

РЯБАЯ ОКСАНА ОЛЕГОВНА

**ВЛИЯНИЕ АУТОФАГИИ НА МЕХАНИЗМЫ РОСТА, ПРОГРЕССИИ И
ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МЕЛАНОМЫ КОЖИ ЧЕЛОВЕКА**

14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

Научный руководитель:

доктор медицинских наук

Степанова Евгения Владиславовна

Официальные оппоненты:

Бойчук Сергей Васильевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей патологии; декан медико-биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Уласов Илья Валентинович, доктор биологических наук, заведующий группой экспериментальной биотерапии и диагностики Института регенеративной медицины федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет).

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский научный центр рентгенодиагностики» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «2» апреля 2020 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д 001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва, Каширское шоссе, д.23).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва Каширское шоссе, д.24) и на сайте www.ronc.ru

Автореферат разослан «.....»2020 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Метастатическая меланома является одним из наиболее агрессивных типов опухолей с плохим прогнозом течения болезни, что связано с высоким метастатическим потенциалом, поздней диагностикой и резистентностью к химиотерапии на поздних стадиях (Bray F. et al, 2018; Ndoye A. et al, 2016). Меланома является гетерогенной опухолью ввиду наличия различных генетических нарушений в зависимости от ее подтипов. Так в 50-70% случаев меланомы кожи встречаются мутации в гене *BRAF* (Davies H. et al, 2002). Данная мутация приводит к конститутивной активации RAS-RAF-MEK-ERK сигнального пути, регулирующего пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток, а также их резистентность к противоопухолевым агентам (Zhang, C. et al, 2015). Таким образом, новые лекарственные препараты и варианты их комбинаций на сегодняшний день являются одним из актуальных вопросов химиотерапии злокачественных опухолей и меланомы, в частности.

Аутофагия является эволюционно сложившимся катаболическим путем, который помогает опухолевым клеткам преодолевать неблагоприятные условия (химиотерапия, радиотерапия, гипоксия) или нехватку питательных веществ и энергии в клетках за счет своей способности к поддержанию уровня АТФ, что приводит к росту опухоли и лекарственной устойчивости (Levy J.M.M. et al, 2017). При меланоме аутофагия рассматривается как адаптивный механизм преодоления неблагоприятных условий. Считается, что активирующие мутации в гене *BRAF* влияют на способность меланомных клеток к аутофагии: *BRAF*-мутированные клетки меланомы являются более резистентными к терапии и отличаются повышенным уровнем базальной аутофагии в опухоли по сравнению с нормальными тканями (Armstrong J.L. et al, 2011).

Ряд противоопухолевых препаратов способен активировать процесс аутофагии, поэтому ингибирование аутофагии может помочь преодолеть химиорезистентность меланомы к стандартной терапии. К примеру, алкилирующие химиотерапевтические препараты, такие как темозоломид (TMZ), индуцируют процесс аутофагии при глиоме и меланоме кожи (Katayama M. et al, 2007; Ma X.-H. et al, 2011). Использование ингибиторов аутофагии — хлорокина (CQ) или LY-294.002 (LY) — потенцирует действие химиотерапевтических препаратов, вызывая аддитивную или синергическую цитотоксичность и апоптоз. В недавних исследованиях показано, что противоопухолевая комбинация хлорокина с TMZ приводила к индукции апоптоза в клеточных линиях глиомы с диким типом p53 (Amaravadi R. et al, 2016; Guo X. et al, 2012).

Недавно было обнаружено, что ингибирование белка GRP78 (glucose-related protein 78), основного компонента стресса эндоплазматического ретикулума, приводит к подавлению аутофагии и повышению чувствительности к лечению TMZ (Cerezo M. et al, 2016).

Аутофагия и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) являются основными биологическими процессами в опухоли, вовлеченными в индукцию резистентности и метастазирования, и тесно взаимосвязаны (Kalluri R. et al, 2009; Levine B. et al, 2008). С одной стороны, клетки, участвующие в ЭМП, требуют активации аутофагии, чтобы выжить во время метастатического распространения. С другой стороны, аутофагия, выступая в качестве онкосупрессора, может ингибировать ранние фазы метастазирования, блокируя активацию ЭМП, дестабилизируя важнейшие медиаторы этого процесса (Yang L. et al, 2018).

Цель исследования

Изучить значение процесса аутофагии в механизмах роста, прогрессии и химиорезистентности клеточных линий меланомы кожи человека.

Задачи исследования

1. Исследовать различия в активации аутофагии в клеточных линиях меланомы человека с нормальным и мутированным геном *BRAF*.
2. Исследовать влияние ингибиторов аутофагии хлорокина и LY-294.002 на цитотоксичность темозоломида на клеточных линиях меланомы человека.
3. Изучить роль GRP78-зависимой аутофагии в ответе клеточных линий на терапию темозоломидом.
4. Исследовать уровень базальной аутофагии и экспрессии основных маркеров ЭМП на ряде клеточных линий меланомы.
5. Выявить потенциальную эффективность инактивации аутофагии посредством малых интерферирующих РНК (миРНК) к ATG5 и GRP78 и ингибиторов аутофагии LY-294.002 и хлорокина на изменение экспрессии маркеров ЭМП и миграционную способность клеточных линий меланомы.

Методы и методология исследования

В качестве модельной системы *in vitro* были использованы клеточные линии меланомы человека A375 и MeWo, полученные из ATCC, а также клеточных линии меланомы, полученные из образцов опухолей пациентов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Мутации в гене *BRAF* определяли ПЦР и верифицировали секвенированием по Сэнгеру. Оценка антипролиферативного эффекта определялась с помощью МТТ-теста, способности клеток к колониеобразованию. Уровень апоптоза и распределение клеток по фазам клеточного цикла определяли методом проточной цитофлуориметрии после окраски аннексином V и йодистым пропидием. Исследование экспрессии маркеров аутофагии и эпителиально-мезенхимального перехода проведено методом иммуноблоттинга, ПЦР в

реальном времени с обратной транскрипцией и иммуноцитохимически. Данные методы являются общеупотребимыми и достоверными в исследовании экспрессии белков. Ко-экспрессия маркеров аутофагии и ЭМП проведена методом конфокальной микроскопии на клеточном анализаторе InCell Analyzer 6000. Оценка инвазивной и миграционной способности клеток изучалась методом оценки зарастания «раны».

Научная новизна

В работе проведены исследования *in vitro* новых потенциально эффективных режимов терапии с использованием ингибиторов аутофагии и TMZ. Эти комбинации разработаны на основе данных о взаимодействии ингибиторов аутофагии и используемых химиопрепаратов на молекулярном уровне. Впервые представлена взаимосвязь между базальным уровнем аутофагии и наличием мутаций в гене *BRAF* на клетках меланомы человека. Впервые изучена роль аутофагии в ответе клеток меланомы на противоопухолевую терапию в зависимости базального уровня аутофагии и мутационного статуса гена *BRAF*.

Научная новизна диссертации также состоит в комплексном изучении взаимодействия фундаментальных процессов ЭМП и аутофагии в клеточных линиях, что позволит оценить значимость маркеров ЭМП и аутофагии в качестве предикторов опухолевой прогрессии. Впервые изучены ко-экспрессия ZEB1, TWIST и маркеров аутофагии Beclin 1, LC3B и p62, а также изменение их экспрессии под действием ингибиторов аутофагии и применяемого лекарственного лечения.

В целом, результаты диссертации расширяют представления о биологии меланомы, позволяют выявить новые потенциальные мишени и разработать новые подходы для борьбы с этим заболеванием.

Теоретическая и практическая значимость

Практическая значимость исследования состоит в том, что разработаны новые подходы к персонализации лечения больных метастатической меланомой на основе молекулярно-генетического и биологического статуса опухоли, а также результатов доклинических исследований новых комбинаций с использованием классических противоопухолевых препаратов.

Расширение представлений о перекрестном функционировании аутофагии и эпителиально-мезенхимального перехода и параллельном регулировании этих двух процессов посредством общих сигнальных путей на примере исследования клеточных линий меланомы позволит найти клинически значимые биомаркеры для предсказания опухолевой прогрессии и, возможно, новые мишени для противоопухолевой терапии.

Личный вклад

Автор лично провела анализ научной литературы по теме диссертации, принимала непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке плана исследования. Автором

проведены экспериментальная реализация плана исследования, анализ и обобщение полученных данных, подготовлены публикации, полностью отражающие все полученные результаты. Доклады по теме диссертации были представлены лично автором на всероссийских и международных научных конференциях.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – Онкология («биологические науки») и области исследования п.2. «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной биологии, морфологии, иммунологии, биохимии и др.)».

Положения, выносимые на защиту

1. Мутации в гене *BRAF* влияют на уровень аутофагии в клетках меланомы.
2. Ингибирование аутофагии посредством хлорокина и LY-294.002 влияет на чувствительность меланомных клеток к токсическому воздействию темозоломида.
3. Ингибирование аутофагии, вызванной стрессом эндокплазматического ретикулума, повышает чувствительность клеток меланомы к темозоломиду.
4. Ингибирование аутофагии влияет на миграционную способность клеток меланомы.
5. Эпителиально-мезенхимальный переход и аутофагия взаимосвязаны в противоопухолевом ответе клеточных линий меланомы.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований используются в повседневной работе лаборатории биомаркеров и механизмов опухолевого ангиогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Основные положения диссертации доложены на следующих конференциях: Белорусско-российская научно-практическая конференция «Отечественные противоопухолевые препараты» (Минск, 2013 г.), XX Российский онкологический конгресс (Москва, 2016 г.), II Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 2016 г.), III Петербургский онкологический форум «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2017 г.), IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 2018 г.).

Апробация

Апробация диссертации состоялась 8 ноября 2019 года на совместной конференции лабораторий и отделений НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей, НИИ канцерогенеза, НИИ клинической онкологии им. акад. РАН и РАМН Н.Н. Трапезникова ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации

Материалы диссертационных исследований изложены в 23 научных статьях, из них 13 статей в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, 5 статей входят в реферативные базы данных SCOPUS, Web of Science.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа написана по традиционной форме, изложена на 138 страницах машинописного текста, состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты собственных исследований» и «Обсуждение результатов», заключения и списка цитируемой литературы, включающего ссылки на 237 отечественных и зарубежных источников, и содержит 24 иллюстрации и 7 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Влияние мутации V600 гена *BRAF* на уровень аутофагии в клеточных линиях меланомы человека

На панели клеточных линий метастатической меланомы, полученных от больных, проходивших лечение в ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также у двух линий из американского каталога клеточных культур (ATCC), были исследованы мутации в гене *BRAF*. Среди 14 исследованных клеточных линий 9 имели активирующие мутации в гене *BRAF*: 8 – V600E и 1 – V600K. 5 клеточных линии имели дикий тип гена *BRAF* (*BRAF^{wt}*) (таблица.1).

Таблица 1 – Мутационный статус исследованных клеточных линий меланомы

Клеточная линия	Статус гена <i>BRAF</i>	Клеточная линия	Статус гена <i>BRAF</i>
Mel Rac	WT	Mel Gi	V600E
Mel Z	V600E	Mel Me	WT
Mel Ibr	V600E	Mel HN	V600E
Mel IL	V600K	Mel Ksen	V600E
Mel Gus	WT	Mel MTP	WT
Mel R	V600E	A375	V600E
Mel P	V600E	MeWo	WT

Далее мы изучили ассоциацию статуса гена *BRAF* с базальным уровнем аутофагии в клетках. Активность аутофагии определялась по уровню экспрессии мРНК Beclin 1 – маркеру, который участвует в инициации аутофагии. Базальный уровень экспрессии мРНК гена *Beclin 1* регистрировали в клетках всех исследованных линий меланомы (рисунок 1). 12 изученных клеточных линий были разделены на те, что имеют низкий и высокий уровень базальной аутофагии. 2 из 3 линий с низким базальным уровнем аутофагии имели *BRAF^{wt}*. Среди клеточных линий с высоким уровнем лишь 2 из 9 линий имели дикий тип гена.

Величина базальной экспрессии Beclin 1 варьировала от 0,15-0,26 до 0,82-1,16 о.е. Средний уровень экспрессии составил $0,42 \pm 0,28$ о.е. в $BRAF^{wt}$ и $0,65 \pm 0,32$ о.е. в $BRAF^{v600}$ клетках ($p=0,66$). Хотя уровень экспрессии белка Beclin1 не коррелировал с наличием мутаций в меланомных клетках, 60% клеточных линий $BRAF^{wt}$ и 14,3% $BRAF^{v600}$ имели уровень экспрессии Beclin1 менее 0,3 о.е. ($p=0,22$).

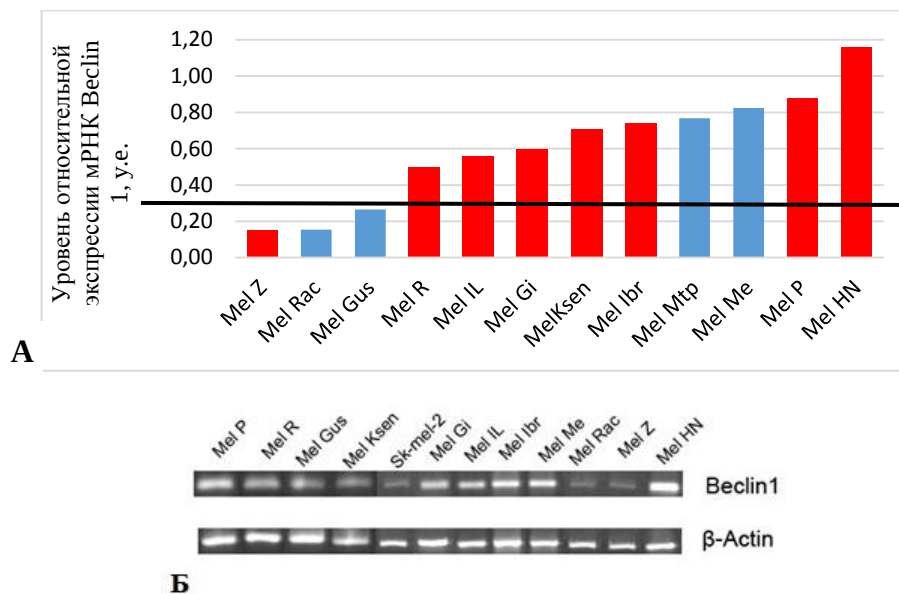


Рисунок 1 — А. Базальный уровень аутофагии в клеточных линиях меланомы человека. Б. Анализ экспрессии мРНК гена *Beclin1* на клеточных линиях меланомы человека. Электрофореграмма продуктов ОТ-ПЦР.

Недостаток питательных веществ (голодание) является универсальным и наиболее быстрым активатором аутофагии. Способность клеточных линий меланомы к индукции аутофагии была изучена по соотношению уровня мРНК гена *Beclin1* у клеточных линий, растущих в нормальных условиях и при недостатке питательных веществ. С целью создания неблагоприятных условий клетки инкубировались в питательной среде RPMI-1640 без добавления ТЭС в течение 24 часов. При соотношении $> 1,1$, клеточная линия оценивалась как способная к индукции аутофагии.

В 6 линиях меланомы (mel Ibr, mel P, mel R, mel Gi, mel Me и mel IL) не наблюдалось значительных изменений уровня экспрессии белка (соотношение мРНК гена *Beclin1* в условиях голодания по отношению к норме составляло от 0,94 до 1,28 о.е.). В 5 линиях (mel Gus, mel Ksen, Mel MTP, mel Rac и mel Z) наблюдали значительное повышение уровня экспрессии мРНК при голодании (от 1,81 до 5,70 о.е.), а в одной (mel HN) – снижение (до 0,48 о.е.).

Культивирование клеточных линий в среде без питательных веществ приводило к увеличению экспрессии *Beclin1* в 2-5 раз в клетках $BRAF^{wt}$, в то время как в $BRAF^{v600}$ клеточных линиях он практически не менялся ($p=0,11$).

Таким образом, прямой корреляции между активирующими мутациями в гене *BRAF* и уровнем аутофагии не обнаружено в изученных клеточных линиях. Тем не менее, в условиях недостатка питательных веществ уровень аутофагии практически не изменялся в *BRAF*^{v600} клетках, тогда как в *BRAF*^{wt} клетках происходила индукция аутофагии.

Исследование цитотоксического действия TMZ

Исследование было проведено на 7 клеточных линиях метастатической меланомы человека, 4 из которых (Mel Gi, Mel Z, Mel Ksen, Mel IL) имели мутацию *BRAF*^{v600}, а 3 (Mel Me, Mel Mtp, Mel Rac) – дикий тип гена *BRAF*.

Антипролиферативная активность TMZ оценивалась по величине IC₅₀ по результатам трех независимых экспериментов. Среднее значение IC₅₀ не зависело от мутационного статуса *BRAF* и составляло в среднем 270,5±62,6 мМ (p<0,05). Данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Значение IC₅₀ темозоломида (TMZ) на клеточных линиях меланомы

Клеточная линия	Значение IC ₅₀ TMZ, мМ
Mel IL	360 ± 41
Mel Rac	280 ± 40
Mel Z	160 ± 25
Mel Mtp	265 ± 17
Mel Me	328 ± 36
Mel Gi	285 ± 29
Mel Ksen	428 ± 50

Влияние ингибиторов аутофагии на цитотоксичность TMZ

Для дальнейших исследований использовали TMZ в нетоксической концентрации 100 мМ.

В качестве ингибиторов были взяты хлорокин (CQ), который, являясь слабым основанием, изменяет уровень pH в лизосомах и непосредственно нарушает слияние аутофагосомы с лизосомой и LY-294.002 (LY) — ингибитор PI3K/AKT, фазы инициации аутофагии. Чтобы оценить их эффект и исключить отдельное влияние токсичности ингибиторов, в эксперимент были взяты CQ и LY в нетоксических концентрациях по данным МТТ: LY (5 мМ) и CQ (20 мМ) (рисунок 2А).

Влияние ингибиторов аутофагии на цитотоксичность TMZ исследовали при предварительной инкубации клеток в течение 1 часа с CQ и LY, после чего добавляли TMZ и культивировали клетки в течение 48 часов. Все комбинации демонстрировали усиленный антипролиферативный эффект по сравнению с монотерапией TMZ. Комбинация 20 мМ CQ и 100 мМ TMZ приводила к 10-15% ингибированию роста для всех клеточных линий по сравнению с TMZ. Комбинация 100 мМ TMZ и 5 мМ LY приводила к 30% увеличению гибели клеток на Mel MTP, Mel Z, Mel Rac и Mel Ksen, но не Mel IL (только 15%) (рисунок 2Б).

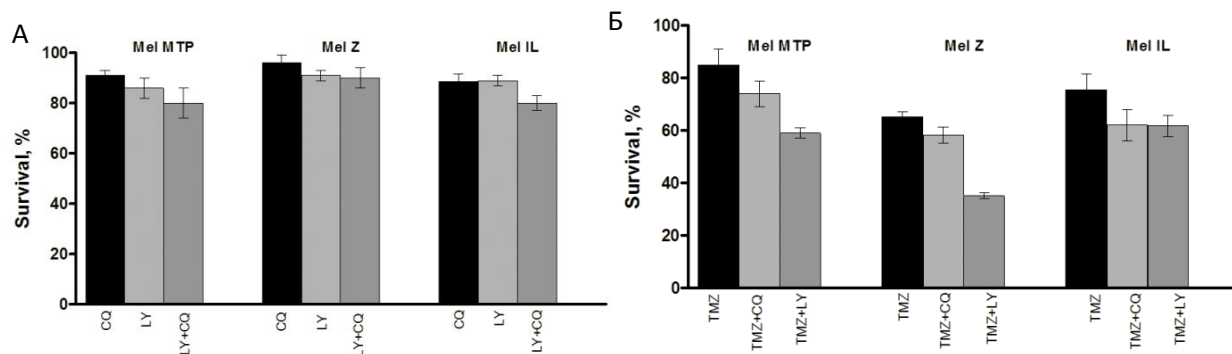


Рисунок 2 — А. Изучение цитотоксического действия ингибиторов аутофагии, а также их комбинации на клеточные линии меланомы после 48-часовой инкубации с CQ (20 μ M) и/или LY (5 μ M). **Б.** Сокультивирование клеточных линий Mel MTP, Mel Z и Mel IL с 100 μ M TMZ и 20 μ M CQ или 5 μ M LY приводило к повышенной цитотоксичности TMZ ($p < 0.05$).

Таким образом, повышенная цитотоксичность комбинации TMZ с CQ и LY не коррелировала с наличием активирующих мутаций *BRAF* и уровнем аутофагии. Поскольку эффект при комбинированном использовании был схож для всех клеточных линий, дальнейшие эксперименты были проведены на 3 линиях с онкогенным и диким типом *BRAF* — Mel MTP (wt), Mel IL (v600k) и Mel Z (v600e).

Меланомные клетки культивировали в присутствии TMZ с/без CQ или LY в течение 24 часов в ряде экспериментов на колониеобразование. Применение TMZ в монорежиме не влияло на количество колоний Mel IL. Комбинация TMZ+LY снижала на 10% количество колоний относительно контроля, а TMZ+CQ — на 25% ($p = 0.05$). Количество колоний Mel Z снижалось на 30% при применении TMZ, добавление LY не оказывало действия на формирование колоний клетками. Комбинация TMZ и CQ снижала количество колоний на ~ 60% по сравнению с контролем ($p < 0.05$) (рисунок 3). Следует отметить, что под действием как TMZ, так и его комбинаций с CQ/ LY клетки Mel MTP не образовывали колоний.

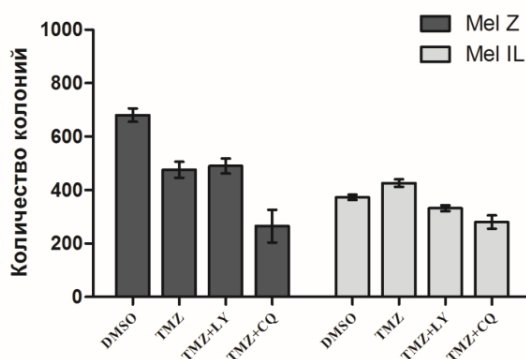


Рисунок 3 – Влияние TMZ и его комбинации с LY или CQ на образование колоний клетками меланомы.

Влияние ЭПР-стресса на цитотоксичность TMZ и его комбинации с ингибитором аутофагии CQ

Чтобы лучше понять механизм, лежащий в основе синергетической цитотоксичности TMZ и CQ в наших клетках, мы трансфецировали клетки Mel Z, Mel IL и Mel MTP с помощью малых интерферирующих (ми)РНК к GRP78 (siGRP78) либо контрольным вектором (siCTRL). Эффективность трансфекции представлена на рисунке 4. Все исследованные клеточные линии с различным базальным уровнем аутофагии экспрессировали GRP78. При этом TMZ индуцировал повышение уровня белка GRP78. Обработка клеток, трансфицированных siGRP78, TMZ приводила к усилению цитотоксичности только в клеточной линии Mel MTP с высокой базальной аутофагией.

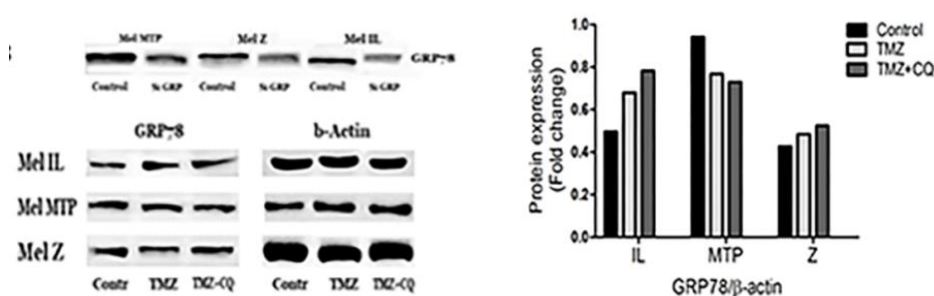


Рисунок 4 – Оценка эффективности трансфекции клеточных линий меланомы с 30 нМ миРНК к GRP78 (siGRP78) или контрольным вектором (siCTRL)

Далее мы определили цитотоксический эффект TMZ на клеточных линиях меланомы с нокдауном GRP78 методом МТТ. Нокдаун GRP78 усиливал цитотоксическое действие TMZ в монорежиме в клетках Mel MTP с высоким базальным уровнем аутофагии, но не наблюдалось ингибирующего действия в Mel IL по сравнению с контрольными клетками и, что удивительно, подавление GRP78 снижало токсичность TMZ в клетках Mel Z. Более того, подавление GRP78-зависимой аутофагии снижало цитотоксическое действие CQ в клеточных линиях Mel Z и Mel IL, но индуцировало антипролиферативный эффект в Mel MTP (рисунок 5).

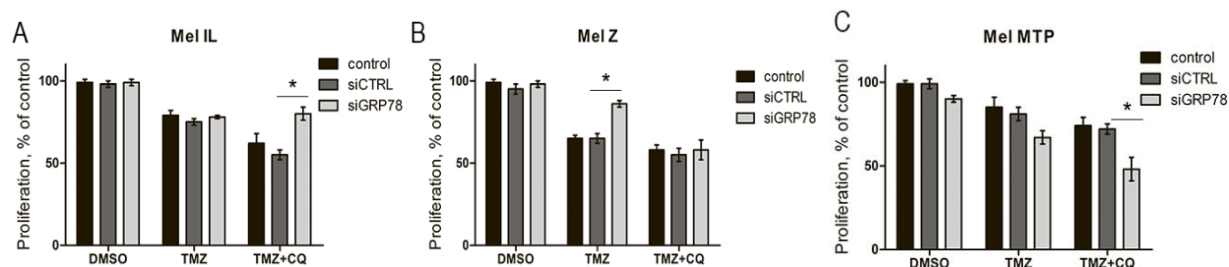


Рисунок 5 – Влияние подавления экспрессии GRP78 на антипролиферативный эффект комбинации TMZ (100 мМ) и CQ (20мМ). Жизнеспособность клеток под действием TMZ и CQ была изучена в Mel IL, Mel Z и Mel MTP клеточных линиях методом МТТ. Контрольные клетки инкубировали с эквимоллярным количеством ДМСО ($p < 0.05$).

После трансфекции клетки культивировали в присутствии TMZ, или TMZ с CQ, или оставляли интактными в течение 24 часов в ряде экспериментов на способность клеток к колониобразованию.

В клетках Mel IL и Mel Z нокдаун GRP78 усиливал цитотоксические эффекты TMZ, дополнительно снижая количество образовавшихся колоний на ~ 20%. Обработка siGRP78-трансфицированных клеток меланомы 100 μ M TMZ и 20 μ M CQ снижала количество колоний на ~ 70% в клетках Mel Z, но не влияла на Mel IL. Клетки Mel MTP не образовывали колоний при трансфекции siGRP78 (Рисунок 6).

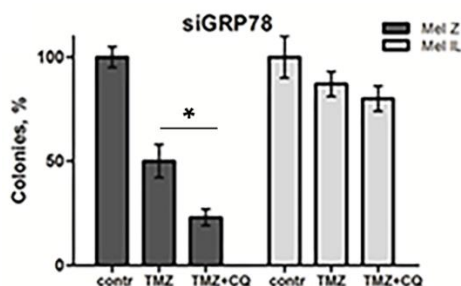


Рисунок 6 – Влияние CQ на цитотоксичность TMZ в ряде экспериментов на способность клеток к колониобразованию после трансфекции клеточных линий миРНК к GRP78, * < 0.05 .

Таким образом, TMZ приводил к снижению количество колоний, образованных при обработке TMZ, а комбинация TMZ с CQ усиливала цитотоксические эффекты TMZ. Нокдаун GRP78 потенцировал цитотоксическое действие TMZ, а, следовательно, GRP78-зависимая аутофагия ограничивала цитотоксичность TMZ.

Влияние комбинированного действия TMZ с ингибиторами аутофагии на клеточный цикл

Мы исследовали влияние комбинации TMZ и ингибиторов аутофагии на распределение клеток по фазам клеточного цикла. В монорежиме CQ снижал G2/M фазу. Однако, этот эффект был наиболее значимым в линиях с мутантным геном *BRAF*. LY в монорежиме приводил к снижению S-фазы. На рисунке 7 представлены результаты исследования двух клеточных линий A375 (*BRAF*^{v600}) и MeWo (*BRAF*^{wt}).

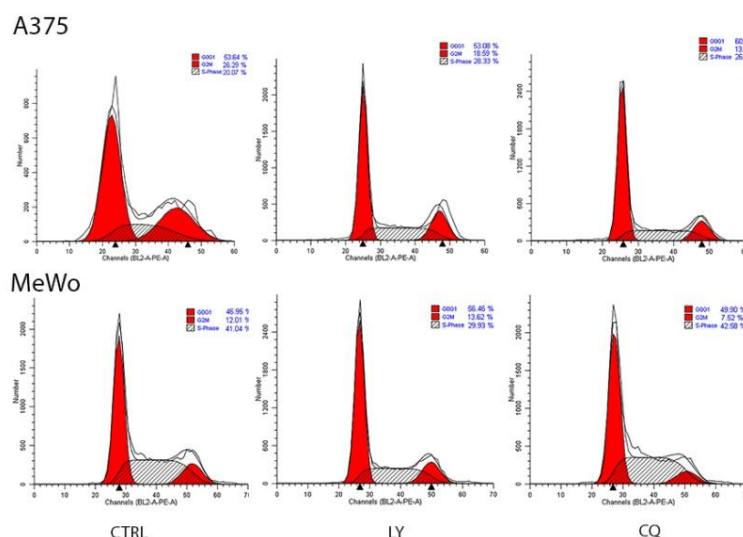


Рисунок 7 – Влияние ингибиторов LY и CQ на распределение клеток A375 и MeWo по фазам клеточного цикла.

Обработка клеток 100 μ M TMZ увеличивала популяцию клеток в фазе G1 в клетках с мутацией *BRAF*^{v600} — Mel Z и Mel IL, но не в *BRAF*^{wt} Mel MTP. Комбинация TMZ и CQ снижала популяцию клеток в фазе G2/M во всех клеточных линиях. Популяция G1 увеличивалась под действием TMZ и CQ по сравнению с TMZ только в *BRAF*-мутированных клетках: 56,4% против 78,8% в Mel IL, 54,9% против 71,4% в Mel Z. Комбинация TMZ и LY приводила к более значительному накоплению клеток в фазе G1 в клеточных линиях Mel IL (56,4% против 85,23%) и Mel Z (54,9% против 74%) по сравнению с TMZ. Комбинация TMZ с ингибиторами аутофагии не влияла на клеточный цикл Mel MTP (рисунок 8).

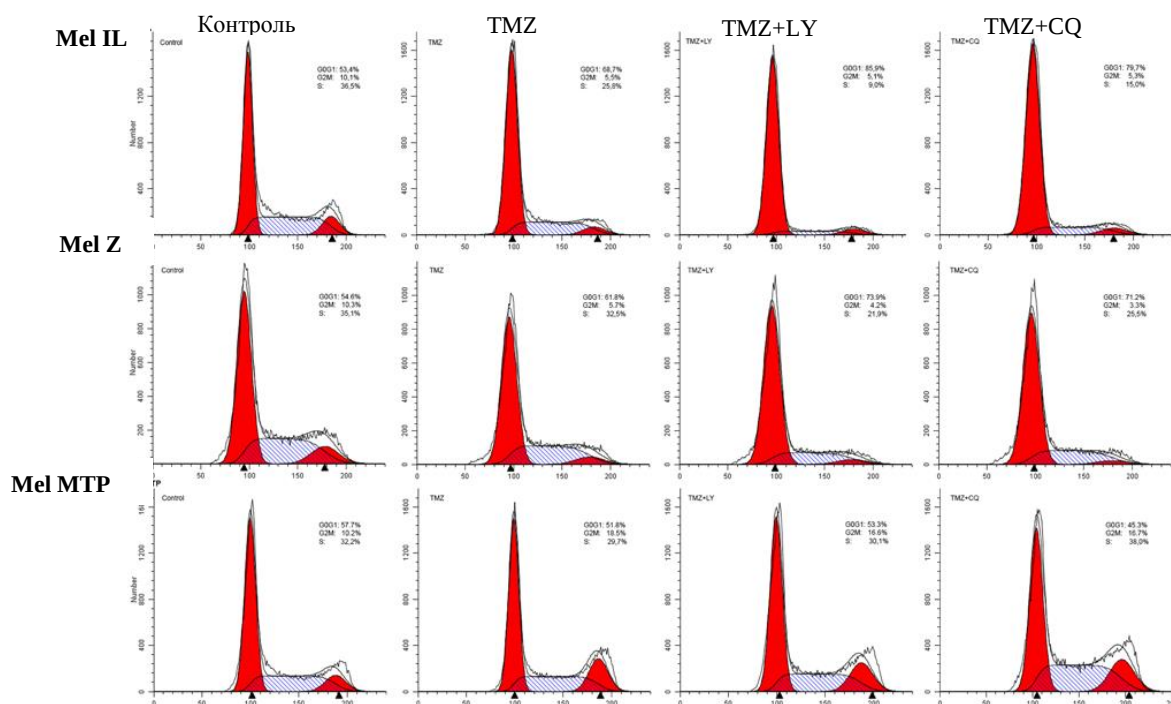


Рисунок 8 — Влияние комбинации TMZ и ингибиторов LY и CQ на распределение клеток по фазам клеточного цикла.

Трансфекция siGRP78 приводила к увеличению накопления клеток в фазе G1 по сравнению с контрольными клетками при обработке TMZ (49% против 73% для Mel IL и 67% против 87% для Mel Z). Однако CQ не влиял на распределение клеток по фазам клеточного цикла при подавлении GRP78 (рисунок 9). Интересно, что линия Mel MTP, характеризующаяся высоким уровнем аутофагии, не была чувствительной к siGRP78, но комбинация с CQ увеличивалась количество клеток в фазе G1, что не наблюдалось в siCTRL клетках (рисунок 9).

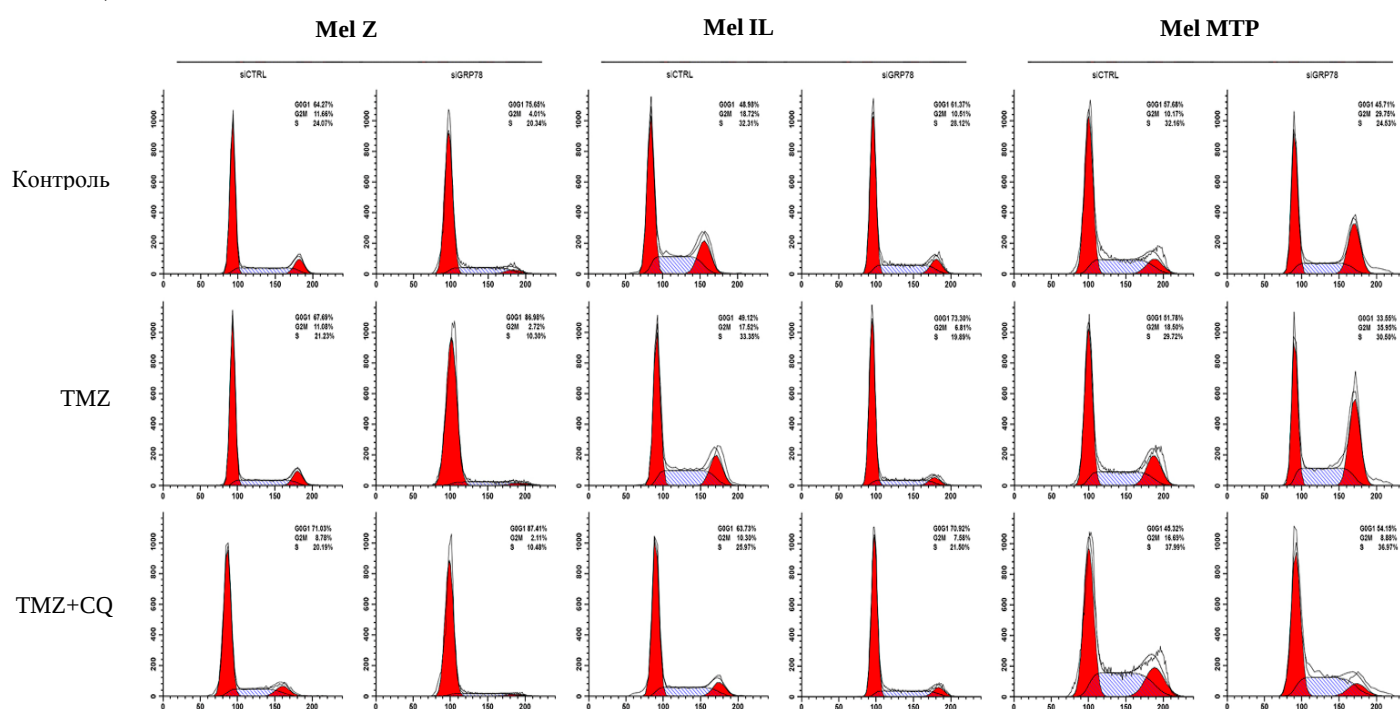


Рисунок 9 – Влияние подавление экспрессии GRP78 на распределение клеток по фазам клеточного цикла (CV < 5%).

Механизмы гибели клеток меланомы человека под действием TMZ и его комбинаций с ингибиторами аутофагии

Изучение апоптотической гибели клеток меланомы человека под действием TMZ и CQ или LY. Для изучения влияния комбинации препаратов на апоптоз мы окрашивали клетки меланомы с помощью аннексина V-ФИТЦ/пропидия йодида и анализировали на проточном цитометре. Уровень апоптотических клеток (ранний + поздний апоптоз) в случае применения TMZ или его комбинаций с CQ или LY представлен в таблице 3.

Таблица 3 — Апоптотическая активность 100 μ M TMZ и/или ингибиторов аутофагии на клеточных линиях меланомы. Окраска аннексином V/PI после 24-часовой инкубации с препаратами. CV < 5%, * p<0.05

Клеточная линия	Количество апоптотических клеток, %		
	Mel Z	Mel IL	Mel MTP
TMZ	12,6*	9*	24*

LY	4.5	1.5	14.5
CQ	8.3	5.3	15.5
TMZ+LY	20.1*	14.2*	39.3*
TMZ+CQ	27.6*	28.3*	39.5*

Таким образом, мы пришли к выводу, что комбинированный эффект TMZ и CQ опосредуется увеличением апоптоза в клетках меланомы. Однако усиление апоптоза комбинацией TMZ и CQ не зависит от мутаций в гене *BRAF*.

Исследование аутофагии в клетках меланомы при комбинации TMZ с CQ/LY. Мы изучили влияние комбинации TMZ с CQ или LY на активацию аутофагии в клеточных линиях меланомы по уровню экспрессии мРНК Beclin 1, LC3B и p62. TMZ является индуктором аутофагии, что было подтверждено увеличением уровня экспрессии мРНК Beclin 1 в клетках меланомы, а добавление ингибиторов аутофагии напротив уменьшало уровень Beclin 1. Течение процесса аутофагии в клетках можно изучать путем соотношения уровня мРНК LC3BI/II и p62/SQSTM1: при повышении уровня LC3BI/II снижается содержание p62/SQSTM1 в клетках (Klionsky D.J et al., 2016).

Мы продемонстрировали, что под действием TMZ уровень экспрессии мРНК LC3BI/II был увеличен в клеточных линиях Mel IL и Mel Z, но не в MTP, а транскрипционная активность p62/SQSTM1 была снижена (рисунок 10). При добавлении CQ или LY отмечали повышение уровня транскрипционной активности p62/SQSTM1 одновременно со снижением экспрессии LC3BI/II, что доказывает подавление аутофагии в клетках.

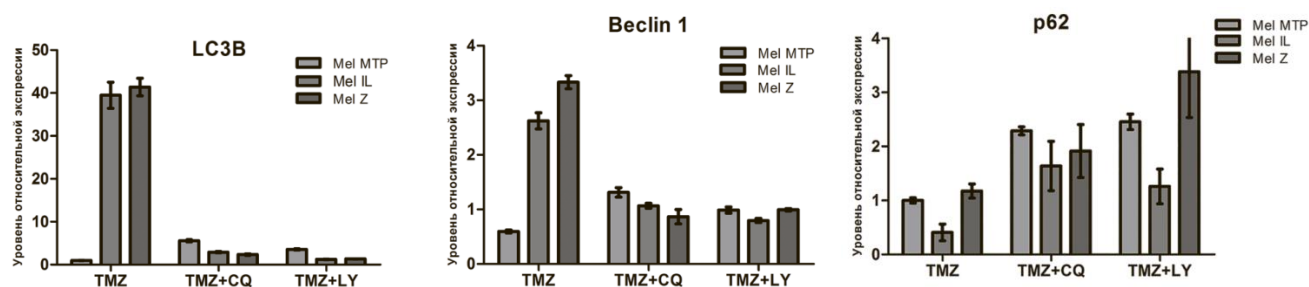


Рисунок 10 – Изменение экспрессии мРНК генов Beclin 1, LC3B и p62/SQSTM1 после культивации с TMZ (100 μ M) с/без CQ (20 μ M) или LY (5 μ M).

Оценивая переход LC3B-I в LC3B-II методом иммуноблоттинга (рисунок 11), мы показали, что монотерапия TMZ приводила к накоплению LC3BI/II в 3 исследуемых клеточных линиях, а его комбинация с CQ увеличивала экспрессию белка LC3BI/II, блокируя расщепление аутолизосом. Добавление LY к TMZ не показывало аналогичных результатов на уровень

LC3BI/II в клетках. При этом экспрессия p62/SQSTM1 при комбинированной терапии TMZ и CQ повышался только у линий Mel MTP и Mel IL.

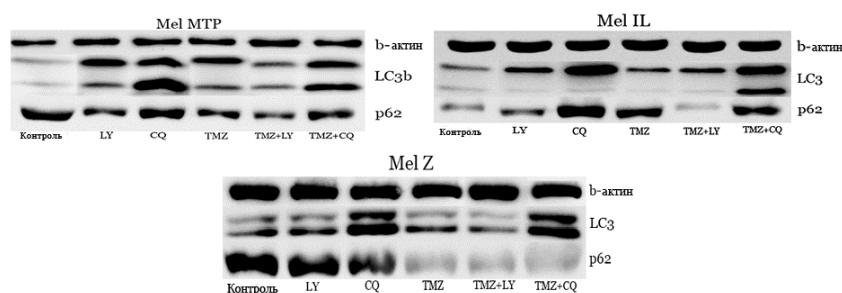


Рисунок 11 – Иммуноблоттинг экспрессии LC3BI/II и p62/SQSTM1 после комбинированной терапии TMZ и CQ или LY на клеточных линиях меланомы

Для мониторинга аутофагии мы также проанализировали совместную локализацию LC3BII с лизосомами и эффект ингибирования аутофагии под действием CQ или LY в течение 1, 4 и 24 часов. Мы окрашивали клетки LC3B с одновременной обработкой трекером лизосом (LTR). Совместная колокализация пунктата LC3B с точечной флуоресценцией LTR подсчитывалась как образование аутолизосомы. В необработанных клетках пунктат LC3B был диффузным. Обработка TMZ увеличивала интенсивность флуоресценции LC3B и колокализацию аутофагосом с лизосомами в клетках меланомы. Данная колокализация нарастала во времени. Добавление LY и CQ приводило к снижению интенсивности флуоресценции LC3B по сравнению только с обработкой TMZ в Mel IL и Mel Z, но не в Mel MTP (рисунок 12).

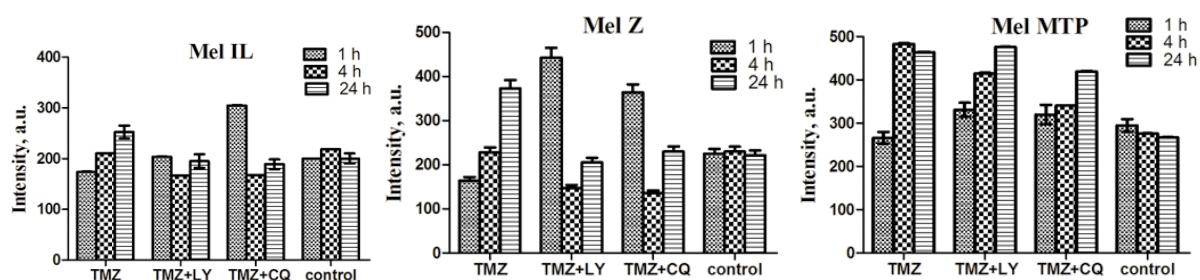


Рисунок 12 – Изучение эффективности комбинированного действия TMZ и CQ или LY в зависимости от уровня аутофагии в клеточных линиях Mel Z, Mel IL, Mel MTP. Колокализация LTR (50нМ) и LC3B оценивалась путем подсчета интенсивности флуоресценции маркера LC3B на лизосомах.

Изучение апоптотической гибели клеток меланомы человека при ЭПР-стрессе. Мы исследовали активацию каспазы 7 методом проточной цитометрии в клеточных линиях меланомы. Было обнаружено, что в линии Mel Z апоптоз не активируется через каспазный путь. Однако активация каспазы 7 происходила при культивации с препаратами в клетках, трансфицированных siGRP78. В клеточных линиях со средним (Mel IL) и высоким (Mel MTP)

базальным уровнем аутофагии мы наблюдали активацию каспазы 7 при обработке TMZ, а ее комбинации с CQ дополнительно усиливали активацию маркеров апоптоза. Подавление GRP78 приводило к более явной активации каспазы 7 в клетках Mel IL и Mel MTP по сравнению с контролем. Однако подавление GRP78 усиливало апоптоз только в клеточной линии Mel MTP (до 96%). Таким образом, клетки с изначально высокой аутофагией более чувствительны к ее ингибированию (рисунок 13).

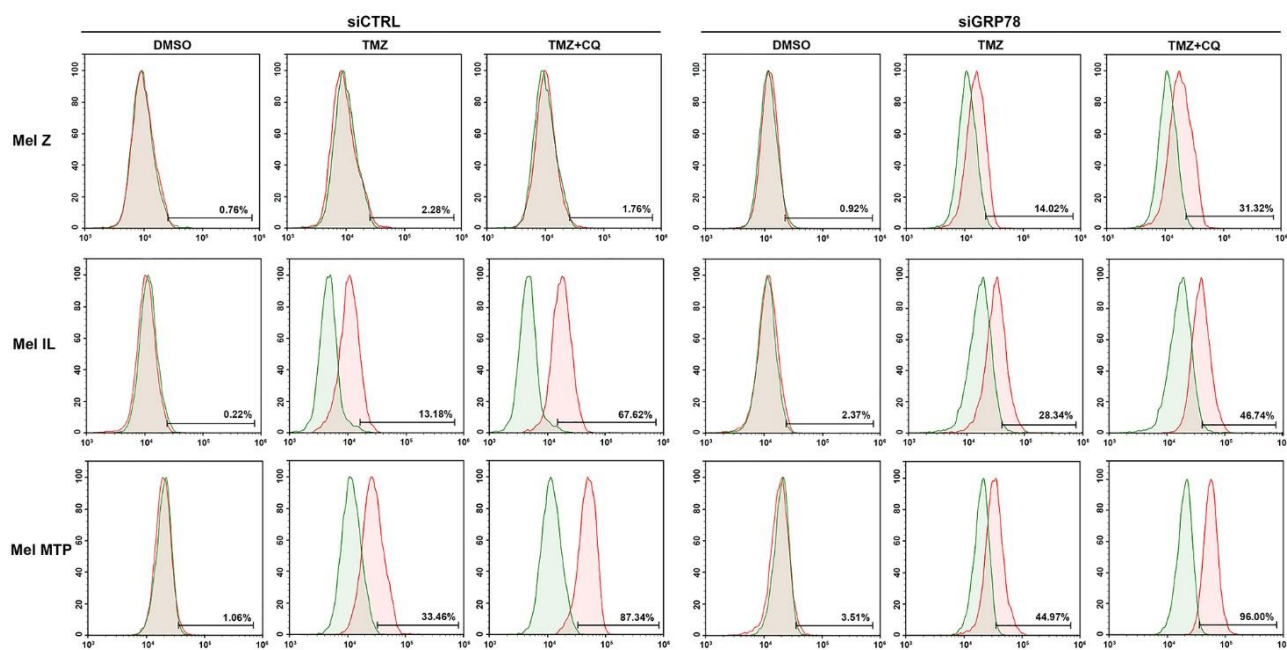


Рисунок 13 – Зависимость количества апоптотических клеток под действием комбинации TMZ и CQ от уровня аутофагии в клетках меланомы ($p < 0.05$).

При изучении GRP78-зависимой аутофагии, мы обнаружили, что инактивация GRP78 снижает способность TMZ и комбинации TMZ с CQ преобразовывать LC3BI в LC3BII, особенно в клетках Mel MTP. Более того, в GRP78-трансфицированных клетках p62 не деградировал в аутолизосоме по сравнению с контрольными клетками. Интересно, что в клеточной линии Mel IL экспрессия Beclin 1 была снижена в siGRP78 клетках, но была повышена в клетках Mel MTP. Таким образом, GRP78 играет значительную роль в TMZ-зависимой аутофагии (рисунок 14).

В монорежиме TMZ повышал уровни маркеров апоптоза каспазы 7 и cPARP во всех клеточных линиях. Подавление GRP78 также приводило к индукции каспазы 7 и вызывало повышение уровня cPARP при комбинированной обработке TMZ и CQ в клетках Mel MTP по сравнению с контрольными клетками, но не было различий в клетках Mel IL и Mel Z (рисунок 14). Таким образом, мы предполагаем, что комбинированный эффект TMZ и CQ опосредован усиленным апоптозом.

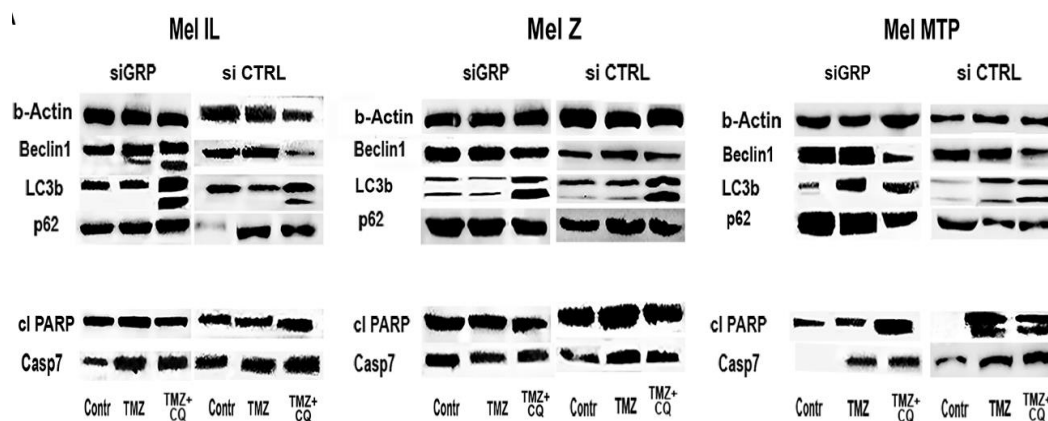


Рисунок 14 – Влияние подавления GRP78-зависимой аутофагии на каспаза 7-опосредованный апоптоз в клеточных линиях меланомы

Исследование аутофагии в клетках меланомы при ЭПР-стрессе. Для доказательства того, что TMZ индуцирует аутофагию и не блокирует клиренс аутолизосом, клетки трансфицировали тандемными сенсорами Premo® RFP-GFP-LC3 и Premo® RFP-p62. Клетки обрабатывали 100 μ M TMZ и 20 μ M CQ в течение 24 часов, в контрольные клетки добавляли эквимоллярное количество ДМСО. В отсутствие какой-либо обработки распределение в клетках LC3⁺-пунктата было диффузным. Добавление TMZ активировало аутофагию, что доказывалось увеличением количества аутофагосом и их функциональным слиянием с лизосомами за счет рекрутирования GFP-LC3 при аутофагии. TMZ в сочетании с CQ увеличивал количество аутофагических вакуолей по сравнению с монорежимом TMZ, отражающую нарушение функций лизосом, а также блокаду дистальной аутофагии, приводящую к сохранению зеленой и красной флуоресценции. При добавлении TMZ, количество p62⁺-пунктата уменьшалось, а ингибирование аутофагии приводило к накоплению p62⁺ пузырьков. В трансфицированных с миРНК к GRP78 клетках мы обнаружили нарушение аутофагического потока, и меньшее количество p62-позитивных клеток, при этом комбинированная терапия не оказала эффекта на распределение p62-пунктата.

Изучение взаимосвязи аутофагии и ЭМП в клеточных линиях меланомы

Влияние аутофагии на маркеры ЭМП. Мы изучили базальную экспрессию E-cadherin, N-cadherin, β -catenin, Vimentin, MMP2 и MMP9 в 6 клеточных линиях меланомы A375, Mel Z, Mel IL, несущих мутации в гене *BRAF*, и линиях с диким типом *BRAF* – MeWo, Mel MTP и Mel Me. Хотя клетки меланомы происходят не из эпителиальных клеток, а из меланоцитов, в литературе накапливаются сообщения о переключении фенотипа клеток меланомы, сходной с программой ЭМП (EMT-like). Установлено, что все клеточные линии отличаются высоким базальным

уровнем маркеров мезенхимальности: виментина, N-кадгерина и MMP2 по сравнению с эпителиальным маркером E-кадхерином (Рисунок 15).

Таким образом, на уровне базальной экспрессии прямой корреляции между уровнем аутофагии и ЭМП не отмечено.

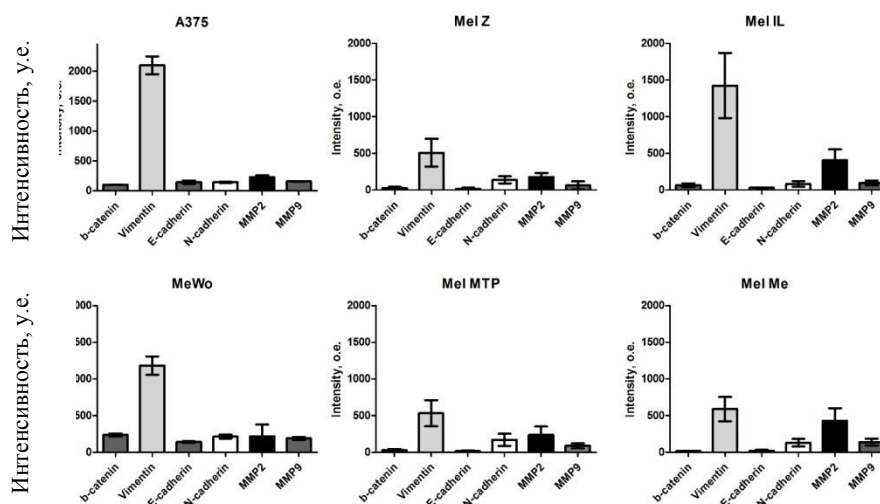


Рисунок 15 – Иммуноцитохимическое исследование экспрессии маркеров ЭМП в клеточных линиях меланомы. у.е. – условные единицы

Для дальнейших экспериментов по изучению взаимосвязи ЭМП и аутофагии были выбраны 2 клеточные линии A375 и MeWo.

Влияние ингибиторов аутофагии на инвазивную способность клеток меланомы. Оценка влияния ингибиторов аутофагии на инвазивную активность клеток меланомы была изучена в экспериментах по миграции «в рану». Клетки высаживались в субконфлюэнтной плотности, через 24 часа чертили «рану» и добавляли LY, CQ или проводили трансфекцию 30 nM siGRP78, siATG5 или siCTRL. Далее визуализировали зарастание раны в присутствии препаратов под световым микроскопом в 5 полях (Рисунок 16). В качестве отрицательного контроля зарастания «раны» использовали среду без содержания сыворотки (SF).

Снижение инвазии под действием LY и CQ относительно контроля отмечалось в обеих клеточных линиях и не превышало 15%. Хотя LY менее значимо подавлял миграцию клеток A375. Ингибирование аутофагии посредством подавления экспрессии мРНК ATG5 и GRP78 снижало миграцию лишь у клеток MeWo (40% зарастания «раны»), но не A375 (85% зарастание «раны»). Это может быть объяснено более агрессивным фенотипом клеток A375 и, как следствие, повышенной подвижностью.

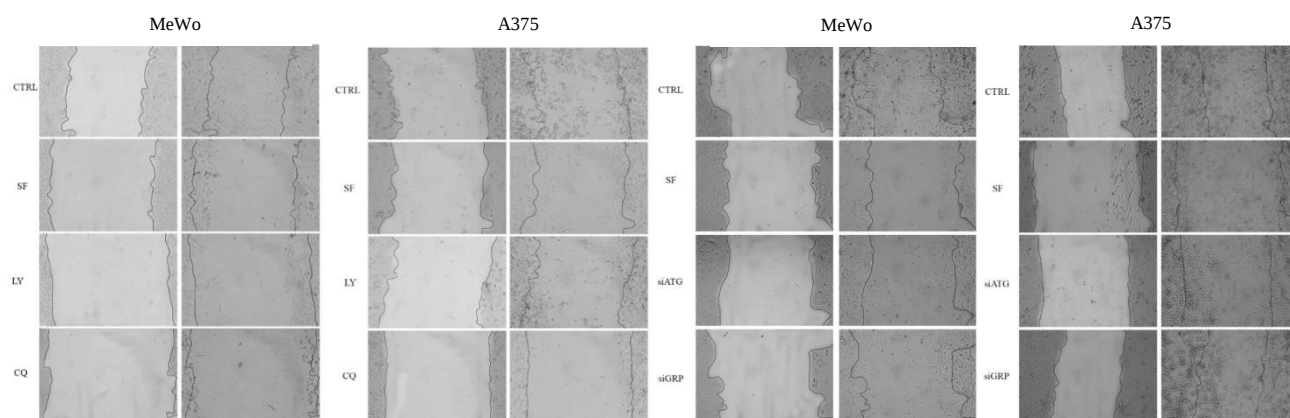


Рисунок 16 – Инвазивная способность клеточных линий MeWo и A375 в «ранозаживляющем» тесте после инкубации с LY (10 μ M), CQ (20 μ M), или трансфекции клеток миРНК к GRP78 и ATG5, или бессывороточной средой (SF). Зарастание «раны» визуализировали в 5 различных полях ($\times 20$) под световым микроскопом.

Мы изучили инвазивную способность клеточных линий Mel IL, Mel Z и Mel MTP после инкубации с TMZ, LY и CQ или их комбинацией. TMZ и ингибиторы аутофагии более значимо снижали миграционную способность BRAF^{v600} клеток Mel IL по сравнению с BRAF^{wt} Mel MTP. Таким образом, комбинация TMZ с LY или CQ уменьшала миграцию всех изученных клеточных линий, а BRAF-мутированные клетки в большей степени нуждаются в аутофагии для миграции и инвазии (рисунок 17).

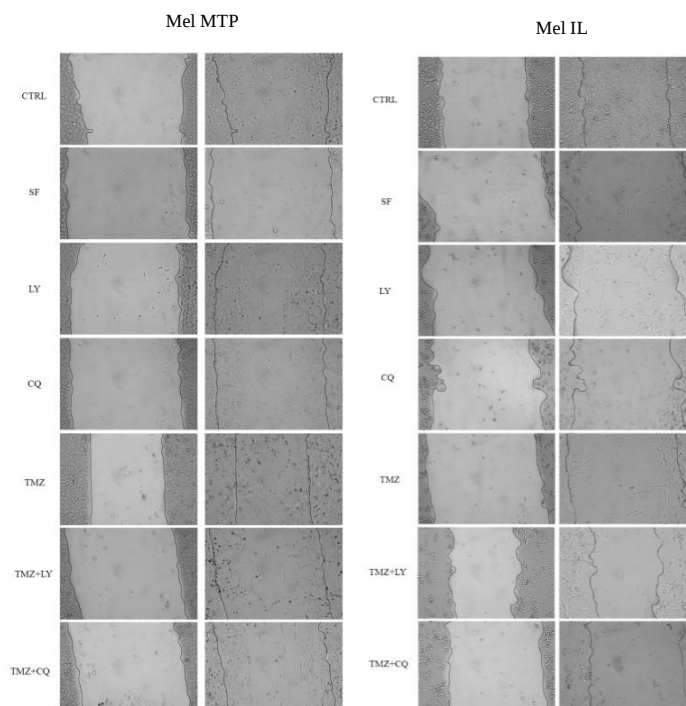


Рисунок 17 – Инвазивная способность клеточных линий Mel MTP и Mel IL в «ранозаживляющем» тесте после инкубации с TMZ (100 μ M) и/или ингибиторами аутофагии LY (10 μ M), CQ (20 μ M) или бессывороточной средой (SF). Зарастание «раны» визуализировали ежедневно в 5 различных полях ($\times 20$) под световым микроскопом.

Изучение экспрессии маркеров ЭМП под действием ингибиторов аутофагии. Для оценки степени участия аутофагии в ЭМП мы исследовали экспрессию E-cadherin, N-cadherin, β -catenin, Vimentin, MMP2, ZEB1, SNAIL, TWIST, LC3BI/II, p62/SQSTM1, Beclin 1 и ATG5 под действием ингибиторов аутофагии LY и CQ в течение 24 и 48 часов или при трансфекции клеток миРНК к ATG5. В клетках A375 оба изученных ингибитора снижали экспрессию маркеров мезенхимальности vimentin, MMP2 и транскрипционных факторов ZEB1, SNAIL и TWIST. Отмечалось повышение уровня N-cadherin в присутствии ингибиторов в течение 48 часов. Изучение маркеров аутофагии показало, что Beclin 1 не вовлечен в процесс ЭМП и действие ингибиторов. Присутствие CQ приводило к нарушению слияния аутофагосомы с лизосомой, что подтверждается увеличенным накоплением LC3BII и повышенным уровнем p62/SQSTM1 в клетках A375. Уровень ATG5 также не изменялся. Не отмечено влияния LY на маркеры аутофагии. Схожая картина наблюдалась и в линии меланомы MeWo с диким типом гена *BRAF*. Однако отмечалось подавление Beclin 1 и ATG5 после 48-часовой инкубации с ингибиторами аутофагии. Таким образом, наши результаты показывают, что оба ингибитора аутофагии LY и CQ вовлечены в подавление ЭМП, однако, имеют разные механизмы действия.

Подавление аутофагии посредством миРНК к ATG5 приводило к увеличению экспрессии LC3BI (при отсутствии экспрессии LC3BII) и p62/SQSTM1, а также E-cadherin ZEB1, SNAIL. Подавление Vimentin отмечалось только в BRAF-мутированной линии A375. Однако уровень N-cadherin оставался неизменным (рисунок 18).

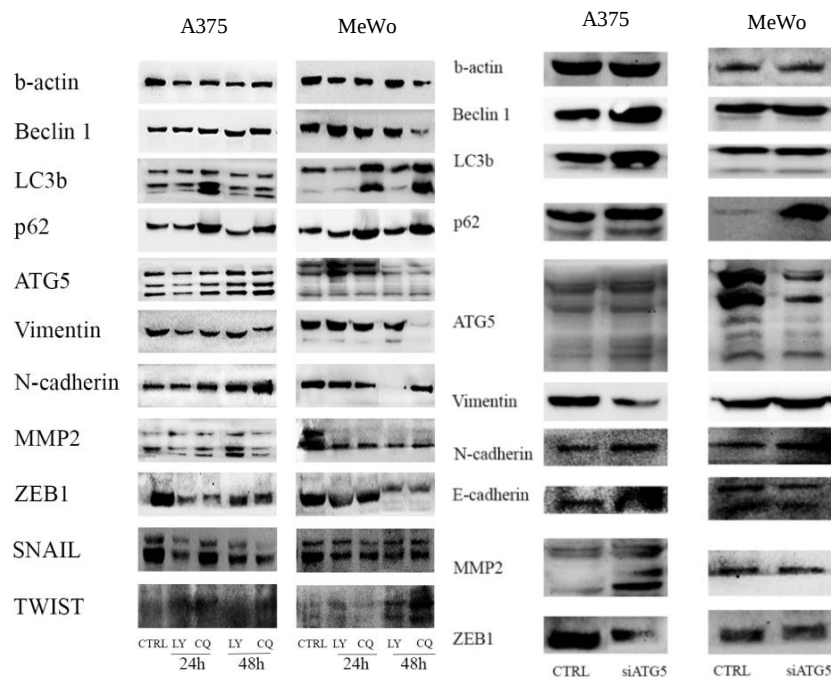


Рисунок 18 –Анализ экспрессии Beclin 1, LC3BI/II, p62/SQSTM1, ATG5, Vimentin, N-cadherin, MMP2 и ZEB1 при ингибировании аутофагии в клеточных линиях меланомы A375 и MeWo. Экспрессию каждого маркера определяли по отношению к β -actin в качестве референсного контроля

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Метастатическая меланома является одним из наиболее агрессивно протекающих злокачественных новообразований, поэтому поиск новых противоопухолевых агентов, а также клинически значимых биомаркеров для предсказания опухолевой прогрессии является крайне важным. В последнее время активно изучается процесс аутофагии в опухолевых клетках и возможности его использования в качестве нового таргета при лечении опухолей.

Целью настоящей работы было исследование значения аутофагии в механизмах роста, прогрессии и химиорезистентности клеточных линий меланомы кожи человека. Нами изучено влияние активирующих мутаций в гене *BRAF* на способность клеток меланомы к аутофагии. В результате было выявлено, что клеточные линии имели разный уровень аутофагии: клетки с мутацией гена *BRAF* имели более высокий базальный уровень аутофагии по сравнению с клетками *BRAF* дикого типа. Мы показали, что использование ингибиторов аутофагии позволяет усиливать цитотоксичность TMZ. При этом клеточные линии с исходно более высоким уровнем аутофагии были более чувствительны к ее инактивации и лучше отвечали на химиотерапию TMZ. Ингибиторы аутофагии также снижали количество колоний во всех изученных линиях, при этом оба ингибитора аутофагии LY и CQ увеличивали накопление популяции клеток в стадии G0/G1 в линиях Mel Z, Mel IL, но не Mel MTP. Мы показали, что инактивация белка GRP78 (активатора ЭПР-стресса) приводит к повышению чувствительности к терапии путем ингибирования аутофагии, активации каспаз-зависимого апоптоза и ареста клеточного цикла. При этом клеточные линии меланомы с высоким базальным уровнем аутофагии оказались более чувствительными к инактивации белка GRP78 по сравнению с клетками с низким и средним базальным уровнем аутофагии.

Нами получены данные по экспрессии маркеров ЭМП в клеточных линиях меланомы. В изученных клеточных линиях отмечена повышенная экспрессия мезенхимальных маркеров Vimentin и MMP2 при сниженной экспрессии E-cadherin. В рамках изучения взаимодействия аутофагии и ЭМП получены данные по влиянию ингибиторов аутофагии LY и CQ на снижение инвазии, миграционной способности и колониобразования клетками меланомы. Показано, что ингибиторы аутофагии влияют на экспрессию маркеров ЭМП.

В целом, в результате выполнения настоящего исследования впервые показано, что использование ингибиторов аутофагии может рассматриваться как перспективный подход в терапии меланомы и служить маркером предсказания опухолевой прогрессии

ВЫВОДЫ

1. Исследованные различия в активации аутофагии по экспрессии белка Beclin1 в клеточных линиях меланомы человека с нормальным и мутированным геном *BRAF* выявили, что средний уровень экспрессии Beclin1 составил $0,42 \pm 0,28$ о.е. в *BRAF*^{wt} и $0,65 \pm 0,32$ о.е. в *BRAF*^{v600} клетках ($p=0,66$). В условиях недостатка питательных веществ уровень аутофагии практически не изменялся в *BRAF*^{v600} клетках, тогда как в *BRAF*^{wt} клетках происходила индукция аутофагии;
2. Ингибиторы аутофагии хлорокин (CQ) и LY-294.002 (LY) при низких концентрациях повышали чувствительность клеток меланомы к темозоломиду (TMZ). CQ и LY снижали TMZ-индуцированную аутофагию, тем самым усиливая ингибирующее действие на клеточные линии меланомы. TMZ в сочетании с CQ или LY синергически ингибировал рост за счет ареста клеточного цикла и индукции апоптоза.
3. GRP78-зависимая аутофагия ограничивала цитотоксичность TMZ. Ингибирование аутофагии за счет подавления ЭПР-стресса способствовала преодолению устойчивости к терапии TMZ в клетках меланомы с высоким базальным уровнем аутофагии.
4. Все изученные клеточные линии отличались высоким базальным уровнем маркеров мезенхимальности vimentin, N-cadherin и MMP2 и транскрипционных факторов ZEB1, SNAIL, TWIST по сравнению с эпителиальным маркером E-cadherin. Прямой корреляции между уровнем аутофагии и ЭМП на уровне базальной экспрессии не отмечено.
5. Оба изученных ингибитора аутофагии, LY и CQ, снижали экспрессию маркеров мезенхимальности N-cadherin, Vimentin, MMP2 и транскрипционных факторов ZEB1, SNAIL, TWIST в двух изученных клеточных линиях меланомы. Однако степень влияния ингибиторов аутофагии была ассоциирована со статусом гена *BRAF*. Таким образом, полученные данные показывают, что ингибиторы аутофагии вовлечены в подавление ЭМП.
6. Ингибиторы аутофагии более значимо снижали миграционную способность *BRAF*-мутированных клеток по сравнению с клетками, имеющими дикий тип *BRAF*. Следует предположить, что *BRAF*-мутированные клетки в большей степени нуждаются в аутофагии для осуществления миграции и инвазии.
7. Ингибирование аутофагии можно рассматривать как перспективный подход для повышения эффективности терапии TMZ в клетках с онкогенными мутациями *BRAF*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Рябая, О.О. Влияние активирующих мутаций V600 гена B-RAF на способность клеток меланомы к аутофагии / О.О. Рябая, И.В. Цыганова, Т.А. Сидорова, О.С. Бурова, Е.В. Степанова // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2013. – № 3. – С. 68-72.

2. Рябая, О.О. Модуляция аутофагии влияет на цитотоксичность паклитаксела клеточных линиях меланомы человека in / О.О. Рябая, А.Н. Иншаков, Т.А. Сидорова, Э.Ш. Соломко, Е.В. Степанова // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13. – № 4. – С. 17-22.
3. Рябая, О.О. Роль аутофагии в механизме гибели опухолевых клеток / О.О. Рябая, А. В. Егорова, Е. В. Степанова // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135. – № 2. – С. 177-188.
4. Ryabaya, O.O. Autophagy inhibitors chloroquine and LY294002 enhance temozolomide cytotoxicity on cutaneous melanoma cell lines in vitro / O.O. Ryabaya, A.N. Inshakov, A.V. Egorova, M.A. Emelyanova, T.V. Nasedkina, A.S. Zasedatelev, D.A. Khochenkov, E.V. Stepanova // Anticancer Drugs. – 2017. – Vol. 28. – № 3. – С. 307-315.
5. Рябая, О.О. Роль ингибирования аутофагии в изменении цитотоксичности темозоломида на клеточных линиях меланомы / О.О. Рябая, А.Н. Иншаков, А.А. Малышева, И.С. Абрамов, Н.В. Шолина, Д.А. Хоченков, Е.В. Степанова // Успехи молекулярной онкологии. – 2017. – Т 4. – №3. – С. 75-82.
6. Ryabaya, O. Detection of BRAF, NRAS, KIT, GNAQ, GNA11 and MAP2K1/2 mutations in Russian melanoma patients using LNA PCR clamp and biochip analysis / O. Ryabaya, M. Emelyanova, L. Ghukasyan, I. Abramov, E. Stepanova, A. Kudryavtseva, A. Sadritdinova, C. Dzhumakova, T. Belysheva, S. Surzhikov, L. Lyubchenko, A. Zasedatelev, T. Nasedkina // Oncotarget. – 2017 – Vol. 8. – №32. – С. 52304–52320.
7. Рябая, О.О. Преодоление резистентности клеточных линий меланомы к таргетным ингибиторам В-RAF за счет инактивации рецепторных тирозинкиназ / О.О. Рябая, А.А. Малышева, Ю.А. Хоченкова, Э.Ш. Соломко, Д.А. Хоченков // Молекулярная биология – 2018. – Т. 52. – №3. – С. 466-473.
8. Ryabaya, O. Inhibition of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy sensitizes melanoma cells to temozolomide treatment / O. Ryabaya. A. Prokofieva, D. Khochenkov, I. Abramov, A. Zasedatelev, E. Stepanova // Oncology Reports. – 2018 – №40. – С. 385-394.
9. Рябая, О.О. Роль эпителиально-мезенхимального перехода и аутофагии в противоопухолевом ответе клеточных линий меланомы на таргетное ингибирование MEK и mTOR киназ. / О.О. Рябая, А.А. Прокофьева, Д.А. Хоченков, Р.А. Акасов, С.В. Буров, Е.А. Марквичева, Е.В. Степанова // Сибирский онкологический журнал. – 2019 – Т. 18. – №3 – С. 54–63.