

УДК 615.2/3:577.352.2:576.36

Д.А. Афанасьева, М.А. Барышникова, Ю.А. Хоченкова, П.В. Гольшико,  
Д.А. Хоченков, Е.В. Степанова, О.О. Рябая

**ЛИПОСОМАЛЬНАЯ АРАНОЗА НЕ ИНДУЦИРУЕТ АУТОФАГИЮ**

ФГБНУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина», Москва

**Контактная информация**

Барышникова Мария Анатольевна, к.фарм.н., ведущий научный сотрудник лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО

адрес: 115478, Москва, Каширское ш., 24; тел. +7(499)324-10-65

e-mail: [ma\\_ba@mail.ru](mailto:ma_ba@mail.ru)

Статья поступила 08.11.2014, принята к печати 24.11.2014.

**Резюме**

Ранее было показано, что араноза в лекарственной форме "Лиофилизат для приготовления раствора для инъекций" (араноза-лио) вызывает клеточную смерть за счет активации апоптоза через CD95-рецептор в отличие от ее липосомальной лекарственной формы, механизм действия которой пока не изучен. Известно, что гибель опухолевых клеток под воздействием противоопухолевых препаратов может также проходить через активацию аутофагии.

**Цель данной работы** – определить влияние липосомальной лекарственной формы аранозы на аутофагию.

Исследование проводили на клеточных линиях меланомы человека *mel Mtp*, *mel Ibr*, *mel Kor*, *mel Z* и *mel Mtp clone X*. Клетки инкубировали в течение 24 ч с аранозой-лио, либо с липосомальной аранозой в концентрации 450 мкг/мл, после чего проводили анализ экспрессии мРНК гена *Beclin 1*.

В результате на большинстве клеточных линий показано снижение экспрессии мРНК *Beclin 1*. Это может быть связано с тем, что липосомальная форма препарата вызывает гибель клеток по механизму внутреннего апоптоза, который подавляет аутофагию.

**Ключевые слова:** араноза, липосомы, аутофагия, клеточная гибель.

D.A. Afanasieva, M.A. Baryshnikova, Yu.A. Khochenkova, P.V. Golyshko,  
D.A. Khochenkov, E.V. Stepanova, O.O. Ryabaya

**THE LIPOSOMAL ARANOSA DOES NOT INDUCE AUTOPHAGY**

FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow

**Abstract**

Previous studies have shown that aranosa-lío initiate cell death by activation of CD95-receptor of apoptosis. The mechanism of liposomal aranosa action is still unknown.

Anticancer drugs may cause tumor cell death by the activation of autophagy.

The purpose of this study was to determine the influence of liposomal aranosa on autophagy.

The study was assessed on human melanoma cell lines *mel Mtp*, *mel Ibr*, *mel Kor*, *mel Z* and *mel Mtp clone X*. The cells were treated with aranosa-lío or liposomal aranosa at concentration 450 µg/ml for 24 hours. The expression of autophagy were analyzed the expression of mRNA *Beclin 1*.

Expression of mRNA *Beclin 1* was reduced on the majority of cell lines, which might be due to the fact that the liposomal form of the drug caused cell death by intrinsic apoptosis which is suppose to suppress autophagy.

**Key words:** aranosa, liposomes, autophagy, cell death.

**Введение**

Идентифицировано несколько вариантов программированной клеточной смерти, таких как внешний и внутренний апоптоз, регулируемый некроз, аутофагия, пироптоз и другие [8; 22; 28]. Среди них наиболее хорошо изучен апоптоз [1; 2; 25; 26; 30–35]. Лекарственные противоопухолевые препараты индуцируют апоптоз по внешнему механизму посредством взаимодействия с «рецепторами смерти» (CD95/Fas, TNF и др) или внутреннему с вовлечением митохондрий. Различные лекарственные формы одного и того же препарата могут индуцировать апоптоз путем активации различных сигнальных механизмов. Наиболее яркий пример – препараты в лекарственной форме лиофилизата для приготовления раствора для инъекций и в липосомальной лекарственной форме [6; 7]. При введении липосомальной лекарственной формы меняются фармакокинетика препарата, время

циркуляции в крови, механизмы взаимодействия и проникновения в клетку [5; 12; 14–17; 24].

Исследования последних лет показывают, что гибель опухолевых клеток, устойчивых к апоптозу, может пойти по пути активации неконтролируемой аутофагии [23]. Аутофагия представляет собой процесс, посредством которого самоликвидируются поврежденные органеллы клетки, внутриклеточные патогены, а также долгоживущие, аномальные или агрегированные белки. Основным механизмом процесса является формирование специализированных структур – аутофагосом.

Это двухмембранные липидные образования (пузырьки), которые захватывают органеллы или часть цитозоля, подлежащие разрушению, и расщепляют их с помощью гидролитических ферментов в аутолизосомах, которые образуются за счет слияния аутофагосом с лизосомами.

Влияние липосомальной лекарственной формы препарата на аутофагию еще не изучалось.

В связи с этим мы поставили задачу сравнить индукцию аутофагии двумя лекарственными формами противоопухолевого препарата аранозы – производного нитрозомочевины. Этот препарат используется для лечения меланомы и опухолей нейроэндокринной природы [11; 19–21]. В лаборатории разработки лекарственных форм ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» получены две лекарственные формы аранозы – лиофилизат для приготовления раствора для инъекций (араноза-лио) и липосомальная [9; 18]. Ранее было показано, что липосомальная араноза не использует CD95/Fas-зависимый внешний путь апоптоза [3; 4; 6; 7; 10].

**Целью настоящей работы** стало определение влияния липосомальной аранозы на модуляцию аутофагии.

## Материалы и методы

### Клеточные линии

Использованы клеточные линии диссеминированной меланомы человека *mel Z*, *mel Kor*, *mel Mtp*, *mel Ibr* и *Mel Mtp clone X*, полученные в НИИ ЭДТО ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» [13; 29]. Клеточные линии культивировали на полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки теленка (ТЭС, HyClone, США); 2мМ/мл глутамин, 50мг/мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия) при 37 °C в атмосфере 5 %-ного CO<sub>2</sub>.

### Определение уровня экспрессии мРНК Beclin1

Детекцию экспрессии мРНК *Beclin 1* определяли с помощью ОТ-ПЦР. Для этого клеточные линии *mel Z*, *mel Kor*, *mel Mtp*, *mel Ibr* и *Mel Mtp clone X* сажали по 2×10<sup>5</sup> клеток на лунку в дуплетах на 6-луночные планшеты в полной среде. Через сутки в лунки с клетками добавляли аранозу-лио в концентрации 450 мкг/мл и липосомальную аранозу в той же концентрации, инкубировали в течение 24 часов, после чего снимали с планшетов и лизировали, используя реагент *TRIzol*. Из лизата клеток выделяли тотальную РНК в системе хлороформ-изопропиловый спирт.

Обратную транскрипцию проводили в соответствии со стандартным протоколом [27]. Реакцию проводили в амплификаторе «Терцик» (Россия) по программам: 24 °C – 10 мин, 42 °C – 50 мин и 70 °C – 15 мин. Использовали праймеры для гена *Beclin1* F: 5'-AAGACAGAGCGATGGTAG-3' и R: 5'-CTGGGCTGTGGTAAGTAA-3' (продукт 282 н.п.); для β-Actin 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' и 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3' (продукт 460 н.п.). Условия амплификации для *Beclin 1* (26 циклов): предварительная обработка 94 °C 2 мин, денатурация ДНК 94 °C 30 с, отжиг праймеров 62 °C 30 с, элонгация 72 °C 1 мин; для β-Actin (24 цикла): 94 °C 2 мин, 94 °C 20 с; 60 °C – 20 с; 72 °C – 45 с. Продукты амплификации анализировали после электрофореза в 1,5 % -ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий в стандартной концентрации. Уровень экспрессии *Beclin 1* оценивали в относительных единицах оптической плотности (о.е.) с помощью программы «ImageJ» по отношению к уровню β-Actin.

## Результаты и обсуждение

Исследование было проведено на 5 клеточных линиях метастатической меланомы человека. В

предварительных исследованиях было показано, что клеточные линии *mel Kor* и *mel Mtp* имеют ген *B-RAF*<sup>WT</sup> "дикого" типа, а *mel Ibr* и *mel Z* – мутантный статус *B-RAF*<sup>V600E</sup>. Клеточная сублиния *mel MTP-cloneX* на наличие мутаций в гене *B-RAF* не тестирована.

Анализ модуляции аутофагии проводили после инкубации клеток с препаратами в концентрации 450 мкг/мл в течение 24 ч по изменению количества мРНК гена *Beclin1*.

Предварительные результаты показали, что выживаемость клеток, инкубированных с аранозой-лио в концентрации 450 мкг/мл, составляет 50–76 %, тогда как при той же концентрации и инкубации с липосомальной аранозой выживает 39–52 % клеток (см. таблицу). Наличие мутаций в гене *B-RAF* не оказывало влияния на цитотоксичность аранозы в обеих лекарственных формах.

Для определения влияния двух лекарственных форм аранозы на процесс аутофагии проводили анализ экспрессии мРНК гена *Beclin 1*. Белок Beclin 1 (Atg6) стимулирует аутофагию, участвуя в инициации образования аутофагосом.

Базальный уровень мРНК *Beclin 1* регистрировали в клетках 4 из 5 исследованных линий меланомы (*mel Mtp*, *mel Ibr*, *mel Kor*, *mel Z*), его величина варьировала от 0,19 до 0,49 о.е. Линия *mel Mtp clone X* имела минимальную базальную экспрессию мРНК *Beclin 1* (рис. 1), и в дальнейшем не анализировалась.

Способность клеточных линий к индукции аутофагии оценивалась по соотношению уровня мРНК *Beclin 1* в условиях 24-часовой инкубации с препаратами аранозы. При соотношении > 1 клеточную линию оценивали как способную к индукции аутофагии.

Араноза-лио блокировала аутофагию на одной из четырех клеточных линий меланомы. Значимое снижение экспрессии гена *Beclin 1* наблюдалось только на клеточной линии *Mel Z*. На клеточных линиях *mel Mtp*, *mel Ibr* араноза-лио вызывала статистически незначимую индукцию аутофагии в среднем на 0,1 о.е. (рис. 2, А и Б). Напротив, на клеточной линии *mel Kor* араноза-лио вызывала незначительное снижение аутофагии (рис. 2, В и Г).

Липосомальная араноза вдвое снижала экспрессию мРНК *Beclin 1* по сравнению с контролем на 3 клеточных линиях *mel Mtp*, *mel Z* и *mel Kor*. Только на клетках *mel Ibr* была отмечена незначительная индукция аутофагии (рис. 2).

Таким образом, использование липосомальной аранозы подавляло аутофагию на клеточных линиях меланомы.

В настоящее время аутофагию большинством исследователей рассматривают как стратегию защиты опухолевых клеток от гибели, вызываемой противоопухолевыми препаратами. Выступая в качестве основного механизма удаления поврежденных химиопрепаратами органелл и белков, аутофагия рассматривается как один из важных путей выживаемости опухолевых клеток. Предполагается, что ее ингибирование приведет к фатальным повреждениям в клетке, и, в конечном итоге, к массовой клеточной гибели.

Аутофагию и апоптоз часто наблюдают в одной клетке, в большей части случаев потому, что аутофагия предшествует апоптозу. Существует несколько молекулярных механизмов, обеспечивающих связь между аутофагией и апоптозом, так как часто они находятся под контролем множества общих сигнальных механизмов, они также могут взаимно регулировать друг друга.

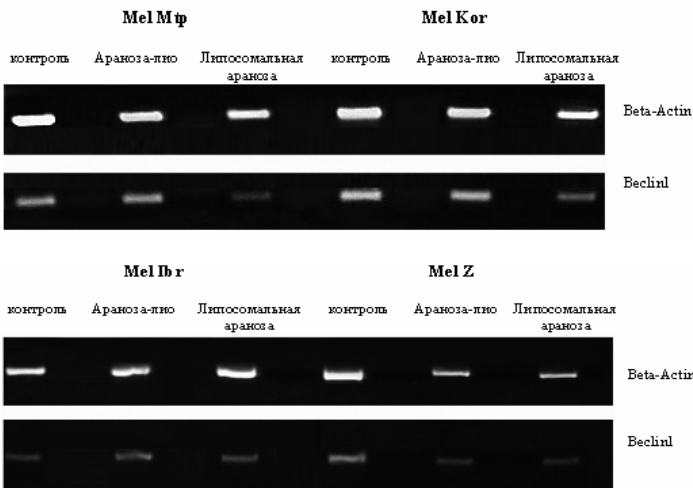


Рис. 1. Электрофореграмма изменения уровня Beclin1 на клеточных линиях меланомы под влиянием аранозы-лио и липосомальной аранозы.

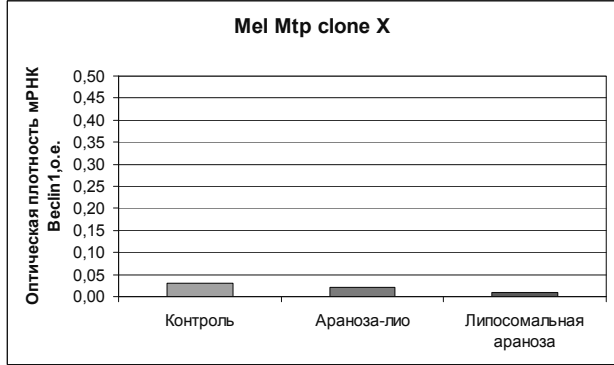
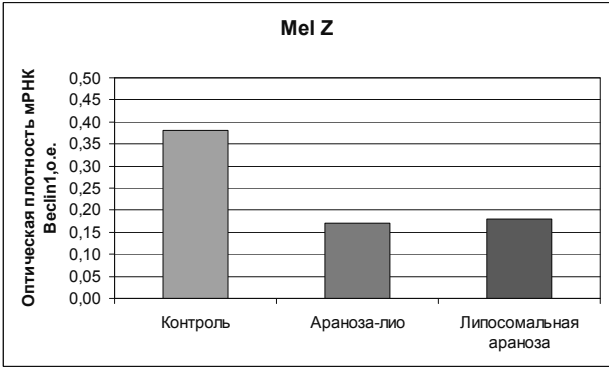
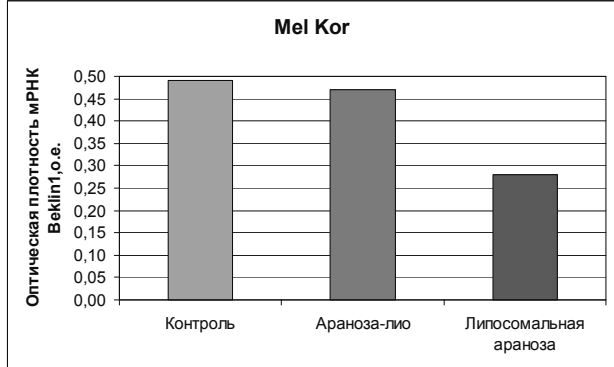
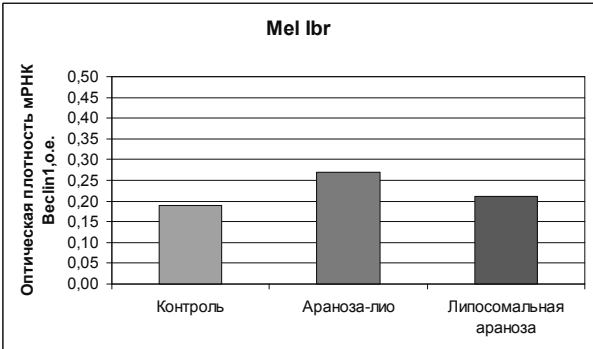
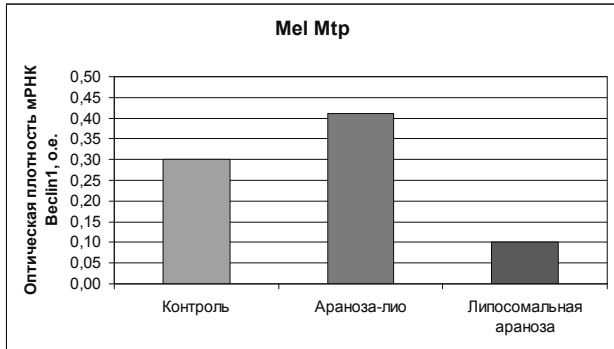
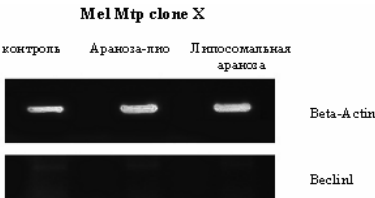
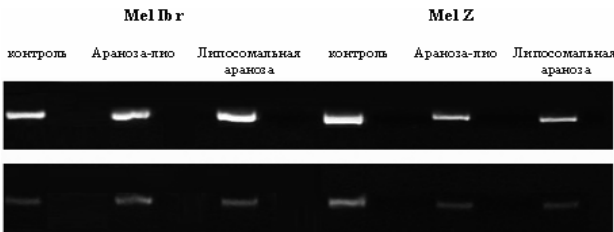


Рис. 2. Изменение экспрессии мРНК Beclin1 под влиянием Аранозы-лио и липосомальной аранозы на клеточных линиях *mel Mtp* (А), *mel Ibr* (Б), *mel Kor* (В), *mel Z* (Г) и *mel Mtp clone X* (Д)

Таблица

Модуляция аутофагии на клеточных линиях меланомы при инкубации с Аранозой-лио и липосомальной аранозой

Клеточная линия	Статус <i>B-RAF</i>	Араноза-лио		Липосомальная араноза	
		Выживаемость клеток, %	Изменение экспрессии Beclin 1	Выживаемость клеток, %	Изменение экспрессии Beclin 1
<i>Mel Kor</i>	<i>B-RAF</i> <sup>WT</sup>	50	0,9	41	0,6
<i>Mel Mtp</i>	<i>B-RAF</i> <sup>WT</sup>	70	1,4	52	0,3
<i>Mel Ibr</i>	<i>B-RAF</i> <sup>V600E</sup>	76	1,4	40	1,1
<i>Mel Z</i>	<i>B-RAF</i> <sup>V600E</sup>	60	0,4	39	0,5

Путем аутофагии может быть снижено количество проапоптотических белков в цитоплазме клетки. На более поздних стадиях с помощью аутофагии разрушается эффекторная каспаза-8. Если в клетках все-таки запускается апоптоз, в большинстве случаев включаются механизмы ингибирования аутофагии. Считается, что это необходимо для блокирования цитопротекторных функции аутофагии при усилении апоптотических сигналов. Большой частью механизмы блокирования включают каспаза-зависимое расщепление белков Atg3 и Beclin1. При определенных условиях активация апоптоза может сопровождаться усилением аутофагии.

Таким образом, существует тонко регулируемый диалог между аутофагией и апоптозом. Молекулярные механизмы, которые контролируют решение запустить один или оба этих процесса в ответ на специфические стимулы, остаются, в большей степени, неизвестными.

### Литература

1. Барышников А.Ю. Взаимодействие опухоли и иммунной системы организма // Практическая онкология. – 2003. – Т. 4, № 3. – С. 127–30.
2. Барышников А.Ю., Шишкин Ю.В. Программированная клеточная смерть (апоптоз) // Российский онкологический журнал. – 1996. – №1. – С. 58.
3. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Бурова О.С. и др. Роль CD95/Fas рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 3–8.
4. Барышникова М.А., Грищенко Н.В., Полозкова А.П. Влияние лекарственных форм аранозы на индукцию апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 64.
5. Барышникова М.А., Занцева М., Барышников А.Ю. Взаимодействие липидных капсул с клеткой // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 11–5.
6. Грищенко Н.В., Барышникова М.А., Полозкова А.П. и др. Липосомальные противоопухолевые препараты не используют CD95-зависимый сигнальный путь апоптоза // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
7. Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 49–54.
8. Ковалева О.В., Шитова М.С., Збаровская И.Б. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? // Клиническая онкогематология. – 2014. – Т. 7, № 2. – С. 103–13.
9. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Полозкова А.П., Оборотова Н.А. Разработка наноструктурированной лекарственной формы аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
10. Козеев С.Г., Барышникова М.А., Афанасьева Д.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 24.
11. Лихванцева В.Г., Оборотова Н.А., Когония Л.М. и др. Первый опыт применения аранозы в лечении увеальных меланом // Российский биотерапевтический журнал. – 2005. – Т. 4, № 3. – С. 34–9.
12. Матюшин А.А., Барышникова М.А., Барышников А.Ю., Караулов А.В. Липосомы: организм, опухоль, клетка // Физиология и патология иммунной системы. Иммунофармакогеномика. – 2013. – Т. 17, № 6. – С. 3–10.
13. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин // Вестник РАМН. – 2005. – № 7. – С. 37–40.
14. Оборотова Н.А. Липосомальные лекарственные формы противоопухолевых препаратов (обзор) // Химико-фармацевтический журнал. – 2001. – Т. 35, № 5. – С. 30.
15. Оборотова Н.А., Барышников А.Ю. Липосомальные лекарственные формы в клинической онкологии // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 121, № 5. – С. 464.
16. Оборотова Н.А. Направленная доставка противоопухолевых препаратов // Антибиотики и химиотерапия – 1991. – Т. 36, № 10. – С. 47.
17. Оборотова Н.А., Санарова Е.В. Роль новых фармацевтических технологий в повышении избирательности действия противоопухолевых препаратов // Российский химический журнал. – 2012. – № 3–4. – С. 33–40.
18. Оборотова Н.А., Лопатин П.В. 30 лет лабораторной разработки лекарственных форм ГУ РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 3–7.
19. Полозкова С.А., Орел Н.Ф., Маркович А.А., Горбунова В.А. Химиотерапия аранозой в монорежиме и в комбинации с другими препаратами метастатических нейроэндокринных опухолей // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т. 11, № 2. – С. 42.
20. Полозкова С.А., Горбунова В.А., Орел Н.Ф., Маркович А.А. Клинический опыт применения аранозы в режиме монотерапии и в комбинации с капецитабином, темозоломидом и доксорубицином при метастатических нейроэндокринных опухолях // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12. – № 2. – С. 67.
21. Полозкова С.А., Степанова Е.В., Барышников А.Ю. и др. Экспрессия MGMT в опухолевой ткани при лечении пациентов с нейроэктодермальными опухолями режимами на основе аранозы // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 21–6.
22. Рыжов С.В., Новиков В.В. Молекулярные механизмы апоптотических процессов // Российский биотерапевтический журнал. – 2002. – Т. 1, № 1. – С. 27–33.
23. Рябая О.О., Цыганова И.В., Сидорова Т.И. и др. Влияние активирующих мутаций V600 гена B-RAF на способность клеток меланомы к аутофагии // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2013. – № 3. – С. 68–72.
24. Толчева Е.В., Оборотова Н.А. Липосомы как транспортное средство для доставки биологически активных молекул // Российский биотерапевтический журнал. – 2006. – Т. 5, № 1. – С. 54–61.
25. Baryshnikov A.Yu., Polosukhina E.R., Tupitsin N.N. et al. CD95 (Fas/APO-1) antigen is a new prognostic marker of blast cells of acute lymphoblastic leukaemia patients / Book Editor(s): Kaspers, G.J.L.; Pieters, R.; Veerman, A.J.P. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma III Book Series: Advances in Experimental Medicine and Biology? 1999. – 457–P. 251–8.
26. Baryshnikov A.Yu., Polosukhina E.R., Zabolina T.N. et al. FAS(APO-1/CD95) antigen: new activation marker for evaluation of the immune status // Russian Immunological J. – 1997. – 2(2). – P. 115.
27. Deng R., Li W., Guan Z. et al. Acetylcholinesterase expression mediated by c-Jun-NH2-terminal kinase pathway during anticancer drug-induced apoptosis // Oncogene. – 2006. – 25. – P. 7070–7.
28. Galuzzi L., Vitale L., Abrams J.M. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012 // Cell Death Differ. – 2012. – 19(1). – P. 107–20.
29. Michailova I.N., Morozova L.Ph., Golubeva V.A. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines // Melanoma Research. – 2008. – № 5. – P. 303–13.
30. Polosukhina E.R., Zabolina T.N., Shishkin Yu.V. et al. Studing of Fas(APO-1/CD95) antigen expression by flow cytometry with monoclonal antibodies IPO-4 // Experimental Oncology. – 1997. – 19(3). – P. 206–11.
31. Polosukhina E.R., Baryshnikov A.Yu., Shishkin Yu.V. et al. Expression of antigen CD95(Fas/APO-1) mediating apoptosis in hemoblastosis using monoclonal antibodies ICO-160 // Hematology and transfusiology. – 2000. – 45(4). – P. 3–6.
32. Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Blokhin D.Yu. et al. CD95-deficient cells of Jurkat/A4 subline are resistant to drug-induced apoptosis // Experimental Oncology. – 2001. – 23(3). – P. 175–81.
33. Vartanian A.A., Burova O.S., Stepanova E.V. et al. The involvement of apoptosis in melanoma vasculogenic mimicry // Melanoma Research. – 2007. – 11(1). – P. 1–8.
34. Vartanian A.A., Baryshnikov A.Yu. Crosstalk between apoptosis and antioxidants in melanoma vasculogenic mimicry // Advances in Experimental Medicine and Biology. – 2007. – 601. – P. 145–53.
35. Wong R.S. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment // J/Exp Clin Cancer Res. – 2011. – 26. – P. 30–87.

### Заключение

Липосомы доставляют препарат в опухолевые клетки путем эндоцитоза, в результате чего не происходит контакта противоопухолевого препарата с клеточной мембраной, лекарственное вещество высвобождается из липосомы внутри клетки.

Снижение экспрессии мРНК Beclin1 под действием липосомальной аранозы может быть связано с тем, что препарат вызывает гибель клеток, запуская внутренний путь апоптоза, который, в свою очередь, подавляет аутофагию.

Изучение способности лизосомальных форм препаратов влиять на механизмы аутофагии требует дополнительного изучения.

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 12-04-33257 мол\_а\_вед.*