

ВОВЛЕЧЕНИЕ АУТОФАГИИ В ВАСКУЛОГЕННУЮ МИМИКРИЮ ПРИ МЕЛАНОМЕ

А.А. Варганян, О.С. Булова, И.В. Уласов, М.А. Барышникова

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Амалия Арташевна Варганян zhivotov57@mail.ru

Введение. Аутофагия — катаболический процесс удаления отработанных органелл, долгоживущих белков, патогенов и продуктов распада с помощью двумембранных фагосом — сопровождает жизнедеятельность нормальной клетки на протяжении всего времени ее существования. Аутофагия обеспечивает выживание клетки в условиях стресса, играет существенную роль в защите от инфекций, в развитии аутоиммунных процессов. В последние годы получены доказательства существования альтернативной системы кровоснабжения опухоли — васкулогенной мимикрии (ВМ), которая может частично компенсировать недостаток питания и кислорода в условиях гипоксии.

Цель исследования — выявление взаимосвязи между аутофагией и ВМ.

Материалы и методы. В работе были использованы 2D- и 3D-культивирование клеток меланомы, выведенных в клеточную линию из операционного материала больных диссеминированной меланомой, электрофорез и вестерн-блот, нокдаун генов с помощью малых интерферирующих РНК (small interfering RNA, siRNA), проточная цитофлуориметрия, флуоресцентная микроскопия.

Результаты. О базовом уровне аутофагии в клетках меланомы судили по экспрессии LC-3B и флуоресценции монодансилкадаверина. Оба теста являются маркерами поздней стадии аутофагии. Нами показано, что в клетках меланомы, формирующих сосудистоподобные структуры (СПС) на матригеле, базовый уровень аутофагии был значительно выше, чем в клетках меланомы, не способных участвовать в ВМ. Блокирование аутофагии 3-метиладенином (3-methyladenine, 3-МА) или хлорокином — ингибиторами инициации и терминальной фазы аутофагии — приводило к заметному снижению способности клеток меланомы участвовать в ВМ. Полученные результаты были подтверждены siRNA-опосредованным подавлением экспрессии гена *VECN1*, участвующего в инициации аутофагии, и гена *ATG5*, который считается маркером поздней необратимой стадии аутофагии. Нокдаун генов *VECN1* или *ATG5* в клетках меланомы *mel P* снижал уровень белка *Beclin-1* и *Atg5* на 70–75 % и блокировал формирование СПС на матригеле. Клетки меланомы с нокдауном гена *ATG5* меняли форму с веретеноподобной на шаровидную, но сохраняли способность мигрировать и узнавать друг друга, формирование СПС не наблюдалось. Низкомолекулярный ингибитор ВМ, ЛХС-1269, заметно снижал базовый уровень аутофагии.

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о том, что активация аутофагии является необходимым условием формирования СПС. Мы предполагаем, что аутофагия обеспечивает прогрессию опухоли 2 путями: способствуя выживанию опухолевых клеток при химио- и радиотерапии и стимулируя процесс формирования васкулярных каналов, доставляющих питание и кислород в области опухоли с гипоксией.

Ключевые слова: меланома, аутофагия, васкулогенная мимикрия

DOI: 10.17650/1726-9784-2017-16-2-66-73

THE INVOLVEMENT OF AUTOPHAGY IN MELANOMA VASCULOGENIC MIMICRY

A.A. Vartanian, O.S. Burova, I.V. Ulasov, M.A. Baryshnikova

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

Introduction. Autophagy, a catabolic process of protein and organelle recycling by transferring defective cytoplasm and organelles into double-membraned vesicles to degrade and regenerate materials, plays a critical role in maintaining energy homeostasis. Autophagy also protects against stress and infection, participates at the development of autoimmune disease. In recent years, the existence of alternative blood circulation system in tumors, vasculogenic mimicry (VM), which can partially compensate the lack of nutrients and oxygen under the hypoxic conditions, has been described.

Objective. To elucidate the relationship between autophagy and VM.

Materials and methods. In this study we used 2D- and 3D-culturing of melanoma cells derived from surgical species of patients with disseminated melanoma, electrophoresis and western blot, knockdown of the genes by using small interfering RNA (siRNA), flow cytometry, fluorescence microscopy.

Results. We detected the basal level autophagy by examining the expression of autophagy-specific protein (LC-3B) by flow cytometry and cellular immunofluorescence staining by monodancylcadaverine. Both assays are the markers of autophagy late stage. Here we

show that the level of autophagy in melanoma cells *mel P*, participated in capillary-like structures (CLS) formation in matrigel, was considerably higher than in *mel Me* cells which do not involve in VM. To explore the function of autophagy in the ability of melanoma cells to form CLS 3-methyladenine (3-MA) or chloroquine – inhibitors of initiation and terminal stage of autophagy – were used. Both inhibitors reduced the ability of melanoma cells to engage in VM. The data obtained were confirmed by siRNA-mediated gene silencing of *BECN1* involved in the initiation of autophagy and *ATG5* gene which is considered to be a marker of late stage of autophagy. Knock-down of *BECN1* or *ATG5* in *mel P* melanoma cells reduced the level of protein Beclin-1 and Atg5 about 70–75 %, and suppressed CLS formation in matrigel. Melanoma cells with the *ATG5* gene knockdown changed the shape but maintained the ability to migrate and recognize each other, the formation of CLS was not observed. Low molecular weight VM inhibitor LCS-1269, significantly reduced the basic level of autophagy.

Conclusion. Our data indicate that autophagy participates in CLS formation, and inhibition of autophagy suppresses CLS formation. We suggest that autophagy plays a dual role in the survival and development of tumors: autophagy helps cancer cells against environment stress and provides a temporary survival pathway by promoting energy regeneration, autophagy also promotes VM formation which supplies nutrients and oxygen to less vascularized area of tumor.

Key words: autophagy, melanoma, vasculogenic mimicry

Введение

Аутофагия – процесс, при котором внутренние компоненты клетки доставляются внутрь ее лизосом и подвергаются в них деградации, – находится в центре научных интересов более 20 лет. Сформировавшись в ходе эволюции как реакция на дефицит питательных веществ, система аутофагии сегодня рассматривается как способ поддержания гомеостаза клетки [1, 2]. Аутофагия играет существенную роль в выживании клетки в условиях стресса, развитии аутоиммунных и воспалительных процессов. С другой стороны, аутофагия может быть древнейшей системой защиты клеток от вторжения извне, так как вместе с частью цитоплазмы могут захватываться вирусы или другие внутриклеточные паразиты.

При аутофагии *de novo* формируются специализированные структуры – фагофоры – двумембранные липидные образования, которые изолируют подлежащий уничтожению материал и расщепляют его в аутофагосоме. Аутофагосома образуется слиянием фагофор с лизосомами [3]. Благодаря аутофагии становится возможным расщепление собственных макромолекул и повторное их использование для поддержания нормальной жизнедеятельности клетки. Непрерывно работающая система аутофагии поддерживает также концентрацию токсичных метаболитов клетки на безопасном уровне [4]. В опухолевых клетках аутофагия имеет патологически повышенную активность, и неэффективность химио- и радиотерапии во многом связывают с аутофагией [5, 6]. Опухолевые клетки используют аутофагию также для того, чтобы выжить в условиях гипоксии [7]. Подобные условия могут возникнуть, например, при недостаточном кровоснабжении опухоли.

По данным ряда клинических испытаний, антиангиогенные препараты достоверно увеличивают общую выживаемость онкологических больных [8].

В то же время аккумулируются данные, свидетельствующие о том, что большинство опухолей практически не отвечают на анти-VEGF терапию (anti-vascular endothelial growth factor therapy, anti-VEGF therapy – терапия, направленная на блокировку фактора роста эндотелия сосудов) [9]. Одной из причин выживаемости опухолевых клеток в условиях блокирования ангиогенеза может быть гетерогенность кровеносных сосудов. Формирование сосудов в опухоли происходит на фоне неконтролируемой митогенной стимуляции и измененного внеклеточного матрикса. Это приводит к замещению эндотелия в сосудах опухолевыми клетками, иногда эндотелиальные клетки могут и вовсе отсутствовать. Образование опухолевыми клетками васкулярных каналов, ограниченных базальной мембраной, в отсутствие эндотелиальных клеток и фибробластов получило название «васкулогенная мимикрия» (VM) [10]. Формируют васкулярные каналы опухолевые клетки с высокозлокачественным фенотипом, слабоагрессивные опухолевые клетки таких структур не формируют.

Целью настоящего исследования было получение экспериментального подтверждения существования взаимосвязи между аутофагией и VM. Мы предполагаем, что аутофагия выполняет двойную функцию в опухоли: способствует выживанию опухолевых клеток при химио- и радиотерапии, а также стимулирует процесс формирования васкулярных каналов, что может частично компенсировать недостаточно быстрое развитие в опухоли кровеносной микроциркуляторной сети.

Материалы и методы

Материалы

BECN1 siRNA (small interfering RNA – малая интерферирующая РНК) (sc-29797), *ATG5* siRNA (sc-41446), контрольная siRNA (sc-37007), siRNA Dilu-

tion Buffer (sc-29527) и антитела к Beclin-1 (sc-48341) и Atg5 (sc-133158) были получены от Santa Cruz Biotechnology (США). Липофектамин-2000 (#11668027) был приобретен у Thermo Fisher Scientific (США). Хлорокин (С6628), 3-метиладенин (3-methyladenine, 3-МА) (M9281) и монодансилкадаверин (monodansylcadaverine, MDC) (#D4008) были приобретены у Sigma-Aldrich Corporation (США). Антитела к LC-3В были получены от Abcam (ab51520) (Великобритания). Вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцеина изотиоцианатом (goat anti-rabbit IgG – козы антикроличьи иммуноглобулины класса G), были получены от AbD Serotec (Великобритания) (№ STAT121F). В работе также был использован ингибитор ВМ – ЛХС-1269 (ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» (РОНЦ им. Н.Н. Блохина) Минздрава России).

Культура клеток

В работе использованы клеточные линии меланомы mel P, mel II и mel Me [11]. Клетки культивировали в полной среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 2 ммоль/мл глутамина и 0,1 мг/мл гентамицина. В экспериментах использовали клетки 70–75 % конфлюентности.

3D -культура

100 мкл матригеля (8,7 мг/мл) быстро наносили на дно 24-луночного планшета на льду, планшет оставляли при комнатной температуре в течение 1 ч и затем помещали в CO₂-инкубатор на 30 мин. Клетки добавляли в количестве 2×10^5 в полной среде RPMI-1640 на гелевую матрицу и продолжали инкубировать при +37 °С в CO₂-инкубаторе. Формирование сосудистоподобной структуры (СПС), которое является *in vitro* тестом ВМ [12, 13], наблюдалось через 14–16 ч роста клеток на матригеле.

Электрофоретическое разделение белков

Электрофоретическое разделение белков проводили в полиакриламидном геле по методу Laemmli в денатурирующих условиях. Клетки после трансфекции *BECN1* siRNA или *ATG5* siRNA снимали с культуральных флаконов раствором Версена, промывали натрий-фосфатным буфером и гомогенизировали в буфере А (200 ммоль/мл маннитола, 70 ммоль/мл сахарозы, 5 ммоль/мл пиперазин-N-N»-бис-2-этансульфонової кислоты (PIPES) с рН 7,5, 1 ммоль/мл этилен-бис-оксиэтиленнитрилтетрауксусной кислоты (EGTA) и коктейль ингибиторов протеаз). Экстракт белков центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 мин для удаления ядер. Супернатант (цитоплазматическая фракция) иммунопреципитировали с использованием протеин А-сефарозы, конъюгированной с антителами к Beclin-1 и ATG5, в течение 2 ч при +4 °С. Далее центрифугировали при 2500 об/мин в течение 5 мин для выделения

иммунокомплекса, сорбированного на бусах протеин А-сефарозы, промывали 5 раз буфером Б, содержащим трис-буфер солевой, 20 мкмоль/мл ортованадата и коктейль ингибиторов протеаз. Образцы лизировали в буфере Laemmli кипячением в течение 4 мин на водяной бане. Белки разделяли электрофоретически при 120 В на полиакриламидном геле с 10 % додецилсульфатом натрия. Состав использованных буферных растворов: концентрирующий буфер – 0,5 моль Трис-НСl рН 6,8, 0,4 % додецилсульфата натрия; разделяющий буфер – 120 ммоль Трис, 1,25 моль глицина и 0,5 % додецилсульфата натрия; электродный (трис-глициновый) буфер – 120 ммоль Трис, 1,25 моль глицина и 0,5 % додецилсульфата натрия; буфер для нанесения образцов – 0,01 % бромфеноловый синий, 200 ммоль Трис-НСl рН 6,8, 4 % додецилсульфата натрия, 40 % глицерина, 400 ммоль β-меркаптоэтанола.

Вестерн-блот

После окончания электрофореза гель, не окрашивая, переносили электрофоретически в течение 1 ч при 80 В на мембрану (EMD Millipore, США). По окончании переноса мембрану промывали в трис-буфере солевом с 5 % альбумина сывороточного бычьего для блокирования неспецифического связывания белков. Гибридизацию проводили с первичными антителами к Beclin-1 или Atg5 в течение 2 ч при комнатной температуре при качании на шейкере. Затем промывали 3 раза по 15 мин в трис-солевом буфере с Твин-20, далее инкубировали 2 ч при комнатной температуре со вторичными антителами, конъюгированными с щелочной фосфатазой, и проявляли 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфатом/нитросиним тетразолием. Состав использованных буферных растворов: трис-солевой буфер – 390 ммоль глицина, 480 ммоль Трис-НСl рН 7,5, 1 % додецилсульфата натрия, 20 % метанола; трис-солевой буфер с Твин-20–0,1 моль Трис-НСl рН 7,5, 0,2 моль хлорида натрия, 0,1 % Твин-20; альбумин сывороточный бычий – 5 % альбумина сывороточного бычьего в трис-солевом буфере. Для количественного анализа вестерн-блота была использована программа Gel Analysis Software (Syngene, Великобритания).

Трансфекция клеток меланомы siRNA in vitro

В 24-луночный планшет засевали 50 тыс. клеток меланомы в полной среде RPMI-1640 без антибиотика. Клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при +37 °С в течение 18–24 ч. Предварительно готовили смесь (на каждую лунку), состоящую из 80 пмоль siRNA (1 мкг) и 1 мкл липофектамина-2000 в RPMI-1640 без антибиотика и сыворотки, и инкубировали при комнатной температуре 20 мин. Клетки меланомы 60–70 % конфлюентности промывали средой без сыворотки и антибиотика и инкубировали

ли с siRNA и липофектамино-2000 в полной среде RPMI-1640 без антибиотика в CO₂-инкубаторе при +37 °C в течение 6–8 ч. Далее среду для трансфекции заменяли свежей полной средой RPMI-1640 и клетки меланомы инкубировали еще 24–36 ч. Трансфицированные клетки использовали для исследования их способности формировать СПС.

Определение экспрессии LC-3В

Клетки меланомы (1 × 10⁶ клеток) ресуспендировали в 3 мл охлажденного 70 % спирта и хранили при +4 °C. Перед реакцией окрашивания клетки осаждали центрифугированием (7 мин, 500 об/мин). Осевшие клетки осторожно пипетировали в 1 мл натрий-фосфатного буфера, осаждали центрифугированием и ресуспендировали в 50 мкл натрий-фосфатного буфера, содержащего поликлональные антитела к LC-3В, и инкубировали 30 мин при +4 °C в темноте. Клетки отмывали 1 мл натрий-фосфатного буфера от не связавшихся антител, ресуспендировали в натрий-фосфатном буфере, содержащем вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцеина изотиоцианатом. Экспрессию LC-3В оценивали на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США). В каждой пробе анализировали до 10 тыс. событий.

Окрашивание клеток MDC

Клетки меланомы в течение ночи инкубировали с ингибитором аутофагии – хлорокином или ингибитором ВМ – ЛХС-1269. 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 флуоресцентном микроскопе IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США).

Результаты и обсуждение

Опухоль для выживания и прогрессии может индуцировать частичную трансдифференцировку опухолевых клеток в эндотелийподобный фенотип, позволяющий формировать васкулярные каналы, необходимые для доставки питания и, возможно, метастазирования [10]. Исследования последних лет указывают на то, что кратковременное блокирование аутофагии существенно снижает продолжительность жизни опухолевых клеток [14]. Недавно группой китайских ученых было показано, что уровень экспрессии Beclin-1 в клетках карциномы желудка SGC7901, растущих в 3D-культуре, на матрикеле, значительно выше, чем в тех же клетках, растущих в 2D-культуре, на пластике [15]. Этими же авторами впервые высказано предположение об участии аутофагии в ВМ при раке клеток эпителиальной ткани желудка. Целью нашей работы было выявление

взаимосвязи между аутофагией и ВМ при меланоме. В работе были использованы клеточные линии метастатической меланомы кожи, выведенные из опухолевого материала пациентов, находившихся на лечении в НИИ клинической онкологии ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, – mel P и mel II, формирующие СПС на матрикеле, и mel Me, не способная участвовать в ВМ. Об уровне аутофагии в клетках меланомы судили по изменениям, происходящих в поздней стадии аутофагии, – экспрессии LC-3В [16]. Известно, что в поздней стадии аутофагии – слиянии фагофор с лизосомами – важную роль играют белки семейства Atg [17]. Активация аутофагии сопровождается протеолитическим расщеплением белка LC-3 (Atg8) в изоформу LC-3А. Его конъюгация с фосфатидилэтаноламином приводит к образованию LC-3В формы, которая и встраивается в мембрану аутофагосомы. В процессе формирования аутофагосомы участвует только LC-3В изоформа белка. Недавно был предложен новый метод для мониторинга аутофагии – окрашивание аутофагосом флуоресцентным красителем MDC [18]. Избирательное аккумулялирование MDC в аутофагосомах посредством специфического взаимодействия с липидами мембран аутофагосом свидетельствует о переходе аутофагии в позднюю, необратимую фазу.

На рис. 1 представлены результаты определения базового уровня аутофагии в клетках меланомы mel P и mel Me. Видно, что в клетках mel P, формирующих СПС, базовый уровень аутофагии, определенный как экспрессией LC-3В (рис. 1а, б), так и флуоресценцией MDC (рис. 1в, г), значительно выше, чем в клетках mel Me.

Более детальное исследование участия аутофагии в формировании СПС показало, что селективный ингибитор инициации аутофагии – 3-МА или ингибитор поздней стадии аутофагии – хлорокин блокируют формирование СПС клетками меланомы mel P. В предварительных исследованиях были определены концентрации обоих ингибиторов, в присутствии которых более 95 % клеток меланомы оставались живыми. Это условие является необходимым для формирования СПС на матрикеле: клетки должны быть живыми, чтобы мигрировать, узнавать друг друга, вытягиваться и формировать СПС. Клетки mel P в присутствии ингибиторов аутофагии не теряли способность мигрировать, но рисунок структур, сформированных на матрикеле, заметно отличался от геометрии классических СПС (рис. 2а–в). Представленные результаты были воспроизведены на другой клеточной линии меланомы, участвующей в ВМ, – mel II (данные не приводятся) и подтвердили выявленную закономерность: ингибиторы аутофагии блокируют формирование СПС. Для верификации этого феномена нами был осуществлен нокаун ге-

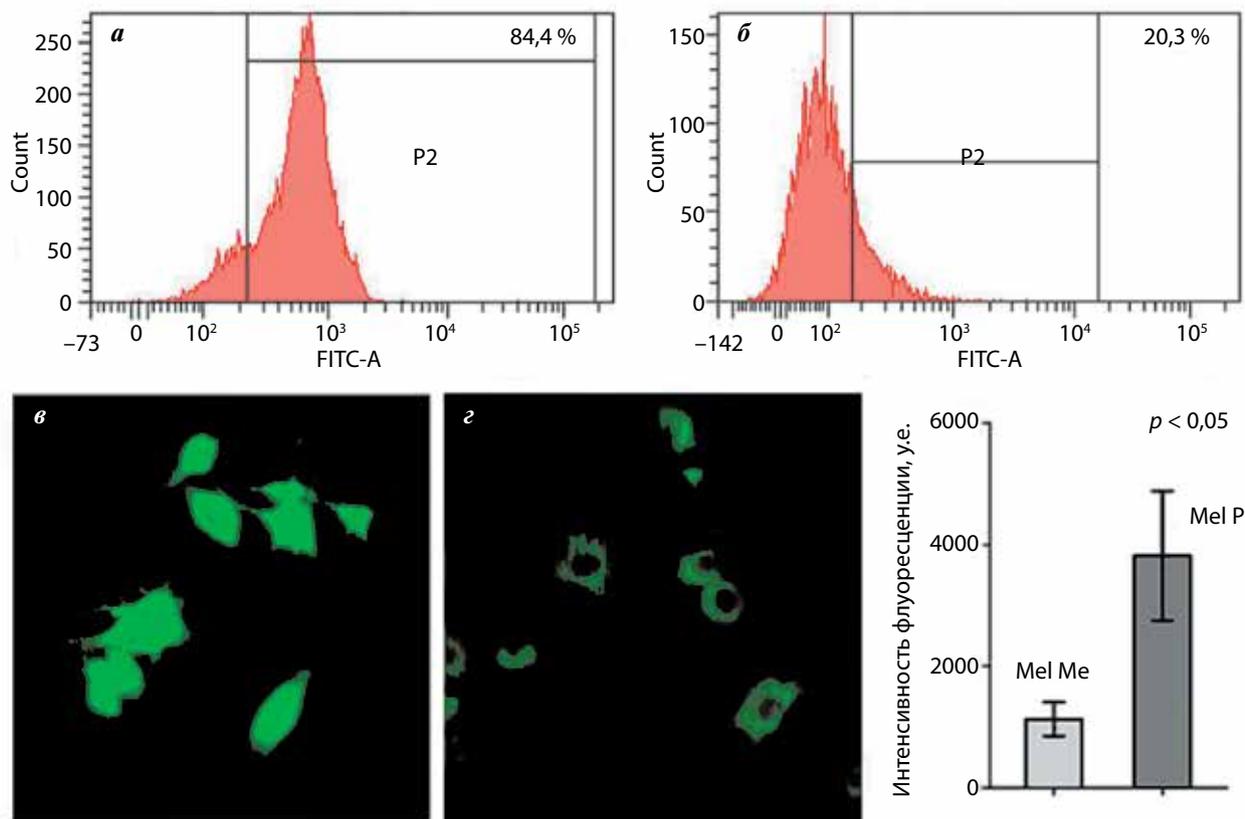


Рис. 1. Базовый уровень аутофагии в клетках меланомы *mel P* и *mel Me*. Уровень экспрессии LC-3В определяли проточной цитофлуориметрией с использованием антител к LC-3В (а, б), уровень аутофагии определяли окрашиванием клеток меланомы флуоресцентным красителем MDC (в, г)

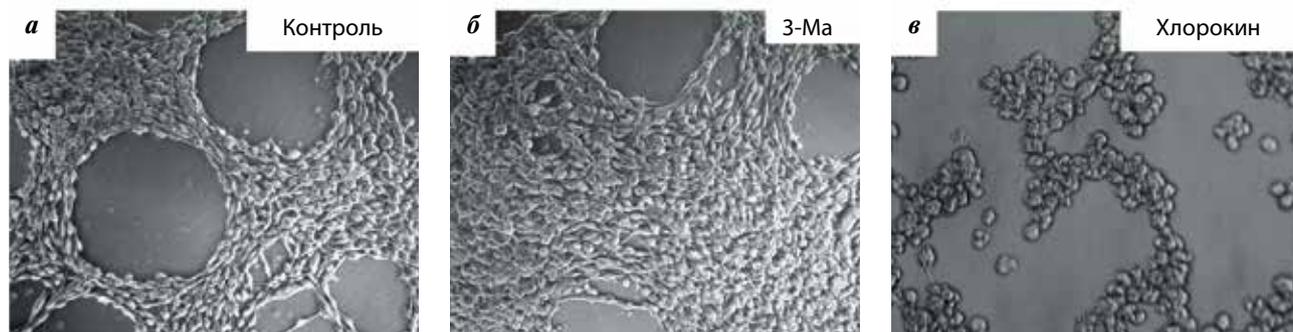


Рис. 2. Влияние ингибиторов аутофагии на формирование сосудистоподобных структур на матригеле клетками меланомы *mel P*: а – контроль; б – ингибитор инициации аутофагии 3-МА, 1 ммоль; в – ингибитор поздней стадии аутофагии хлорокин, 20 мкмоль, блокирует формирование сосудистоподобных структур. $\times 20$

нов, участвующих в инициации (*BECN1*) или терминальной стадии аутофагии (*ATG5*), с помощью siRNA. Белок Atg5 является ключевым компонентом аутофагосом [17]. Известно, что комплекс Atg5 + Atg12, присоединяя Atg16, приобретает свойство лигазы, которая пришивает Atg8 (LC-3В) к фосфатидилэтаноламину мембраны аутофагосом. Клетки меланомы *mel P* трансфецировали *BECN1* siRNA с липофектамино-2000. Клетки меланомы, трансфецированные контрольной siRNA (sc-37 007) (рис. 3а), на матриге-

ле практически не отличались от контрольных клеток *mel P* (рис. 3в). SiRNA-опосредованное подавление экспрессии *BECN1* (в наших экспериментах – на $72 \pm 3 \%$) практически не отражалось на способности клеток *mel P* участвовать в ВМ (рис. 3б, г), наблюдалось лишь вытягивание единичных клеток, которое не приводило к формированию СПС. SiRNA-опосредованное подавление экспрессии гена *ATG5* приводило к снижению уровня Atg5 на $70 \pm 3 \%$ и полностью нивелировало способность клеток меланомы

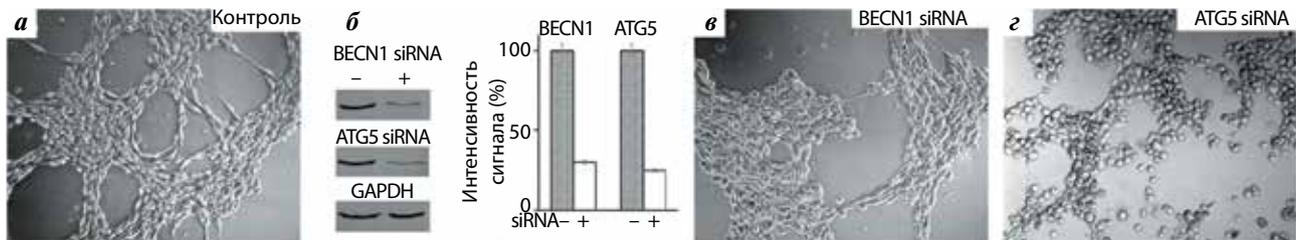


Рис. 3. Эффект нокадауна гена *BECN1* и гена *ATG5* на формирование сосудистоподобных структур клетками меланомы *mel P*: а – клетки были трансфицированы контрольной малой интерферирующей РНК (siRNA); б – вестерн-блот демонстрирует снижение уровня *Becn1-1* и *ATG5* после трансфекции *BECN1* siRNA или *ATG5* siRNA. Количественные характеристики представлены графически справа: нокадаун гена *BECN1* (в) или нокадаун *ATG5* (г) блокирует формирование сосудистоподобных структур. $\times 20$

формировать СПС (рис. 3б, г). Клетки меланомы, трансфицированные *ATG5* siRNA, на матриксе принимали шаровидную форму, но сохраняли способность мигрировать и узнавать друг друга, формирование СПС не наблюдалось. Изменение формы клетки из веретеноподобной в шаровидную в ответ как на фармакологический ингибитор поздней стадии аутофагии – хлорокин, так и на нокадаун гена *ATG5*, указывает на существование связи (возможно, опосредованной) между слиянием фагосомы с лизосомой и реорганизацией актина клетки.

Чрезвычайно интересным нам представлялось проследить изменения уровня аутофагии в условиях блокирования ВМ. Ранее нами был идентифицирован высокоэффективный ингибитор ВМ ЛХС-1269 [19]. Клетки *mel P* росли на пластике в течение 16–18 ч в присутствии 10^{-7} моль ЛХС-1269 или 20 мкмоль хлорокина (не цитотоксические концентрации). Об уровне аутофагии судили по экспрессии LC-3В (рис. 4а–в). Можно видеть, что экспрессия LC-3В в клетках меланомы, которые росли в присутствии

ингибитора ВМ ЛХС-1269, снижена по сравнению с контролем (на 44 ± 2 %). Аналогичная корреляция наблюдалась, когда уровень аутофагии определяли по окрашиванию клеток флуоресцентным красителем MDC (рис. 4г–е). Хлорокин снижал базовый уровень аутофагии на 56 ± 4 %. Заметное снижение аутофагии в ответ на блокаду ВМ (сравнимую с хлорокином) предполагает, что конститутивно активная аутофагия может являться одним из доминирующих свойств опухолевой клетки, способной участвовать в ВМ. Таким образом, экспериментально подтверждено, что высокий базовый уровень аутофагии является обязательным и необходимым условием организации клеток меланомы в СПС. У нас нет ответа на вопрос, как аутофагия может активироваться при переходе клетки в агрессивную фазу роста и какой вклад она вносит в ВМ. Ответ, по-видимому, нужно искать в существовании неидентифицированных еще эндогенных/экзогенных активаторов аутофагии или несогласованности событий в ядре и цитоплазме клетки.

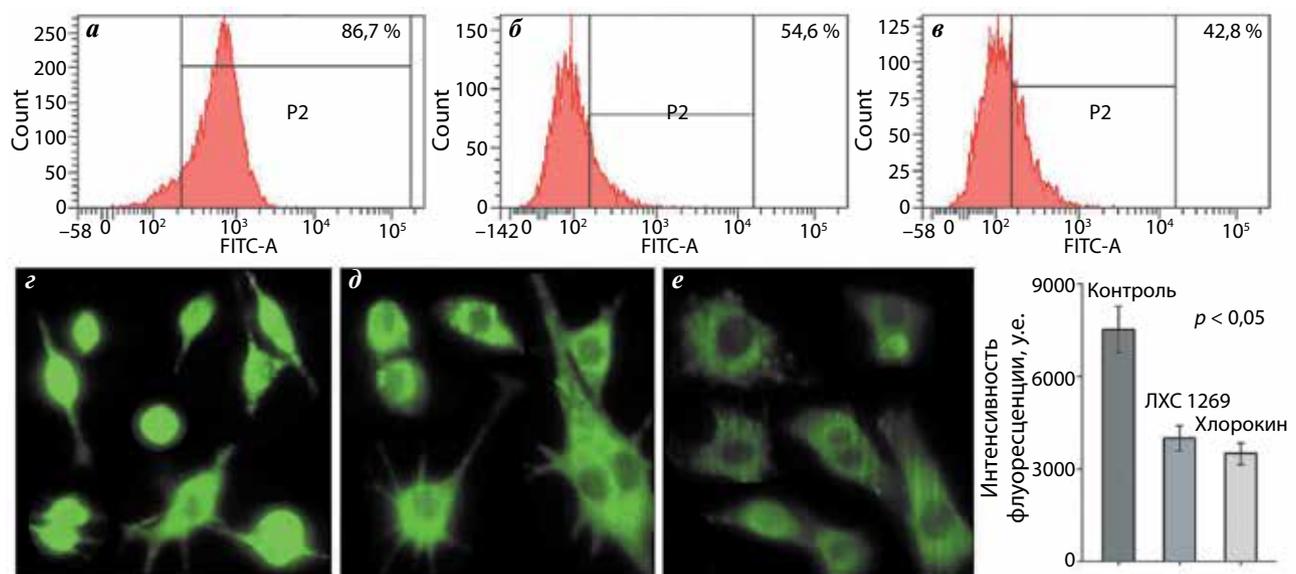


Рис. 4. Влияние специфического ингибитора васкулогенной мимикрии – ЛХС-1269 (10^{-7} моль) и хлорокина (20 мкмоль) на уровень аутофагии в клетках меланомы *mel P*: а, б – базальный уровень аутофагии определяли проточной флуориметрией; в, г – базальный уровень аутофагии определяли окрашиванием клеток флуоресцентным красителем монодансилкадаверинем

Сегодня не известно ни одного физиологического процесса, аналогичного ВМ, у взрослых или детей. Единственным примером ВМ, встречающимся у человека, является формирование цитотрофобластами васкулярных каналов в плаценте в ходе эмбриогенеза. Полученные нами данные о блокировании аутофагии ЛХС-1269 открывают новые возможности ингибирования роста опухоли с минимальным влиянием на нормальные физиологические процессы.

Заключение

По-видимому, на ранних стадиях трансформации клетки активация аутофагии способствует развитию защитного механизма, проявляя противоопухолевый эффект. На поздних стадиях заболевания при гипоксии или лучевой терапии, или действии противоопухолевых препаратов аутофагия используется опухолевой клеткой как механизм выживания и может стать причиной лекарственной устойчивости и быстрой прогрессии опухоли.

В настоящей работе мы показали, что аутофагия участвует в формировании СПС на матрикеле, которое является *in vitro* тестом ВМ. Эксперименты с использованием фармакологических ингибиторов аутофагии и siRNA-опосредованным снижением экспрессии генов, участвующих в инициации аутофагии или в терминальной ее стадии, подтвердили участие аутофагии в ВМ. Другим подтверждением участия аутофагии в ВМ явилось снижение базового уровня аутофагии в клетках меланомы блокатором ВМ – ЛХС-1269. Полученные нами результаты указывают на то, что аутофагия в опухолевых клетках не только поддерживает жизнеспособность клеток в условиях метаболического стресса, действия химио- и радиотерапии,

но и способна стимулировать процесс формирования альтернативной системы кровоснабжения опухоли – ВМ, которая может частично компенсировать недостаточно быстрое развитие в опухоли кровеносной микроциркуляторной сети. Становится очевидным, что аутофагия – это тот чувствительный индикатор, который сигнализирует о высокозлокачественном фенотипе опухолевой клетки. Все это подводит нас к идее, что для повышения эффективности лечения злокачественных новообразований необходимо ингибировать аутофагию в опухолевых клетках. И поиск блокаторов аутофагии представляется как многообещающий подход к лечению рака.

В настоящее время проходят I и II фазы клинических испытаний около 20 низкомолекулярных ингибиторов аутофагии [20]. Предварительные результаты указывают на положительную динамику в лечении опухолей. Но нельзя игнорировать тот факт, что аутофагия – регулярное избавление от отработанного материала и получивших повреждение органелл клетки – имеет особенно большое значение для клеток нервной системы (нейронов). Когда система аутофагии работает в этих клетках слишком медленно или не безошибочно, это приводит к развитию таких нейродегенеративных расстройств, как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, хорея Гентингтона [21]. Для всех этих патологий характерны медленные, но неотвратимые изменения в функционировании головного мозга.

В ближайшие 5–10 лет, скорее всего, мы придем к более детальному пониманию процесса аутофагии в онкологии, что откроет нам либо новые эффективные методы терапии, либо позволит улучшить качество жизни онкологических больных.

Авторы благодарят А. Белявского и Е. Егорова за ценные советы в обсуждении работы. Авторы также выражают искреннюю благодарность Д. Хоченкову за помощь в интерпретации результатов по флуоресцентному изображению.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Mizushima N., Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell* 2011;147(4):728–41. DOI: 10.1016/j.cell.2011.10.026. PMID: 22078875.
- Singh R., Cuervo A.M. Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* 2011;13(5):495–504. DOI: 10.1016/j.cmet. PMID: 21531332.
- Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death. *Cell Death Differ* 2001;8(6):569–81. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400852. PMID: 11536007.
- Rabinowitz J.D., White E. Autophagy and metabolism. *Science* 2010;330(6009):1344–8. DOI: 10.1126/science.1193497. PMID: 21127245.
- Guo J.Y., Xia B., White E. Autophagy-mediated tumor promotion. *Cell* 2013;155(6):1216–9. DOI: 10.1016/j.cell.2013.11.019. PMID: 24315093.
- Degenhardt K., Mathew R., Beaudoin B. et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006;10(1):51–64. DOI: 10.1016/j.ccr.2006.06.001. PMID: 16843265.
- Sun K., Deng W., Zhang S. et al. Paradoxical roles of autophagy in different stages of tumorigenesis: protector for normal or cancer cells. *Cell Biosci* 2013;3(1):35–42. DOI: 10.1186/2045-3701-3-35. PMID: 24016776.

8. Gerger A., LaBonte M., Lenz H.L. Molecular predictors of response to antiangiogenesis therapies. *Cancer J* 2011;17(2):134–41. DOI: 10.1097/PP0.0b013e318212db3c. PMID: 21427557.
9. Cantelmo A.R., Pircher A., Kalucka J. et al. Vessel pruning or healing: endothelial metabolism as a novel target? *Expert Opin Ther Targets* 2017;21(3):239–47. DOI: 10.1080/14728222.2017.1282465. PMID: 28081641.
10. Folberg R., Maniotis A.J. Vasculogenic mimicry. *APMIS* 2004;112(7–8):508–25. DOI: 10.1111/j.1600-0463.2004.apm11207-0810.x. PMID: 15563313.
11. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю. и др. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин. *Вестник РАМН* 2005;7:37–40.
12. Kimlin L.C., Casagrande G., Virador V.M. In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. *Mol Carcinog* 2013;52(3):167–82. DOI: 10.1002/mc.21844. PMID: 22162252.
13. Yamada K.M., Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell* 2007;130(4):601–10. DOI: 10.1016/j.cell.2007.08.006. PMID: 17719539.
14. Amaravadi R.K., Lippincott-Schwartz J., Yin X.M. et al. Principles and current strategies for targeting autophagy for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2011;17(4):654–66. DOI: 10.1158/1078-0432. PMID: 21325294.
15. Ding Y., Zhao K., Wu Y., Xing C. Expression and significance of Beclin-1 in vasculogenic mimicry formation of gastric cancer. *Oncol Rep* 2014;17(7):716–9. PMID: 25070456.
16. Hönscheid P., Datta K., Muders M.H. Autophagy: detection, regulation and its role in cancer and therapy response. *Int J Radiat Biol* 2014;90(8):628–35. DOI: 10.3109/09553002. PMID: 24678799.
17. Pyo J.O., Nah J., Jung Y.K. Molecules and their functions in autophagy. *Exp Mol Med* 2012;44(2):73–80. DOI: 10.3858/emm.2012.44.2.029. PMID: 22257882.
18. Barth S., Danielle Glick D., Kay F., Macleod K.F. Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* 2010;221(2):117–24. DOI: 10.1002/path.2694. PMID: 20989884.
19. Вартамян А.А., Барышникова М.А., Эктова Л.В. и др. Производные индолкарбазолов, блокирующие васкулогенную мимикрию в опухоли. Патент РФ № 2557554. Бюлл. № 21, 2015.
20. Ozpolat B., Benbrook D.M. Targeting autophagy in cancer management – strategies and developments. *Cancer Manag Res* 2015;7:291–9. DOI: 10.2147/CMAR.S34859. PMID: 26392787.
21. Menzies F.M., Fleming A., Rubinsztein D.C. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2015;16(6):345–57. DOI: 10.1038/nrn3961. PMID: 25991442.