

# ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА *CD95/FAS* В КЛЕТКАХ ЛИНИЙ МЕЛАНОМЫ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ ЛИПОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ АРАНОЗЫ

Д.А. Афанасьева, В.А. Мисюрин, А.В. Пономарев, И.М. Лученко, О.С. Бурова, М.А. Барышникова

ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;  
Россия, 115478, Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Мария Анатольевна Барышникова [ma\\_ba@mail.ru](mailto:ma_ba@mail.ru)

**Введение.** Араноза является алкилирующим агентом, благодаря чему демонстрирует цитотоксические и цитостатические эффекты. Ряд исследований показал, что липосомальная лекарственная форма аранозы обладает некоторыми преимуществами перед традиционной растворимой формой. Интересно, что липосомальная форма некоторых алкилирующих агентов, например цисплатина, повышает уровень экспрессии мРНК генов внешнего пути апоптоза.

**Цель исследования** — изучение влияния липосомальной и свободной форм аранозы на активность генов, кодирующих рецепторы внешнего пути апоптоза *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* и *DR4/5* в клетках линий меланомы *mel Kor*, *mel Z*, *mel Mtp*, *mel Mtp-X*, *mel Ibr*, *mel Ch*, *mel Is* и *mel R*.

**Материалы и методы.** Клеточные линии меланомы человека инкубировали с 2 лекарственными формами аранозы — лиофилизатом для приготовления раствора для инъекций и липосомальной. В количественной полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени исследовали уровень экспрессии генов *DR3*, *DR4/5*, *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2* и *TRAIL*. Уровень экспрессии рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

**Результаты.** Наиболее подверженным изменениям оказался уровень экспрессии мРНК гена *CD95/Fas*. Липосомальная форма аранозы повысила уровень экспрессии *CD95/Fas* в клетках линий *mel Ibr* и *mel Mtp-X* и понизила в клетках линий *mel Ch* и *mel Is*.

**Выводы.** Таким образом, липосомальная форма аранозы может влиять на устойчивость клеток линий меланомы к апоптозу.

**Ключевые слова:** мРНК, суперсемейство *TNFSFR*, *CD95/Fas*, апоптоз, липосомы, производные нитрозоалкилмочевины

DOI: 10.17650/1726-9784-2016-15-3-34-39

## LIPOSOMAL ARANOSE CAN CHANGE MRNA *CD95/FAS* EXPRESSION LEVEL IN MELANOMA CELL LINES

D.A. Afanasieva, V.A. Misyurin, A.V. Ponomarev, I.M. Luchenko, O.S. Burova, M.A. Baryshnikova

N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Ministry of Health of Russia; 24 Kashyrskoe shosse, Moscow, 115478, Russia

**Background.** Aranose is alkylating antineoplastic agent with cytotoxic and cytostatic properties. Liposomal form of aranose has advantages compared with traditional dosage form. Another alkylating agent, cisplatin, promotes mRNA increase expression level of genes, which control external apoptosis way.

**Objective.** We assume that liposomal form of aranose can change the *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* and *DR4/5* expression level in melanoma cell lines *mel Kor*, *mel Z*, *mel Mtp*, *mel Mtp-X*, *mel Ibr*, *mel Ch*, *mel Is* and *mel R*.

**Materials and methods.** There are two forms of aranose were used in this work: liposomal form and traditional diluted form for injection. Melanoma cell lines were incubated with both forms. We used RQ PCR to evaluate mRNA expression of *DR3*, *DR4/5*, *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2* and *TRAIL* relatively gene *ABL*.

**Results.** *CD95/FAS* mRNA expression level was most changeable. Liposomal aranose increase *CD95/FAS* expression level in *mel Ibr* and *mel Mtp-X* cell lines and reduced *CD95/FAS* expression level in *mel Ch* and *mel Is*.

**Conclusion.** Thus, liposomal aranose can change mRNA *CD95/FAS* expression level in melanoma cell lines. Using this process, liposomal form can affect the apoptotic cell death of melanoma.

**Key words:** mRNA, *TNFSFR* superfamily, *CD95/Fas*, apoptosis, liposomes, nitrosoureas

### Введение

Ранее было обнаружено, что липосомальные формы препаратов из класса нитрозомочевин, в частности аранозы и ормустина, оказывают цитотоксическое действие на клеточные линии, резистентные к традиционной инъекционной лекарственной фор-

ме — лиофилизату для приготовления раствора для инъекций [1]. В клетках резистентных культур не экспрессируется рецептор внешнего пути апоптоза *CD95/Fas* [2, 3]. На основании этого можно предположить, что в противоопухолевом эффекте аранозы-лио и ормустина-лио рецептор *CD95/Fas* играет

значимую роль, так как в его отсутствие клетка менее чувствительна к инициации внешнего пути апоптоза (клеточной гибели). Из данных литературы известно, что липосомальный цисплатин вызывает гибель опухолевых клеток, резистентных к относительно низким дозам химиопрепаратов, активируя экспрессию белков, ответственных за реализацию внешнего пути апоптоза [4, 5]. Внешний путь активации апоптоза начинается с контакта мембранных рецепторов суперсемейства TNFSFR, гомологичных друг другу, с собственными лигандами [6]. Потеря этих рецепторов часто становится причиной развития лекарственной резистентности опухолевых клеток. С другой стороны, восстановление исходного уровня экспрессии данных рецепторов на поверхности клетки может увеличить эффективность противоопухолевой терапии.

В связи с этим целью настоящей работы было исследование влияния липосомальной и свободной форм аранозы на активность генов, кодирующих рецепторы внешнего пути апоптоза *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* и *DR4/5* в клетках линий меланомы *mel Kor*, *mel Z*, *mel Mtp*, *mel Mtp-X*, *mel Ibr*, *mel Ch*, *mel Is* и *mel R*.

## Материалы и методы

### Клеточные линии

Исследования проводили на 8 клеточных линиях диссеминированной меланомы человека: *mel Kor*, *mel Z*, *mel Mtp*, *mel Mtp-X*, *mel Ibr*, *mel Ch*, *mel Is* и *mel R*, полученных из банка клеточных культур ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 мМ NEPERES, 2 мМ L-глутамин, пенициллин (25 000 Ед) — стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> (полная среда). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

### Противоопухолевые препараты

Исследовали 2 лекарственных формы аранозы, препарата из группы нитрозоалкилмочевины:

- араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 500 мг (араноза-лио), производства филиала «Наукопрофи» ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
- липосомальная лекарственная форма аранозы (липосомальная араноза), предоставленная лабораторией разработки лекарственных форм НИИ ЭДнТО ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Было изучено влияние аранозы-лио, липосомальной аранозы и пустых липосом на экспрессию мРНК

рецепторов апоптоза суперсемейства TNFSFR — CD95/Fas, TNFR1, TNFR2, TRAIL, DR3, DR4/5 в клетках линий меланомы человека. Клетки инкубировали с препаратами в концентрации 0,5 ИК50 в течение 72 часов.

### Подготовка клеточного материала и выделение общей РНК

Клетки снимали с культуральных флаконов 0,02 % раствором Версена объемом 2 мл, содержащим 0,25 % трипсина. Клетки находились в трипсине 2 мин при постоянном наблюдении за их состоянием с помощью микроскопа. Добавляли 10 мл буфера STE (0,1 М NaCl, 1 М трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) и центрифугировали в течение 5 мин при 800 об/мин. Удаляли супернатант, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл физиологического раствора и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин. Из полученного осадка клеток далее выделяли РНК.

Выделение РНК из предварительно обработанных образцов производилось по протоколу, предложенному P. Chomczynski и N. Sacchi [7]. Подготовленный клеточный материал лизировали в 0,5 мл гуанидин-тиоционатного буфера (4 М тиоционата гуанидина, 25 мМ цитрата натрия, 0,5 % N-лаурилсаркозината натрия и 0,1 М меркаптоэтанола). Во время лизиса материал пропускали через иглу 19G не менее 20 раз. Далее в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (pH 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (pH 4,2), встряхивали и добавляли 0,25 мл хлороформа. Полученную смесь встряхивали до молочно-белого цвета и центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин и охлаждении до 4 °С. После центрифугирования отбирали 0,65 мл верхней водной фазы, содержащей клеточную РНК, и смешивали с 0,65 мл изопропанола. Инкубирование РНК в изопропанолу проводилось в течение 20 ч при температуре –20 °С. После инкубирования РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 12 000 об/мин, удаляли супернатант и 2 раза промывали в 80 % этаноле. После промывок осадок РНК высушивали в термостате в течение 20 мин при 37 °С, растворяли в 20 мкл деионизованной воды и измеряли концентрацию раствора.

Для синтеза кДНК с использованием ревертазы брали 2 мкг матричной РНК, выделенной на предыдущем этапе. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием фермента RevertAid Reverse и коммерческого набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, предложенных фирмой-производителем. Для отжига использовали смесь случайных гексамеров («Синтол», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали рабочую смесь без добавления РНК. Пробу доводили до конечного объема 120 мкл деионизованной водой.

### Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени

Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием 2-кратной реакционной смеси (40 мМ трис-НСl, 100 мМ KCl, 4 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ каждого из 4 дезоксирибонуклеотидов и 0,2 мМ β-меркаптоэтанола) и Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу было добавлено 5 μl кДНК, 250 нМ прямого, 250 нМ обратного праймера и 140 нМ флуоресцентного зонда. Подбор праймеров и флуоресцентных зондов проводили с использованием программы Vector NTI 10 на основе данных нуклеотидных последовательностей генов *DR3*, *DR4/5*, *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2* и *TRAIL*, доступных на интернет-ресурсе <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

В каждом образце был исследован уровень экспрессии генов *DR3*, *DR4/5*, *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2* и *TRAIL*. Уровень экспрессии рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

Данный эксперимент проводили на приборе DTlite («ДНК-технология», Россия). Программа проведения реакций была следующей: предварительная обработка в течение 5 мин при 94 °C и 45 циклов денатурации в течение 10 с при 94 °C с последующим отжигом праймеров и синтезом в течение 12 с при 60 °C.

Для детекции флуоресценции был выбран канал Нех. Измерения велись по общепринятой методике относительно гена *ABL*, уровень экспрессии которого был принят за 100 % [8]. В качестве положительного контроля использовали векторы pET-15b, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность синтезированных олигонуклеотидных последовательностей подтверждена секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

### Статистический анализ данных

Сравнение количественного уровня экспрессии генов в различных линиях проводили методом  $\chi^2$  в открытой статистической программе PAST 3. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

### Результаты

Активность генов, кодирующих рецепторы апоптоза суперсемейства *TNFSFR* – *CD95/Fas*, *TNFR1*, *TNFR2*, *TRAIL*, *DR3* и *DR4/5*, оценивали количественно в 8 клеточных линиях диссеминированной меланомы человека на основании уровня экспрессии мРНК (табл. 1).

Из табл. 1 видно, что в исследуемых клеточных культурах преобладала экспрессия мРНК *CD95/Fas*-рецептора. В клетках линий mel Ch, mel Ibr, mel Is и mel R наблюдался более высокий уровень экспрессии мРНК *CD95/Fas* (46,65; 17,68; 61,56 и 16,49 % соответственно), чем в клетках остальных линий. В клетках линии mel Ibr наблюдалась коэкспрессия мРНК *CD95/Fas* и *DR3* (на уровне 5 %). Гены других рецепторов инициации внешнего пути апоптоза в клетках большинства линий либо вообще не экспрессировались, либо были малоактивны. Так, в клетках линий mel Kor и mel Ibr наблюдалась экспрессия генов *TNFR2* и *TRAIL*, а в клетках линии mel Z – *DR3*.

Было изучено действие 2 лекарственных форм аранозы – аранозы-лио и липосомальной аранозы – и пустых липосом, не содержащих аранозу, на уровень экспрессии мРНК генов рецепторов суперсемейства *TNFSFR*. Данные лекарственные формы оказали различные эффекты на активность генов (табл. 2).

Наиболее чувствительными к препаратам оказались клетки линии mel Ibr. В них липосомальная араноза вызывала повышение уровня экспрессии мРНК

Таблица 1. Уровень экспрессии мРНК рецепторов апоптоза суперсемейства *TNFSFR* в клетках меланомы человека

Линия клеток	Уровень мРНК рецептора внешнего пути апоптоза, %*					
	<i>CD95/Fas</i>	<i>TNFR1</i>	<i>TNFR2</i>	<i>TRAIL</i>	<i>DR3</i>	<i>DR4/5</i>
mel Ch	46,65 ± 2,15	0	0	0	0	0
mel Ibr	17,68 ± 0,72	0	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	5,08 ± 0,2	0
mel Is	61,56 ± 2,74	0	0	0	0	0
mel Kor	2,72 ± 0,13	0	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0	0
mel Mtp	2,72 ± 0,14	0	0	0	0	0
mel Mtp-X	0,96 ± 0,03	0	0	0	0	0
mel R	16,49 ± 0,73	0	0	0	0	0
mel Z	0,32 ± 0,01	0	0	0	0,32 ± 0,01	0

\*Измерения проводили относительно гена *ABL*, уровень экспрессии которого был принят за 100 %.

**Таблица 2.** Влияние аранозы-лио, липосомальной аранозы и пустых липосом на экспрессию мРНК рецепторов клеточной гибели суперсемейства TNFSFR

Линия клеток	Препарат	Уровень мРНК рецептора внеклеточного пути апоптоза, %*					
		DR3	DR4/5	CD95/Fas	TNFR1	TNFR2	TRAIL
mel Ibr	ПЛ	1,18 ± 0,04**	0	18,95 ± 1,08	0	23,33 ± 0,95*	0,03 ± 0,01
	ЛА	0	0	348,22 ± 21,4*	0	0,84 ± 0,03*	0,84 ± 0,03*
	А	5,83 ± 0,53	0	87,06 ± 2,07*	0	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
	Контроль	5,08 ± 0,14	0	17,68 ± 0,92	0	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01
mel Kor	ПЛ	0,17 ± 0,02	0	12,50 ± 0,87*	0	0,34 ± 0,01*	0,34 ± 0,01*
	ЛА	0	0	20,31 ± 1,14*	0	0,73 ± 0,02*	0,73 ± 0,03*
	А	0	0	20,31 ± 2,04*	0	0,52 ± 0,02*	0,52 ± 0,02*
	Контроль	0	0	2,72 ± 0,04	0	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,01
mel Mtp	ПЛ	0	0	3,85 ± 0,19*	0	0	0
	ЛА	0	0	1,27 ± 0,03*	0	0	0
	А	0	0	0,90 ± 0,05*	0	0	0
	Контроль	0	0	2,72 ± 0,06	0	0	0
mel Mtp-X	ПЛ	0	0	1,36 ± 0,03*	0	0	0
	ЛА	0	0	7,69 ± 0,29*	0	0	0
	А	0	0	2,72 ± 0,01*	0	0	0
	Контроль	0	0	0,96 ± 0,07	0	0	0
mel Z	ПЛ	0,02 ± 0,01*	0	0,18 ± 0,03*	0	0	0
	ЛА	0,42 ± 0,02	0	0,42 ± 0,02*	0	0	0
	А	0,55 ± 0,09	0	0,55 ± 0,06*	0	0	0
	Контроль	0,32 ± 0,04	0	0,32 ± 0,04	0	0	0
mel Ch	ПЛ	2,06 ± 0,11*	0	7,69 ± 0,31*	0	0	0
	ЛА	1,79 ± 0,07*	0	3,59 ± 0,12*	0	0	0
	А	0	0	7,69 ± 0,31*	0	0	0
	Контроль	1,46 ± 0,06	0	46,65 ± 2,13	0	0	0
mel Is	ПЛ	0	0,34 ± 0,01	6,25 ± 0,24*	0	0	0
	ЛА	0,84 ± 0,03	0	12,50 ± 0,45*	0	0	0
	А	0	0,28 ± 0,01	0	0	0	0
	Контроль	0,90 ± 0,03	0	61,56 ± 2,78	0	0	0
mel R	ПЛ	1,03 ± 0,04*	0	18,95 ± 0,67	0	0	0
	ЛА	0,55 ± 0,02*	0	21,76 ± 0,87*	0	0	0
	А	0,59 ± 0,02*	0	21,76 ± 0,79*	0	0	0
	Контроль	0,10 ± 0,01	0	16,49 ± 0,56	0	0	0

**Примечание.** ПЛ — пустые липосомы; ЛА — липосомальная араноза; А — араноза-лио. \* Измерения велись относительно гена ABL, уровень экспрессии которого был принят за 100 %; \*\*  $p < 0,05$  относительно контроля

CD95/Fas-рецептора в 20 раз по сравнению с контролем — до 348 %, тогда как в контроле экспрессия мРНК составляла 17,68 %. Араноза-лио также вызывала повышение уровня экспрессии мРНК CD95/Fas в 5 раз по сравнению с контролем — до 87 %. Кроме

того, в клетках mel Ibr зарегистрировано повышение уровня экспрессии мРНК рецептора TNFR2 до 23,33 % после инкубирования с пустыми липосомами. Во всех оставшихся линиях пустые липосомы не влияли на экспрессию мРНК рецепторов внешнего пути апоптоза.

После инкубации с исследуемыми препаратами произошли значительные изменения только уровня экспрессии мРНК *CD95/Fas*. В клетках линии *mel Kor* обе лекарственные формы аранозы вызвали повышение экспрессии мРНК *CD95/Fas* в 10 раз по сравнению с контролем — до 20 %. В клетках линии *mel Mtp-X*, в которых изначально отсутствовала мРНК *CD95/Fas*, после взаимодействия с липосомальной аранозой экспрессия мРНК *CD95/Fas* повышалась на 7,69 %, а после инкубации с аранозой-лио — до 2,72 %. В клетках линии *mel R*, изначально имеющих достаточно высокий уровень экспрессии мРНК *CD95/Fas* (16,49 %), он незначительно и в одинаковой степени повышался после инкубации с обеими лекарственными формами (до 21,76 %). В клетках линии *mel Z* уровень экспрессии мРНК *CD95/Fas* был очень низким как в контроле, так и после инкубации с препаратами. В клетках линии *mel Mtp*, несмотря на наличие на поверхности рецептора *CD95/Fas*, наблюдали небольшой процент экспрессии мРНК *CD95/Fas*, который снижался после инкубации с обеими лекарственными формами аранозы, но повышался после инкубации с пустыми липосомами. В клетках линий *mel Ch* и *mel Is*, у которых изначально наблюдался высокий уровень экспрессии мРНК *CD95/Fas*, под влиянием препаратов он значительно снизился.

### Обсуждение

Согласно данным литературы утрата *CD95/Fas*-рецептора приводит к устойчивости клетки к химиопрепаратам [9–15]. Предполагалось, что *CD95/Fas*-рецептор необходим для реализации механизма действия традиционных лекарственных форм противоопухолевых препаратов, но оставалось неясным, каким образом действует липосомальная лекарственная форма препарата.

М. Koch и соавт. изучали механизмы резистентности к цисплатину, который, как и араноза, относится к алкилирующим агентам и вызывает гибель клеток через повреждение их ДНК. По данным первых наблюдений, эффективность действия препарата или, наоборот, резистентность клеток линии рака яичников к цисплатину не коррелирует со степенью повреждения их ДНК. М. Koch и соавт. заключили, что липосомальный цисплатин в отличие от свободного препарата вызывает гибель резистентных опухолевых клеток, активируя внешний путь апоптоза через TNF-рецептор [4, 16]. Позже эта группа исследователей обнаружила, что при действии липосомального цисплатина повышается активность генов, ответственных за реализацию внешнего пути апоптоза [5]. Цисплатин в свободной форме, наоборот, стимулирует работу систем, ответственных за развитие апоптоза по внутриклеточному пути. Хотя М. Koch и соавт. не исследовали все белки-участники процес-

са апоптоза, они убедительно показали, что липосомальная форма алкилирующего агента обладает значительным цитостатическим эффектом.

Мы предположили, что липосомальная форма аранозы может активировать экспрессию генов рецепторов внешнего пути апоптоза в клетках линий меланомы, как это было показано в работе с липосомальным цисплатином [4, 5]. Для этого мы изучили уровень экспрессии мРНК рецепторов внешнего пути апоптоза и его изменение после инкубирования с традиционной и липосомальной лекарственными формами аранозы. В результате было обнаружено, что в исходных клетках линий диссеминированной меланомы человека из всех рецепторов внешнего пути апоптоза в основном активен *CD95/Fas*-рецептор. Он присутствует в 6 из 8 исследованных клеточных линий: *mel Ch*, *mel Ibr*, *mel Is*, *mel Kor*, *mel Mtp* и *mel R*. В клетках линий *mel Mtp-X* и *mel Z* экспрессия мРНК рецепторов внешнего пути апоптоза не наблюдалась.

В 7 из 8 исследованных клеточных линий меланомы после инкубирования с различными лекарственными формами аранозы менялся уровень экспрессии мРНК гена *CD95/Fas*. В некоторых случаях (линии *mel Ibr* и *mel Mtp-X*) липосомальная араноза вызывала более выраженное повышение уровня экспрессии *CD95/Fas*, чем араноза-лио. В других случаях (линии *mel Ch* и *mel Is*) уровень экспрессии *CD95/Fas* в присутствии липосомальной формы аранозы снижался. Возможно, сделанное ранее предположение о том, что липосомальная араноза не использует *CD95/Fas*-рецепторный путь [2], требует уточнения, а именно: это может происходить не в каждой линии клеток.

Линии, в которых наблюдались эффекты понижения или повышения уровня экспрессии гена *CD95/Fas*, относятся к низкодифференцированным [17]. Для низкодифференцированных линий характерны значительное количество генетических аномалий и большая резистентность к противоопухолевым препаратам. Эффект повышения уровня экспрессии гена *CD95/Fas* может быть предиктором высокой эффективности липосомальной лекарственной формы, по крайней мере для части высокозлокачественных клеток.

### Заключение

Обе лекарственные формы аранозы приводят к различным эффектам, в том числе к повышению и понижению уровня экспрессии мРНК гена *CD95/Fas*. Данные эффекты наблюдаются в основном в низкодифференцированных линиях меланомы. Стимулирование экспрессии гена *CD95/Fas* имеет большое значение для разработки новых терапевтических подходов, основанных на применении липосомальной формы аранозы, так как они позволяют рассчитывать на понижение устойчивости опухолевой клетки к апоптозу.



## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Грищенко Н.В., Альбассит Б., Барышникова М.А. и др. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозоминов. Российский биотерапевтический журнал 2014;13(1):49–53.
2. 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;13(1):37–42.
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;13(3):3–7.
4. Koch M., Krieger M.L., Stolting D. et al. Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal cisplatin: Molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling. *Biochem Pharmacol* 2013;85(8):1077–90. DOI: 10.1016/j.bcp.2013.01.028. Epub 2013 Feb 8. PMID: 23396090.
5. Stölting D.P., Koch M., Wiese M. et al. Liposomal cisplatin can overcome chemotherapy resistance of A2780 ovarian cancer cells by inducing the extrinsic apoptotic pathway. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2014;52(1):78–81. DOI: 10.5414/CPXCES13EA03. PMID: 24290409.
6. Мисюрин В.А. Структура и свойства основных рецепторов и лигандов внешнего пути апоптоза. Российский биотерапевтический журнал 2015;14(2):23–30.
7. Chomczynski P., Sacchi N. The singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty something years on. *Nat Protoc* 2006;1(2):581–5. PMID: 17406285.
8. Moore F.R., Rempfer C.B., Press R.D. Quantitative BCR-ABL1 RQ-PCR fusion transcript monitoring in chronic myelogenous leukemia. *Methods Mol Biol* 2013;999:1–23. DOI: 10.1007/978-1-62703-357-2\_1. PMID: 23666687.
9. Блохин Д.Ю., Власенкова Н.К., Герасимова Г.К. и др. Поиск молекулярных механизмов обеспечения множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток. Российский биотерапевтический журнал 2013;12(2):10.
10. Блохин Д.Ю., Соколовская А.А., Власенкова Н.К. и др. Множественная лекарственная устойчивость опухолевых клеток, резистентных к апоптозу. *Вестник РАМН* 2007;10:41–6.
11. Блохин Д.Ю., Чмутин Е.Ф., Иванов П.К. Молекулярные мишени для противоопухолевой терапии: факторы роста, ангиогенеза и апоптоза. Российский биотерапевтический журнал 2011;10(3):25–30.
12. Славина Е.Г., Бигвава Х.А., Заботина Т.Н. и др. Модификация фактором некроза опухоли(ФНО-альфа) цитотоксического и апоптотического действия противоопухолевых лекарств в клетках меланомы человека. Российский биотерапевтический журнал 2009;8(4):37–44.
13. Соколовская А.А., Заботина Т.Н., Блохин Д.Ю., Барышников А.Ю. Идентификация лекарственно-индуцированного апоптоза в лейкозных клетках. *Медицинская иммунология* 1999;1(3–4):109.
14. 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):175–181.
15. Sokolovskaya A.A., Zabolina T.N., Blokhin D.Yu. et al. Comparative analysis of apoptosis induced by various anticancer drugs in Jurkat cells. *Experimental Oncology* 2001;23(1):46–50.
16. Kreiger M.L., Eckstein N., Schneider V. et al. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro. *Int J Pharm* 2010;389(1–2):10–7. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2009.12.061. Epub 2010 Jan 7. PMID: 20060458.
17. Михайлова И.Н., Ковалевский Д.А., Бурова О.С. и др. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека. *Сибирский онкологический журнал* 2010;37(1):29–39.