

УДК 576.32/.36

# Оценка эффективности действия различных ингибиторов аутофагии на опухолевые стволовые клетки A549

К. В. Александрова, И. И. Суворова\*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*E-mail: irsuvorov@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.12.2022

Принята к печати 20.02.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11891

**РЕФЕРАТ** Аутофагия – важная часть общего механизма, обеспечивающего внутриклеточный протеостаз, который определяет физиологические и фенотипические характеристики клеток. Многочисленными исследованиями установлено, что аутофагия играет центральную роль в поддержании жизнеспособности всех типов клеток, включая злокачественные. Опубликованы данные, показывающие, что аутофагия во многом поддерживает стволовые черты опухолевых клеток. Исходя из этого, модулирование аутофагии рассматривается как одна из перспективных фармакологических мишеней для элиминации опухолевых стволовых клеток в процессе терапии. Однако аутофагия представляет собой многостадийный внутриклеточный процесс, в котором участвуют многочисленные белки и который может параллельно активироваться различными сигнальными модулями. Все это затрудняет выбор эффективного фармакологического препарата для воздействия на аутофагию. По этой причине продолжается поиск препаратов, направленных на элиминацию опухолевых стволовых клеток с помощью фармакологического ингибирования аутофагии. В настоящей работе нами отобрана панель ингибиторов аутофагии (Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, ITZ-01). Используя линию опухолевых клеток A549, способных экспрессировать коровые факторы стволовости Oct4 и Sox2, мы оценили воздействие этих препаратов на выживаемость и сохранение исходных свойств опухолевых стволовых клеток. Показано, что из выбранных препаратов только Autophinib обладает эффективным токсичным действием на опухолевые стволовые клетки. Согласно полученным результатам, ингибирование аутофагии посредством Autophinib приводит к снижению экспрессии белка Sox2 в клетках A549, что коррелирует со значительной индукцией апоптоза. Более того, обработанные Autophinib клетки A549 не способны к формированию сфероидов, что свидетельствует об ослаблении свойств стволовости. Таким образом, из числа исследованных препаратов только Autophinib может быть рассмотрен в качестве потенциального средства для элиминации раковых стволовых клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** опухолевые клетки, раковые стволовые клетки, аутофагия, Sox2, Oct4, Autophinib.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** Vps34 (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, hVps34) – каталитическая субъединица фосфатидилинозит-3-киназы класса 3.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время аутофагия рассматривается как перспективная молекулярная мишень для терапии раковых клеток. Известно, что аутофагия играет критическую роль на всех стадиях онкогенеза, а именно, при диссоциации опухолевых клеток от первичной опухоли и, соответственно, при образовании диссоциированных опухолевых клеток; в процессе эпителиально-мезенхимального перехода и, таким образом, в метастазировании; а также поддерживает фенотип опухолевых стволовых клеток, обеспечивая резистентность опухоли и ее возобнов-

ление. С учетом того, что аутофагия лежит в основе различных фенотипических и физиологических проявлений злокачественных клеток, в рамках настоящей работы исследованы последствия ингибирования аутофагии на элиминацию опухолевых клеток *in vitro*. На основе опубликованных данных определена панель плохо изученных фармакологических препаратов, которые блокируют аутофагию в клетках и в настоящее время рассматриваются как агенты, перспективные для терапии опухолей различных типов. Фармакологический агент Autophinib, синтезированный в 2017 году, представляет интерес как но-

вый перспективный ингибитор аутофагии ( $IC_{50} = 90$  и  $40$  нМ), действующий посредством ингибирования липидной киназы Vps34 ( $IC_{50} = 19$  нМ *in vitro*) [1, 2]. Липид-киназа Vps34 участвует в образовании преаутофагосомальной мембраны, на основе которой формируются будущие аутофагосомы, и регулируется киназами Ulk1 и Ulk2 [3]. Киназы Ulk1 и Ulk2 инициируют процесс аутофагии и, таким образом, подавление как Ulk1/2, так и Vps34 ингибирует аутофагию на самом раннем этапе. В нашей работе использованы два ингибитора киназ Ulk1 и Ulk2 – SBI-0206965 ( $IC_{50} = 108$  и  $711$  нМ для Ulk1 и Ulk2 соответственно) и MRT68921 ( $IC_{50} = 2.9$  и  $1.1$  нМ, для Ulk1 и Ulk2 соответственно). В 2015 году обнаружили, что MRT68921 и SBI-0206965 являются специфичными ингибиторами аутофагии, далее они были определены как потенциальные противоопухолевые препараты [4–8]. В 2018 году показали, что IPTZ-01 действует как эффективный ингибитор аутофагии [9]. В опытах на моделях рака молочной железы *in vitro* и *in vivo* препарат IPTZ-01 показал высокую противоопухолевую активность с ингибированием аутофагии посредством дестабилизации лизосом [9]. Препарат Siramesine был впервые синтезирован в 1995 году в качестве анксиолитика, так как он является селективным агонистом сигма-2-рецепторов, с которыми эффективно связываются различного класса психотропные соединения в мозге [10]. В настоящее время показано, что Siramesine эффективно блокирует аутофагию посредством дестабилизации лизосом в опухолевых клетках [11]. Таким образом, Siramesine и IPTZ-01 супрессируют аутофагию на поздних этапах ее развития, когда зрелые аутофагосомы не способны слиться с лизосомами из-за повреждений последних для дальнейшей деградации внутриклеточного материала. Как правило, клетки, в которых аутофагия блокируется на поздних стадиях, характеризуются высокой аккумуляцией аутофагосомных структур в цитоплазме.

Таким образом, согласно немногочисленным данным, указанные ингибиторы аутофагии способны эффективно элиминировать раковые клетки *in vitro* и *in vivo*, однако до сих пор эти препараты не изучены в достаточной степени для того, чтобы можно было на основе критической массы научных данных сделать вывод об их перспективе в использовании в терапии рака. Способность выбранных фармакологических агентов эффективно элиминировать опухолевые клетки проверили на опухолевой линии A549, которая обладает свойствами стволовости. Опухолевые стволовые клетки очень устойчивы к химиотерапии, по этой причине они являются хорошей модельной системой *in vitro* для скрининга потенциальных противоопухолевых агентов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Культивирование клеток

Клетки опухолевой линии A549 культивировали при  $37^{\circ}\text{C}$  и  $5\%$   $\text{CO}_2$  в среде DMEM («Биолот», Россия), содержащей  $10\%$  сыворотки (FBS, Hyclone, США). Клетки этой линии получены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных». В работе использовали следующие ингибиторы (Selleckhem, США): Autophinib ( $5$  мкМ), SBI-0206965 ( $1$  мкМ), Siramesine ( $0.5$  мкМ), MRT68921 ( $1$  мкМ), IPTZ-01 ( $1$  мкМ).

### Трансдукция клеток и их анализ

Лентивирусный вектор, несущий репортер SORE6-mCherry, любезно предоставлен Гордеевым С.А. (Институт цитологии РАН). Трансдукция клеток A549 лентивирусным вектором осуществлена согласно протоколу [12]. Флуоресценцию белка mCherry детектировали на проточном цитометре Becton Dickinson FACScan (США) на канале ECD-A.

### Образование сфероидов

Клетки A549 культивировали в висячих каплях в планшетах без адгезивного покрытия Sarstedt (Германия). Предварительно клетки обрабатывали ингибиторами аутофагии в указанных концентрациях в течение 3 дней. Далее клетки снимали с чашек с помощью раствора трипсина–версена ( $1 : 1$ ) и высевали в плотности  $4000$  клеток в капле. Сфероидные колонии размером не менее  $50$  мкм анализировали через 7 дней с помощью инвертированного микроскопа TS100-F (Nicon, Япония).

### Оценка жизнеспособности

Количество живых и мертвых клеток оценивали методом проточной цитометрии. Клетки снимали с чашек с помощью раствора трипсина–версена ( $1 : 1$ ) и центрифугировали. Далее к суспензии живых клеток добавляли DAPI ( $1$  мкг/мкл), инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре и анализировали на проточном цитометре Becton Dickinson FACScan (США). Краситель DAPI проникал в пермеабелизованные клетки, что позволяло идентифицировать мертвые клетки.

### ОТ-ПЦР

Тотальную РНК выделяли с использованием реагента TRIZOL («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили согласно протоколу производителя («Евроген»), используя ревертазу MMLV,  $2.5$  мкг РНК и  $1$  мкг случайных гексапраймеров. Количественную ОТ-ПЦР проводили с использованием набора для ПЦР («Евроген») в реальном време-

ни, содержащего краситель SYBR Green, на приборе 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, США). Были использованы следующие праймеры: *sox2* (F) – TTGCTGCCTCTTTAAGACTAGGA, *sox2* (R) – CTGGGGCTCAAACCTTCTCTC; *gapdh* (F) – GAGGTCAATGAAGGGGTCTAT, *gapdh* (R) – AGTCAACGGATTTGGTCTGTA.

### Анализ активности каспазы-3 *in vitro*

Клетки лизировали в буфере, содержащем 50 мМ HEPES (ICN, США) pH 7.4, 0.1% CHAPS (Sigma), 0.5% IGEPAL-100 (ICN), 5 мМ DTT (Sigma), в течение 30 мин при 4°C. В реакционную смесь (40 мМ HEPES pH 7.4, 0.1% CHAPS, 1 мМ DTT и 40 мкМ флуорогенного субстрата AcDEVD-AMC (Sigma)) добавляли равное количество белка из лизатов, инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Флуоресценцию измеряли на флуориметре GloMax®-Multi Jr.

### Иммуноблоттинг

Клетки лизировали в PBS, содержащем 1% NP-40, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% SDS, ингибиторы протеаз и фосфатаз, и далее центрифугировали. Количество белка в пробах измеряли по методу Брэдфорда; на гель наносили равное количество белка в каждой пробе. В качестве первичных антител использовали антитела к Oct4, Sox2 (Santa Cruz, США), LC3 (Cell Signaling, США),  $\alpha$ -тубулин (Sigma). В качестве вторичных антител использовали антитела кролика против иммуноглобулинов мыши и антитела козла против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена. Белки выявляли методом усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham, Англия). Полученные результаты денситометрировали с использованием программы ImageJ. Значения нормированы на контроль нагрузки ( $\alpha$ -тубулин) и приведены к относительным единицам измерения.

### Статистический анализ

Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Средние значения сравнивали с использованием критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони.

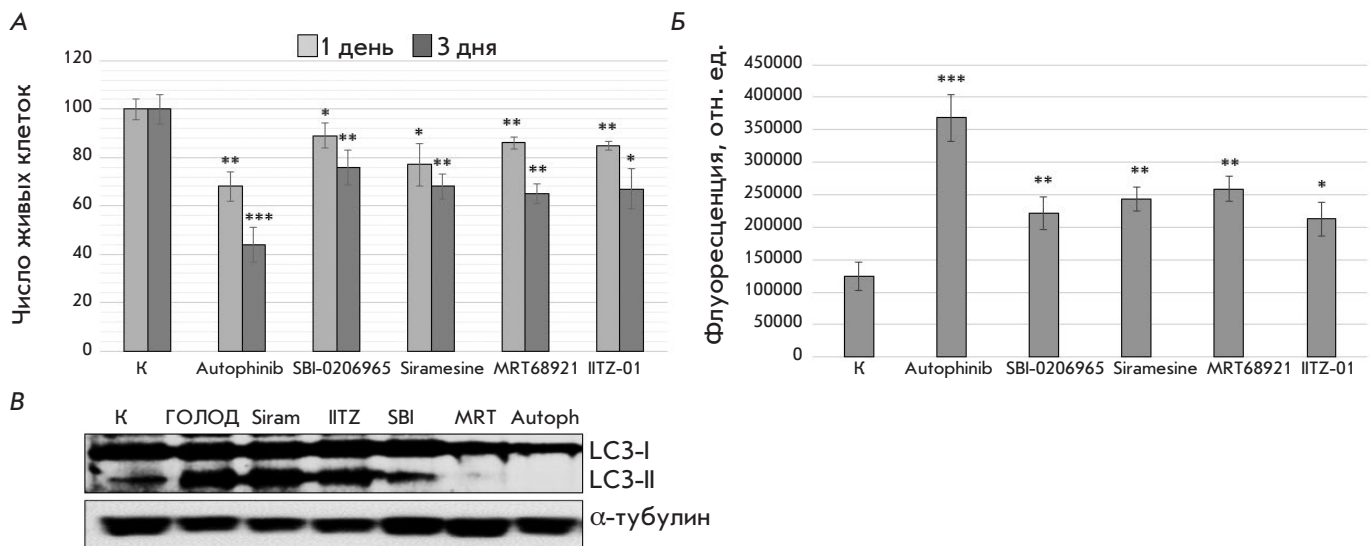
## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Фармакологический агент Autophinib оказывает выраженный цитотоксический эффект на опухолевые клетки A549

Рабочие концентрации фармакологических агентов Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921,

IITZ-01 были подобраны на основании опубликованных данных таким образом, чтобы (1) выбранная концентрация не вызывала гибель более 50% клеток в течение суток; (2) выбранная концентрация позволяла исследовать стволовые свойства выживших клеток после 3 дней обработки. Согласно полученным данным, Autophinib (5 мкМ), SBI-0206965 (1 мкМ), Siramesine (0.5 мкМ), MRT68921 (1 мкМ) и IITZ-01 (1 мкМ) вызывали гибель не более 30% клеток A549 после одного дня обработки (рис. 1А). Через 3 дня после обработки препаратами SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01 число погибших клеток A549 увеличилось до 40% (рис. 1А). Ингибитор аутофагии Autophinib проявил ярко выраженный цитотоксический эффект как на первые (чуть больше 30% мертвых клеток), так и на третьи сутки обработки (около 60% мертвых клеток) (рис. 1А). Анализ активности каспазы-3 *in vitro* показал, что все указанные модуляторы аутофагии вызывают активацию апоптоза в клетках A549, при этом наиболее сильным про-апоптотическим действием обладает Autophinib (рис. 1Б). В то время как SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01 усиливали активацию каспазы-3 приблизительно в 2 раза по сравнению с контролем через 1 сут после обработки, Autophinib увеличивал уровень активности каспазы-3 приблизительно в 3 раза (рис. 1Б). Таким образом, из всех отобранных нами препаратов наибольшую способность элиминировать опухолевые клетки A549 показал Autophinib.

Чтобы выяснить, насколько фармакологические агенты Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, IITZ-01 эффективно подавляют аутофагию в диапазоне выбранных концентраций, были использованы антитела против белка LC3. Известно, что вторая форма этого белка LC3-II образуется путем конъюгации цитозольного белка LC3 (LC3-I) с фосфатидилэтаноламином на поверхности зарождающихся аутофагосом. По этой причине считается, что LC3-II относительно специфично маркирует аутофагосомы и аутофаголизосомы и может свидетельствовать об интенсификации аутофагии в клетках. Согласно полученным результатам, аутофагическая активность в клетках A549, индуцированная сывороточным голоданием в течение 4 ч, эффективно подавляется агентами Autophinib, SBI-0206965 и MRT68921 (рис. 1В). При действии препаратами Siramesine и IITZ-01 вторая форма белка LC3 накапливалась в клетках, так же как и при сывороточном голодании в отсутствие указанных агентов. Вероятно, это связано с тем, что механизм ингибирования аутофагии агентами Siramesine и IITZ-01 преимущественно связан с дестабилизацией лизосом и по этой причине не препятствует активации аутофагии на ранних стадиях вплоть до аккумуляции



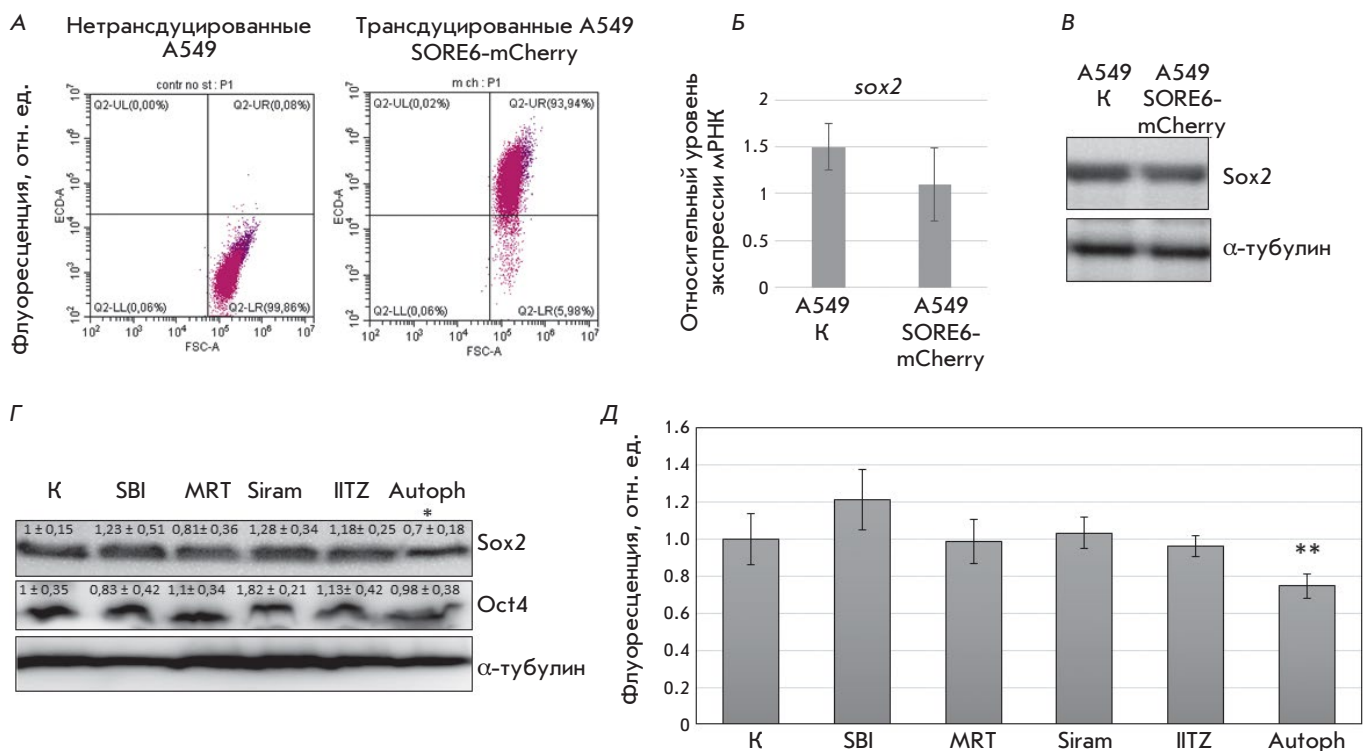
**Рис. 1.** Влияние ингибиторов аутофагии на выживаемость раковых клеток A549. **А** – анализ числа живых клеток линии A549 в норме и при действии ингибиторов аутофагии Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, IITZ-01. Представлены результаты проточной цитометрии с использованием красителя DAPI, который проникает только в пермеабилizованные клетки. Подсчет клеток проводили на 1-й и 3-й дни обработки указанными агентами ( $n = 10000$  событий). Планки погрешности отражают стандартную ошибку среднего ( $n = 3$ ), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$ . **Б** – анализ активности каспазы-3 *in vitro* в контрольных клетках линии A549 и через сутки после обработки ингибиторами аутофагии Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, IITZ-01. Планки погрешности отражают стандартную ошибку среднего ( $n = 3$ ), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.025$ , \*\*\* $p < 0.005$ . **В** – иммуноблоттинг клеточных лизатов, полученных из клеток A549 в норме и при действии сывороточного голодания в течение 4 ч. A549 были обработаны агентами Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, IITZ-01 в течение 4 ч в условиях сывороточного голодания. Использованы антитела против белков LC3-I/II и α-тубулин

аутофагосом, маркированных LC3-II. Интересно отметить, что среди используемых ингибиторов киназы Ulk1/Ulk2 агент MRT68921 лучше подавлял аутофагию в клетках A549 в условиях голодания, чем SBI-0206965 (рис. 1B). Фармакологический агент Autophinib полностью препятствует накоплению второй формы белка LC3 (LC3-II), что свидетельствует об эффективной супрессии этого процесса в клетках.

### В опухолевых клетках A549 Autophinib вызывает снижение экспрессии фактора Sox2

Транскрипционные факторы, обильно экспрессирующиеся в эмбриональных стволовых клетках, считаются драйверами стволовых свойств опухолевых клеток. Кроме того, уровень экспрессии Sox2 и Oct4 коррелирует с гистологической злокачественностью опухоли соответственно; эти белки часто служат прогностическими маркерами ответа злокачественных клеток на терапию и исход заболевания [13, 14]. Для того, чтобы в полной степени охарактеризовать уровень экспрессии факторов Sox2 и Oct4 в линии опухолевых клеток A549, эти клетки трансдуцировали лентивирусной конструкцией, несущей флуоресцентный репортер SORE6-mCherry [12]. Флуоресцентный репортер SORE6-mCherry

содержит шесть повторов промоторных регионов для связывания транскрипционных факторов Sox2 и Oct4 с последующей индукцией транскрипции красного флуоресцентного белка mCherry. Он был сконструирован для детекции опухолевых стволовых клеток [12]. Как видно на рис. 2A, трансдуцированные клетки линии A549 имеют значительный уровень флуоресценции в красной области спектра, идентифицирующей активность белков Oct4 и Sox2. Согласно полученным результатам, лентивирусная трансдукция не изменяет уровень экспрессии фактора Sox2 как на уровне гена, так и на уровне белка, что свидетельствует об адекватности используемой модели (рис. 2B и B). Далее изучено влияние фармакологических агентов Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01 на уровень белков Oct4 и Sox2 в клетках линии A549 после трех дней обработки. Показано, что количество белка Oct4 остается постоянным при воздействии всех типов фармакологических агентов, в то время как уровень Sox2 снижается в клетках A549, обработанных препаратом Autophinib, и остается постоянным при действии SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01 (рис. 2Г). Оценка уровня экспрессии факторов Oct4 и Sox2 в A549, трансдуцирован-

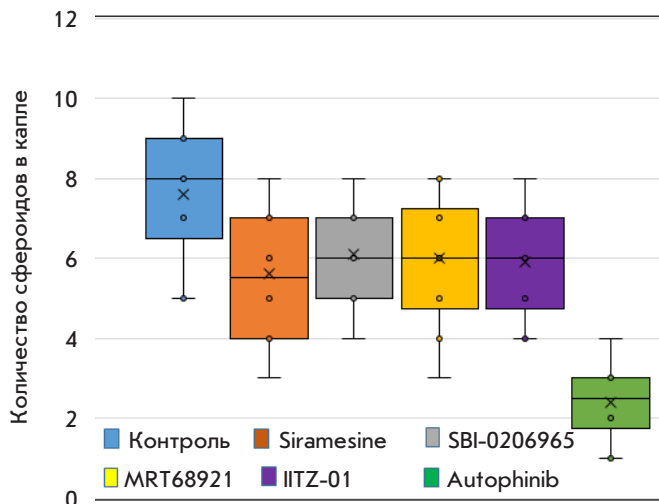


**Рис. 2.** Влияние ингибиторов аутофагии на уровень экспрессии белков Sox2 и Oct4 в опухолевых клетках линии A549. **А** – результаты проточной цитометрии нетрансдуцированных и трансдуцированных клеток линии A549 репортерной конструкцией SORE6-mCherry. Флуоресценция детектирована на канале ECD-A. **Б** – анализ экспрессии мРНК Sox2 методом количественной ОТ-ПЦР контрольных и обработанных клеток A549 в течение 1 и 3 дней указанными агентами. Экспрессия нормализована по GAPDH. **В** – иммуноблотинг клеточных лизатов на содержание белка Sox2 в клетках линии A549, нетрансдуцированных и трансдуцированных генетической конструкцией SORE6-mCherry. α-Тубулин приведен в качестве контроля нагрузки. **Г** – иммуноблотинг клеточных лизатов на содержание белков Sox2, Oct4, α-тубулин в клетках линии A549 в норме и после обработки указанными агентами в течение 3 дней. Результаты денситометрии представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего ( $n = 3$ ), \* $p < 0.05$ . **Д** – анализ флуоресцентного свечения репортерной конструкции методом проточной цитометрии в клетках линии A549 в норме и после обработки указанными агентами в течение 3 дней. Результаты представлены в виде диаграммы. Среднее значение флуоресценции определено на основе трех независимых экспериментов с учетом клеточной аутофлуоресценции. Планки погрешности отражают стандартную ошибку среднего ( $n = 3$ ), \*\* $p < 0.05$

ных лентивирусной конструкцией SORE6-mCherry, подтвердила ослабление свойств стволовости в опухолевых клетках при действии Autophinib (рис. 2Д). Трансформированные клетки A549 культивировали в течение 3 дней в присутствии ингибиторов аутофагии Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01 и далее анализировали с помощью проточной цитометрии. Согласно полученным данным, уровень флуоресценции репортерной конструкции SORE6-mCherry заметно снижается в клетках A549, обработанных Autophinib (рис. 2Д). На основании результатов вестерн-блотинга (рис. 2Г) можно предположить, что снижение флуоресцентного свечения связано с уменьшением активности Sox2, но не Oct4, белковый уровень которого остается постоянным при действии Autophinib. При этом можно предположить, что цитотоксическое действие Autophinib

сопряжено с ослаблением свойств стволовости и по этой причине имеет ярко выраженный эффект. Таким образом, полученные данные демонстрируют, что из всей панели выбранных ингибиторов аутофагии только препарат Autophinib изменяет стволовые характеристики клеток A549.

**Обработка клеток A549 агентом Autophinib препятствует образованию опухолевых сфероидов**  
 Опухолевые сфероиды – это формируемые опухолевыми клетками трехмерные структуры, которые имитируют солидные опухоли *in vivo* во многих ключевых аспектах, как например, гетерогенная архитектура, внутренние градиенты сигнальных факторов, питательных веществ и оксигенации. Опухолевые сфероиды представляют собой более адекватную модель лекарственной устойчивости по сравнению



**Рис. 3.** Влияние ингибиторов аутофагии на способность клеток линии A549 к образованию сфероидов. Результаты представлены в виде диаграмм размаха. Сферы размером не менее 50 мкм подсчитывали в одной капле

с монослойными культурами [15]. Для того, чтобы оценить злокачественный потенциал выживших клеток A549 после обработки ингибиторами аутофагии Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01, оценили способность опухолевых клеток образовывать сфероиды. Клетки линии A549 предварительно культивировали в присутствии указанных агентов в течение 3 дней, затем диссоциировали и культивировали в условиях, необходимых для образования 3D-структур. Согласно полученным данным, клетки A549, обработанные препаратами SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01, способны к формированию сфероидных структур размером не менее 50 мкм, хотя и в меньшей степени по сравнению с контролем (рис. 3). По всей видимости, уменьшенное количество сфероидов, образованных из предобработанных A549, может быть следствием инициируемой этими агентами апоптотической программы, которая сохранилась в пересаженных для образования 3D-структур клетках. Напротив, фармакологический агент Autophinib способен в значительной степени блокировать потенциал раковых клеток к формированию сфероидов, что может быть связано с серьезным нарушением внутриклеточного протеостаза A549. По всей видимости, влияние препарата Autophinib может иметь необратимые последствия для опухолевых клеток, ведущие к неспособности восстановить гомеостаз и последующей элиминации.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы разрабатывается множество ингибирующих аутофагию химических соединений, применение которых, как ожидается, приведет к об-

ширной гибели раковых клеток и низкой токсичности в отношении нормальных клеток человека [16, 17]. Некоторые препараты, воздействующие на аутофагию, уже применяются в клинике (рапамицин, хлорохин, гидроксихлорохин), в то время как другие находятся на стадии клинических испытаний, как например, ингибиторы киназы mTOR [17, 18]. Тот факт, что около 70% клинических исследований сосредоточены на роли аутофагии в онкогенезе, указывает на многообещающую роль модуляции аутофагии в лечении рака [19].

В настоящей работе предпринята попытка оценить потенциальную терапевтическую значимость препаратов Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, IITZ-01 в элиминации опухолевых стволовых клеток A549. Показано, что среди указанных ингибиторов аутофагии только Autophinib обладает выраженными противоопухолевыми свойствами, ослабляя стволовые свойства злокачественных клеток, индуцируя в них апоптоз и препятствуя возобновлению популяции. По всей видимости, детектируемые противоопухолевые эффекты препарата Autophinib достигаются посредством серьезного нарушения клеточного протеостаза, вызванного ингибированием белка Vps34 и последующей блокадой не только аутофагии. Дело в том, что липид-киназа Vps34 является одним из основных продуцентов фосфатидилинозитол-3-фосфата в клетке, который в свою очередь рекрутирует соответствующие белки на мембраны. По этой причине Vps34 не только играет ключевую роль в индукции аутофагии и образовании первичной мембраны с привлечением мембранных белковых комплексов, но и имеет решающее значение для осуществления эндоцитоза [20, 21]. Таким образом, ингибирование белка Vps34 приводит к подавлению образования мембранных везикул, необходимых как для осуществления аутофагии, так и для эндоцитоза, что в целом повреждает внутриклеточный гомеостаз. Кроме того, эндоцитоз во многом опосредует взаимодействие между опухолевыми клетками, и его нарушение может разобщать раковые клетки [22]. По всей видимости, неспособность клеток линии A549 образовывать сфероиды после обработки агентом Autophinib также связана с повреждением межклеточной коммуникации. Таким образом, противоопухолевое действие Autophinib связано не только с ингибированием аутофагии, но затрагивает и другие сигнальные пути. По этой причине фармакологические агенты SBI-0206965 и MRT68921, которые блокируют аутофагию посредством целенаправленной супрессии белков Ulk1 и Ulk2, оказались менее токсичными для опухолевых стволовых клеток A549 по сравнению с Autophinib. Интересно, что препараты Siramesine и IITZ-01 также прояви-

ли слабый элиминирующий эффект против клеток A549, хотя их действие связано с дестабилизацией лизосом, которые необходимы как для аутофагии, так и для эндоцитарных путей. Тем не менее, ингибирование киназы Vps34 оказалось более эффективной стратегией в устранении опухолевых стволовых клеток в рамках проведенной работы, а также в других описанных экспериментах. Показано, что активность киназы Vps34 необходима для экспансии опухолевых стволовых клеток печени, соответственно, РНК-интерференция этого белка приводит к противоположному эффекту, препятствуя росту опухоли *in vivo* [23]. Кроме того, фармакологическое ингибирование Vps34 эффективно устраняет популяцию опухолевых стволовых клеток в печени, а также ингибирует рост опухолей *in vivo* [23]. Более того, подавление активности киназы Vps34 эффективно устраняет опухолевые стволовые клетки в условиях комбинированной терапии в модели опухолевых сфероидов [24]. Показано, что комбинированное лечение с использованием 5-фторурацила и препарата 36-077, являющегося ингибитором Vps34, вызывает преимущественное разрушение опухолевых клеток со стволовым фенотипом [24].

На основе полученных результатов и опубликованных данных становится очевидным, что фармако-

логический подход к ингибированию аутофагии в раковых клетках должен затрагивать перекрестные сигнальные пути. Монотерапия на основе блокады аутофагии в настоящее время уже признается неэффективной [19]. Основными причинами являются: (1) дуальная роль аутофагии в раке; (2) отсутствие терапевтически подходящих ингибиторов аутофагии; (3) не до конца изученные перекрестные взаимодействия между аутофагией и другими сигнальными путями в клетке. Показано, что совместное ингибирование аутофагии и эндоцитарных путей на основе блокады Vps34 может быть хорошей стратегией в элиминации опухолевых стволовых клеток, и, соответственно, изучение аутофагии в контексте везикулярного транспорта можно рассматривать как перспективную исследовательскую задачу. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грантовое соглашение № 075-15-2020-773). Клеточные линии получены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», поддержанного грантом Минобрнауки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-683).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Robke L., Laraia L., Corrales M.A., Konstantinidis G., Muroi M., Richters A., Winzker M., Engbring T., Tomassi S., Watanabe N., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2017. V. 56. № 28. P. 8153–8157.
- Li H., Li M., Chen K., Li Y., Yang Z., Zhou Z. // *Med. Oncol.* 2022. V. 39. № 12. P. 244.
- Russell R.C., Tian J., Yuan H., Park H.W., Chang Y-Y., Kim J., Kim H., Neufeld T.P., Dillin A., et al. // *Nat. Cell. Biol.* 2013. V. 15. № 7. P. 741–750.
- Petherick K.J., Conway O.J.L., Mparamhanga C., Osborne S.A., Kamal A., Saxty B., Ganley I.G. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 18. P. 11376–11383.
- Egan D.F., Chun M.G.H., Vamos M., Zou H., Rong J., Miller C.J., Lou H.J., Raveendra-Panickar D., Yang C.-C., Sheffler D.J., et al. // *Mol. Cell.* 2015. V. 59. № 2. P. 285–297.
- Chen Y., Xie X., Wang C., Hu Y., Zhang H., Zhang L., Tu S., He Y., Li Y. // *Cell. Death Dis.* 2020. V. 11. № 8. P. 712.
- Singha B., Laski J., Ramos Valdés Y., Liu E., DiMattia G.E., Shepherd T.G. // *Am. J. Cancer Res.* 2020. V. 10. № 5. P. 1384–1399.
- Zheng Y., Liu L., Wang Y., Xiao S., Mai R., Zhu Z., Cao Y. // *Cell Biosci.* 2021. V. 11. № 1. P. 63.
- Guntuku L., Gangasani J.K., Thummuri D., Borkar R.M., Manavathi B., Ragampeta S., Vaidya J.R., Sistla R., Vegi N.G.M. // *Oncogene.* 2019. V. 38. № 4. P. 581–595.
- Perregaard J., Moltzen E.K., Meier E., Sánchez C. // *J. Med. Chem.* 1995. V. 38. № 11. P. 1998–2008.
- Ostenfeld M.S., Høyer-Hansen M., Bastholm L., Fehrenbacher N., Olsen O.D., Groth-Pedersen L., Puustinen P., Kirkegaard-Sørensen T., Nylandsted J., Farkas T., et al. // *Autophagy.* 2008. V. 4. № 4. P. 487–499.
- Tang B., Raviv A., Esposito D., Flanders K.C., Daniel C., Nghiem B.T., Garfield S., Lim L., Mannan P., Robles A.I., et al. // *Stem Cell Reports.* 2015. V. 4. № 1. P. 155–169.
- Zhao X., Lu H., Sun Y., Liu L., Wang H. // *Medicine (Baltimore).* 2020. V. 99. № 42. P. e22804.
- Yuan D., Wang J., Yan M., Xu Y. // *Int. J. Biol. Markers.* 2021. V. 36. № 4. P. 45–53. <https://doi.org/10.1177/17246008211042899>
- Ishiguro T., Ohata H., Sato A., Yamawaki K., Enomoto T., Okamoto K. // *Cancer Sci.* 2017. V. 108. № 3. P. 283–289.
- Ariosa A.R., Lahiri V., Lei Y., Yang Y., Yin Z., Zhang Z., Klionsky D.J. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2021. V. 1867. № 12. P. 166262.
- Mohsen S., Sobash P.T., Algwaiz G.F., Nasef N., Al-Zeidaneen S.A., Karim N.A. // *Curr. Oncol.* 2022. V. 29. № 3. P. 1695–1708.
- Amaravadi R.K. // *Autophagy.* 2022. V. 18. № 6. P. 1470–1471.
- Marinković M., Šprung M., Buljubašić M., Novak I. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018. V. 2018. P. 8023821.
- Lindmo K., Stenmark H. // *J. Cell. Sci.* 2006. V. 119. № Pt 4. P. 605–614.
- Nascimbeni A.C., Codogno P. // *FEBS J.* 2017. V. 284. № 9. P. 1267–1278.
- Wu B., Wang Q., Shi X., Jiang M. // *Cell Commun. Signaling.* 2022. V. 20. № 1. P. 161.
- Liu F., Wu X., Qian Y., Jiang X., Wang Y., Gao J. // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11. № 6. P. 427.
- Kumar B., Ahmad R., Sharma S., Gowrikumar S., Primeaux M., Rana S., Natarajan A., Oupicky D., Hopkins C.R., Dhawan P., et al. // *Cancers (Basel).* 2021. V. 13. № 9. P. 2168.