосредованных функций. Таким образом, получено экспериментальное подтверждение блокирования CD437 цитопротекторной функции аутофагии.

Заключение

В России рак легкого является наиболее часто встречающейся злокачественной опухолью и наиболее распространенной причиной смерти от онкологии. В случае нелеченого рака легкого 87 % больных умирают в течение 2 лет с момента установления диагноза [22]. Совместное проведение хирургического, лучевого и медикаментозного лечения позволяет повысить выживаемость больных, однако на поздних

стадиях заболевания выживаемость остается по-прежнему низкой и за последние десятилетия существенно не улучшилась.

Несмотря на то что нарушение процессов апоптоза является лишь одним из признаков инициации злокачественного новообразования, современная противоопухолевая терапия направлена, в основном, на активацию апоптоза в опухолевых клетках. Хотя существуют успехи в лечении злокачественных новообразований, проблема возникновения резистентности остается актуальной. В последние годы в качестве мишени для преодоления лекарственной резистентности активно изучается процесс аутофагии. В настоящее время достоверно известно, что нелетальный уровень стресса обычно активирует антистрессовую киназу (PI-3K) с последующей активацией аутофагии по mTOR-сигнальному пути [23]. Такой путь сегодня рассматривается как цитопротекторная функция аутофагии, когда расщепление эндогенных макромолекул в аутолизосомах обеспечивает клетку строительным материалом и энергией,

или когда поврежденные органеллы клетки должны быть удалены. Если стрессовое воздействие на клетку превышает критические значения по длительности или интенсивности, в клетках включается каспаза-зависимое расщепление белков Atg3 и Beclin 1, отменяется аутофагия и наблюдается апоптотическая гибель клетки [19]. В недавних исследованиях было показано, что ингибиторы аутофагии на основе хинолина в сочетании с традиционной химиотерапией значительно увеличивают выживаемость и улучшают качество жизни пациентов с мультицент-

ральной глиобластомой и другими солидными опухолями [24].

Ингибирование слияния аутофагосомы с лизосомой CD437, обнаруженное нами в ходе исследования, вместе с данными литературы о том, что CD437 практически не проявляет цитотоксического эффекта на нормальных бронхиальных эпителиальных клетках легкого [25, 26], позволяют поднять вопрос о возможности нового режима лечения рака легкого на основе комбинирования CD437 с цитотоксическими препаратами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wolf G. A history of vitamin A and retinoids. *FASEB J* 1996;10:1102–1107. DOI: 10.1096/fasebj.10.9.8801174.
2. Goodman G.E., Alberts D.S., Meyskens F.L. Retinol, vitamins, and cancer prevention: 25 Years of learning and relearning. *J Clin Oncol* 2008;26:5495–6. DOI: 10.1200/JCO.2008.19.0884.
3. Smith W.E., Yazdi E., Miller L. Carcinogenesis in pulmonary epithelia in mice on different levels of vitamin A. *Environ Res* 1972;5:152–63. DOI: 10.1016/0013-9351(72)90030-8.
4. Zhao X., Spanjaard R.A. The apoptotic action of the retinoid CD437/AHPN: diverse effects, common basis. *J Biomed Sci* 2003;10(1):44–9. DOI: 10.1007/BF02255996.
5. Chen J.Y., Clifford J., Zusi C. Two distinct actions of retinoid-receptor ligands. *Nature* 1996;382(6594):819–22. DOI: 10.1038/382819a0.
6. Garattini E., Gianni M., Terao M. Retinoid related molecules an emerging class of apoptotic agents with promising therapeutic potential in oncology: pharmacological activity and mechanisms of action. *Curr Pharm Des* 2004;10(4):433–48. DOI: 10.2174/1381612043453351.
7. White E. The role for autophagy in cancer. *J Clin Invest* 2015;125(1):42–6. DOI: 10.1172/JCI73941.
8. Levy J.M., Towers C.G., Thorburn A. Targeting autophagy in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2017;17(9):528–42. DOI: 10.1038/nrc.2017.53.
9. Bollag W., Isnardi L., Jablonska S. Links between pharmacological properties of retinoids and nuclear retinoid receptors. *Int J Cancer* 1997;70:470–2. PMID: 9033657.
10. Zhao X., Demary K., Wong L., Vaziri C. Retinoic acid receptor-independent mechanism of apoptosis of melanoma cells by the retinoid CD437 (AHPN). *Cell Death Differ* 2001;8(9):878–86. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400894.
11. Shyu R.Y., Lin D.Y., Reichert U. Synthetic retinoid CD437 induces cell-dependent cycle arrest by differential regulation of cell cycle associated proteins. *Anticancer Res* 2002;22(5):2757–64. PMID: 12529993.
12. Lotan R. Receptor-independent induction of apoptosis by synthetic retinoids. *J Biol Regul Homeost Agents* 2003;17(1):13–28. PMID: 12757019.
13. Saxton R.A., Sabatini D.M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017;168:960–76. PMID: 28283069.
14. Karimi Roshan M., Soltani A., Soleimani A. Role of AKT and mTOR signaling pathways in the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. *Biochimie* 2019;165:229–34. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.08.003.
15. Guo X., Wang X.F. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* 2009;19(1):71–88. DOI: 10.1038/cr.2008.302.
16. Xuefei Li, Xiaorong Hu, Jichun Wang. Inhibition of autophagy via activation of PI3K/Akt/mTOR pathway. *Int J Mol Med* 2018;42(4):1917–24. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3794.
17. Perry C.N., Kyo S., Hariharan N. Novel methods for measuring cardiac autophagy. *Methods Enzymol* 2009;453:325–42. DOI: 10.1016/S0076-6879(08)04016-0.
18. Maheswari U., Sadras S.R. Mechanism and Regulation of Autophagy in Cancer. *Crit Rev Oncol* 2018;23(5v6):269–80. DOI: 10.1615/CritRevOncol.2018028394.
19. Wang Z., Liu G., Jiang J. Profiling of apoptosis- and autophagy-associated molecules in human lung cancer A549 cells in response to cisplatin treatment. *It J Oncol* 2019;543:1071–85. DOI: 10.3892/ijo.2019.4690.
20. Wirawan E. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria. *Cell Death & Disease* 2010;1(1):e18. DOI: 10.1038/cddis.2009.16.
21. Pasquier B. Autophagy inhibitors. *Cell Mol Life Sci* 2016;73(5):985–1001. DOI: 10.1007/s00018-015-2104-y.
22. Мерабишвили В.М., Арсеньев А.И., Тарков С.А. Заболеваемость и смертность населения от рака легкого, достоверность учета. *Сибирский онкологический журнал* 2018;17(6):15–26. DOI.org/10.21294/1814-4861-2018-17-6-15-26. [Merabishvily V.M., Arseniev A.I., Tarkov S.A. Lung cancer morbidity and mortality in population, accuracy of accounting. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian journal of oncology* 2018;17(6):15–26. (In Russ.)].
23. Xu Z., Han X., Ou D., Liu T. Targeting PI3K/AKT/mTOR-mediated autophagy for tumor therapy. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020;104(2):575–87. DOI: 10.1007/s00253-019-10257-8.
24. Noonan J., Zarrer J., Murphy B.M. Targeting Autophagy in Glioblastoma. *Crit Rev Oncol* 2016;21(3–4):241–52. DOI: 10.1615/CritRevOncol.
25. Sun S.Y., Kurie J.M., Yue P. Differential responses of normal, premalignant, and malignant human bronchial epithelial cells to receptor-selective retinoids. *Cancer Res* 1999;59(2):431–7. PMID: 10037194.
26. Sun S.Y., Yue P., Chen X. The synthetic retinoid CD437 selectively induces apoptosis in human lung cancer cells while sparing normal human lung epithelial cells. *Cancer Res* 2002;62(8):2430–6. PMID: 11956107.

Благодарности

Авторы благодарят Уласова И.В. за помощь в обсуждении результатов и Рябую О.О. за предоставление ингибиторов PI-3K и хлорокина.

Acknowledgments

The authors thank I. Ulasov for valuable comments and critical reading the MS and O. Ryabaya for providing the PI-3K inhibitors, CQ and LY.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.А. Вартанян / A.A. Vartanian: <https://orcid.org/0000-0001-9342-5523>

Д.А. Хоченков / D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>

Е.Н. Кособокова / E.N. Kosobokova: <https://orcid.org/0000-0002-4660-8519>

В.С. Косоруков / V.S. Kosorukov: <https://orcid.org/0000-0002-8462-2178>

Вклад авторов

А.А. Вартанян: разработка концепции и дизайна статьи, сбор и обработка данных, подготовка рукописи;

Д.А. Хоченков, Е.Н. Кособокова, В.С. Косоруков: сбор и обработка данных, предоставление материалов исследования, анализ и интерпретация данных.

Author's contribution

A.A. Vartanian: developing the concept and design of the article, data collection and processing, preparation of the manuscript;

D.A. Khochenkov, E.N. Kosobokova, V.S. Kosorukov: data collection and processing, providing research materials, data analysis and interpretation.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена в рамках НИОКТР № АААА-А20-120031190017-7 «Разработка и доклиническое исследование лекарственного средства BEL400, предназначенного для терапии опухолей».

Financing. This work was carried out with the financial support of the Russian Ministry of Health within the framework of experimental scientific development program № АААА-А20-120031190017-7 “Development and preclinical study of the drug BEL400 for tumor therapy”.

Статья поступила: 06.10.2020. Принята к публикации: 22.10.2020.

Article submitted: 06.10.2020. Accepted for publication: 22.10.2020.