

**Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии  
имени Н.Н. Блохина»  
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

*На правах рукописи*

**ПОНОМАРЕВ АЛЕКСАНДР ВАСИЛЬЕВИЧ**

**ВЛИЯНИЕ ДВУХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ АРАНОЗЫ НА ЗАЩИТНЫЕ  
СИСТЕМЫ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК**

14.01.12 – онкология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Научные руководители:**

доктор биологических наук

**Мисюрин Андрей Витальевич**

кандидат фармацевтических наук

**Барышникова Мария Анатольевна**

**Москва – 2019**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

|   |    |
|---|----|
| ВВЕДЕНИЕ .....  | 4  |
| Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....   | 9  |
| 1.1. Лекарственная устойчивость метастатической меланомы .....  | 9  |
| 1.1.1. Резистентность за счет выведения препаратов из клеток .....  | 10 |
| 1.1.2. Устойчивость к лекарственным средствам за счет измененной активации ферментов.....                     | 11 |
| 1.1.3. Лекарственная устойчивость, обусловленная изменениями репарации ДНК                                    | 12 |
| 1.1.4. Лекарственная устойчивость посредством модуляции апоптоза .....  | 12 |
| 1.1.5. Резистентность к ингибиторам BRAF .....  | 14 |
| 1.2. Механизмы лекарственной устойчивости к производным нитрозомочевин ..                                     | 14 |
| 1.3. Преодоление лекарственной устойчивости липосомальными противоопухолевыми препаратами .....               | 16 |
| 1.4. Сигнальные белки, участвующие в процессах клеточной гибели .....   | 21 |
| 1.4.1. P53 и MDM2.....  | 21 |
| 1.4.2. MyD88, NF-κB1, NF-κB2 .....  | 25 |
| 1.5. Блокирование PD-1 в терапии меланомы .....   | 32 |
| 1.6. Заключение .....   | 35 |
| Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....   | 36 |
| 2.1. Материалы и оборудование .....   | 36 |
| 2.2. Методы исследования.....   | 40 |
| 2.2.1. Изучение цитотоксического действия препаратов методом МТТ-тест .....                                   | 40 |
| 2.2.2. Подготовка клеточного материала и выделение общей РНК.....   | 41 |
| 2.2.3. Количественная полимеразно-цепная реакция в реальном времени и определение уровня экспрессии мРНК..... | 43 |
| 2.2.4. FISH-гибридизация .....  | 45 |
| 2.2.5. Секвенирование по Сенгеру.....   | 46 |
| 2.2.6. Реакция иммунофлуоресценции .....  | 46 |
| 2.3. Статистическая обработка результатов .....   | 46 |
| Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....   | 48 |

|   |    |
|---|----|
| 3.1. Определение ИК50 исследуемых препаратов .....  | 48 |
| 3.2. Мутационный статус TP53 в клеточных линиях метастатической меланомы человека.....  | 48 |
| 3.3. Изменение уровня экспрессии мРНК TP53 и MDM2 в клеточных линиях метастатической меланомы после воздействия лекарственных форм аранозы .....          | 55 |
| 3.4. Изменение уровня экспрессии мРНК MyD88, NFkB2 и NFkB1 в клеточных линиях метастатической меланомы после воздействия лекарственных форм аранозы ..... | 62 |
| 3.5. Изменение экспрессии PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы после воздействия лекарственных форм аранозы .....                    | 69 |
| Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ .....  | 76 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....  | 82 |
| ВЫВОДЫ .....  | 83 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....  | 84 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....  | 85 |

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы и степень ее разработанности

Метастатическая меланома является наиболее агрессивным злокачественным новообразованием кожи. Для лечения метастатической меланомы применяют химиотерапию, таргетную терапию, хирургию и иммунотерапию. Несмотря на то, что химиотерапия является признанным методом лечения метастатической меланомы, к противоопухолевым препаратам часто развивается лекарственная устойчивость, которая приводит к неэффективности терапии. Поэтому поиск способов преодоления лекарственной резистентности продолжает оставаться актуальной задачей.

В последние годы значительное развитие получила иммунотерапия опухолей. Разрешены к применению или находятся на последних фазах клинических испытаний новые иммунотерапевтические препараты для лечения меланомы, в том числе блокаторы взаимодействия молекул PD-1 с PD-L1/PD-L2 [10; 74]. Данные препараты показывают хорошие результаты по сравнению с традиционной химиотерапией опухолей [88]. Было замечено, что их эффективность зависит от наличия или отсутствия молекулы PD-L1 в опухоли [159]. Возможно, иммунологические механизмы, индуцирующие экспрессию PD-L1, могут также быть связаны с лекарственной устойчивостью к химиотерапии.

Несмотря на значительные успехи иммунотерапии, на сегодняшний день стандартным методом лечения пациентов с метастатической меланомой кожи без BRAF/cKIT-мутации остается химиотерапия [20]. Ряд исследований посвящен комбинации традиционной химиотерапии или таргетной терапии с иммунотерапией, в частности, изучается влияние химиопрепаратов на индукцию противоопухолевого иммунитета, что может помочь в выборе оптимального сочетания препаратов и в итоге улучшить клинический эффект [27; 86; 189]. В настоящее время многие комбинации иммунопрепаратов с химиопрепаратами находятся еще на доклинической стадии исследования. Часто не понятно, будет ли химиотерапия способствовать иммуногенности опухоли, или же, наоборот,

окажет иммуносупрессивный эффект, который может нивелировать положительное воздействие иммунотерапии. Для большинства таких комбинаций требуются тщательные клинические исследования [91].

К числу химиопрепаратов, применяемых для лечения метастатической меланомы, помимо производных триазина (дакарбазина), относятся и производные нитрозомочевины, в том числе араноза. Для лечения меланомы кожи зарегистрирована лекарственная форма аранозы «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций». В лаборатории разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России создана новая лекарственная форма аранозы – «липосомальная» [11; 12]. Известно, что липосомальные формы противоопухолевых препаратов способны преодолевать множественную лекарственную устойчивость [7; 23]. Однако механизм, с помощью которого это происходит, до сих пор до конца не ясен.

В исследованиях [7; 13] было показано, что «липосомальная» араноза *in vitro* оказывает воздействие на клеточные линии, устойчивые к аранозе «лиофилизату для приготовления раствора для инъекций» (араноза-лио). Было обнаружено, что лекарственные формы аранозы по-разному воздействуют на клетки меланомы, в частности, липосомальная араноза, в отличие от аранозы-лио, не вызывает индукцию аутофагии [1; 2].

Возможно, липосомы вызывают гибель опухолевых клеток за счет воздействия на сигнальные пути, обеспечивающие защиту опухолевых клеток, в частности, на те, в которые вовлечены сигнальные белки p53 и NF-κB. Кроме того, мы предположили, что химиотерапия разными лекарственными формами аранозы может оказывать воздействие на иммунную противоопухолевую защиту.

### **Цель исследования**

Изучение воздействия на защитные системы опухолевых клеток разных лекарственных форм препарата из класса нитрозомочевины аранозы («липосомальной» и «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций»)

### Задачи исследования

1. Изучить мутационный статус гена *TP53* в клеточных линиях метастатической меланомы человека.
2. Изучить изменение экспрессии мРНК *TP53* и *MDM2* в клеточных линиях метастатической меланомы человека при воздействии «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» и «липосомальной» форм аранозы.
3. Изучить изменение экспрессии мРНК *NFkB1*, *NFkB2*, *MyD88* в клеточных линиях метастатической меланомы человека при воздействии «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» и «липосомальной» форм аранозы.
4. Изучить изменение экспрессии мРНК *PD-L1*, *PD-L2* в клеточных линиях метастатической меланомы человека при воздействии «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» и «липосомальной» форм аранозы.

### Научная новизна исследования

В настоящей работе впервые показано, что лекарственные формы аранозы («липосомальная» и «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций») при одинаковом действующем веществе по-разному влияют на экспрессию мРНК сигнальных белков *MDM2* и *NFkB1* в клеточных линиях метастатической меланомы: араноза «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» статистически значительно повышает экспрессию мРНК *MDM2* – фактора резистентности опухоли к химиотерапии по сравнению с «липосомальной», воздействие «липосомальной» аранозы повышает экспрессию мРНК *NFkB1* – фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК метилированием по сравнению с «лиофилизатом для приготовления раствора для инъекций». Впервые показано, что араноза «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» повышает экспрессию мРНК *PD-L2* в клеточных линиях метастатической меланомы по сравнению с «липосомальной».

## Теоретическая и практическая значимость

Получены новые данные о механизме действия препарата из группы производных нитрозомочевины аранозы. Араноза «лиофилизат для приготовления раствора для инъекций» запускает механизмы устойчивости к химиотерапии, через повышение экспрессии мРНК *MDM2*, и к цитотоксическим лимфоцитам, через повышение экспрессии мРНК *PD-L2*. Однако, в липосомальной лекарственной форме араноза, наоборот, запускает механизмы, способствующие чувствительности клеток к терапии, через повышение экспрессии мРНК *NFkB1* – фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК, и снижает экспрессию мРНК *PD-L2*, что может повысить чувствительность опухоли к цитотоксическим лимфоцитам. Полученные результаты могут быть использованы для обоснования применения липосомальной формы аранозы для лечения метастатической меланомы.

## Методы и методология и исследования

Методологическую основу исследования составили труды российских ученых в области исследования сигнальных путей клеточной гибели и механизмов развития лекарственной устойчивости Б.П. Копнина, А.Ю. Барышникова, Д.Ю. Блохина, Т.А. Богуш и др. При проведении исследования использованы методы: работа с клеточными культурами, FISH диагностика, секвенирование по Сенгеру, количественная ПЦР, проточная цитофлуориметрия. Применялись математические методы анализа и обработки результатов, полученных в ходе экспериментальной работы.

## Положения, выносимые на защиту

1. Мутации и делеции гена *TP53* не являются фактором чувствительности к аранозе для клеточных линий меланомы.
2. Уровень экспрессии мРНК генов *TP53*, *MyD88*, *NFkB2*, *PD-L1* в клетках меланомы не имеет существенных различий после воздействия «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» и «липосомальной» аранозы.

3. Экспрессия мРНК *MDM2* выше после воздействия на клетки меланомы «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» по сравнению с «липосомальной» аранозой.

4. Экспрессия мРНК *NFκB1* выше после воздействия на линии меланомы «липосомальной» аранозы по сравнению с «лиофилизатом для приготовления раствора для инъекций».

5. Экспрессия мРНК *PD-L2* отвечающего за уклонение от иммунного надзора выше после воздействия на клетки меланомы «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» по сравнению с «липосомальной» аранозой.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

При проведении экспериментальной работы использовано сертифицированное современное оборудование, методами статистической обработки установлена воспроизводимость результатов исследований, что позволяет считать их достоверными. Материалы диссертационной работы были представлены на XV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» имени А.Ю. Барышникова, Москва, 2018.



## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Лекарственная устойчивость метастатической меланомы

Меланома – это одна из разновидностей кожных злокачественных новообразований, которая развивается из пигментных клеток – меланоцитов. Меланома является наиболее опасным типом рака кожи и проявляет резистентность к химиотерапии. Это свойство стало серьезной проблемой общественного здравоохранения, поскольку заболеваемость меланомой неуклонно растет в последние десятилетия. Если заболевание диагностируется и лечится на ранней стадии, большинство случаев меланомы излечимы. На поздней стадии при наличии метастазов, которые распространились на другие органы, меланома имеет крайне неблагоприятный прогноз с медианой выживаемости менее 10 месяцев [111].

В основном для лечения не метастатической меланомы применяется хирургия. Однако, после появления метастазов, количество вариантов лечения меланомы становится достаточно ограниченным.

Химиотерапия является мало эффективным методом лечения метастатической меланомы из-за лекарственной устойчивости, которая характерна для этого заболевания. Развитие устойчивости к лекарственным средствам либо как первичной резистентности, либо после применения цитостатического лекарственного средства (приобретенной резистентности) является серьезной проблемой, которая ограничивает эффективность химиотерапии для лечения злокачественной меланомы. Поэтому, если резистентность к лекарственным препаратам будет преодолена, может быть улучшена выживаемость.

Молекулярные основы устойчивости к химиотерапии при меланоме являются многофакторными: дефекты в системе транспортировки препаратов, нарушения апоптоза или изменения в ферментативных системах, которые опосредуют клеточные метаболические механизмы [111; 227]. Кроме того, в

развитие резистентности вносят вклад сигнальные белки NFκB и p53 (их роль будет рассмотрена отдельно). Понимание изменений в молекулярных процессах, связанных с лекарственной устойчивостью, может способствовать в разработке новых терапевтических подходов к лечению метастатической меланомы.

### **1.1.1. Резистентность за счет выведения препаратов из клеток**

Система выведения препаратов является наиболее часто наблюдаемым механизмом, ответственным за снижение внутриклеточного накопления цитостатических веществ в резистентных к лекарственным средствам клеточных линиях. Устойчивость к лекарственным средствам опосредуется ABC-транспортерами (ATP-binding cassette), которые активно транспортируют лекарства из клетки [202]. Два класса АТФ-зависимых белков-транспортеров лекарственных средств, Р-гликопротеин (Pgp) и белки, связанные с множественной лекарственной устойчивостью (MRP), осуществляют выведение лекарственных веществ, что уменьшает накопление препаратов и делает опухолевые клетки устойчивыми к цитотоксическим эффектам многих противоопухолевых агентов. Среди 48 известных человеческих ABC-транспортеров, которые клетки меланомы чаще всего экспрессируют, отмечены такие как ABCB1 (MDR1), ABCC1 (MRP1), ABCC2 (MRP2), ABCA9, ABCB5, ABCB8, ABCD1 и ABCG2 (MXR) [48; 69; 78; 134]. Как известно, экспрессия ABCB5 и ABCB8 способствует устойчивости к доксорубину в клетках меланомы [69; 73] а экспрессия ABCC2 резистентности к цисплатину [128]. Luo et al. выделили субпопуляцию клеток способных к выведению препаратов непосредственно от пациентов с меланомой. Было показано, что эти клетки обладают повышенной способностью к выбросу препаратов и устойчивы к паклитакселу через регуляцию ABCB1 и ABCB5 [134]. Однако большинство клеточных линий меланомы, а также первичных и метастатических опухолей не экспрессируют Pgp, и этот механизм резистентности не может рассматриваться в клетках меланомы человека как основной [94; 180]. С другой стороны, MRP часто экспрессируется в меланоме, но его экспрессия слабо регулируется в ответ на

химиотерапию. Хотя транспортировка препаратов недостаточно изучена, по имеющимся в литературе данным можно предположить, что способность к выбросу препаратов может не являться основной причиной опосредованной лекарственными средствами резистентности при раке кожи. Тем не менее, некоторые исследования продемонстрировали связь резистентности меланомы с экспрессией MRP1 [36] и MRP2 [102]. Поэтому роль MRP-зависимых механизмов транспорта в лекарственной устойчивости меланомы остается неясной.

### **1.1.2. Устойчивость к лекарственным средствам за счет измененной активации ферментов**

Инактивация препаратов может уменьшить доступность свободного лекарственного средства для связывания его с внутриклеточными мишенями. Внутриклеточная детоксикация многих противоопухолевых препаратов (в основном алкилирующих агентов) происходит путем конъюгации с глутатионом (GSH) и катализируется ферментом глутатион-S-трансферазой (GST) [178; 209; 210]. Глутатион является мощным антиоксидантом, который ингибирует окислительный стресс, способный повредить ДНК и РНК. Было установлено, что уровень глутатиона выше в меланоме по сравнению с доброкачественными меланоцитарными невусами [137; 146]. Сообщалось, что добавление глутатиона ингибировало апоптоз, индуцированный с-Мус в клеточных линиях меланомы [37]. Однако в других исследованиях не наблюдалось существенной корреляции между изменением метаболизма GST / GSH и прогрессированием опухоли, лечением и клиническим ответом [65; 178; 179].

Топоизомераза (Торо) представляет собой ядерный фермент, который играет важную роль в транскрипции и рекомбинации ДНК, а также в сегрегации хроматид во время митоза. Он является мишенью различных ингибирующих химиотерапевтических агентов, таких как камптотецин и его производные, которые ингибируют Торо I, а также доксорубицин, этопозиды, митоксантрон, которые ингибируют Торо II [56; 172]. В меланоме резистентность к этопозиду ассоциирована как с мутацией, так и с делецией [44], которые усиливают

активность Торо II [122]. Однако Satherley et al. не смогли установить связь химиочувствительности с экспрессией Торо II в хориоидальной меланоме [177].

### **1.1.3. Лекарственная устойчивость, обусловленная изменениями репарации ДНК**

Алкилирующие агенты индуцируют образование цитотоксических Об-хлорэтилгуаниновых ДНК путем образования аддуктов с последующими поперечными связями между цепями и ингибированием репликации ДНК или транскрипции РНК, что приводит к остановке клеточного цикла в фазе G2. ДНК-рестрикционный фермент Об-алкилгуанин ДНК-алкилтрансфераза помогает в восстановлении этих аддуктов, таким образом ухудшая цитотоксический эффект и является основным фактором резистентности к этим лекарственным средствам [76]. Обнаружено, что клеточные линии меланомы, обладающие резистентностью, способны к усиленной репарации повреждений ДНК [173]. Повышенная активность Об-метилгуанин-ДНК метилтрансферазы (MGMT), фермента, участвующего в восстановлении повреждений ДНК вызванных алкилированием, была связана с лекарственной устойчивостью в клетках меланомы [51]. Клинические испытания показывают слабую связь ответа на химиотерапию с экспрессией MGMT [143; 144]. По результатам ретроспективного исследования можно предположить, что молекулы MGMT не прогнозируют клинический ответ при терапии дакарбазином [135].

### **1.1.4. Лекарственная устойчивость посредством модуляции апоптоза**

Апоптоз представляет собой сложную генетическую программу клеточной гибели, состоящую из нескольких путей. В настоящее время известно два хорошо изученных каспаз-активирующих каскада, которые регулируют опосредованную каспазами клеточную гибель. Внешний путь инициируется связыванием лигандов с рецепторами смерти на клеточной поверхности (например, CD95, TRAIL-R1-4, TNF-R1), которые после олигомеризации рекрутируют адапторные молекулы и

инициаторные каспазы (каспаза-8 / каспаза-10), что приводит к протеолитическому каскаду [100; 101]. Внутренний путь апоптоза включает митохондриальное высвобождение цитохрома С, который связывается с Араф-1 и тем самым вызывает конформационные изменения этого апоптотического белка с последующим вовлечением в комплекс прокаспазы-9. Прокаспаза-9 впоследствии самокатализируется [191]. Эти два пути сходятся при активации эффекторных каспаз, которые запускают работу специфических эндонуклеаз, приводящих к фрагментации ДНК и расщеплению ядерных белков [95]. Гибель или выживание клеток уравнивается рядом регуляторных молекул на нескольких уровнях, таких как p53, Ras, белки семейства Bcl-2 или члены семейства IAP. Koetz-Ploch et al. показали, что в резистентных клетках меланомы микроРНК-125а способствует устойчивости к ингибиторам BRAF путем подавления апоптоза, а также реактивации сигнальных путей, таких как MAPK и АКТ [118].

Дакарбазин, применяемый для лечения меланомы, вызывает повреждение ДНК опухолевой клетки и индуцирует апоптоз. Обнаружено, что дакарбазин вызывает слабый апоптотический ответ, как отдельно, так и в комбинации с цисплатином и винбластином [126]. В исследовании R.A. Anvekar et al. добавляли ингибитор антиапоптотических белков АВТ-737 к клеточным линиям меланомы, слабо отвечающим на дакарбазин. В результате АВТ-737 вызывал чувствительность линий меланомы к общепринятым химиотерапевтическим средствам, приводил к усилению апоптоза [26]. Y. Liu et al. показали, что соединение ВНЗ эффективно индуцирует апоптоз в клетках меланомы путем прямого связывания с антиапоптотическими белками семейства Bcl-2, включая фосфорилированный Mcl-1 [130].

Кроме того, при злокачественных меланомах антиапоптотический белок Bcl-2 сверхэкспрессируется, тогда как Араф-1, важный фактор формирования апоптосомы во внутреннем пути апоптоза, понижается [41; 184; 190]. Аналогично сверхэкспрессия индуцированного белка дифференцировки клеток миелоидного лейкоза (Mcl-1) наблюдалась в устойчивых к лекарственным средствам клеточных линиях [71].

### **1.1.5. Резистентность к ингибиторам BRAF**

Открытие сигнальных путей онкогена BRAF и MAPK привело к разработке таргетной ингибирующей BRAF терапии. Однако, при монотерапии ингибиторами BRAF, резистентность развивается у большинства пациентов. Резистентность может развиваться за счет генетических изменений или иных причин [188; 216; 227]. Генетические механизмы резистентности могут быть обусловлены следующими мутациями: NF1 (loss of neurofibromatosis type-1) [119; 152; 225], потеря PTEN (phosphatase and tensin homolog) [158; 213], повышение COT (cancer Osaka thyroid kinase) [107], мутация MEK [213; 216], инактивация отрицательной обратной связи ERK (extracellular-related kinase) и изменения в сигнальном пути PI3K-АКТ (phosphoinositide 3-kinase-АКТ) [157; 188].

### **1.2. Механизмы лекарственной устойчивости к производным нитрозомочевин**

Препараты, относящиеся к группе производных нитрозомочевины, обладают противоопухолевой цитотоксической активностью, за счет переноса алкильных групп в нуклеофильные центры ДНК, РНК, белков и алкилирования их молекул. Этот процесс в итоге приводит к гибели опухолевых клеток.

Реакция алкилирования – это замещение активной алкильной группой водородного атома в молекуле какого-либо соединения. Алкильная группа – это остаток углеводорода, который потерял один атом водорода. Например, метан  $\text{CH}_4$  образует метильную группу ( $-\text{CH}_3$ ) [15]. Если алкилирование идет путем замещения водородного атома метильной группой, то это является метилированием. Алкилирующие вещества образуют положительно заряженные алкилирующие группы, которые связываются с электроотрицательными структурами в клетке (нуклеофильные группы).

Алкилирующие соединения проявляют цитотоксичность за счет алкилирования структурных элементов ДНК (пуринов, пиримидинов) и реже РНК. Например, метильная группа соединяется с атомом азота, происходит так называемое метилирование основания. В результате таких реакций происходит

изменение структуры азотистого основания и, следовательно, структуры ДНК. С помощью специальных ферментов (эндонуклеаз) алкилированный, дефектный фрагмент ДНК может быть «вырезан», в результате чего образуется разрыв ДНК. Но поврежденная ДНК может еще быть восстановлена с помощью ДНК-полимераз. За счет алкилирования так же могут возникать сшивки, когда образуются дополнительные связи между нитями ДНК. Это препятствует их разделению, необходимому для репликации и ведет к гибели клетки.

Если измененный участок ДНК не будет репарирован, поврежденная ДНК не сможет выполнять свои функции. В результате в клетке возникает сигнал о необратимом повреждении ДНК, после чего включаются механизмы апоптоза. Конечным результатом является гибель клеток, что применительно к опухоли означает ее регрессию. При этом индукция в клетке ферментов репарации в ответ на повреждения ДНК алкилированием и восстановление повреждений могут быть одной из причин резистентности клеток к этим препаратам.

Одним из производных нитрозомочевины, применяемых для лечения меланомы, является араноза – метильное производное нитрозомочевины. Она представляет собой арабинопиранозил-N-метил-N-нитрозомочевину, т.е. носителем цитотоксической группы (N-метил-N-нитрозомочевины) является моносахарид L-араноза [8]. Производные нитрозомочевины в настоящее время применяются в составе схем комбинированной химиотерапии при лечении ряда заболеваний, в том числе, диссеминированной меланомы [21].

Поскольку уровни повреждений ДНК, достигнутые во время терапии этими препаратами, достаточно высоки, они вызывают апоптоз в раковых клетках [150; 171]. Цитотоксичность аранозы зависит в основном от метилирования гуанина в положении O<sub>6</sub> (O<sub>6</sub>MeG) и уровня O<sub>6</sub>-метилгуанин ДНК метилтрансферазы (MGMT).

Небольшие повреждения ДНК O<sub>6</sub>MeG индуцируются менее чем в 8 % от общего количества реакций метилирования [34; 35], но имеют особое значение из-за их свойств вызывать ошибки при репликации ДНК. O<sub>6</sub>MeG не блокирует значительно синтез ДНК, а вызывает образование GC-точечных мутаций после

двух раундов репликации ДНК и, следовательно, является аддуктом ДНК [32], важным для индукции [81] и прогрессирования опухоли [33]. Поскольку ОбМеG не блокирует синтез ДНК, интересно, что при этом ОбМеG может являться цитотоксическим повреждением ДНК [58; 110]. Цитотоксичность обратно связана с мутагенезом [112], что означает, что при мутациях цитотоксичность не проявляется. Это цитотоксическое повреждение восстанавливается ферментом MGMT. При этом одна метильная группа переносится из Об-положения гуанина в цистеин (Cys 145) на MGMT, тем самым инактивируя MGMT и нацеливая его на протеасомную деградацию [162]. Резистентность клеток к повреждениям ОбМеG, следовательно, прямо пропорционально количеству MGMT и скорости, с которой клетка может повторно синтезировать фермент, причем защита увеличивается линейно с увеличением MGMT до точки, когда N-метилирование, например N3MeG и N3MeA становится цитотоксическим [110]. Было показано, что ОбМеG является повреждением ДНК, способным инициировать апоптоз в клеточных системах. Клетки, экспрессирующие MGMT, почти полностью устойчивы к метилирующим агентам в диапазоне доз, где N-метилирование не является цитотоксическим и наоборот клетки не способные репарировать ОбМеG с помощью MGMT были чувствительны к апоптозу, индуцируемому метилирующим агентом, в том же диапазоне доз [139]. Поскольку MGMT играет такую важную роль в защите клеток от метилирования химиотерапевтическими веществами, неудивительно, что метилирующие препараты нашли применение для опухолей, которые экспрессируют самые низкие количества MGMT [52], а именно злокачественная глиома [218] и метастатическая меланома [68; 163].

### **1.3. Преодоление лекарственной устойчивости липосомальными противоопухолевыми препаратами**

Появление нанотехнологий оказало значительное влияние на клиническую терапию в последние два десятилетия. Липосомы и полимерные наночастицы использовались в качестве наноразмерных носителей для более эффективной и безопасной доставки множества препаратов. Среди различных разновидностей



наночастиц липосомы являются наиболее распространенным средством доставки лекарств, и на сегодняшний день ряд липосомальных препаратов применяются в клинике. Липосомы состоят из амфифильных липидных молекул, которые собираются в двуслойные сферические везикулы [4; 57]. Липосомально-опосредованная доставка лекарств обладает рядом преимуществ, обеспечивая эффективность, биосовместимость, неиммуногенность, повышенную растворимость химиотерапевтических агентов и способность инкапсулировать широкий спектр лекарств [61]. Кроме того, липосомы показали высокий терапевтический потенциал в качестве носителей лекарственных веществ и для таргетной доставки. Доставка лекарств с помощью липосом улучшает фармакокинетические и фармакодинамические профили терапевтической полезной нагрузки, способствует контролируемому и устойчивому высвобождению препаратов и проявляет более низкую системную токсичность по сравнению со свободным лекарственным средством [221]. В настоящее время в мире разработаны различные липосомальные продукты для лечения рака, это Doxil, DaunoXome®, DepoCyt® и ONCO-TCS, они представляют собой липосомальные препараты доксорубицина (DOX), даунорубицина, цитарабина и винкристина соответственно [72; 83; 108; 176]. В противоопухолевой терапии с помощью липосом применяется пассивное нацеливание на опухоль за счет добавления в состав липосом ПЭГ и активное нацеливание на поверхностные рецепторы раковых клеток FR, TfR и EGFR и микроокружение опухоли, включая VEGF, VCAM, матричные металлопротеазы,  $\alpha\beta$ -интегрины и поверхностная трансплантация липосом с аптамерами [61]. Использование нанотехнологий может улучшить фармакокинетику и уменьшить побочные эффекты, связанные с препаратами.

Липиды были первыми самоорганизованными материалами, используемыми для доставки лекарств, главным образом в виде мицелл и липосом. Липосомы классифицируются по размеру и количеству слоев фосфолипидной мембраны [160] на многослойные везикулы (MLV - multilamellar vesicles) со средним размером от 1 до 5 мкм, большие однослойные везикулы

(LUV - large unilamellar liposomes/vesicles) в диапазоне размеров 100-250 нм с единственным липидным бислоем, и небольшие однослойные везикулы (SUV - small unilamellar liposomes/vesicles), состоящие из одного фосфолипидного бислоя, окруженного водной фазой с диапазоном размеров 20-100 нм [89].

Липосомы состоят из амфифильных липидных молекул, которые собираются в двуслойные сферические везикулы. Наиболее часто используемые материалы для липосом – это фосфатидилэтаноламин (ФЭ), фосфатидилхолин и холестерин, которые легко могут быть включены в липосомальные мембраны; эти материалы повышают липосомальную стабильность и жесткость, фармакокинетику доставки и эффективность биоактивных агентов, таких как лекарственные средства, белки или олигонуклеотиды. Другие благоприятные характеристики включают в себя то, что липосомы нетоксичны, неинвазивны и могут доставлять гидрофильные и / или липофильные вещества. Липосомы играют важную роль в доставке лекарств для лечения рака [89].

Липосома защищает препарат от инактивации в плазме, и из-за ограничений по размеру при переносе больших молекул липосома не проходит через здоровый эндотелий сосудов. Поэтому препарат слабо накапливается в здоровых тканях. Но разрывы в эндотелии сосудистой сети опухоли приводят к повышенной проницаемости для крупных носителей и в сочетании с ослабленной лимфатикой увеличивают накопление липосомального препарата в опухоли [66]. По данным литературы (приведены ниже) некоторые противоопухолевые препараты в липосомальной форме способны преодолевать лекарственную устойчивость. Но преимущество липосомальных форм остается неясным в связи с недостаточностью данных о молекулярных механизмах их действия.

Липосомальный доксорубицин создан для снижения кардиотоксичности свободного доксорубицина [170]. Доксорубицин при этом помещается в липосомы, на поверхности которых находится молекула полиэтиленгликоля. Данные липосомы не захватываются клетками ретикулоэндотелиальной системы из-за присутствия на их поверхности молекулы полиэтиленгликоля. Как следствие, препарат длительное время циркулирует в сыворотке крови. Из-за

малого диаметра липосомы проникают через стенки капилляров опухоли, которые имеют повышенную проницаемость. Разрушение липосомальной мембраны и высвобождение лекарственного средства происходит после проникновения в опухоль [153].

Клетки линии K562 устойчивы доксорубину, за счет выведения препарата наружу из клеток. Но воздействие липосомального доксорубина способствовало цитотоксичности как родительских клеток K562, так и клеток с гиперэкспрессией гена *MDR1* дозо-зависимым образом [23]. Клетки рака молочной железы MCF-7 устойчивые к доксорубину и гиперэкспрессирующие Р-гликопротеин накапливали и были чувствительны к липосомальному доксорубину [174]. Показано, что резистентные клеточные линии A2780/AD рака яичника и CT26/DOX толстой кишки проявляли чувствительность к липосомальному доксорубину при развитии в иммунодефицитных мышцах [142]. Так же, липосомальный доксорубин способствует апоптозу клеток эндотелия сосудов в опухолях, обладающих лекарственной устойчивостью [154]. Есть исследование, где с помощью конфокальной микроскопии и внутриклеточного анализа обнаружено, что липосомы эффективно доставляют доксорубин в клетки. Препарат легко накапливается в ядре, как в чувствительных клетках, так и в клетках с множественной лекарственной устойчивостью [115]. Поглощение клетками доксорубина в липосомах изменяет структуру его распределения в клетках с множественной лекарственной устойчивостью путем частичного смещения лекарственного средства в ядерные компартменты, по сравнению со свободным доксорубином [205]. Есть данные, что липосомный доксорубин преодолевает лекарственную устойчивость путем ингибирования Р-гликопротеина в опухолевых клетках человека [166]. Показано, что для липосом разного липидного состава эффективность поглощения клетками различается [125].

В связи с имеющимися данными можно сказать, что липосомальный доксорубин способен преодолевать лекарственную устойчивость на клеточных линиях.

Липосомальный цисплатин. Среди прочих химиопрепаратов, для лечения меланомы применяется цисплатин. Для препаратов платины, как и для других алилирующих веществ, свойственно вызывать повреждения ДНК в клетках опухоли. В основном эти повреждения происходят за счет сшивок ДНК. Например, образуются связи между цепочками ДНК, которые ингибируют ДНК- и РНК-полимеразы, нарушают деление клеток и могут вызывать апоптоз [79; 80; 109].

В настоящее время проходят клинические испытания липосомальный цисплатин [228]. Обнаружено, что липосомальный цисплатин в отличие от свободного преодолевает лекарственную резистентность клеток рака яичника A2780cis [121]. Однако цитотоксическая активность липосомального цисплатина не связана с детектируемой платинизацией ДНК в резистентных клетках рака яичников. Поэтому можно предполагать, что существуют отличия в механизме действия липосомального цисплатина и свободного лекарственного средства. Свободный цисплатин вызывал экспрессию генов митохондриального пути апоптоза (BAX, BID, CASP9). Напротив, липосомальная форма индуцировала экспрессию генов из сигнальных путей повреждения ДНК и нескольких генов внешнего пути апоптоза (TNFRSF10B-DR5, CD70-TNFSF7). Таким образом, представляется, что липосомальный цисплатин преодолевает резистентность, индуцируя повреждение ДНК и, как следствие, запрограммированную гибель клеток по внешнему пути [117]. Имеются дополнительные данные, что липосомальный цисплатин может преодолеть резистентность к химиотерапии раковых клеток яичника A2780 путем индукции внешнего пути апоптоза [199].

Химиопрепараты могут способствовать производству аутокринного лиганда, который, соединяясь с рецептором смерти на опухолевой клетке, инициирует каскад сериновых протеаз каспаз и уход клеток в апоптоз [3].

Было обнаружено, что сублиния клеток лимфобластного лейкоза Jurkat, на поверхности которых отсутствует CD95/Fas рецептор, устойчивы к доксорубину. При этом клетки родительской линии, несущие CD95/Fas, чувствительны [192; 193]. Подобное явление обнаружено и для клеток меланомы mel Mtp, сублиния

которых без рецептора CD95/Fas устойчива к нитрозомочевинам. Но если воздействовать на эту сублинию *mel Mtp* липосомальной аранозой, клетки оказываются чувствительными [5; 6; 7]. Механизмы этого явления еще слабо изучены. Например, есть данные, что липосомальная араноза не индуцирует аутофагию в данных клетках [1].

Можно предположить, что липосомы вызывают гибель опухолевых клеток за счет воздействия на сигнальные пути, обеспечивающие защиту опухолевых клеток, в частности, на те, в которые вовлечены сигнальные белки p53 и NF-κB.

## **1.4. Сигнальные белки, участвующие в процессах клеточной гибели**

### **1.4.1. P53 и MDM2**

Белок p53 кодируется геном *TP53*. Ген *TP53* расположен на коротком плече (p) хромосомы 17 и состоит из 11 экзонов. Ген *TP53* человека охватывает 20 кб и кодирует ядерный фосфопротеин (длина 393 аминокислот). В качестве онкосупрессивного белка p53 действует как «страж генома». В норме «стрессорная» функция p53 неактивна до того момента, как произойдет ее активирование за счет повреждений ДНК или других геномных aberrаций. Белок p53 затем активирует свои нисходящие эффекторы для ареста клеточной пролиферации и ингибирования репликации поврежденной ДНК, чтобы провести процесс репарации. Но, если повреждение сложное, белок p53 может запускать программу апоптоза. Потеря у p53 функции «хранителя генома» позволяет продолжить репликацию клеток с поврежденной ДНК и, в свою очередь, приводит к накоплению генетических изменений, которые способствуют злокачественной прогрессии [14; 39].

В нормальных клетках p53 часто не обнаруживается из-за быстрого убиквитинирования с помощью белка MDM-2 и последующей протеасомной деградации [38]. Однако при повреждении ДНК и некоторых других стрессах, включая онкогенный стресс, количество p53 увеличивается из-за нарушения его деградации [124]. Примечательно, что инактивация p53 является одной из характеристик рака. Это ожидаемо, поскольку p53 может вызвать остановку роста

клеток, апоптоз, аутофагию и/или клеточное старение, что наносит ущерб раковым клеткам [220; 222]. Также p53 должен препятствовать ангиогенезу, который способствует прогрессированию опухоли [222]. Однако, поскольку эти функции также вредны для нормально растущих стволовых клеток и развивающихся тканей [97], p53 тщательно контролируется различными тесно связанными белками, наиболее изученным из которых является MDM-2 [235]. Поэтому еще одним механизмом ухудшения реакции p53 на онкогенный стресс может быть сверхэкспрессия MDM-2 [98; 140]. Хотя мутация гена-супрессора опухоли *TP53* является общей чертой многих типов опухолей [169; 195], мутационная инактивация p53 при меланоме встречается редко, а p53 дикого типа часто показывает высокие уровни экспрессии [90; 194; 196]. Кроме того, увеличение экспрессии *TP53* не является достаточным фактором для хорошего ответа на лечение меланомы [127]. Таким образом, можно предположить, что p53 дикого типа в меланоме не функционирует в качестве опухолевого супрессора [30].

Хромосомные изменения, особенно аллельные потери, практически на каждой хромосоме, были описаны в первичной меланоме, а также в клеточных линиях, полученных из метастазов, демонстрируя множественные генетические изменения на разных локусах генов и документируя гетерогенную природу генетических изменений в меланоме [39; 40; 93]. Ген *TP53* находится на коротком плече хромосомы 17p и подвергается делециям или мутациям при многих опухолях. Например, при В-ХЛЛ делеции 17p связаны с плохим клиническим прогнозом [186].

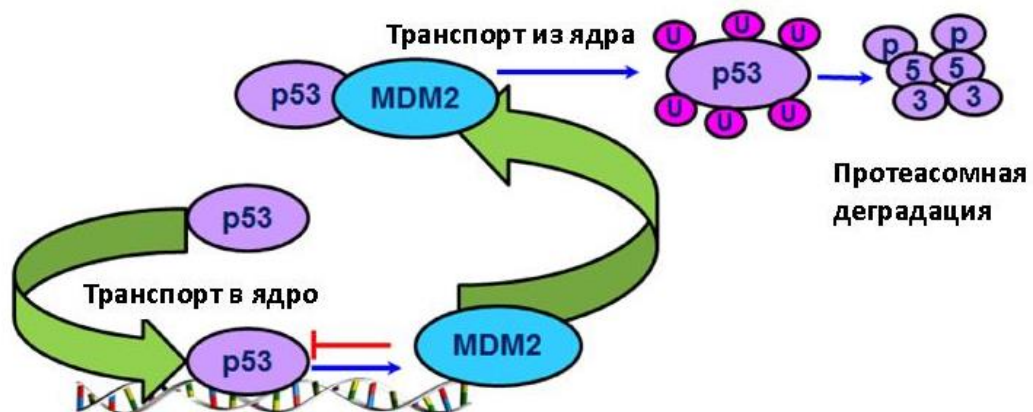
Несмотря на значительную роль мутированного *TP53* в патологии рака, остается фактом, что у половины всех больных раком присутствует *TP53* дикого типа. Это указывает на существование других факторов, способствующих образованию и прогрессированию опухоли. Одним из таких факторов является p53-ингибирующий белок MDM2. MDM2 является ключевым физиологическим регулятором p53 и контролирует уровни белка p53 [114]. При клеточном стрессе p53 связывается с промотором MDM2, тем самым увеличивая экспрессию MDM2.

Белок MDM2 содержит домен RING на С-конце, функционирующий как E3-лигаза, а также p53-связывающий домен на N-конце. MDM2 связывается с p53 и блокирует его N-терминальный трансактивационный домен, и одновременно способствует экспорту p53 из ядра в системы протеосомной деградации. [114; 223]. В результате увеличения уровня белка p53 происходит усиление активности MDM2, а это, в свою очередь, вызывает деградацию p53 [139]. После клеточного стресса, такого как повреждение ДНК, активность MDM2 снижается, что приводит к стабилизации p53 [28]. Таким образом, клеточные уровни p53 и его ингибитора MDM2 взаимно контролируются механизмом обратной связи [28; 139], где MDM2 снижает p53, а p53 активирует MDM2. В результате этой регулирующей схемы ядерные концентрации p53 и MDM2 обычно сохраняются на низких уровнях [114] (**Рисунок 1**). Следовательно, нарушение баланса MDM2 / p53 (например, чрезмерная экспрессия MDM2) может иметь разрушительные последствия. Такой дисбаланс часто ассоциируется со злокачественными изменениями в нормальных клетках. Повышенные уровни MDM2 приводят к опухолегенезу и коррелируют с плохим клиническим прогнозом [223].

Однако, MDM2 не является единственным отрицательным регулятором p53, и поэтому необходимо помнить о наличии других. p53 взаимодействует в сложной сети с несколькими другими факторами. Например, он также регулируется белками SirT1 (Sirtuin 1) [60] или Wip1 (wt-p53 induced phosphatase/PPM1D) [132].

Имеются данные, что ингибиторы MDM2 способны усиливать эффективность комбинированного лечения со стандартной химиотерапией. Этот факт говорит о возможности увеличения лекарственной устойчивости опухоли при повышенной экспрессии MDM2. Например, соединение Nutlin-3 обладает активностью против широкой группы раковых клеток с диким типом p53 *in vitro* и *in vivo* [183]. В сочетании с химио-лучевой терапией соединение проявляло синергическую активность против рака предстательной железы [200] и легких [45], а также против лимфоцитарной лейкемии [53] и нейробластомы [31]. Сообщалось о синергических эффектах nutlin-3 с цитостатическими препаратами.

Эффект Nutlin-3 был особенно полезным, если его вводили в сочетании с повреждающими ДНК препаратами. Платиновые агенты, такие как карбоплатин, образуют аддукты ДНК с платиной, приводящие к двунитевым разрывам ДНК и гибели клеток [77]. Deben et al. исследовали преимущества комбинации Nutlin-3 с цисплатином (цисплатин, за которым следует nutlin-3). Они использовали ряд клеточных линий NSCLC с дифференциальным статусом p53. Хотя Nutlin-3 показал хорошую эффективность даже в качестве одного агента, авторы предположили, что противоопухолевый эффект может быть усилен, если его применять в комбинации с ДНК-разрушающими агентами. Последовательное лечение цисплатином и nutlin-3 приводило к синергетическому цитотоксическому ответу в клеточных линиях с диким типом p53. Наблюдалось значительное увеличение экспрессии генов мишеней p53. Было также продемонстрировано, что комбинированная терапия малых молекул с ДНК-разрушающими агентами (цисплатин) привела к синергичному цитотоксическому ответу [59]. Исследования *in vitro* показали сильную синергию между карбоплатином и Nutlin-3а [206]. Исследования *in vivo* с опухолями меланомы показали, что соединение 27 (производное 1,4-бензодиазепин-2,5-диона, ингибитора MDM2) усиливает активность доксорубина, если применять их в комбинации [116]. Эти соединения в комбинации приводили к ингибированию роста опухоли в дозах, которые неактивны, если их вводят отдельно. Комбинация привела к снижению токсичности из-за более низких требуемых доз.



**Рисунок 1.** – Взаимодействие белков MDM2 и p53 (цитируется с изменениями по [149]).



Таким образом, в литературе отмечено, что белок p53 при меланоме по каким-то неизвестным причинам не выполняет своей роли опухолевого супрессора. Но, тем не менее, ингибирование MDM2 способно снижать лекарственную устойчивость клеток меланомы.

#### 1.4.2. MyD88, NF-κB1, NF-κB2

MyD88 (англ. Myeloid differentiation primary response gene 88) — цитозольный адаптерный белок, участвует в передаче сигнала от всех толл-подобных рецепторов (англ. Toll-like receptor, TLR), за исключением TLR3, а также от всех рецепторов, связывающих семейство цитокинов IL-1 [133].

TLR считаются основным семейством паттерн-распознающих рецепторов (PRR, от англ. pattern recognition receptors), которые активируются микробными продуктами [патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (PAMPs)] и эндогенными лигандами, часто высвобождаемыми при повреждении ткани и гибели клеток [связанные с повреждением молекулярные паттерны (DAMPs)]. TLR играют важную роль в контроле за воздействием микробиоты на местное и системное воспаление и иммунитет. TLR также реагируют на эндогенные лиганды и, таким образом, способны ощущать изменения в гомеостазе тканей [84]. Передача сигнала от TLR идет через четыре разных адаптерных белка. MyD88 участвует в передаче сигнала от всех толл-подобных рецепторов (англ. Toll-like receptor, TLR), за исключением TLR3 [133]. Сигналинг через MyD88 активирует NF-κB, митоген-активированные протеинкиназы (МАРК), путь фосфоинозитид-3-киназы (PI3K) -Акт и регуляторные факторы интерферона (IRF) 3, 5 и 7. Мутация MyD88 в аминокислоте 265 часто встречается при злокачественных новообразованиях В-клеток и приводит к конститутивной активации передачи сигналов NF-κB, подтверждая важность этого пути в патогенезе рака [151; 211]. MyD88 имеет повышенную экспрессию при некоторых солидных опухолях [105].

Животные, имеющие дефицит гена, кодирующего MyD88, применяются для изучения роли воспаления в канцерогенезе. NF-κB является основной сигнальной

молекулой, на которую воздействует MyD88, а данные о том, как дефицит MyD88 влияет на канцерогенез, частично совпадают с данными о роли NF-κB при раке [62]. Ранние работы по изучению функций PRR и TLR, в частности, были сосредоточены на фагоцитарных и антигенпрезентирующих клетках. Было показано, что TLR активируют эти типы клеток и действуют как инициаторы воспаления и иммунитета посредством индукции за счет NF-κB- и IRF провоспалительных цитокинов, интерферонов и хемокинов. Позднее было обнаружено, что TLR экспрессируются почти всеми типами клеток [165]. Стимуляция TLR как на кроветворных, так и на негематопоэтических клетках непосредственно влияет на выживаемость и пролиферацию клеток. Стимуляция TLR как в нормальных, так и в опухолевых клетках может приводить к пролиферации клеток или апоптозу [92; 175]. Сигналинг TLR и IL-1R способствует гомеостазу тканей, включая такие процессы как восстановление и регенерация тканей, и это отчасти объясняется эффектами MyD88 способствующими выживанию. Myd88 - / - мыши показали изменение или задержку заживления ран кожи [136], восстановления тканей толстой кишки [164] и регенерации печени [103].

Канцерогенез кожи может быть изучен с использованием двухступенчатой схемы, которая включает обработку мутагеном 7,12-диметилбенз [а] антраценом (DMBA), а затем повторную обработку кожи промотором опухолей 12-О-тетрадеканойлфорбор 13-ацетатом (TPA) [201]. Это приводит к образованию доброкачественных папиллом через 10-15 недель после воздействия. Часть этих папиллом становится локально инвазивной плоскоклеточной карциномой [55]. В этой модели мыши Myd88 - / - более устойчивы к образованию папиллом, чем мыши дикого типа. Местное введение TPA также индуцирует MyD88-зависимое продуцирование иммуносупрессивного фермента, индоламин 2,3 -диоксигеназы, который подавляет активность Т-клеток и способствует образованию опухолей [148]. В мышинной модели меланомы B16 белок MyD88 способствовал ангиогенезу [212]. Инактивация MyD88 во многих линиях опухолевых клеток человека подавляет их пролиферацию [232], что согласуется с его ролью в

выживании и пролиферации клеток [175]. Например, есть данные, что передача сигнала от TLR4 способствует миграции клеток меланомы [203]. TLR2 и TLR4 присутствуют на клетках меланомы человека и могут активировать белок MyD88 в ответ на воспалительные стимулы. Активация Toll-подобных рецепторов на клетках меланомы человека индуцируется воспалительными факторами. Экспрессия мРНК MyD88 при этом повышается примерно в 8 раз [85]. В целом, эти исследования показали, что MyD88, связанный с TLR4 или IL-1R, играет важную роль в промотировании опухолей кожи.

**Nuclear Factor-kappa B (NF-кВ)** является индуцибельным транскрипционным фактором, который активирует экспрессию многих генов, участвующих в регуляции иммунного ответа, апоптоза, ангиогенеза и инвазии опухолевых клеток. Все эти функции указывают на важную роль NF-кВ в развитии опухоли.

NF-кВ представлен пятью белками – p50/105 (NF-кВ1), p52/100 (NF-кВ2), p65 (RelA), c-Rel и RelB. Их NH<sub>2</sub>-конец имеет Rel-гомологичный домен (он состоит из 300 аминокислот), который обеспечивает внутриядерный транспорт NF-кВ, его взаимодействие с ДНК, ингибиторами и образование димерных молекул [9]. Несмотря на множество форм, классическим типом NF-кВ является гетеродимер p50-p65. Он содержится в большинстве клеток и имеет практически все участки, необходимые для связывания с индуцибельными генами [16]. Инактивированные формы p65, Rel B и c-Rel ассоциированы с цитоплазматическим IкВ (ингибиторным белком NF-кВ), тогда как p100 (предшественник p52) и p105 (предшественник p50) содержат внутренние ингибирующие домены [215]. Белок NF-кВ состоит из двух субъединиц, которые могут изменяться, влияя на транскрипционную активность белка. Белки NF-кВ обычно находятся в цитоплазме из-за связывания с ингибитором IкВ. После воздействия активирующих сигналов происходит фосфорилирование, убиквитинирование и деградация IкВ 26S-протеасомой, что позволяет комплексу NF-кВ транслоцироваться в ядро и связывать специфические промоторные последовательности ДНК [25].

Гомодимеры p50 не имеют сильных трансактивирующих доменов и могут фактически ингибировать экспрессию гена, конкурируя с p65 / p50 или другими трансактивирующими комплексами для κB-сайтов. Существует два основных пути, по которым p50 может функционировать в качестве транскрипционного фактора: либо в качестве партнера-димера для субъединиц RelA, c-Rel и RelB, либо как гомодимер p50. Выбор партнера-димера p50 имеет решающее значение для экспрессии генов воспаления, причем p65 или c-Rel, связанные с субъединицами p50, индуцируют экспрессию генов, тогда как гомодимеры p50 в основном (хотя и не всегда) рассматриваются как транскрипционные репрессоры [46].

Механистически NF-κB способствует онкогенезу, вызывая экспрессию различных генов, ответственных за выживание клеток, пролиферацию, миграцию, инвазию. Однако в ряде исследований показано, что высокая экспрессия субъединицы NFκB1, наоборот, может быть связана с противоопухолевыми эффектами.

NF-κB регулирует многочисленные провоспалительные цитокины (например, TNFα, IL-1, IL-6, IL-12), хемокины (например, CXCL1, CXCL2, RANTES) и молекулы адгезии (например, белок клеточной адгезии клеток 1, VCAM-1) активацию и рекрутирование клеток, способствующих воспалению [224]. TNFα и IL-1, в свою очередь, положительно регулируют активацию NF-κB, тем самым усиливая иммунный ответ и продлевая его продолжительность. Однако если их не остановить, воспаление может нанести ущерб тканям хозяина, что приводит к хроническим воспалительным состояниям, таким как ревматоидный артрит и колит, а также может привести к раку [62]. Следовательно, воспалительный ответ должен жестко регулироваться механизмами отрицательной обратной связи. Было показано, что гомодимер p50 играет важную роль в качестве противовоспалительного фактора транскрипции посредством подавления экспрессии провоспалительных генов, одновременно усиливая экспрессию противовоспалительных генов. Гомодимер p50 ингибирует транскрипцию не только путем функционирования в качестве конкурента для

сайтов связывания NF-κB. Комплексы p50:p50:HDAC1 могут активно подавлять провоспалительные гены путем содействия конденсации и ремоделированию хроматина, чтобы сделать гены недоступными для транскрипции [70; 236]. Гомодимеры p50 могут также рекрутировать эухроматиновую гистон-лизиновую N-метилтрансферазу 1 (EHMT1), которая катализирует репрессивное метилирование (H3K9) в промоторах генов, регулируемых интерфероном 1-го типа (IFN), участвующих в антивирусном иммунитете [67].

Белок NF-κB чаще всего описывается как способствующий воспалению и ассоциированный с развитием рака [62], хотя противовоспалительные гомодимеры p50 могут выступать в качестве опухолевых супрессоров при гепатоцеллюлярной карциноме. Гепатоцеллюлярная карцинома (HCC) развивается на фоне хронического гепатита. Лейкоциты, обнаруженные в микроокружении HCC, участвуют в качестве регуляторов роста опухоли. HCC у мышей вызывали за счет воздействия диэтилнитрозамина. Было отмечено, что при истощении печеночных нейтрофилов с помощью антител происходит ослабление опухолевой нагрузки. В исследовании отмечена ранее недооцененная функция NFκB1 как супрессора опухоли, работающего через димеры p50:p50 и ко-репрессор HDAC1. Активируясь, эти противовоспалительные белки подавляют экспрессию в печени группы нейтрофильных хемокинов S100A8 / 9, CXCL1 и CXCL2. Потеря NFκB1 способствует развитию возрастных хронических заболеваний печени, нейтрофилии, фиброза, обнаруживаются повреждения теломер гепатоцитов и возможность образования гепатоцеллюлярной карциномы. Мыши *nfkб1* (S340A / S340A), несущие мутацию, предназначенную для селективного разрушения комплексов p50:p50:HDAC1, более восприимчивы к HCC. У мышей, с отсутствием S100A9, снижена экспрессия хемокинов нейтрофилов и они лучше защищены от HCC. Важно отметить, что мыши *nfkб1* S340A / S340A, которые имели дефект в гомодимере p50, но не p65-p50 гетеродимере, имела такой же фенотип, что и у *nfkб1* - / - мышей [226]. Эти результаты показывают, что подавление притока нейтрофилов к поврежденной печени опосредуется гомодимерами p50 с рекрутированием HDAC1.

В дополнение к своей роли в регуляции воспалительной реакции NFκB1 может также способствовать прямому клеточному защитному ответу против канцерогенов, вызывающих генотоксическое повреждение, в частности против алкилирующих агентов. Было показано, что NFκB1 является специфическим опухолевым супрессором, который предотвращает гематологическую злокачественность после повреждения клеток за счет алкилирования (N-метил-N-нитрозомочевина). Экспрессия мРНК NFκB1 при многих гематологических заболеваниях примерно в 2 раза ниже по сравнению с образцами здоровых доноров. Nfkb1<sup>-/-</sup> клетки накапливают больше индуцированных алкилированием (но не ионизирующим излучением) мутаций, а также мыши Nfkb1<sup>-/-</sup> развивают больше лимфом, чем животные дикого типа [219]. Однако это, вероятно, будет специфичным для конкретных клеток и воздействий, поскольку Nfkb1<sup>-/-</sup> гепатоциты одинаково повреждаются алкилирующим агентом N-диэтилнитрозамином по сравнению с клетками дикого типа [226].

Свидетельство о роли NFκB1 при раке не ограничивается работами на мышах. Сообщается о высокой корреляции между более низкой экспрессией KPC1, фермента убиквинулирующего белок p105 до белка p50, и снижением уровней p50 в тканях опухолей человека при раке головы и шеи и глиобластоме. Возможные последствия этих результатов были отмечены экспериментами с использованием моделей ксенотрансплантатов клеточных линий глиобластомы человека и рака молочной железы у мышей. В этих моделях сверхэкспрессия p50 или KPC1 приводила к увеличению гомодимера p50, способного подавлять рост опухоли глиобластомы. Кроме того, избыток p50 снижает уровень p65, предполагая этим то, что гомодимер p50-p50 может регулировать транскрипцию вместо проопухолевого p50-p65. Анализ транскрипции показал повышенную экспрессию генов, связанных с подавлением опухоли [120]. Выявлены противоопухолевые эффекты повышенной экспрессии NFκB1 в клетках различных типов опухолей, но для меланомы литературных данных не обнаружено [54].

В исследовании [182] показано, что NFκB1 является эффекторным белком цитотоксического ответа на повреждения ДНК через метилирование. Алкилирование гуанина в положении O6 (O6MeG), является первичным цитотоксическим поражением, вызванным метилирующими агентами, например темозоломидом. При этом индуцируется цитотоксичность с помощью механизма, включающего систему репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR-mismatch repair) [198]. В мышинных эмбриональных фибробластах с диким типом (wt) и p65 - / - (MEF) темозоломид ингибирует активность NF-κB [229]. Однако в p50 - / - (nfkб1 - / -) MEF ингибирование NF-κB с помощью темозоломида ослабляется, как и ингибирование NF-κB связанным с SN1-метилатором, метилнитрозомочевинной. Это открытие повторно описано в клетках глиомы человека, которые подверглись siRNA-опосредованному нокдауну p65 или p50. Показано, что темозоломид блокирует как эндогенную, так и TNF-индуцированную активность NF-κB. Важно отметить, что повторная экспрессия p50 в p50 - / - MEF восстанавливает способность темозоломида ингибировать NF-κB [182].

Исследования с использованием мышей *nfkб1* - / - для понимания роли p105 и p50 в иммунитете выявили множественные дефекты как врожденного, так и адаптивного иммунного ответа на патогены [185]. Кроме того, у мышей с мутацией гена *NFκB1* наблюдали склонность к хроническим воспалительным заболеваниям и повышенную восприимчивость к бактериальным инфекциям [104]. Приведем небольшой пример значения NFκB1 в разрешении почечного воспаления. После индукции иммунной клубочковой травмы у крыс, в основном комплексы гетеродимера NF-κB p65 / p50 перемещаются в ядро, тогда как во время фазы разрешения преимущественно гомодимеры p50 могут быть обнаружены внутри клеточного ядра [156].

Относительно значения белка NFκB2 при онкологических заболеваниях данных литературы существенно меньше. При этом не показано какого-либо однозначного свойства этого белка в онкологии [230]. Есть данные, что в случае меланомы высокая экспрессия NFκB2 является благоприятным признаком [99].

Таким образом, для меланомы можно считать белок MyD88 проопухолевым, а белки NFκB1 и NFκB2 противоопухолевыми.

### **1.5. Блокирование PD-1 в терапии меланомы**

В последние годы значительное развитие получила иммунотерапия опухолей. Разрешены к применению или находятся на последних фазах клинических испытаний новые иммунотерапевтические препараты для лечения меланомы, в том числе блокаторы взаимодействия PD-1 с PD-L1/PD-L2 [10; 74]. Данные препараты показывают хорошие результаты по сравнению с традиционной химиотерапией [88; 207]. Было замечено, что их эффективность зависит от наличия или отсутствия молекулы PD-L1 в опухоли [159].

В нормальной физиологии система PD-L1 / PD-1 играет важную роль в ограничении активности Т-клеток в периферических тканях во время воспалительного ответа на инфекцию и ограничении аутоиммунных реакций. PD-1 обычно экспрессируется на Т- и В-клетках [161; 233]. PD-1 взаимодействует с двумя лигандами: PD-L1 (B7-H1, CD274) и PD-L2 (B7-DC, CD273), которые демонстрируют совершенно разные паттерны экспрессии. В норме PD-L1 (CD274) экспрессируется на многих популяциях иммунных клеток [208], тогда как экспрессия PD-L2 (CD273) бывает на небольшом уровне в дендритных клетках и альтернативно активированных макрофагах [128; 131; 214]. Экспрессия PD-L1 на уровне мРНК высока в нормальных человеческих органах, включая сердце, скелетные мышцы, плаценту и легкие [63]. В норме на уровне белка экспрессия PD-L1 либо не обнаруживается [64], либо по другим данным может присутствовать слабая экспрессия, которая повышается под действием воспаления [87; 113]. Относительно молекулы PD-1 при меланоме, обнаружено, что опухоль-инфильтрующие лимфоциты имеют более высокий уровень экспрессии PD-1 по сравнению с нормальными тканевыми инфильтратами Т-клеток или лимфоцитами периферической крови. При этом экспрессия PD-1 коррелировала с пониженной эффекторной функцией [24].



Интересно, что белок PD-L1 индуцируется в различных нелимфоидных клетках, включая эпителиальные [231] и эндотелиальные [168] в ответ на воспалительные цитокины, присутствующие в очаге заболевания. Например, в слизистой оболочке полости рта и коже пациентов с плоским лишаем (хроническое воспалительное кожное заболевание, характеризующееся сильной инфильтрацией Т-клеток под эпителием) была обнаружена существенная экспрессия PD-L1 в кератиноцитах, расположенных вблизи базальной мембраны. Экспрессия белка PD-L1 в первичных культивируемых кератиноцитах ротовой полости человека стимулировалась при культивировании с IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  или IL-1 $\beta$ . Из этих эффекторов IFN- $\gamma$  индуцировал экспрессию PD-L1 наиболее сильно [231]. Также, в экспериментальных условиях кожного воспаления PD-L1 экспрессируется в некоторых клетках микрососудов и кератиноцитах, но в здоровой коже не обнаруживается [138]. Экспрессия PD-L1 в эпителиальных клетках почечных канальцев детектируется у пациентов с почечными заболеваниями, такими как интерстициальный нефрит, волчаночный нефрит и IgA нефропатия. Экспрессия PD-L1 на этих клетках *in vitro* повышалась после стимуляции их IL-1 $\alpha$ , LPS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  или анти-CD40 антителами [49]. Таким образом, эпителиальная экспрессия PD-L1 индуцируется воспалительными стимулами как *in vitro*, так и *in vivo* [167]. В случае меланомы, также существует мнение, что воспаление усиливает экспрессию PD-L1 на клетках опухоли [204].

Возможно, иммунологические механизмы, индуцирующие экспрессию PD-L1, могут также быть связаны с лекарственной устойчивостью к химиотерапии. Есть данные, что в некоторых клеточных линиях меланомы человека повышалась экспрессия поверхностного PD-L1 после выработки резистентности к вемуруфенибу в процессе культивирования с препаратом [29; 106]. Также в исследованиях на клеточных линиях меланомы человека отмечена важность сигнальных белков MAPK и STAT3 в увеличении уровня экспрессии мРНК и белка PD-L1 при воздействии вемуруфениба [29; 106] и STAT3 в поддержании конститутивной экспрессии PD-L1 [129]. Можно отметить, что в экспериментах *in vitro* на линиях плоскоклеточного рака пищевода человека облучение

увеличивало поверхностную экспрессию PD-L1. Для плоскоклеточного рака пищевода лучевая терапия является хорошо налаженным лечебным воздействием и обеспечивает преимущества в выживаемости [47]. Если рассмотреть влияние химиопрепаратов на экспрессию PD-L1 на клетках опухоли, то их воздействие неоднозначно и скорее всего специфично для каждого конкретного препарата. В работах на экспериментальных моделях рака молочной железы паклитаксел, этопозид и 5-фторурацил повышали экспрессию PD-L1 [234], доксорубицин снижал экспрессию PD-L1 на клетках опухоли [82]. Если рассмотреть влияние экспрессии PD-L1 на результаты лечения с помощью химиотерапии пациентов с меланомой, то его экспрессия не являлась сильным прогностическим маркером [197]. J. Sheng и соавт. показали, что при раке легкого экспрессия PD-L1 имеет тенденцию к снижению на образцах опухоли после проведенной химиотерапии, для иммунных клеток микроокружения опухоли изменений экспрессии в PD-L1 не обнаружено [187]. Хотя, скорее всего все зависит от конкретного препарата. Для молекулы PD-L2 подобных литературных данных не найдено.

Несмотря на значительные успехи иммунотерапии, на сегодняшний день стандартным методом лечения пациентов с метастатической меланомой кожи без BRAF/cKIT-мутации остается химиотерапия [20].

Ряд исследований посвящен комбинации традиционной химиотерапии или таргетной терапии с иммунотерапией, в частности, изучается влияние химиопрепаратов на индукцию противоопухолевого иммунитета, что может помочь в выборе оптимального сочетания препаратов и в итоге улучшить клинический эффект [27; 86; 189].

В настоящее время многие комбинации иммунопрепаратов с химиопрепаратами находятся еще на доклинической стадии исследования. Часто не понятно, будет ли химиотерапия способствовать иммуногенности опухоли, или же, наоборот, окажет иммуносупрессивный эффект, который может нивелировать положительное воздействие иммунотерапии. Для большинства таких комбинаций требуются тщательные клинические исследования [91].

## **1.6. Заключение**

Таким образом, можно видеть, что опухолевые клетки меланомы обладают множеством защитных свойств. Причем эта защита как от лекарственного воздействия, так и от цитотоксических лимфоцитов. В связи с этим является актуальным поиск новых препаратов или улучшение характеристик старых. Способность липосомальной аранозы преодолевать лекарственную устойчивость в клеточных линиях заслуживает дополнительного изучения.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Материалы и оборудование

#### *Реактивы*

Среда RPMI-1640 без глутамин (ПанЭко, Россия);  
Сыворотка крови эмбриональная телячья (HyClone, США);  
Пенициллин (25000 Ед) – стрептомицин (25000 мкг) (ПанЭко, Россия);  
Аминокислоты для среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия);  
Витамины растворимые для среды RPMI-1640 (ПанЭко, Россия);  
Диметилсульфоксид (DMSO) (ПанЭко, Россия);  
L-глутамин стерильный (ПанЭко, Россия);  
HEPES 1M, pH=7,2 (ПанЭко, Россия);  
Пируват натрия 100x раствор, 11мг/мл (ПанЭко, Россия);  
Раствор Версена (ПанЭко, Россия);  
Раствор трипсина (ПанЭко, Россия);  
Физиологический раствор (ПанЭко, Россия);  
Фосфатно-солевой буфер (PBS) (pH=7,4) (ПанЭко, Россия);  
Формалин (Химмед, Россия);  
Спирт этиловый (Химмед, Россия);  
Смесь случайных гексамеров (Синтол, Россия);  
Праймеры (Евроген, Россия);  
Гуанидин-тиоционат (Sigma-Aldrich, США);  
Цитрат натрия (Sigma-Aldrich, США);  
Ацетат натрия (Sigma-Aldrich, США);  
Хлорид натрия (Химмед, Россия);  
N-лаурилсаркозил натрия (Sigma-Aldrich, США);  
β-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США);  
Фенол водонасыщенный (Химмед, Россия);  
Этилендиаминтетраацетат (EDTA) (ПанЭко, Россия);

Хлороформ (Химмед, Россия);  
Спирт изопропиловый (Химмед, Россия);  
Tris (Sigma-Aldrich, США);  
TRIzol (Sigma-Aldrich, США);  
Хлорид калия (KCl) (Химмед, Россия);  
Хлорид магния (MgCl<sub>2</sub>) (Химмед, Россия);  
Соляная кислота концентрированная (HCl) (Химмед, Россия);  
МТТ (3-(4,5-диметилтиазолин-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид) (Sigma, США);  
Taq ДНК-полимераза (Fermentas, США);  
Обратная транскриптаза RevertAid Reverse (Fermentas, США);  
6-луночные планшеты (SPL, США);  
96-луночные плоскодонные планшеты (SPL, США);  
Антитела к PD-L1 меченные FITC (Becton Dickinson, США);  
Антитела к PD-L2 меченные APC (Becton Dickinson, США);  
Центрифужные пробирки на 50 мл (SPL, США);  
Центрифужные пробирки на 15 мл (SPL, США);  
Пипетки 10 мл, стерильные, с фильтром, ИУ (Greiner, Франция);  
Флаконы культуральные 25 см<sup>2</sup>, стерильные, наклоненное горло (SPL, США);  
Пробирки для проточного цитофлуориметра (Becton Dickinson, США);  
Зонды для FISH-гибридизации (Kreatech, США);  
Набор для секвенирования BigDye Terminator 3.1v Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США);  
Набор для секвенирования BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems, США).

### ***Клеточные линии***

Исследования проводили на 19 клеточных линиях метастатической меланомы кожи человека из банка клеточных культур лаборатории экспериментальной диагностики и биотерапии опухолей НИИ ЭДнТО ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России [17]. Клеточные линии

различались по степени дифференцировки и наличию или отсутствию мутаций BRAF, NRAS (Табл. 1) [19; 22]. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, 10 мМ HEPES, 2 мМ L-глутамина, пенициллин (25 000 Ед) – стрептомицин (25 000 мкг), пируват натрия, 0,1 % раствор аминокислот и 0,1 % раствор витаминов при 37 °С в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> (полная среда). Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

**Таблица 1** – Характеристика клеточных линий меланомы (цитируется по [19])

| №  | Клеточная линия | Мутация BRAF | Мутация NRAS | Степень дифференцировки клеток |
|----|-----------------|--------------|--------------|--------------------------------|
| 1  | mel P           | V600E        | Wt           | умеренно                       |
| 2  | mel Kor         | Wt           | Q61K         | низко                          |
| 3  | mel Mtp         | Wt           | Q61K         | низко                          |
| 4  | mel Il          | V600E        | Wt           | умеренно                       |
| 5  | mel Is          | V600E        | Wt           | низко                          |
| 6  | mel Si          | L597Q        | Wt           | высоко                         |
| 7  | mel Me          | Wt           | Q61K         | высоко                         |
| 8  | mel Gus         | Wt           | Q61K         | низко                          |
| 9  | mel Z           | V600E        | Wt           | умеренно                       |
| 10 | mel Ksen        | V600E        | Wt           | умеренно                       |
| 11 | mel Hn          | V600E        | Wt           | умеренно                       |
| 12 | mel Gi          | V600E        | Wt           | низко                          |
| 13 | mel Ibr         | V600E        | Wt           | низко                          |
| 14 | mel R           | V600E        | Wt           | умеренно                       |
| 15 | mel Rac         | Wt           | Q61R         | низко                          |
| 16 | mel Ch          | V600E        | Wt           | низко                          |
| 17 | mel Bgf         | V600E        | Wt           | умеренно                       |

|    |          |       |    |       |
|----|----------|-------|----|-------|
| 18 | mel H    | V600E | Wt | низко |
| 19 | mel Cher | V600E | Wt | низко |

### **Противоопухолевые препараты**

**Противоопухолевые препараты.** «Араноза, лиофилизат для приготовления раствора для инъекций, 500 мг» (араноза-лио), производства филиала «Наукопрофи» ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (табл. 2).

**Таблица 2** – Состав аранозы, лиофилизата для приготовления раствора для инъекций, на 1 флакон

| <b>Компонент</b>                                  | <b>Количество, г</b> |
|---|----------------------|
| Араноза субстанция                                | 0,5                  |
| Поливинилпирролидон низкомолекулярный медицинский | 0,5                  |
| Кислота сорбиновая                                | 0,004                |

«Липосомальная» лекарственная форма аранозы (липосомальная араноза), предоставленная лабораторией разработки лекарственных форм НИИ ЭДиТО ФГБУ НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (табл. 3). Кроме лекарственных форм аранозы исследовали воздействие на клетки пустых липосом, того же состава и концентрации, которые использовались для липосомальной аранозы.

**Таблица 3** – Состав липосомальной лекарственной формы аранозы на 1 флакон

| <b>Компонент</b>   | <b>Количество, г</b> |
|--------------------|----------------------|
| Фосфатидилхолин    | 1,0                  |
| Холестерин         | 0,1                  |
| ФЭ-ПЭГ-2000        | 0,05                 |
| Араноза субстанция | 0,2                  |
| Сорбиновая кислота | 0,008                |

## **Оборудование**

Проточный цитофлуориметр FACSCanto II (Becton Dickinson, США);  
Ламинар Purifier class II biosafety cabinet delta series (Labconco, США);  
CO<sub>2</sub>-инкубатор NU-4750E (NuAire, США);  
Шейкер S 3.02 (ELMI, Латвия);  
Холодильник с морозильной камерой на -20 °С (Daewoo, Китай);  
Морозильник на -80 °С Jouan VX570S (Thermo electron corporation, США);  
Микроцентрифуга Combi-spin FVL-2400N (Biosan, Германия);  
Лабораторная центрифуга (Sorvall LEGEND XTR, Германия);  
Инвертированный микроскоп (Leica, Германия);  
Флуоресцентный микроскоп Axio Scope A1 (Zeiss, Германия);  
МТТ-анализатор Multiskan EX (Thermo LabSystems, США);  
Амплификатор «Терцик» (Россия);  
Спектрофотометр SmartSpec Plus (Bio-Rad, США);  
Плита нагревательная ES-NA3040 (ЭКРОС, Россия);  
Термостат ТС-1/20 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия);  
Прибор для постановки ПЦР DTLite, (ДНК-технология, Россия);  
Анализатор ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. Изучение цитотоксического действия препаратов**

#### **методом МТТ-тест**

Для оценки цитотоксической активности использовали МТТ-тест, впервые предложенный Т. Мосманном [147].

МТТ-тест основан на восстановлении желтой соли тетразолия (3-(4,5-диметилтиазолин-2)-2,5-дифенилтетразолий бромид – МТТ) митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием фиолетовых кристаллов формазана, нерастворимых в воде. Количество образовавшегося формазана



зависит от количества живых клеток. Кристаллы формазана растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО) и интенсивность окрашивания раствора определяют спектрофотометрически. Цитотоксический эффект характеризует  $ИК_{50}$  – концентрация вещества, вызывающая гибель 50% клеток.

Исследование проводили на клеточных линиях диссеминированной меланомы человека. Клетки снимали раствором Версена, отмывали от него полной средой и рассаживали в 96-луночные плоскодонные планшеты (SPL, США) по  $7 \times 10^3$  клеток в 180 мкл полной среды RPMI-1640 на лунку. Далее клетки помещали в термостат при  $37^\circ \text{C}$  в атмосфере 5%  $\text{CO}_2$ .

Через 24 ч в лунки с клетками добавляли по 20 мкл исследуемых препаратов в выбранных концентрациях. Клетки инкубировали с препаратами в течение 24 ч при  $37^\circ \text{C}$  и 5%  $\text{CO}_2$ . После инкубации в каждую лунку вносили по 20 мкл раствора МТТ (1 мг/мл в PBS с  $\text{pH}=7,4$ ; Sigma, Chemical Co, США) и оставляли еще на 4 ч при  $37^\circ \text{C}$  при 5%  $\text{CO}_2$ . По окончании инкубации планшеты центрифугировали, отбирали супернатант и вносили в лунки по 150 мкл диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия) для растворения кристаллов формазана, после чего планшеты аккуратно встряхивали на шейкере для равномерного распределения раствора формазана. Оптическую плотность раствора формазана определяли на фотометрическом анализаторе иммуноферментных реакций Multiskan EX (Thermo Labsystems) при длине волны 540 нм. Величина поглощения прямо пропорциональна числу живых клеток. Цитотоксичность (Ц) оценивали по формуле:

$$\text{Ц} = (1 - \text{Oo} / \text{Ok}) * 100,$$

где  $\text{Ok}$  – оптическая плотность в контрольных лунках,  $\text{Oo}$  – оптическая плотность в опытных лунках. Вычисления проводились в программе MS Excel.

### **2.2.2. Подготовка клеточного материала и выделение общей РНК**

Клетки снимали с культуральных флаконов 0,02% раствором Версена, объемом 2 мл, содержащим 0,25 трипсина. Клетки находились в трипсине 2 мин при постоянном наблюдении за их состоянием с помощью микроскопа.

Добавляли 10 мл буфера STE (0,1 М NaCl, 1 М трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА) и центрифугировали в течение 5 мин при 800 об/мин. Удаляли супернатант, а клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл физиологического раствора и центрифугировали в течение 5 мин при 1200 об/мин. Из полученного осадка клеток далее выделяли РНК.

Выделение РНК из предварительно обработанных образцов производилось по протоколу, предложенному P. Chomczynski и N. Sacchi [50]. Подготовленный клеточный материал лизировали в 0,5 мл гуанидин-тиоционатного буфера (4 М тиоционата гуанидина, 25 мМ цитрата натрия, 0,5 М N-лаурил-саркозината натрия и 0,1 М меркаптоэтанола). Во время лизиса материал пропускали через иглу 19G не менее 20 раз. Далее в пробирку добавляли 0,5 мл водонасыщенного фенола (pH 5,2) и 0,125 мл раствора ацетата натрия (pH 4,2), встряхивали и добавляли 0,25 мл хлороформа. Полученную смесь встряхивали до молочно-белого цвета и центрифугировали в течение 10 мин при 12 000 об/мин и охлаждении до 4 °С. После центрифугирования отбирали 0,65 мл верхней водной фазы, содержащей клеточную РНК, и смешивали с 0,65 мл изопропанола. Инкубирование РНК в изопропанолу проводилось в течение 20 ч при температуре -20 °С. После инкубирования РНК осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 12 000 об/мин, удаляли супернатант и 2 раза промывали в 80 % этаноле. После промывок осадок РНК высушивали в термостате в течение 20 мин при 37 °С, растворяли в 20 мкл деионизированной воды и измеряли концентрацию раствора. Концентрация РНК определялась с помощью спектрофотометра SmartSpec Plus (Bio-Rad, США), для чего делались 67-кратные разведения исходной РНК в дистиллированной воде. Для синтеза кДНК брали 2 мкг РНК. Сохранность и качество выделенной РНК определялось по эффективности её конвертации в кДНК, установленной путём определения уровня экспрессии контрольного гена *ABL*. В случае, если экспрессия гена *ABL* детектировалась до тридцатого цикла ПЦР, образец считался информативным. Если детекция происходила на более поздних циклах, образец считался неинформативным. Для синтеза кДНК с использованием ревертазы брали 2 мкг матричной РНК,

выделенной на предыдущем этапе. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием фермента RevertAid Reverse и коммерческого набора реактивов (Fermentas, США) в условиях, предложенных фирмой-производителем. Для отжига использовали смесь случайных гексамеров («Синтол», Россия). В качестве отрицательного контроля использовали рабочую смесь без добавления РНК. Пробу доводили до конечного объема 165 мкл деионизованной водой.

### 2.2.3. Количественная полимеразно-цепная реакция в реальном времени и определение уровня экспрессии мРНК

Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием двукратной реакционной смеси (40 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM каждого из четырех дезоксирибонуклеотидов и 0,2 mM β-меркаптоэтанола) и Taq ДНК-полимеразы (Fermentas, США). В каждую пробу было добавлено 5 мкл кДНК, 250 нМ прямого, 250 нМ обратного праймера и 140 нМ флуоресцентного зонда. Подбор праймеров и флуоресцентных зондов проводили с использованием программы Vector NTI 10 на основе данных нуклеотидных последовательностей генов *TP53*, *MDM2*, *NFκB1*, *NFκB2*, *MyD88*, *PD-L1* и *PD-L2*, доступных на интернет-ресурсе <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> (табл. 4). В каждом образце был исследован уровень экспрессии анализируемых генов. Уровень экспрессии рассчитывали количественно относительно уровня экспрессии гена *ABL*.

**Таблица 4** – Праймеры, зонды и последовательности нуклеотидов

| Праймеры и зонды | Последовательности нуклеотидов          |
|------------------|---|
| TP53-QR          | CGCACCTCAAAGCTGTTCCG                    |
| TP53-QF          | GCATGAACCGGAGGCCCATC                    |
| TP53probe        | R6G-CTGGAAGACTCCAGTGGTAATCTACTGGGA-BHQ1 |
| MDM2-QR          | GTGCACCAACAGACTTTAATAACTTCA             |
| MDM2-QF          | TGTAACCACCTCACAGATTCCAGCTT              |
| MDM2probe        | R6G-AACAAGAGACCCTGGTTAGACCAAAGCCA-BHQ1  |
| NFKB1-QR         | AATTGGGCATGAGCTTCTGA                    |

|            |   |
|------------|---|
| NFKB1-QF   | TGGAAACTAGTGAACCAAAACCTT                |
| NFKB1probe | R6G-CCTGAAATCAAAGATAAAGAAGAAGTGCA-BHQ1  |
| NFKB2-QR   | ATCCAGGCACTCAGGGCTTC                    |
| NFKB2-QF   | CTGTGCCCCAGCTGTTGCAT                    |
| NFKB2probe | R6G-CCTGACTTTGAGGGACTGTATCCAGTACA-BHQ1  |
| MYD88-QR   | CCT TGT ACT TGA TGG GGA TCA G           |
| MYD88-QF   | AAT GTG ACT TCC AGA CCA AAT TTG C       |
| MYD88probe | R6G-CTCAGCCTCTCTCCAGGTGCCCATCAGAAG-BHQ1 |
| PDL1 QR    | TCCACAACCAAAATTCTTTG                    |
| PDL1 QF    | TGCCGACTACAAGCGAATTA                    |
| PDL2 QR    | CCTTTAGGATGTGAGTGTTT                    |
| PDL2 QF    | CTGGGACTACAAGTACCTGA                    |

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

Для детекции флуоресценции был выбран канал Hex. Измерения велись по общепризнанной методике относительно гена *ABL*, уровень экспрессии которого был принят за 100 % [145]. Измерения уровня экспрессии проводились в трёх независимых повторах, после чего для анализа было рассчитано среднее значение. В качестве положительного контроля использовали векторы pET-15b, экспрессирующие клонированные геномные последовательности. Правильность синтезированных олигонуклеотидных последовательностей подтверждена секвенированием по Сэнгеру на анализаторе ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

#### 2.2.4. FISH-гибридизация

Для постановки FISH-гибридизации применялись зонды ONp53(17p13)/SE17 (Kreatech), согласно инструкции производителя ([http://man\\_kbi\\_kreatech\\_fish\\_probes\\_d7.0/](http://man_kbi_kreatech_fish_probes_d7.0/)).

Клетки предварительно помещали в гипотонический раствор 0,075М KCl на 20 мин при 37° С. Далее клетки фиксировались в свежем растворе уксусной кислоты (1 часть) и метанола (3 части). Фиксированные клетки раскапывались на предметные стекла, которые далее высыхали.

*Предварительная обработка.* Выдерживали стекла в течение 10 мин при 80° С, затем остужали их при комнатной температуре. Далее помещали стекла в свежеприготовленную 70 % уксусную кислоту (в деионизованной H<sub>2</sub>O), инкубировали 1 мин при комнатной температуре. Помещали стекла в 1 x PBS, рН7.4, инкубировали 30 сек. Помещали стекла в 1 x PBS, рН7.4 и инкубировали 5 мин. Обезвоживали стекла с помощью помещения их в растворы этанола (70%, 80%, 100%) на 1 мин каждый.

*Нанесение зонда.* Наносили 10µl зонда на площадь 22x22 мм. Накладывались покровные стекла, которые заклеивались Fixogum(LK-071A). Далее образец помещали на термоплитку ES-NA3040 (ЭКРОС, Россия) на 5 мин при 75°С. После оставляли образец на ночь при 37°С в термостате ТС-1/20 СПУ (Смоленское СКТБ СПУ, Россия).

*После гибридизации.* Предварительно разогревали Wash Buffer I (LK-102A) до 72° С. Удаляли со стекла Fixogum(LK-071A). Помещали стекла в 200 мл предварительно нагретый Wash Buffer I (LK-102A) и инкубировали в течение 2 мин при 72° С без перемешивания. Помещали стекла в 200 мл свежего Wash Buffer II (LK-103A), инкубировали в течение 1 мин при комнатной температуре без перемешивания. Обезвоживали стекла в 70%, 85% и 100% этаноле, инкубируя в каждом случае в течение 1 мин при комнатной температуре. Наносили 15µl DAPI (LK-095A) и накладывали сверху покровное стекло. Держали стекла в темноте 10-15 минут и далее приступали к микроскопии.

### 2.2.5. Секвенирование по Сенгеру

Секвенирование экзонов гена *TP53* проводили с использованием набора реактивов BigDye Terminator 3.1v Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) с учетом рекомендаций производителя. Для проведения секвенирующей реакции в прямом направлении использовали праймеры:

Праймеры для секвенирования экзонов 5 и 6 - 5-6F TGTTCACCTTGTGCCCTGACT и 5-6R GGAGGGCCACTGACAACCA

Праймеры для секвенирования экзона 7 - 7F ACTGGCCTCATCTTGGGCCT и 7R GTCAGAGGCAAGCAGAGGCT

Праймеры для секвенирования экзона 8 - 8F TAAATGGGACAGGTAGGACC и 8R TCCACCGCTTCTTGTCTCTGC.

После проведения секвенирующих реакций продукты ПЦР очищали при помощи набора BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). Продукты секвенирующей реакции разделяли и анализировали с использованием генетического анализатора ABI PRISM 310 (Applied Biosystems).

### 2.2.6. Реакция иммунофлуоресценции

После 24 ч инкубации с исследуемыми препаратами клетки снимали с культуральных флаконов раствором Версена и 2 раза отмывали PBS. Разносили в пробирки по 50 мкл (300 тыс. клеток) и добавляли по 20 мкл антител к PD-L1 (CD274FITC, 558065, BD Pharmingen™) и к PD-L2 (CD273APC, 557926, BD Pharmingen™). Инкубировали в течение 30 минут, после чего дважды отмывали в PBS. Подсчет проводили на проточном цитофлуориметре FACSCantoII, с использованием программного обеспечения FACSDiva (Bekton Dikenson).

## 2.3. Статистическая обработка результатов

Для статистического анализа данных использовались непараметрические критерии. Для сравнения уровня экспрессии генов *TP53*, *MDM2*, *MyD-88*, *NFkB1*, *NFkB2*, *PD-L1* и *PD-L2* в клетках меланомы при воздействии различных лекарственных форм аранозы использовался критерий Уилкоксона, в том случае

если выборка была более 5. В иных расчетах применялся критерий Манна-Уитни. Для статистического анализа данных FISH-исследования, брались значения превышающие 5%, так как меньшие значения делеций могут быть ложноположительными. Для анализа и построения графиков применялась программа STATISTICA v.7. Различия считали достоверными при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Определение ИК50 исследуемых препаратов

С помощью МТТ-теста определили чувствительность клеточных линий метастатической меланомы к двум лекарственным формам аранозы. Клеточные линии имели разную чувствительность к исследуемым препаратам. Все клеточные линии были более чувствительны к липосомальной аранозе, чем к аранозе-лио  $p=0,0002$  (табл. 5).

### 3.2. Мутационный статус *TP53* в клеточных линиях метастатической меланомы человека

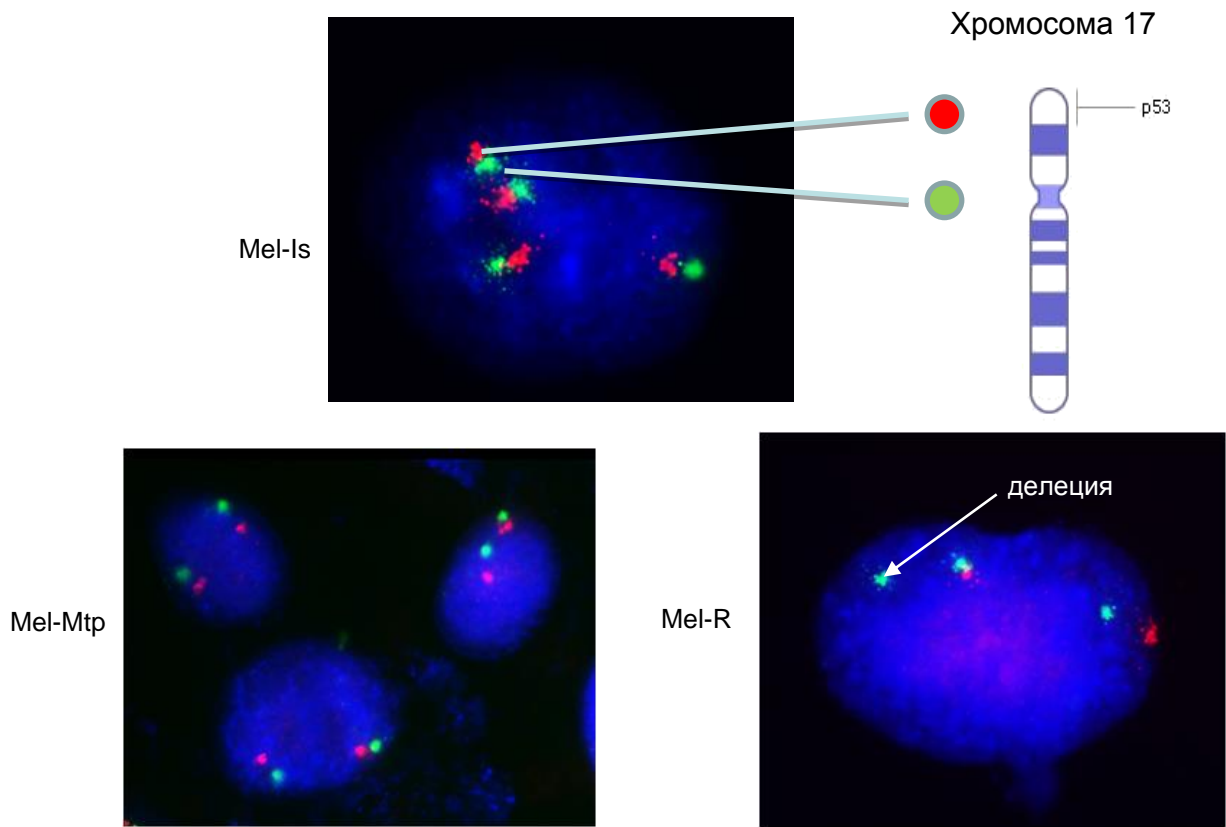
Методом Fish-гибридизации изучили состояние короткого плеча 17-й хромосомы, кодирующей белок p53 (рис. 2). Оказалось, что практически все клеточные линии были неоднородны по наличию делеций короткого плеча 17-й хромосомы (табл. 6). В пределах одной клеточной линии были как нормальные клетки, так и клетки с трисомией, тетрасомией 17-й хромосомы. Часто встречались более сложные нарушения. Ряд клеточных линий имели делеции *TP53*.

**Таблица 5** – ИК50 аранозы-лио и липосомальной аранозы на клеточных линиях метастатической меланомы

| № | Клеточные линии | Концентрация аранозы при достижении ИК50, мкг/мл |                       | Индекс устойчивости ИК50 Ар.-лио /ИК50 Лип-ой ар. |
|---|-----------------|--|-----------------------|---|
|   |                 | Араноза-лио                                      | Липосомальная араноза |   |
| 1 | mel Kor         | 500  | 225                   | 2,2   |
| 2 | mel Z           | 800  | 450                   | 1,8   |
| 3 | mel P           | 1000   | 750                   | 1,3   |
| 4 | mel Rac         | 1250   | 600                   | 2,1   |
| 5 | mel Ch          | 1300   | 800                   | 1,6   |



|    |          |      |     |     |
|----|----------|------|-----|-----|
| 6  | mel Is   | 1300 | 650 | 2   |
| 7  | mel Si   | 1350 | 700 | 1,9 |
| 8  | mel Hn   | 1500 | 900 | 1,7 |
| 9  | mel R    | 1500 | 850 | 1,8 |
| 10 | mel Gi   | 1550 | 900 | 1,7 |
| 11 | mel H    | 1800 | 900 | 2   |
| 12 | mel Il   | 1900 | 900 | 2,1 |
| 13 | mel Ibr  | 2000 | 750 | 2,7 |
| 14 | mel Mtp  | 2000 | 900 | 2,2 |
| 15 | mel Gus  | 2000 | 800 | 2,5 |
| 16 | mel Me   | 2000 | 900 | 2,2 |
| 17 | mel Ksen | 2000 | 750 | 2,7 |
| 18 | mel Bgf  | 2000 | 900 | 2,2 |



**Рисунок 2** – Оценка состояния короткого плеча 17-й хромосомы. Применялись флуоресцентные зонды. Зеленый связывается с центромерой 17-й хромосомы, показывает наличие 17-й хромосомы и их количество в клетке. Красный зонд связывается с коротким плечом 17-й хромосомы (захватывая участок несущий ген *TP53*), его отсутствие говорит о наличии делеции.

**Таблица 6** – Мутационный статус *TP53* в клеточных линиях метастатической меланомы

| Клеточные линии | Мутационный статус <i>TP53</i>   |
|-----------------|--|
| mel R           | В 50 % клеток обнаружена трисомия хромосомы 17 с делецией гена <i>TP53</i> на одной из хромосом. В 25 % клеток обнаружена тетрасомия хромосомы 17 с делецией гена <i>TP53</i> на двух из хромосом. 15 нормальных клеток. В 6 % клеток обнаружена гексосомия хромосомы 17 с делецией гена <i>TP53</i> на 2 из хромосом. В 4 % клеток обнаружено разное сочетание количественных изменений хромосомы 17 и делеций гена <i>TP53</i> . |

|          |  |
|----------|--|
| mel Bgf  | В 44 % клеток обнаружена тетросомия хромосомы 17 с делецией гена <i>TP53</i> на двух из хромосом. В 21 % клеток выявлена трисомия хромосомы 17 с делецией гена <i>TP53</i> на одной из хромосом. 12 % нормальных клеток. В 8 % клеток обнаружена гексосомия хромосомы 17 с делецией гена <i>TP53</i> на 2 из хромосом. В 6 % обнаружена тетросомия хромосомы 17. В 4 выявлена октосомия хромосомы 17 с делецией гена <i>TP53</i> на 4 из хромосом. В 3 % клеток обнаружено разное сочетание количественных изменений хромосомы 17 и делеции гена <i>TP53</i> . |
| mel Kor  | В 60 % клеток выявлена тетросомия хромосомы 17, в 30 % – трисомия хромосомы 17.  |
| mel Hn   | В 85 % клеток выявлена трисомия хромосомы 17.  |
| mel Gi   | В 80 % клеток обнаружена трисомия хромосомы 17.  |
| mel Gus  | В 3 % клеток обнаружена делеция гена <i>TP53</i> . В 2 % клеток трисомия хромосомы 17.   |
| mel Rac  | В 90 % клеток выявлена трисомия хромосомы 17. Остальное норма.   |
| mel IL   | В 40 % выявлена тетросомия с делецией гена <i>TP53</i> в 2 из хромосом 17. В 40 % выявлена трисомия с делецией гена <i>TP53</i> на одной из хромосом 17.   |
| mel Ibr  | В 87 % клеток выявлена тетросомия хромосомы 17. В 9 % клеток трисомия хромосомы 17.  |
| mel Cher | В 65 % клеток – тетросомия хромосомы 17. В 5 % клеток – гексосомия хромосомы 17.   |
| mel H    | В 60 % клеток обнаружена тетросомия хромосомы 17 с делецией гена <i>TP53</i> на 2 хромосомах из четырех. В 37 % трисомия хромосомы 17 с делецией гена <i>TP53</i> на одной из хромосом.  |
| mel Is   | 80 % тетрасомия, 15 % - трисомия хромосомы 17.   |
| mel Me   | 70 % тетрасомия, 15 % трисомия, 4 % трисомия хромосомы 17 с делецией гена <i>TP53</i> на одной из трех хромосом.   |
| mel Mtp  | 90 % норма, 7 % трисомия, 2 % дисомия с делецией гена <i>TP53</i> на одной из двух хромосом, 1 тетрасомия.   |
| mel Si   | 65 % трисомия, 25 % норма, 4 % трисомия с делецией гена <i>TP53</i> на одной хромосоме, 5 % пентасомия, 1 % дисомия с делецией гена на одной хромосоме.  |

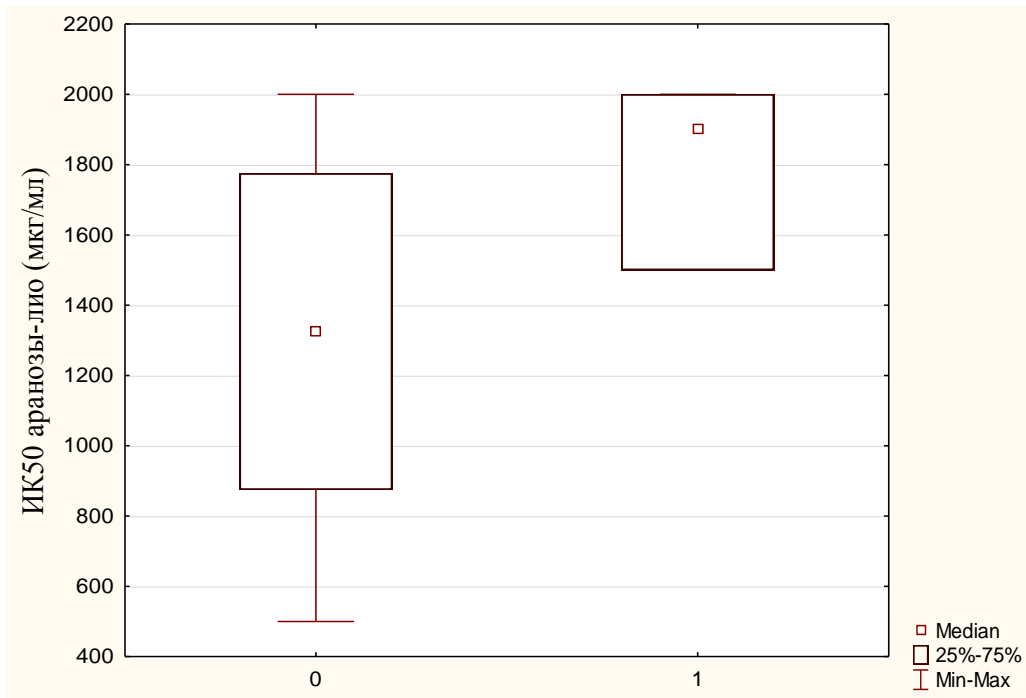
Также методом секвенирования по Сенгеру изучили наличие точечных мутаций *TP53* в клеточных линиях метастатической меланомы и обнаружили наличие мутаций только в двух линиях mel Hn и mel Ibr (табл. 7). С помощью критерия Манна-Уитни был проведен поиск связи между значением ИК50 препаратов и наличием генетических изменений в клеточных линиях (рис. 3, 4). Не обнаружено статистически значимой связи наличия делеций *TP53* и значения ИК50 для аранозы-лио ( $p=0,0869$ ) и липосомальной аранозы ( $p=0,5022$ ) (табл. 8). Не обнаружено связи ИК50 аранозы-лио с наличием мутаций в генах *BRAF* ( $p=0,8$ ), *NRAS* ( $p=0,8$ ) [19] и *TP53* ( $p=0,4642$ ). Не обнаружено связи ИК50 липосомальной аранозы с наличием мутаций в генах *BRAF* ( $p=1$ ), *NRAS* ( $p=1$ ) и *TP53* ( $p=0,6084$ ).

**Таблица 7** – Точечные мутации в клеточных линиях меланомы человека

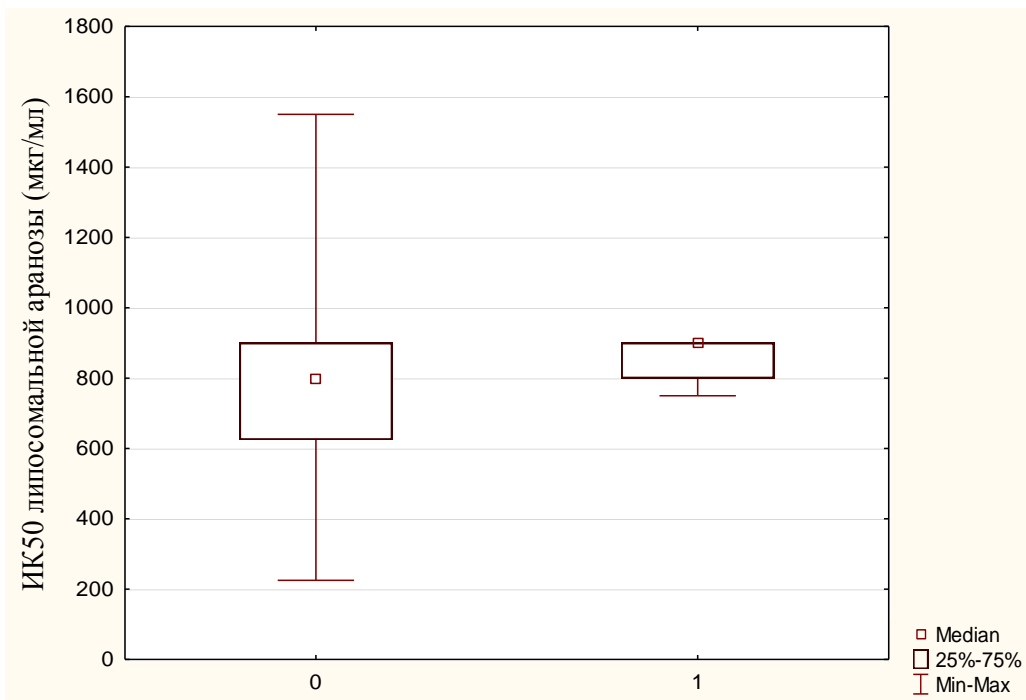
| Клеточная линия | Наличие точечных мутаций в гене <i>TP53</i>                       |
|-----------------|---|
| mel Hn          | с.451С>Т 47 р.Пролин151Серин<br>с.722С>Т 38 р.Серин240Фенилаланин |
| mel Ibr         | с.512А>С 15 р.Глутамин171Аланин                                   |
| mel Rac         | Отсутствие  |
| mel Kor         | Отсутствие  |
| mel Gi          | Отсутствие  |
| mel Is          | Отсутствие  |
| mel Gus         | Отсутствие  |
| mel Ch          | Отсутствие  |
| mel Il          | Отсутствие  |

**Таблица 8** – ИК50 аранозы и экспрессия *TP53* в клеточных линиях метастатической меланомы

| Клеточные линии | ИК50 аранозы-лио, мкг/мл | ИК50 липосомальной аранозы, мкг/мл | Наличие мутации ДНК-связывающего домена | Процент клеток с делециями локуса гена <i>TP53</i> от общей популяции |
|-----------------|--------------------------|------------------------------------|---|---|
| mel Kor         | 500                      | 225                                | отсутствие                              | 0   |
| mel Rac         | 1250                     | 600                                | отсутствие                              | 0   |
| mel Is          | 1300                     | 650                                | отсутствие                              | 0   |
| mel Si          | 1350                     | 700                                | не определено                           | 0   |
| mel Hn          | 1500                     | 900                                | +                                       | 85  |
| mel R           | 1500                     | 850                                | не определено                           | 50  |
| mel Gi          | 1550                     | 900                                | отсутствие                              | 0   |
| mel H           | 1800                     | 900                                | не определено                           | 33  |
| mel Il          | 1900                     | 900                                | отсутствие                              | 50  |
| mel Ibr         | 2000                     | 750                                | +                                       | 15  |
| mel Me          | 2000                     | 900                                | не определено                           | 0   |
| mel Mtp         | 2000                     | 900                                | не определено                           | 0   |
| mel Gus         | 2000                     | 800                                | отсутствие                              | 0   |
| mel Bgf         | 2000                     | 900                                | не определено                           | 50  |



**Рисунок 3** – Сравнение ИК50 аранозы-лио для клеток с делециями – 1 и клеток без делеций – 0. Median – медиана.



**Рисунок 4** – Сравнение ИК50 липосомальной аранозы для клеток с делециями – 1 и клеток без делеций – 0. Median – медиана.

### 3.3. Изменение уровня экспрессии мРНК *TP53* и *MDM2* в клеточных линиях метастатической меланомы после воздействия лекарственных форм аранозы

Перед изучением уровня экспрессии мРНК клеточные линии инкубировали 24 ч с исследуемыми препаратами: аранозой-лио (ИК<sub>50</sub>), липосомальной аранозой (ИК<sub>50</sub>), пустыми липосомами (< ИК<sub>10</sub>), в качестве контроля использовали необработанные клетки (табл. 9).

**Таблица 9** – Экспрессия мРНК генов *MDM2*, *MyD88*, *NFkB1*, *NFkB2*, *TP53* в линиях меланомы, % относительно экспрессии гена *ABL*. ЛА - липосомальная араноза, ПЛ - пустые липосомы.

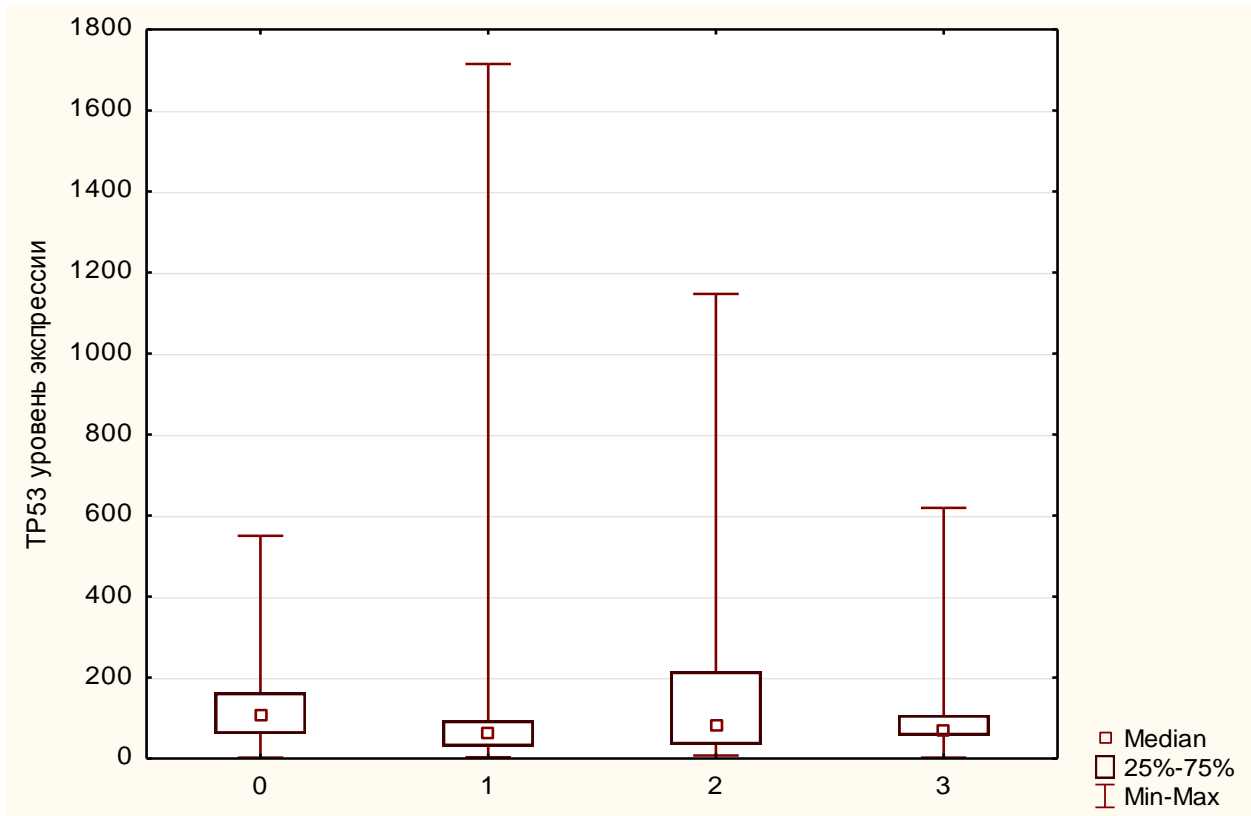
| № | Название | Воздействи<br>е | MDM2    | MYD<br>88 | NFkB1  | NFkB2  | TP53   |
|---|----------|-----------------|---------|-----------|--------|--------|--------|
| 1 | mel BGF  | Контроль        | 23,33   | 20,31     | 25,00  | 25,00  | 2,37   |
|   |          | Араноза         | 186,61  | 70,71     | 40,61  | 75,79  | 3,35   |
|   |          | ЛА              | 70,71   | 57,43     | 53,59  | 26,79  | 7,69   |
|   |          | ПЛ              | 65,98   | 43,53     | 32,99  | 30,78  | 2,21   |
| 2 | mel Cher | Контроль        | 40,61   | 53,59     | 15,39  | 46,65  | 16,49  |
|   |          | Араноза         | 373,21  | 263,90    | 50,00  | 162,45 | 61,56  |
|   |          | ЛА              | 324,90  | 174,11    | 107,18 | 114,87 | 35,36  |
|   |          | ПЛ              | 1212,57 | 200,00    | 87,06  | 141,42 | 70,71  |
| 3 | mel Gus  | Контроль        | 324,90  | 107,18    | 28,72  | 46,65  | 61,56  |
|   |          | Араноза         | 3939,66 | 246,23    | 53,59  | 70,71  | 100,00 |
|   |          | ЛА              | 606,29  | 200,00    | 12,50  | 23,33  | 37,89  |
|   |          | ПЛ              | 984,92  | 141,42    | 43,53  | 65,98  | 81,23  |
| 4 | mel H    | Контроль        | 114,87  | 123,11    | 81,23  | 81,23  | 107,18 |
|   |          | Араноза         | 400,00  | 75,79     | 14,36  | 40,61  | 16,49  |
|   |          | ЛА              | 1212,57 | 282,84    | 107,18 | 141,42 | 214,35 |
|   |          | ПЛ              | 696,44  | 75,79     | 26,79  | 282,84 | 141,42 |
| 5 | mel Hn   | Контроль        | 282,84  | 141,42    | 123,11 | 282,84 | 246,23 |

|           |                |          |              |        |         |        |         |
|-----------|----------------|----------|--------------|--------|---------|--------|---------|
|           |                | Араноза  | 400,00       | 162,45 | 12,50   | 32,99  | 30,78   |
|           |                | ЛА       | 282,84       | 131,95 | 16,49   | 75,79  | 107,18  |
|           |                | ПЛ       | 1714,84      | 87,06  | 13,40   | 35,36  | 46,65   |
| <b>6</b>  | <b>mel Ibr</b> | Контроль | 373,21       | 53,59  | 87,06   | 53,59  | 214,35  |
|           |                | Араноза  | 11942,8<br>2 | 282,84 | 100,00  | 282,84 | 1714,84 |
|           |                | ЛА       | 5971,41      | 93,30  | 2425,15 | 114,87 | 373,21  |
|           |                | ПЛ       | 1212,57      | 492,46 | 214,35  | 141,42 | 229,74  |
| <b>7</b>  | <b>mel II</b>  | Контроль | 107,18       | 81,23  | 93,30   | 107,18 | 100,00  |
|           |                | Араноза  | 606,29       | 107,18 | 75,79   | 70,71  | 53,59   |
|           |                | ЛА       | 857,42       | 141,42 | 246,23  | 70,71  | 324,90  |
|           |                | ПЛ       | 1055,61      | 100,00 | 131,95  | 114,87 | 107,18  |
| <b>8</b>  | <b>mel Is</b>  | Контроль | 263,90       | 40,61  | 43,53   | 75,79  | 162,45  |
|           |                | Араноза  | 984,92       | 16,49  | 46,65   | 17,68  | 35,36   |
|           |                | ЛА       | 107,18       | 14,36  | 7,18    | 4,42   | 17,68   |
|           |                | ПЛ       | 428,71       | 43,53  | 93,30   | 43,53  | 75,79   |
| <b>9</b>  | <b>mel Me</b>  | Контроль | 246,23       | 93,30  | 25,00   | 17,68  | 131,95  |
|           |                | Араноза  | 984,92       | 40,61  | 43,53   | 46,65  | 93,30   |
|           |                | ЛА       | 186,61       | 75,79  | 57,43   | 107,18 | 81,23   |
|           |                | ПЛ       | 324,90       | 46,65  | 61,56   | 43,53  | 65,98   |
| <b>10</b> | <b>mel Mtp</b> | Контроль | 373,21       | 2,06   | 87,06   | 162,45 | 100,00  |
|           |                | Араноза  | 1837,92      | 4,12   | 87,06   | 114,87 | 65,98   |
|           |                | ЛА       | 606,29       | 5,44   | 46,65   | 37,89  | 53,59   |
|           |                | ПЛ       | 428,71       | 1,67   | 81,23   | 107,18 | 61,56   |
| <b>11</b> | <b>mel-R</b>   | Контроль | 275,00       | 137    | 94,00   | 57,00  | 7,00    |
|           |                | Араноза  | 184,00       | 98     | 66,00   | 70,00  | 7,00    |
|           |                | ЛА       | 453,00       | 711    | 202,00  | 293,00 | 24,00   |
|           |                | ПЛ       | 158,00       | 42     | 53,00   | 80,00  | 5,00    |

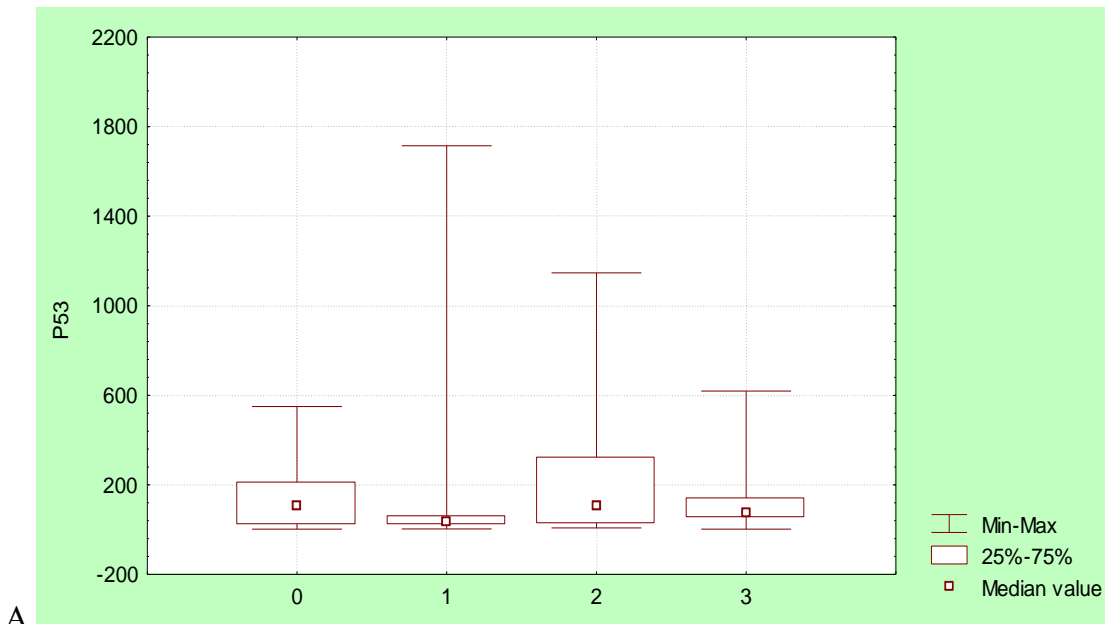


|           |                |          |         |        |        |        |         |
|-----------|----------------|----------|---------|--------|--------|--------|---------|
| <b>12</b> | <b>mel-Ch</b>  | Контроль | 2550,00 | 233    | 346,00 | 147,00 | 550,00  |
|           |                | Араноза  | 4621,00 | 235    | 243,00 | 88,00  | 510,00  |
|           |                | ЛА       | 2825,00 | 632    | 291,00 | 289,00 | 1147,00 |
|           |                | ПЛ       | 2111,00 | 312    | 237,00 | 110,00 | 619,00  |
| <b>13</b> | <b>mel Kor</b> | Контроль | 459,48  | 23,33  | 50,00  | 100,00 | 107,18  |
|           |                | Араноза  | 1969,83 | 746,43 | 40,61  | 114,87 | 87,06   |
|           |                | ЛА       | 1299,60 | 28,72  | 87,06  | 70,71  | 114,87  |
|           |                | ПЛ       | 1212,57 | 12,50  | 50,00  | 57,43  | 57,43   |

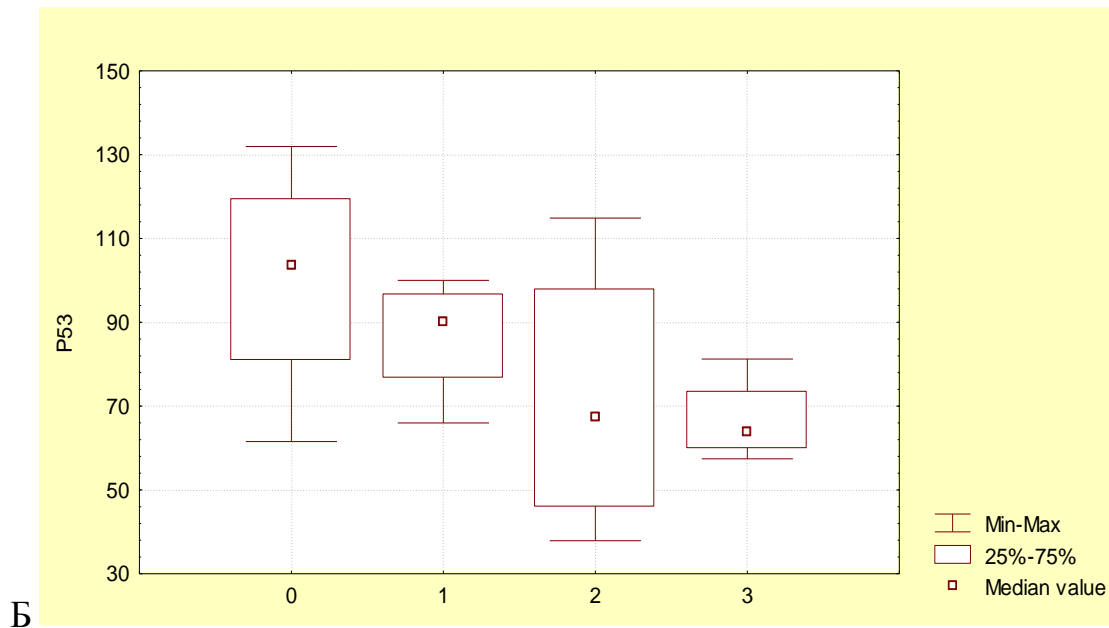
На рисунке 5 показано, что липосомальная араноза вызвала повышение экспрессии мРНК *TP53* по сравнению с аранозой-лио. Но это повышение не было статистически значимым ( $p=0,5543$ ). Однако когда клетки разделили по наличию или отсутствию мутации *BRAF*, оказалось, что указанная выше тенденция свойственна только для клеток с мутацией *BRAF* (рис. 6, А). В клеточных линиях с *BRAF* дикого типа липосомальная араноза наоборот снижала экспрессию *TP53*, по сравнению с аранозой-лио (рис. 6, Б).



**Рисунок 5** – Изменение уровня экспрессии мРНК *TP53* после воздействия исследуемыми препаратами, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3.

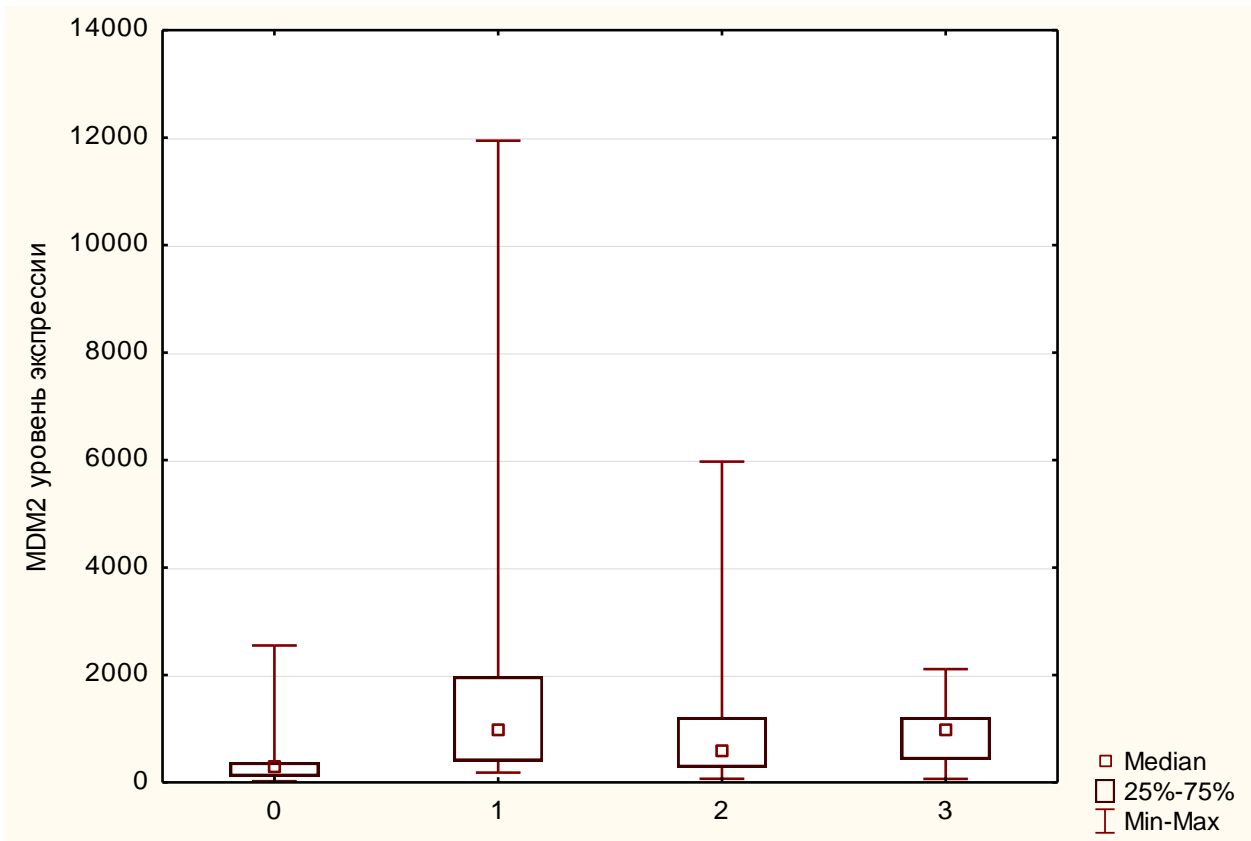


A



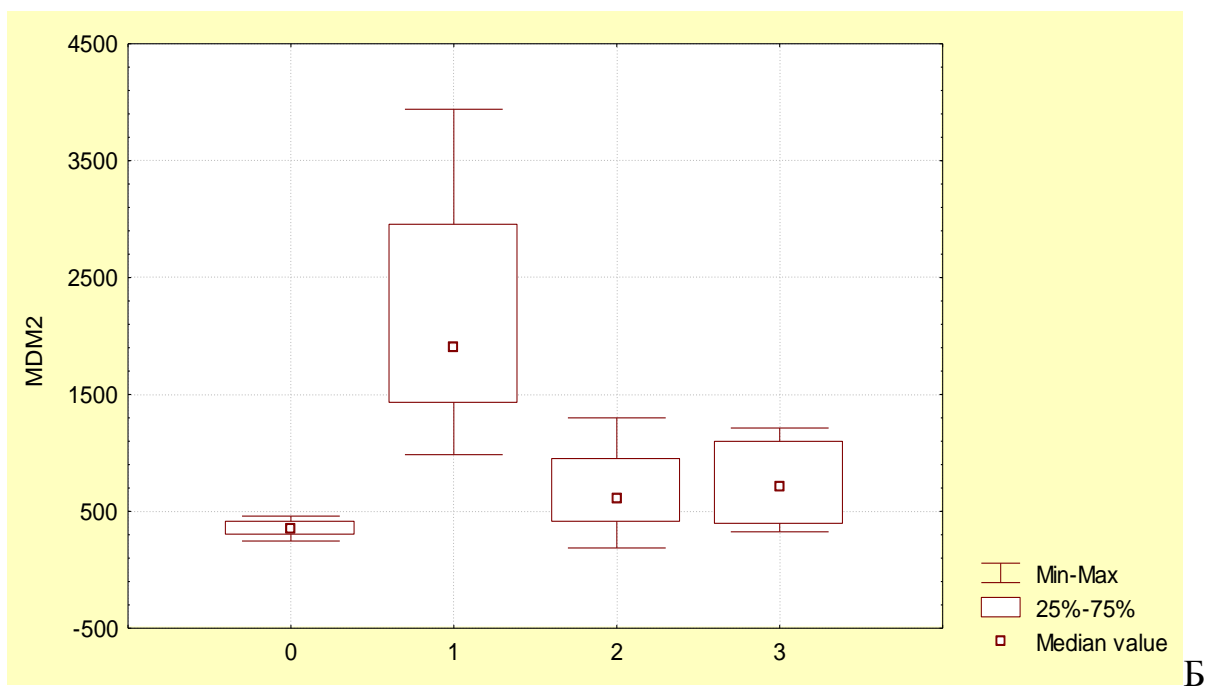
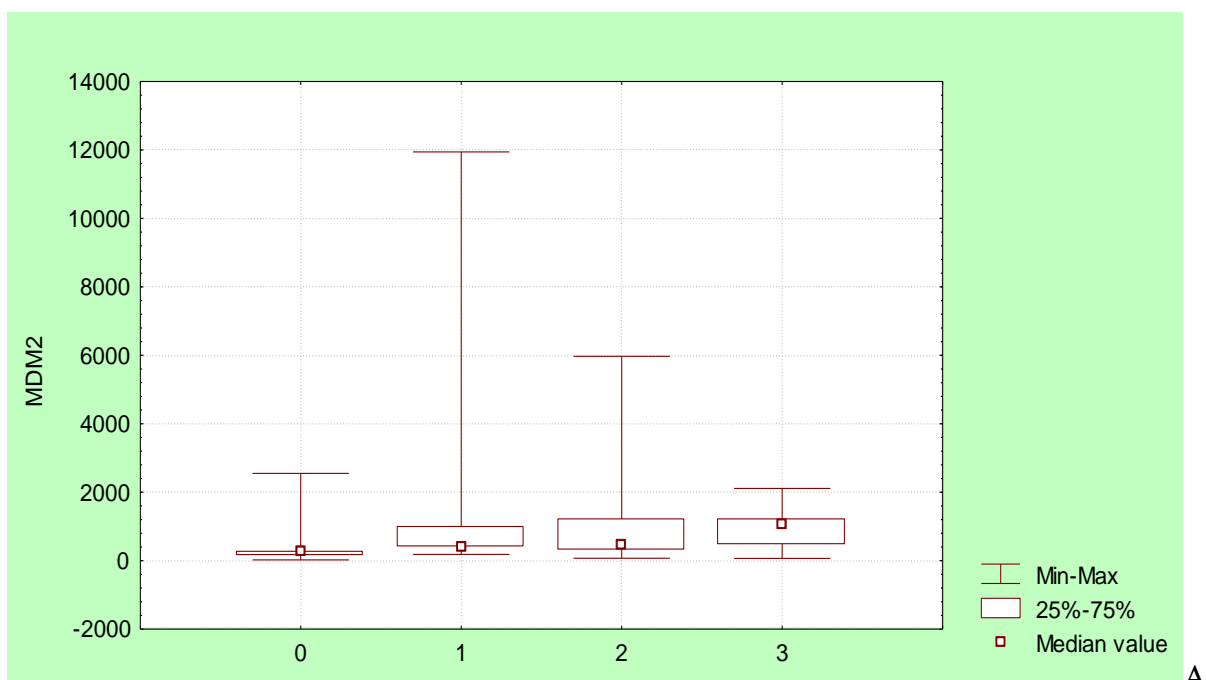
**Рисунок 6** – Изменения уровня экспрессии мРНК *TP53* после инкубации с исследуемыми препаратами в зависимости от наличия мутации *BRAF*, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3. А – клеточные линии с мутацией *BRAF*; Б – клеточные линии с *BRAF* дикого типа.

Изучили изменение уровня экспрессии мРНК *MDM2*. Уровень экспрессии *MDM2* обычно повышается вслед за p53. Мы увидели, что уровень экспрессии *MDM2* повысился после инкубации со всеми исследуемыми лекарственными формами, а также с пустыми липосомами. При этом можно видеть более сильную экспрессию мРНК *MDM2* после воздействия аранозы-лио, по сравнению с липосомальной, что было статистически значимо ( $p=0,0464$ ) (рис. 7).



**Рисунок 7** – Изменение уровня экспрессии мРНК *MDM2* после воздействия исследуемыми препаратами, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3.

При разделении клеток в зависимости от наличия мутации *BRAF* оказалось, что более высокая экспрессия мРНК при аранозе-лио по сравнению с липосомальной сохранялась как в группе клеток с *BRAF* дикого типа, так и в группе с *BRAF*-мутациями (рис. 8). Но статистически значимое ( $p=0,0421$ ) различие между воздействием аранозы-лио и липосомальной аранозой было в группе клеток с *BRAF* дикого типа. Существует много мнений по поводу причин повышенной экспрессии *MDM2* в опухолевых клетках. Стоит отметить, что повышение *MDM2* может способствовать резистентности к химиотерапии [43; 96].



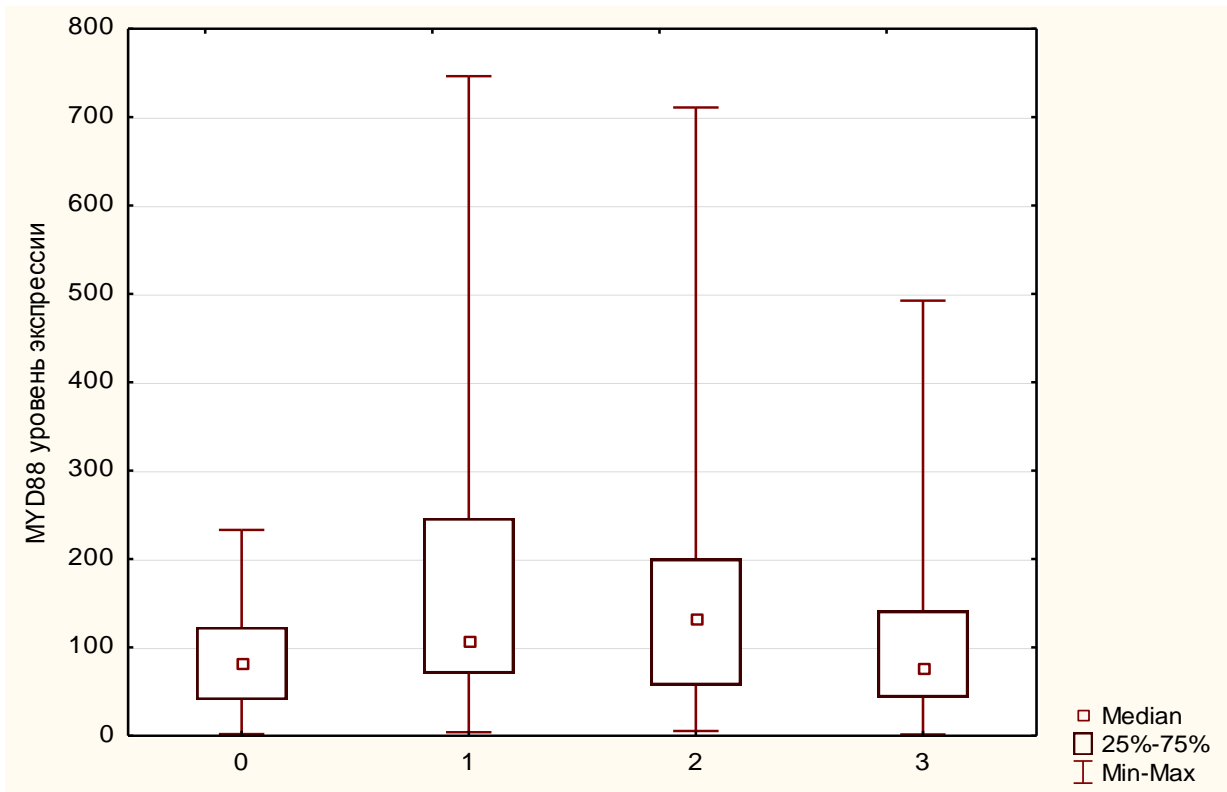
**Рисунок 8** – Изменения уровня экспрессии мРНК *MDM2* после инкубации с исследуемыми препаратами в зависимости от наличия мутации *BRAF*, где контроль – 0, аранзо-лио – 1, липосомальная аранзоа – 2, пустые липосомы – 3. А – клеточные линии с мутацией *BRAF*; Б – клеточные линии с *BRAF* дикого типа.

### **3.4. Изменение уровня экспрессии мРНК *MyD88*, *NfκB2* и *NfκB1* в клеточных линиях метастатической меланомы после воздействия лекарственных форм аранозы**

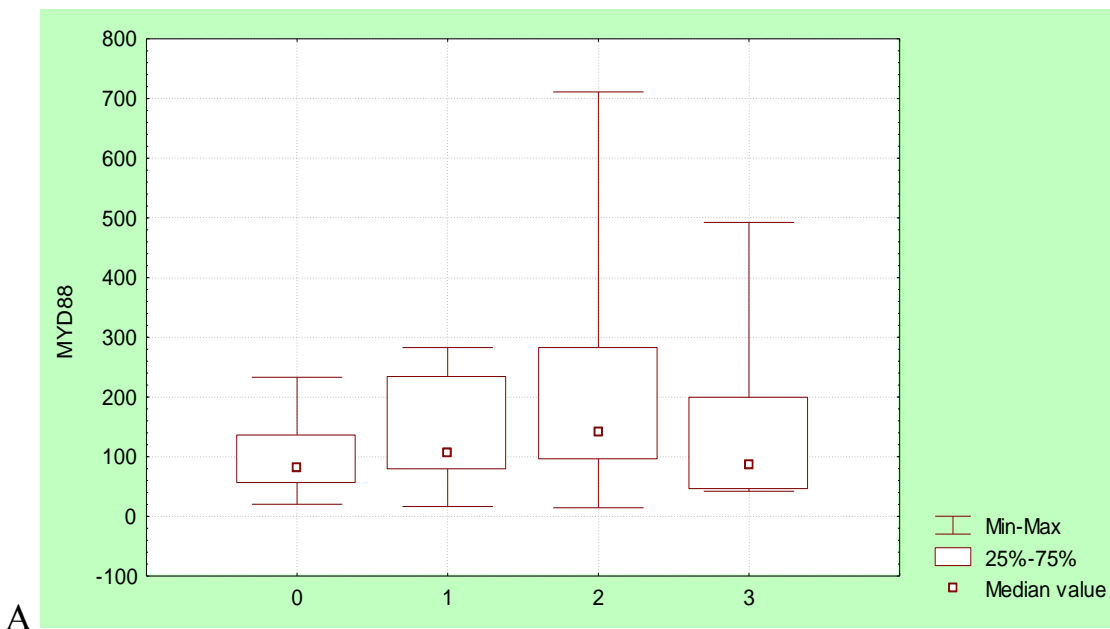
Перед изучением уровня экспрессии мРНК клеточные линии инкубировали 24 ч с исследуемыми препаратами: аранозой-лио (ИК<sub>50</sub>), липосомальной аранозой (ИК<sub>50</sub>), пустыми липосомами (< ИК<sub>10</sub>), в качестве контроля использовали необработанные клетки. Исследовалось 13 клеточных линий меланомы человека (табл. 6).

Активация Toll-подобных рецепторов на клетках меланомы человека индуцируется воспалительными факторами. Экспрессия мРНК *MyD88* при этом повышается примерно в 8 раз [85]. На рисунке 9 показано, что араноза-лио, липосомальная араноза повышают экспрессию мРНК *MyD88* по сравнению с необработанными клетками. При этом липосомальная араноза вызывала более высокую экспрессию мРНК *MyD88* по сравнению с аранозой-лио, но это не было статистически значимо ( $p=0,9721$ ). Лишь на некоторых линиях наблюдается значительное усиление экспрессии. Толл-рецепторы в целом задействованы не очень существенно.

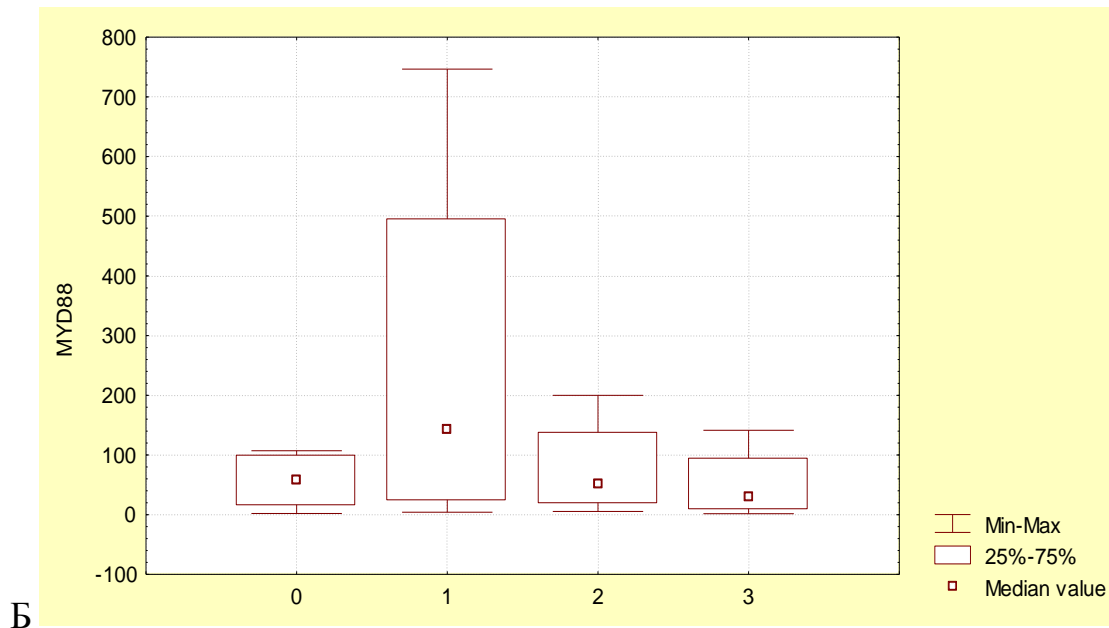
При разделении клеток в зависимости от наличия мутации *BRAF* оказалось, что для линий с мутацией *BRAF* наибольшее повышение экспрессии мРНК *MyD88* было после воздействия липосомальной аранозы. Но для линий с *BRAF* дикого типа наибольшее усиление экспрессии наблюдалось после воздействия аранозы-лио (рис. 10).



**Рисунок 9** – Изменение уровня экспрессии мРНК *MyD88* после воздействия исследуемыми препаратами, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3.



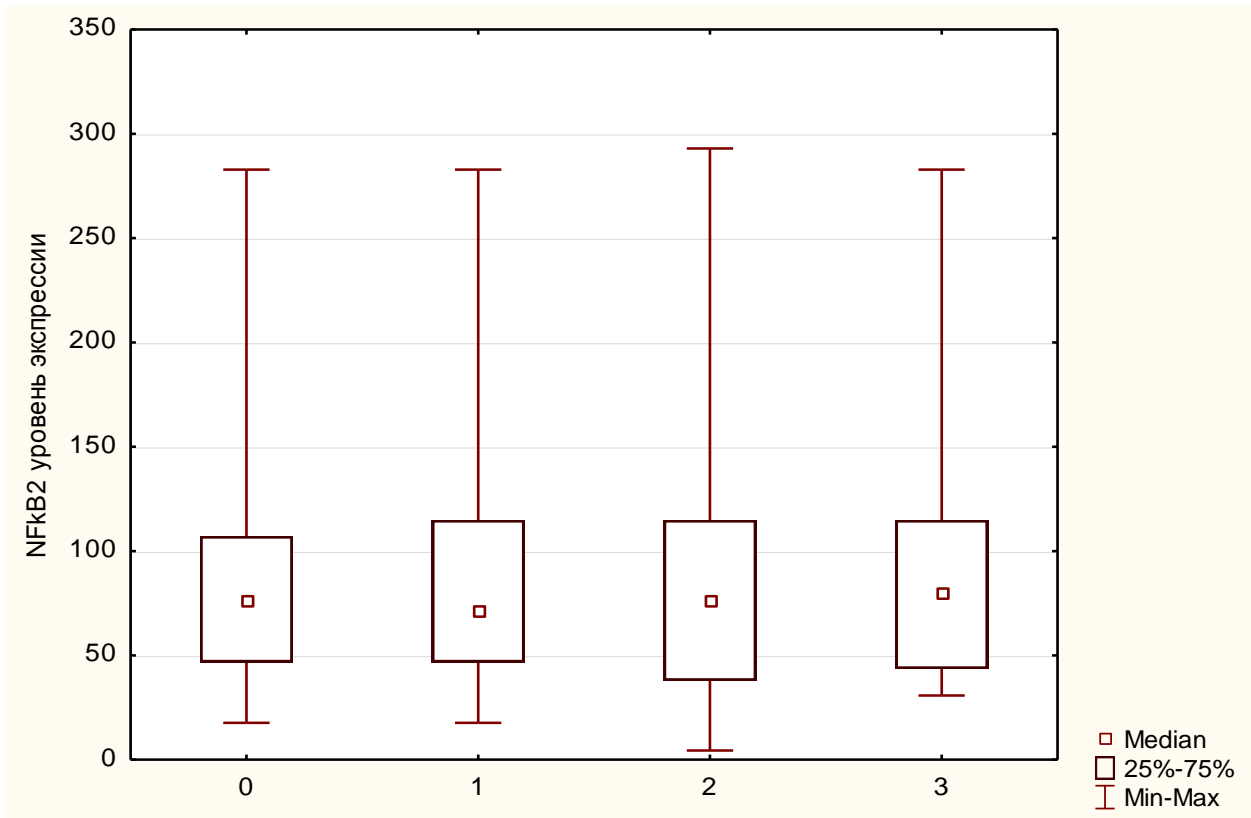
A



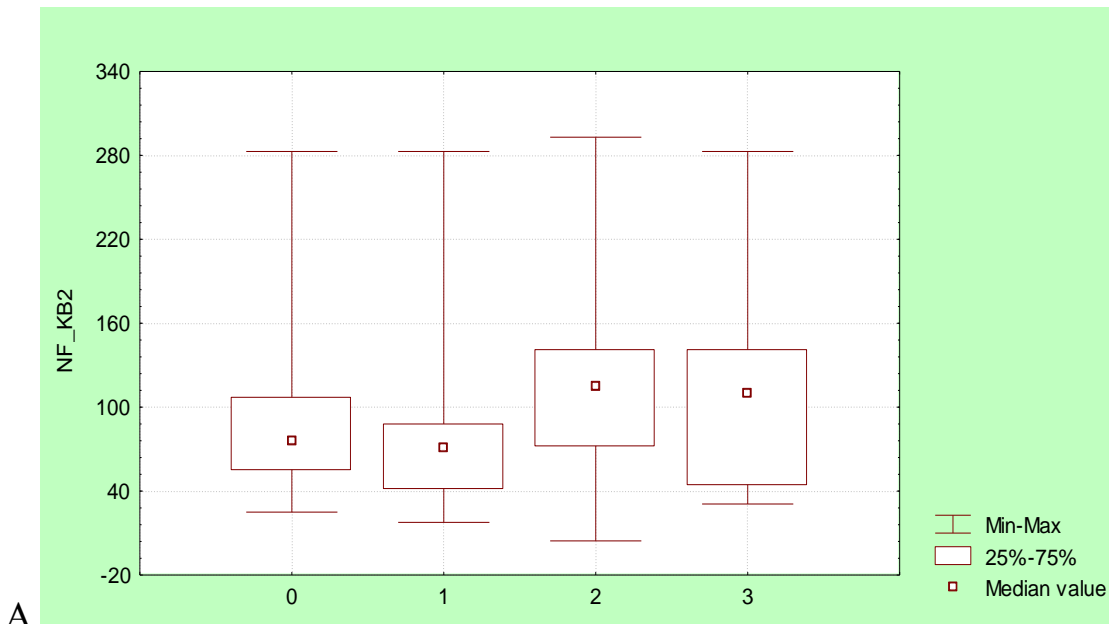
**Рисунок 10** – Изменения уровня экспрессии мРНК *MyD88* после инкубации с исследуемыми препаратами в зависимости от наличия мутации *BRAF*, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3. А – клеточные линии с мутацией *BRAF*; Б – клеточные линии с *BRAF* дикого типа.

При изучении экспрессии мРНК *NFκB2*, обнаружено, что все виды воздействий не вызывали существенных отличий в экспрессии от необработанных клеток (рис. 11). При разделении клеток в зависимости от наличия мутации *BRAF* данная тенденция повторялась для обеих групп линий (рис. 12).

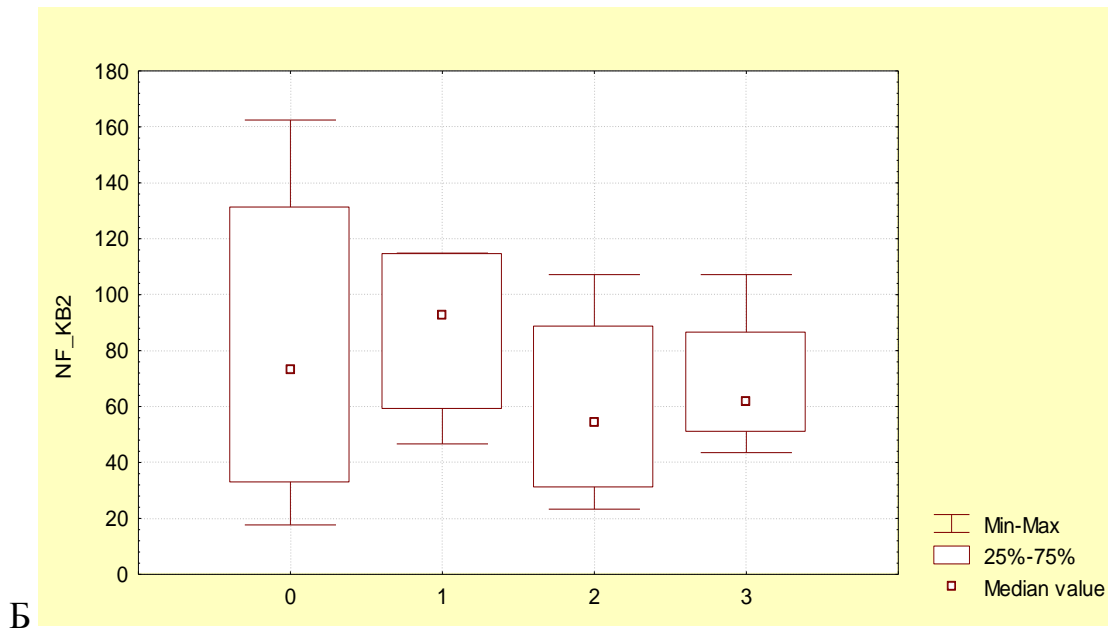




**Рисунок 11** – Изменение уровня экспрессии мРНК *NFkB2* после воздействия исследуемыми препаратами, где контроль – 0, аранзо-лио – 1, липосомальная аранзо – 2, пустые липосомы – 3.



A

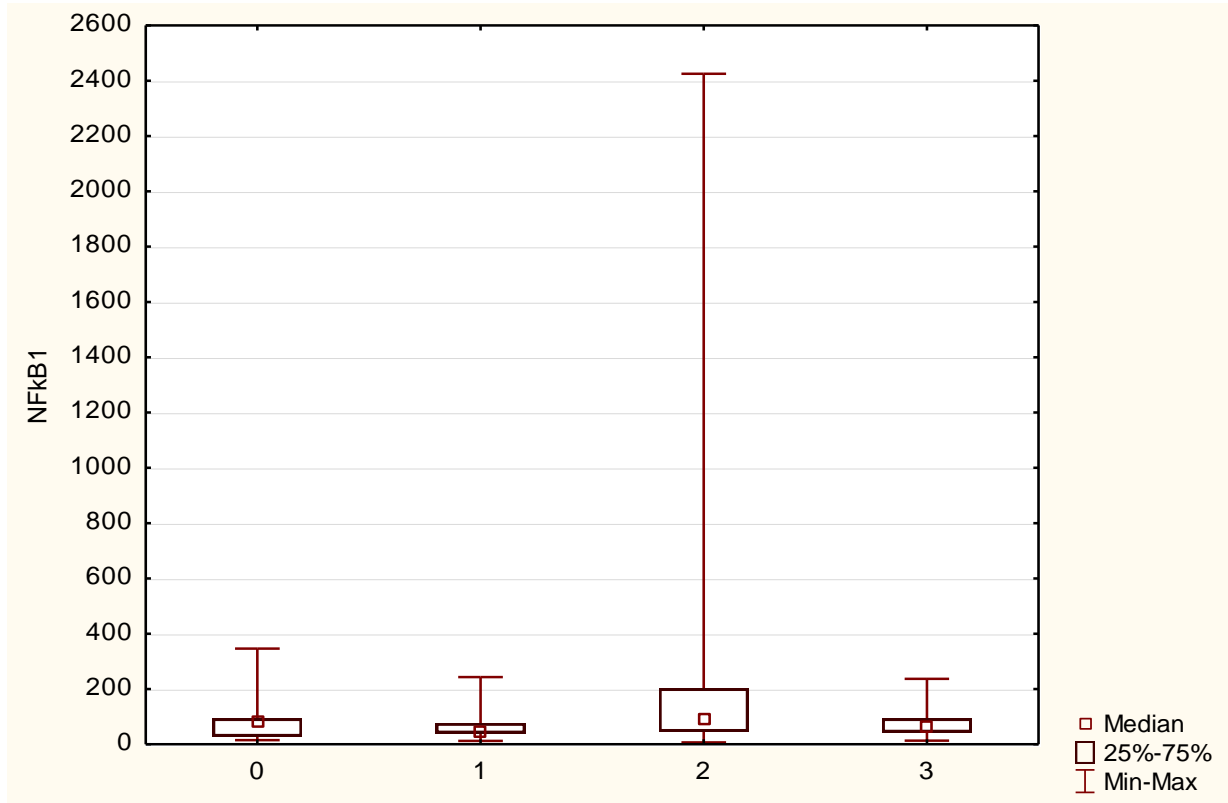


Б

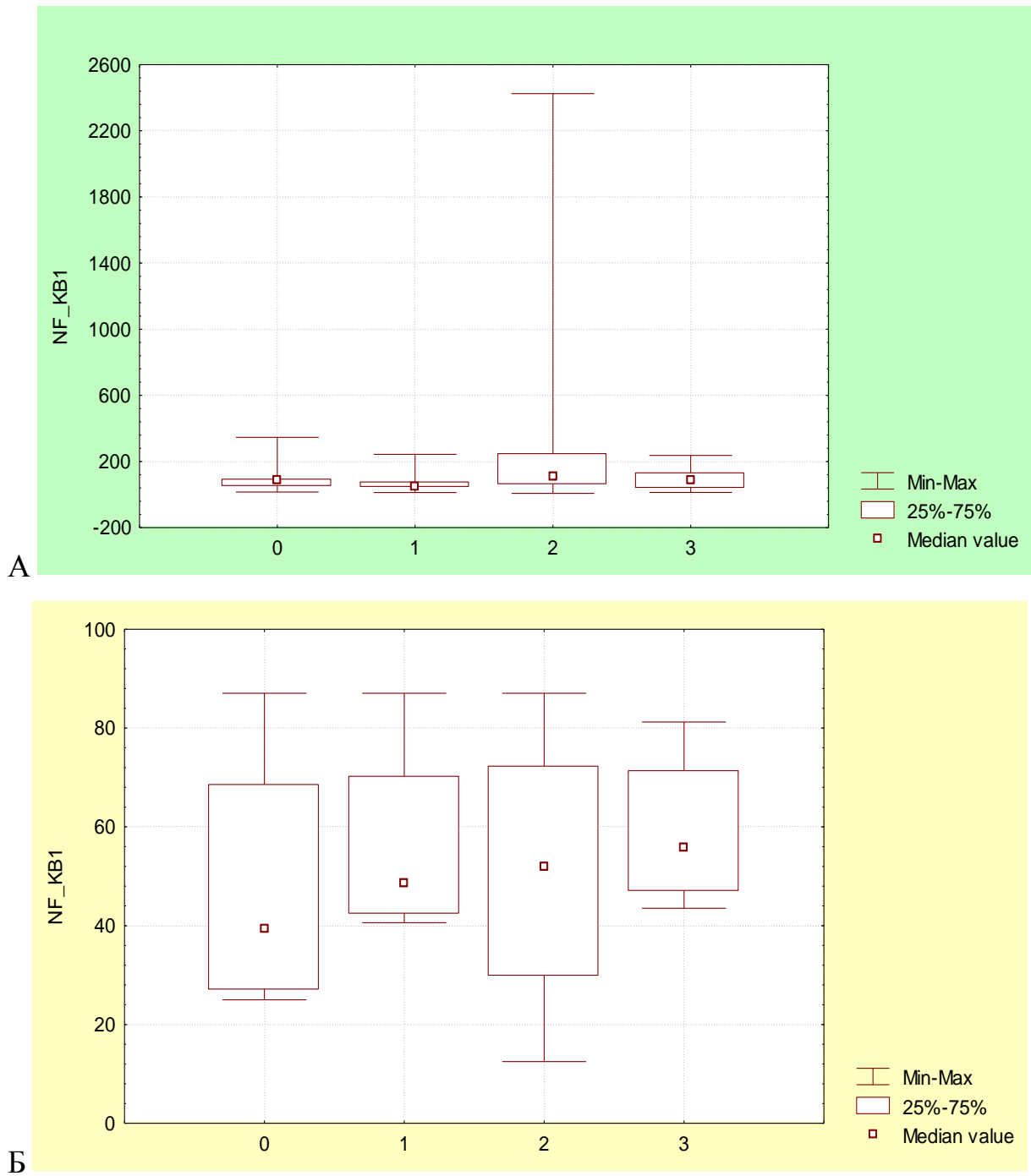
**Рисунок 12** – Изменения уровня экспрессии мРНК *NFκB2* после инкубации с исследуемыми препаратами в зависимости от наличия мутации *BRAF*, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3. А – клеточные линии с мутацией *BRAF*; Б – клеточные линии с *BRAF* дикого типа.

Интересные данные получены при изучении изменения экспрессии мРНК *NFκB1*. Из рисунка 13 видно, что араноза-лио и пустые липосомы не повышают экспрессию *NFκB1*, но повышение наблюдается для липосомальной аранозы. При этом уровень экспрессии *NFκB1* после воздействия липосомальной аранозы значительно выше ( $p=0,0331$ ), по сравнению с аранозой-лио. При разделении клеток в зависимости от наличия мутации *BRAF* данная тенденция усиления экспрессии *NFκB1* от воздействия липосомальной аранозой сохранялась только в группе клеток с мутациями *BRAF*. В этой группе более отчетлива проявляется разница между воздействием аранозы-лио и липосомальной ( $p=0,0209$ ) (рис. 14). В ряде исследований показано, что опухолевые клетки отличаются от нормальных пониженной экспрессией *NFκB1*, что помогает им в выживании [219]. В исследовании [182] было показано, что *NFκB1* является эффекторным белком цитотоксического ответа на повреждения ДНК через метилирование. Известно, что действие аранозы в качестве производного нитрозомочевины реализуется через метилирование ДНК. В ответ на метилирование ДНК *NFκB1* вызывает

ингибирование экспрессии анти-апоптотических генов, находящихся под контролем NFκB. Интересно, что мы наблюдаем эффект повышения экспрессии NFκB1 именно от липосомальной формы аранозы, а не от свободной аранозы-лио.



**Рисунок 13** – Изменение уровня экспрессии мРНК *NFκB1* после воздействия исследуемыми препаратами, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3.



**Рисунок 14** – Изменения уровня экспрессии мРНК *NFκB1* после инкубации с исследуемыми препаратами в зависимости от наличия мутации *BRAF*, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3. А – клеточные линии с мутацией *BRAF*; Б – клеточные линии с *BRAF* дикого типа.

### 3.5. Изменение экспрессии PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы после воздействия лекарственных форм аранозы

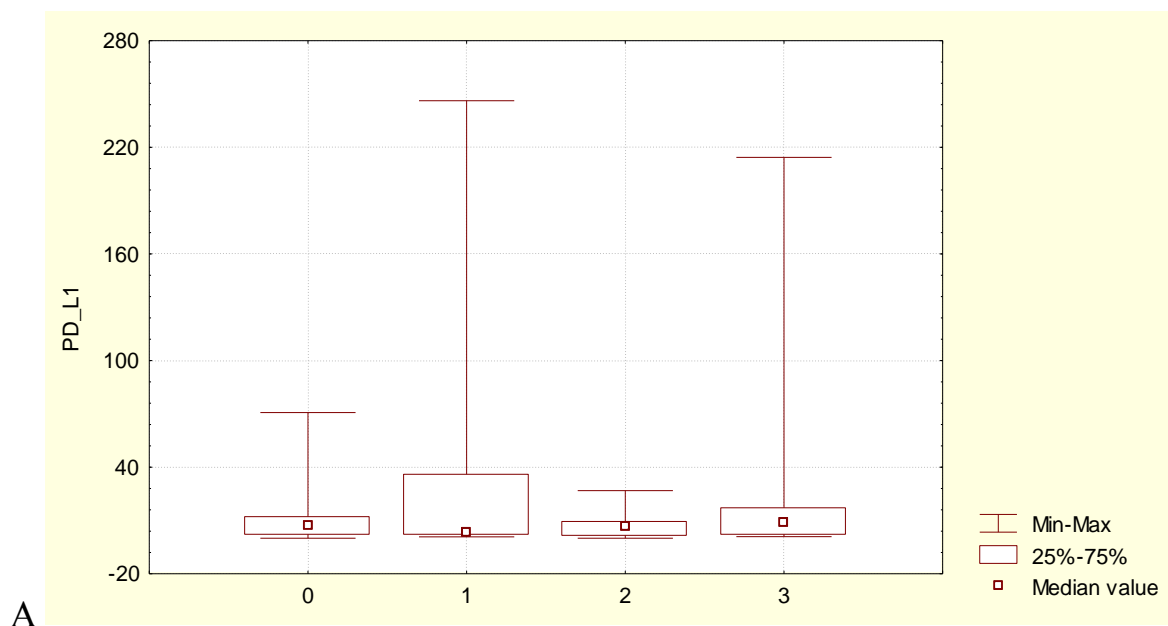
Клеточные линии метастатической меланомы кожи человека инкубировали в течение 24 ч с лекарственными формами аранозы – аранозой-лио и липосомальной, а также с «пустыми» липосомами, после чего оценивали изменение экспрессии мРНК и белков PD-L1 и PD-L2.

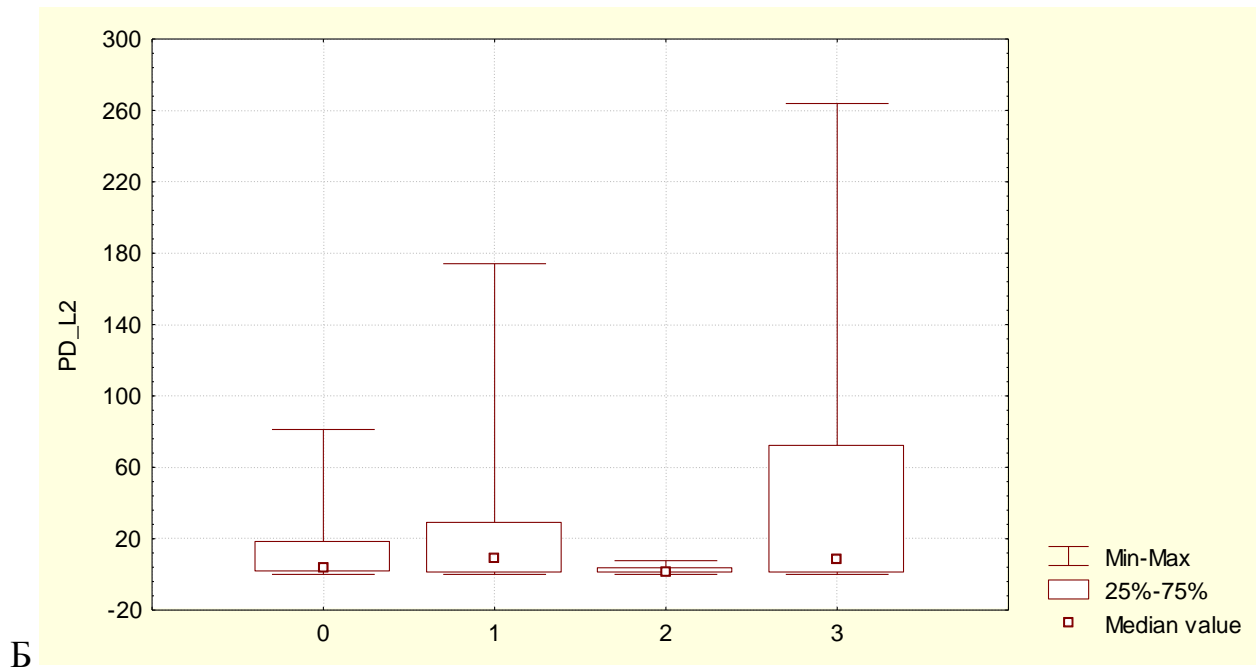
**Таблица 10** – Изменение экспрессии мРНК *PD-L1* и *PD-L2* в клеточных линиях метастатической меланомы человека

| Клеточная линия | Экспрессия мРНК, % относительно гена ABL |              |              |              |                       |              |                 |              |
|-----------------|--|--------------|--------------|--------------|-----------------------|--------------|-----------------|--------------|
|                 | Необработанные клетки                    |              | Араноза-лио  |              | Липосомальная араноза |              | Пустые липосомы |              |
|                 | <i>PD-L1</i>                             | <i>PD-L2</i> | <i>PD-L1</i> | <i>PD-L2</i> | <i>PD-L1</i>          | <i>PD-L2</i> | <i>PD-L1</i>    | <i>PD-L2</i> |
| mel Hn          | 8,84                                     | 0,39         | 50,00        | 0,00         | 10,88                 | 0,00         | 131,95          | 0,00         |
| mel Ibr         | 0,68                                     | 0,63         | 2,92         | 3,12         | 8,84                  | 1,46         | 1,56            | 2,06         |
| mel II          | 5,44                                     | 0,73         | 21,76        | 13,40        | 7,69                  | 2,92         | 18,95           | 15,39        |
| mel Is          | 0,63                                     | 0,00         | 0,78         | 0,01         | 0,36                  | 0,26         | 0,90            | 0,04         |
| mel Si          | 1,79                                     | 6,25         | 0,78         | 0,01         | 0,36                  | 0,26         | 0,90            | 0,04         |
| mel Cher        | 70,71                                    | 20,31        | 123,11       | 40,61        | 5,44                  | 1,18         | 214,35          | 151,57       |
| mel H           | 11,66                                    | 1,10         | 246,23       | 174,11       | 26,79                 | 4,12         | 6,70            | 20,31        |
| mel Gus         | 4,12                                     | 16,49        | 0,78         | 17,68        | 8,84                  | 7,18         | 10,88           | 263,90       |
| mel Bgf         | 12,50                                    | 75,79        | 1,27         | 107,18       | 0,96                  | 3,35         | 12,50           | 123,11       |
| mel Me          | 23,33                                    | 81,23        | 5,44         | 17,68        | 5,08                  | 7,69         | 7,18            | 21,76        |
| mel Mtp         | 8,8                                      | 13,40        | 1,46         | 4,42         | 0,01                  | 1,67         | 1,10            | 1,10         |
| mel Kor         | 0,01                                     | 0,01         | 3,85         | 0,01         | 10,15                 | 0,06         | 15,39           | 0,01         |

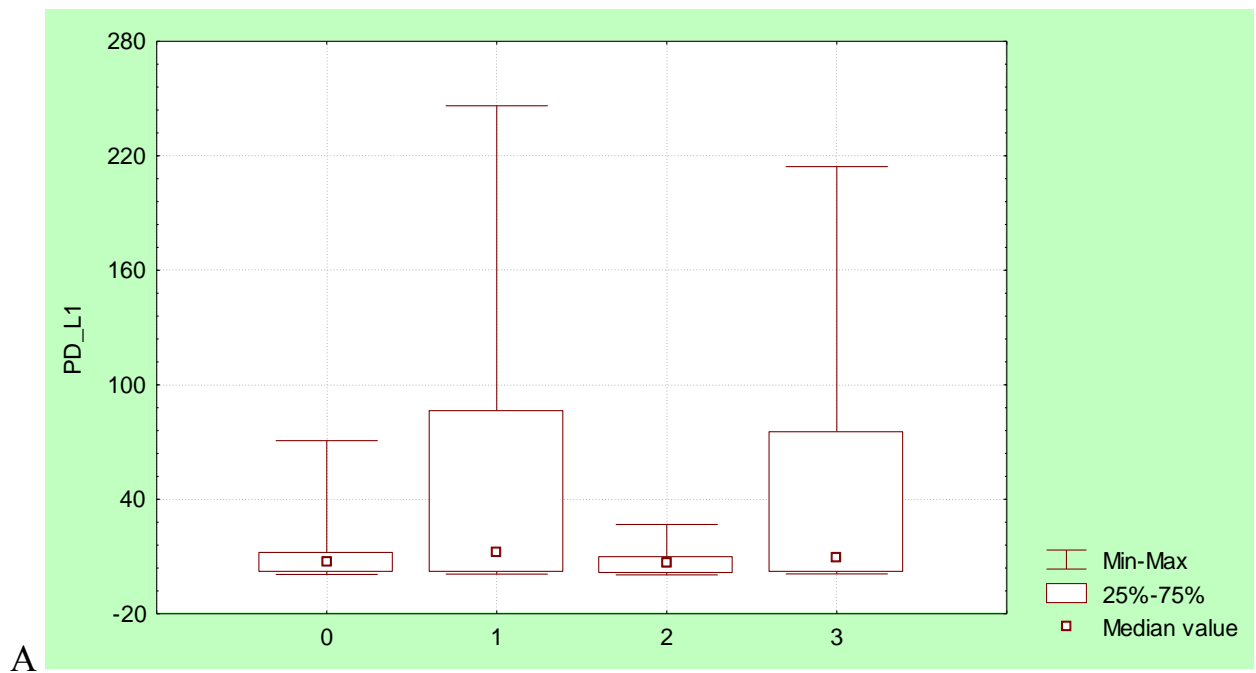
Из таблицы 10 видно, что некоторые клеточные линии имеют высокий базовый уровень мРНК *PD-L1* или *PD-L2* (mel Cher, mel Bgf, mel Me). Уровень экспрессии мРНК *PD-L1* и *PD-L2* не зависит от степени дифференцировки клеточных линий меланомы ( $p=0,8922$  и  $p=0,9582$  соответственно) [18].

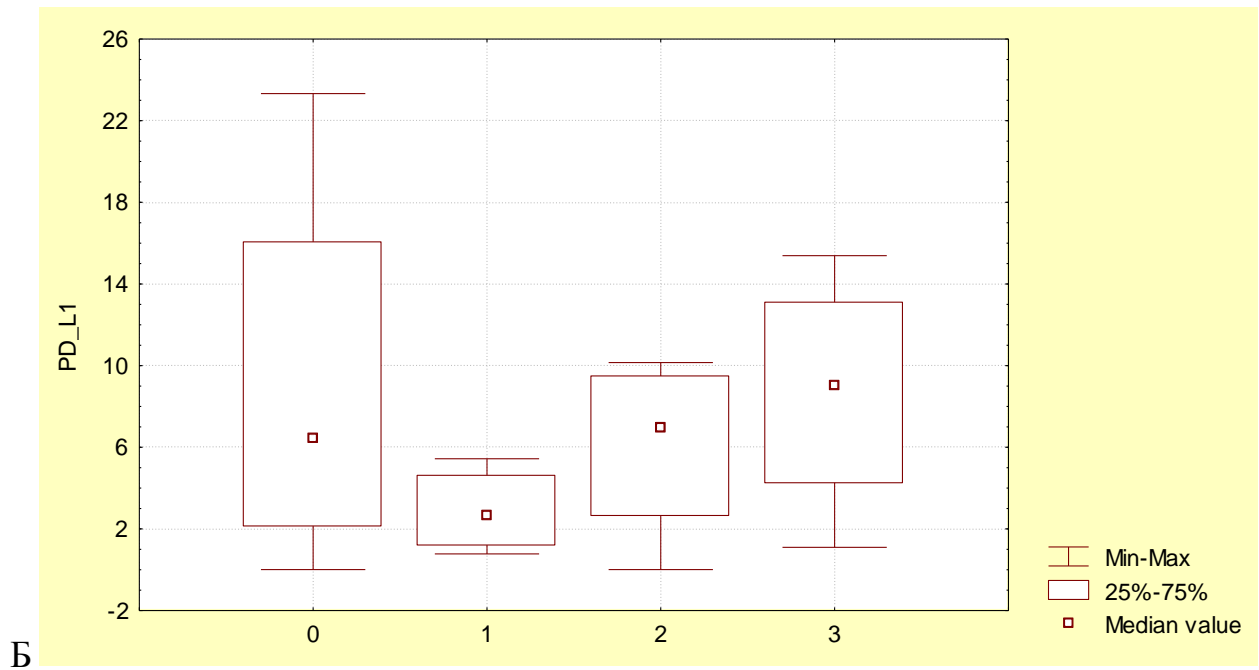
Анализ изменения уровня экспрессии мРНК *PD-L1* показал, что в данном случае не обнаруживается значимого изменения экспрессии после всех видов воздействий (рис. 15) и отсутствует статистически значимое отличие между аранозой-лио и липосомальной ( $p=0,1580$ ). Но для группы клеток с мутациями *BRAF* обнаруживается тенденция к увеличению экспрессии мРНК *PD-L1* после воздействия аранозы-лио и пустых липосом и снижения экспрессии после воздействия липосомальной аранозы (рис. 16). В этой же группе клеток имеется статистически значимое различие между аранозой-лио и липосомальной ( $p=0,04996$ ). Для группы клеток с мутациями *BRAF* наблюдается противоположный эффект – араноза-лио снижает экспрессию, а липосомальная повышает (рис. 16). Для мРНК *PD-L2* обнаруживается тенденция к увеличению экспрессии после воздействия аранозы-лио и пустых липосом и снижения экспрессии после воздействия липосомальной аранозы (рис. 16). При этом экспрессия мРНК *PD-L2* статистически значимо выше после воздействия аранозы-лио по сравнению с липосомальной ( $p=0,0164$ ). Когда клетки разделили по наличию или отсутствию мутации *BRAF*, оказалось, что изменения экспрессии, видимые при суммировании всех клеток, повторяются в обеих группах, но отчетливее проявляются в группе с мутациями *BRAF* (рис. 17).



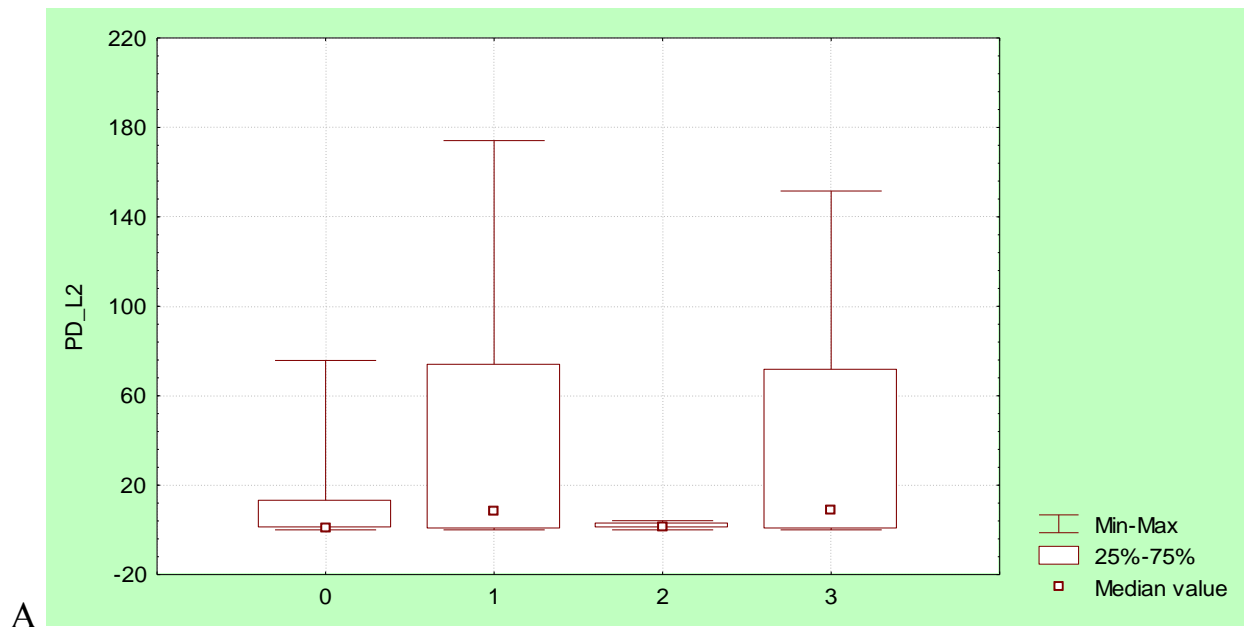


**Рисунок 15** – Изменение уровня экспрессии мРНК *PD-L1* (А) и *PD-L2* (Б) после воздействия исследуемыми препаратами, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3.

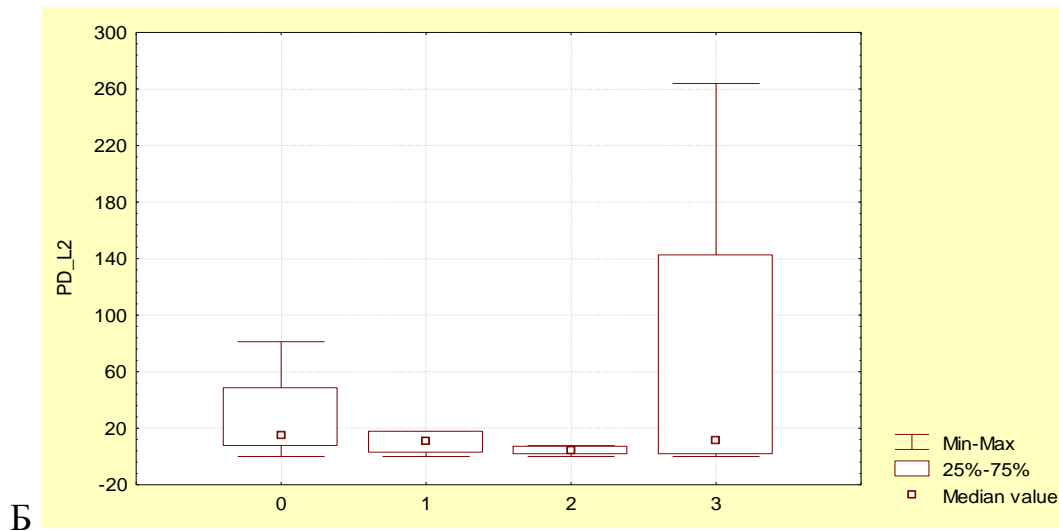




**Рисунок 16** – Изменения уровня экспрессии мРНК *PD-L1* после инкубации с исследуемыми препаратами в зависимости от наличия мутации *BRAF*, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3. А – клеточные линии с мутацией *BRAF*; Б – клеточные линии с *BRAF* дикого типа.







Б

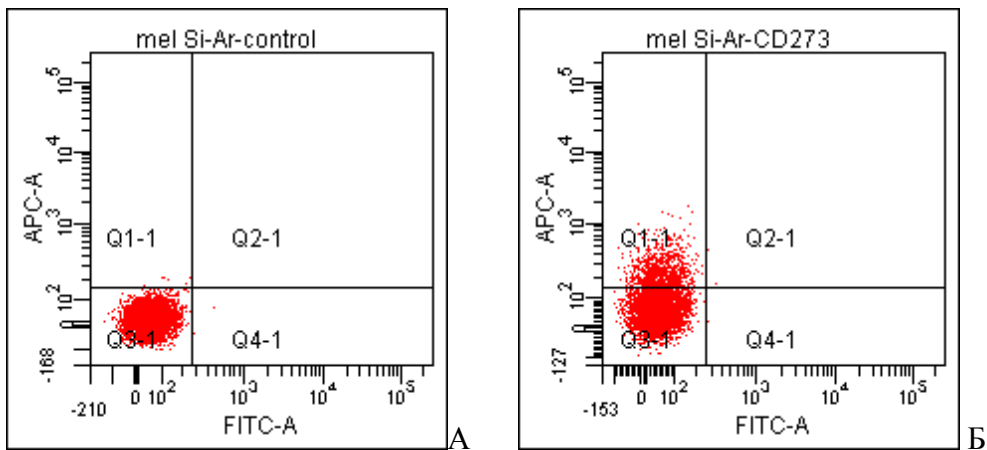
**Рисунок 17** – Изменения уровня экспрессии мРНК *PD-L2* после инкубации с исследуемыми препаратами в зависимости от наличия мутации *BRAF*, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2, пустые липосомы – 3. А – клеточные линии с мутацией *BRAF*; Б – клеточные линии с *BRAF* дикого типа.

Изучена экспрессия поверхностных белков PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы человека на 6 линиях после инкубации с препаратами (ИК50) в течение 48 часов (табл. 11, рис. 18, 19). Их экспрессия в необработанных препаратами клеточных линиях чаще всего не высокая или отсутствует. Положительная экспрессия хотя бы одного из исследуемых белков (PD-L2) детектируется только на 2 линиях из 6 (mel Bgf, mel Si). И только в этих двух линиях происходили изменения экспрессии белка под воздействием препаратов, схожие по тенденции со значениями для мРНК. В других четырех линиях, независимо от значений мРНК, экспрессия белка была незначительна или отсутствовала (табл. 11, рис. 19).

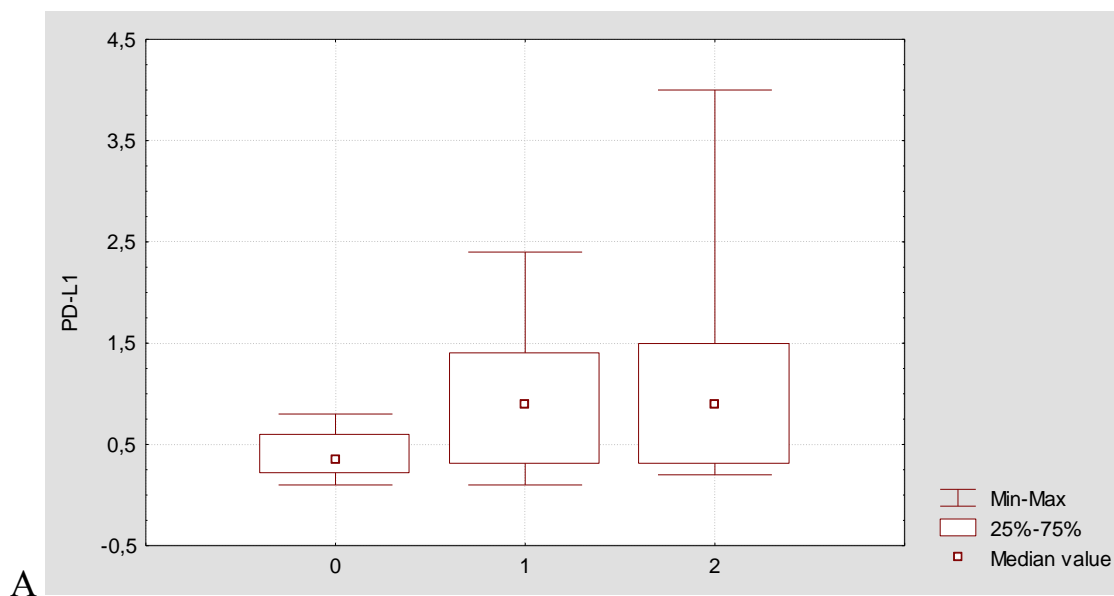
**Таблица 11** – Изменение экспрессии поверхностных белков PD-L1 и PD-L2 в клеточных линиях метастатической меланомы человека

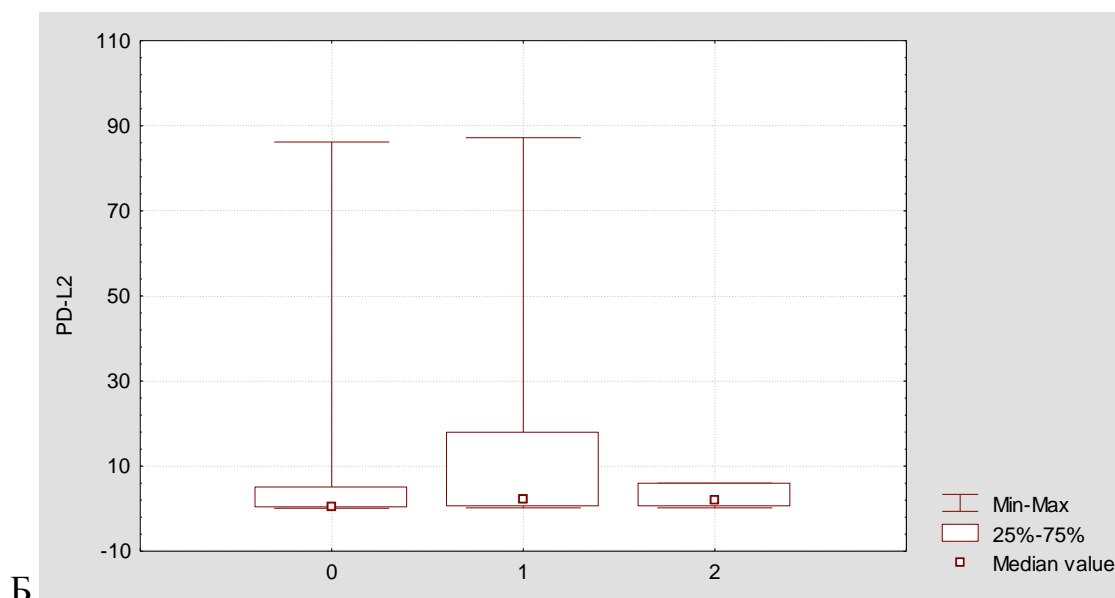
| Клеточная линия | Антиген-положительные клетки, % |       |             |       |                       |       |
|-----------------|---------------------------------|-------|-------------|-------|-----------------------|-------|
|                 | Необработанные клетки           |       | Араноза-лио |       | Липосомальная араноза |       |
|                 | PD-L1                           | PD-L2 | PD-L1       | PD-L2 | PD-L1                 | PD-L2 |
| mel Bgf         | 0,5                             | 86,2  | 1,4         | 87,2  | 4                     | 6     |

|         |     |     |     |     |     |     |
|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| mel Si  | 0,6 | 5,1 | 2,4 | 18  | 1,5 | 6   |
| mel Ibr | 0,2 | 0,8 | 0,7 | 3,7 | 0,3 | 2,6 |
| mel Mtp | 0,8 | 0,1 | 1,1 | 0,7 | 1,4 | 1,3 |
| mel II  | 0,2 | 0,1 | 0,3 | 0,2 | 0,4 | 0,2 |
| mel H   | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,2 | 0,2 | 0,2 |



**Рисунок 18** – Экспрессия молекул PD-L2 на клеточной линии меланомы mel Si после обработки аранзой-лио. А – контроль, неокрашенные клетки mel Si; Б – клетки mel Si с антителами к PD-L2 меченными APC;





**Рисунок 19** – Изменение уровня экспрессии белков PD-L1 (А) и PD-L2 (Б), после воздействия исследуемыми препаратами, где контроль – 0, араноза-лио – 1, липосомальная араноза – 2.

В таблице 12 представлена оценка воздействия разных лекарственных форм аранозы – липосомальной и лиофилизата для приготовления раствора для инъекций. Показано, что лекарственные формы по-разному воздействуют на исследованные в работе сигнальные пути. Араноза-лио повышает экспрессию мРНК *MDM2* и *PD-L2*. А липосомальная араноза повышает экспрессию мРНК *NFkB1* и снижает экспрессию мРНК *PD-L2*.

**Таблица 12** – Отличительные эффекты воздействия различных лекарственных форм аранозы на клеточные линии метастатической меланомы человека

| Мишени                                | Араноза-лио                  | Липосомальная араноза         |
|---------------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
| Сигнальные белки<br>(мРНК)            | <i>MDM2</i> ↑<br>(для BRAF–) | <i>NFkB1</i> ↑<br>(для BRAF+) |
| Ингибиторы иммунного<br>ответа (мРНК) | <i>PD-L2</i> ↑               | <i>PD-L2</i> ↓                |

#### Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

В работе изучалось влияние двух лекарственных форм аранозы на сигнальные пути, влияющие на выживаемость опухолевых клеток и их устойчивость к лекарственным препаратам. Исследования проводили на 19 клеточных линиях диссеминированной меланомы человека (табл. 1), полученных из банка клеточных культур ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. В проведенных ранее исследованиях обнаружено, что данные клеточные линии более чувствительны к липосомальной форме аранозы, по сравнению с аранозой-лио [7]. Данное явление было подтверждено нами с помощью МТТ-теста. Как и предполагалось, все исследованные клеточные линии достигали ИК50 при более низкой дозе аранозы, включенной в липосомы, по сравнению с аранозой-лио.

Это свойство липосомальной аранозы могло бы оказаться крайне полезным в клинике. Но преимущество липосомальных форм остается неясным в связи с недостаточностью данных о молекулярных механизмах их действия. Для уточнения механизма воздействия липосомальной аранозы на сигнальные пути клеточной гибели, нами были произведены данные исследования.

**Определение мутаций *TP53* в клеточных линиях.** При онкологических заболеваниях, часто мутирован ген *TP53*. Точечные мутации обнаруживаются примерно в половине всех опухолей. Однако в случае меланомы точечные мутации *TP53* встречаются редко. Схожие данные получены в нашей работе. Только в 2 линиях из 9 были обнаружены мутации *TP53*. Известно, что при В-ХЛЛ делеции 17р (участок хромосомы 17, где расположен ген *TP53*) связаны с плохим клиническим прогнозом [186]. Нами не было обнаружено связи устойчивости линий меланомы к аранозе с делециями 17р как для аранозы-лио, так и для липосомальной аранозы.

**Изменение мРНК *TP53* и *MDM2*.** В статье N.A. Bowden и соавт. после воздействия цисплатина в течение 24 часов уровень мРНК *TP53* повышался в клетках меланомы и нормальных меланоцитах [42]. Нами было обнаружено

повышение экспрессии мРНК *TP53* после воздействия липосомальной аранозы в некоторых из линий. Интересные результаты получены после разделения линий по наличию или отсутствию мутации *BRAF*. Оказалось, что подобное явление характерно только для *BRAF*-положительных клеток. В случае клеток меланомы сложно сказать, что повышение экспрессии мРНК *TP53* является позитивным признаком, так как по данным литературы увеличение экспрессии *TP53* не является достаточным фактором для хорошего ответа на лечение меланомы [127]. А также белок p53 дикого типа в меланоме не функционирует в качестве опухолевого супрессора [30].

Было изучено изменение уровня экспрессии мРНК *MDM2*. Экспрессия *MDM2* обычно повышается вслед за *TP53*. Было обнаружено, усиление экспрессии *MDM2* после инкубации со всеми исследуемыми лекарственными формами, а также с пустыми липосомами. При этом можно видеть более сильную экспрессию мРНК *MDM2* после воздействия аранозы-лио, по сравнению с липосомальной, что было статистически значимо ( $p=0,0464$ ) (рис. 6). При разделении клеток в зависимости от наличия мутации *BRAF* оказалось, что более высокая экспрессия мРНК при аранозе-лио по сравнению с липосомальной сохранялась как в группе с мутациями, так и без мутаций (рис. 7). Но статистически значимое ( $p=0,0421$ ) различие между воздействием аранозы-лио и липосомальной аранозой было в группе клеток с *BRAF* дикого типа. М.К. Fritsche и соавт. показали, что экспрессия мРНК и белка *MDM2* повысились после воздействия цисплатина на клеточные линии меланомы [75], что говорит о наличии корреляции между экспрессией РНК и белка для *MDM2*. Стоит отметить, что повышение *MDM2* может способствовать резистентности к химиотерапии [43; 96]. Хотя может возникнуть противоречие, почему изменения экспрессии p53 не коррелируют с результатом терапии [127], а белок *MDM2* регулирующий его активность оказывает влияние. Тем не менее, есть множество экспериментальных работ, в том числе и для клеток меланомы, где ингибиторы *MDM2* в сочетании с химиопрепаратами существенно усиливали эффективность лекарственных средств [96; 116].

**мРНК *MyD88*, *NFkB2* и *NFkB1*.** Активация Toll-подобных рецепторов на клетках меланомы человека индуцируется воспалительными факторами. Экспрессия мРНК *MyD88* при этом повышается примерно в 8 раз [85]. В наших результатах происходит менее выраженное повышение уровня экспрессии мРНК *MyD88*. Возможно, на них влияют компоненты умерших клеток через Toll-подобные рецепторы. Как известно, сигналинг через *MyD88* активирует NF-кВ. Поэтому было изучено изменение экспрессии двух его субъединиц *NFkB2* и *NFkB1*. Для белка *NFkB2* в литературе не показано какого-либо однозначного свойства в онкологии [230]. В нашем случае его экспрессия так же не отличалась между воздействием лекарственных форм аранозы и пустыми липосомами.

В исследовании [182] показано, что *NFkB1* является эффекторным белком цитотоксического ответа на повреждения ДНК через метилирование. В ответ на метилирование ДНК *NFkB1* вызывает ингибирование экспрессии анти-апоптотических генов, находящихся под контролем NFкВ. Как известно, механизм действия аранозы на клетки опухоли тоже связан с метилированием. И можно предположить увеличение экспрессии *NFkB1*. Нами обнаружено, что воздействие аранозы-лио и пустых липосом не повышало экспрессию мРНК *NFkB1* по сравнению с контролем. Нами показано, что липосомальная араноза вызывает статистически значимое повышение уровня экспрессии *NFkB1* ( $p=0,0331$ ) по сравнению с аранозой-лио. Причем этот эффект был более выражен в группе клеток с мутациями *BRAF*. Интересно, что мы наблюдаем эффект повышения экспрессии *NFkB1* именно от липосомальной формы аранозы, а не от свободной аранозы-лио. Возможно, липосомальная форма лучше доставляет аранозу к ядру клетки. А свободная форма араноза-лио сильнее нейтрализуется в цитоплазме.

**Определение экспрессии PD-L1 и PD-L2 в клетках меланомы.** Анализ изменения уровня экспрессии мРНК *PD-L1* показал, что в данном случае не обнаруживается значимого изменения экспрессии после всех видов воздействий (рис. 14) и отсутствует статистически значимое отличие между аранозой-лио и липосомальной ( $p=0,1580$ ). Но для группы клеток с мутациями имеется

статистически значимое усиление экспрессии для аранозы-лио по сравнению с липосомальной ( $p=0,0499$ ). Для группы клеток с мутациями *BRAF* наблюдается противоположный эффект – араноза-лио снижает экспрессию, а липосомальная повышает, хотя это статистически не значимо (рис. 15). В итоге можно предположить, что эти различные эффекты нивелируют друг друга и суммарно для всех клеток как с мутациями *BRAF*, так и с диким типом не прослеживаются существенных различий между аранозой-лио и липосомальной. Для мРНК *PD-L2* обнаруживается тенденция к увеличению экспрессии после воздействия аранозы-лио и пустых липосом и снижению экспрессии после воздействия липосомальной аранозы. При этом экспрессия мРНК *PD-L2* статистически значимо выше после воздействия аранозы-лио по сравнению с липосомальной ( $p=0,0164$ ). Когда клетки разделили по наличию или отсутствию мутации *BRAF*, оказалось, что изменения экспрессии, видимые при суммировании всех клеток, повторяются в обеих группах, но отчетливее проявляются в группе с мутациями *BRAF*.

В результатах исследований приведены значения экспрессии белка PD-L1 и PD-L2 на 6 клеточных линиях. Их экспрессия в необработанных препаратами клеточных линиях чаще всего не высокая или отсутствует. Положительная экспрессия хотя бы одного из исследуемых белков (PD-L2) детектируется только на 2 линиях из 6 (mel Vgf, mel Si). И только в этих двух линиях происходили изменения экспрессии белка под воздействием препаратов, схожие по тенденции со значениями для мРНК. В других четырех линиях, независимо от значений мРНК, экспрессия белка была незначительна или отсутствовала. В случае с клиническим материалом отмечена высокая корреляция мРНК и белка для PD-L1 или PD-L2 в опухоли [155, 181]. По данным литературы для нормальной ткани экспрессия мРНК PD-L1 присутствует, но экспрессия белка незначительна или отсутствует. При этом экспрессия поверхностного белка повышается под действием воспаления [167]. В случае меланомы, также существует мнение, что воспаление усиливает экспрессию PD-L1 на клетках опухоли [204]. В случае клеточной культуры, количество воспалительных цитокинов скорее всего невелико или они отсутствуют. Поэтому большинство клеточных линий

меланомы могли бы терять за ненадобностью поверхностную экспрессию данных белков. В тех же линиях, где по каким-то причинам сохраняется конститутивная поверхностная экспрессия PD-L1 или PD-L2, тенденция изменений после воздействия препаратов схожа с тенденцией для мРНК. Для этих клеток не обнаружено существенных изменений для PD-L1 после всех видов воздействий, но обнаружена более низкая экспрессия PD-L2 после воздействия липосомальной аранозы, по сравнению с аранозой-лио.

Учитывая тот факт, что в некоторых клеточных линиях пустые липосомы значительно повышают уровень экспрессии мРНК *PD-L1* или *PD-L2*, становится ясно, что подобные изменения могут быть вызваны не только противоопухолевыми химиопрепаратами. Однако на данном этапе мы не можем объяснить, какие механизмы задействованы при повышении уровня экспрессии мРНК *PD-L1* или *PD-L2* под влиянием аранозы или пустых липосом. В схожих исследованиях на клеточных линиях меланомы человека отмечена важность сигнальных белков MAPK и STAT3 в увеличении уровня экспрессии мРНК и белка PD-L1 при воздействии вемуروفениба [29; 106] и STAT3 в поддержании конститутивной экспрессии PD-L1 [129]. Если рассмотреть влияние химиопрепаратов на экспрессию PD-L1 на клетках опухоли, то их воздействие неоднозначно и скорее всего специфично для каждого конкретного препарата. В работах на экспериментальных моделях рака молочной железы паклитаксел, этопозид и 5-фторурацил повышали экспрессию PD-L1 [234], доксорубин снижал экспрессию PD-L1 на клетках опухоли [82]. Если рассмотреть влияние экспрессии PD-L1 на результаты лечения с помощью химиотерапии пациентов с меланомой, то его экспрессия не являлась значимым прогностическим маркером [197]. J. Sheng и соавт. показали, что при раке легкого экспрессия PD-L1 имеет тенденцию к снижению на образцах опухоли после проведенной химиотерапии, для иммунных клеток микроокружения изменений в экспрессии PD-L1 не обнаружено [187]. Хотя, скорее всего все зависит от конкретного препарата. Для молекулы PD-L2 подобных литературных данных не найдено.



В исследовании К.А. Schats et al. на 46 образцах метастазов меланомы изучали присутствие поверхностного PD-L1 методом иммуногистохимии и его мРНК на 21 образце из 46. Данные иммуногистохимии показали высокую корреляцию с данными экспрессии мРНК *PD-L1*. Во всех образцах, где была измерена мРНК *PD-L1*, было обнаружено ее наличие 1-250 [181]. Эти результаты схожи с нашими данными, полученными на клеточных линиях, не обработанных препаратами. Схожие данные по экспрессии PD-L1 были получены на клеточных линиях меланомы человека в работах [29; 106]. Y. Ohigashi и соавт. показали высокую корреляцию уровня белка PD-L1 и PD-L2 (иммуногистохимия) и мРНК (количественная ПЦР) на первичных образцах опухоли от пациентов с раком пищевода [155]. Данные о корреляции значений мРНК и белка PD-L1 и PD-L2 подтверждают значимость полученных нами данных по изменению экспрессии мРНК после воздействия различными лекарственными формами аранозы. Наши результаты также подтверждают данные других исследователей о том, что уровень мРНК *PD-L1* и белка в клеточных линиях нестабилен.

Увеличение экспрессии PD-L1 и PD-L2 в опухолевых клетках может способствовать защите опухоли от иммунного ответа. В нашем исследовании липосомальная форма аранозы не вызывала повышения уровня экспрессии мРНК *PD-L2*, в отличие от аранозы-лио, которая повышала уровень экспрессии мРНК *PD-L2*. В связи с этими данными можно отметить некоторое преимущество липосомальной аранозы по сравнению с аранозой-лио.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что две лекарственные формы аранозы – липосомальная и лиофилизат для приготовления раствора для инъекций – в определенных случаях оказывают различное воздействие на внутриклеточные сигнальные пути в клетках метастатической меланомы. Араноза-лио запускает механизмы устойчивости к химиотерапии, через повышение экспрессии мРНК *MDM2*, и к цитотоксическим лимфоцитам, через повышение экспрессии мРНК *PD-L2*. Липосомальная араноза, наоборот, запускает механизмы, способствующие чувствительности клеток к терапии, через повышение экспрессии мРНК *NFkB1* – фактора гибели клеток в ответ на повреждение ДНК, и повышает чувствительность к цитотоксическим лимфоцитам через снижение экспрессии мРНК *PD-L2*.

## ВЫВОДЫ

1. Мутации *TP53* обнаружены только в 22% исследованных клеточных линий метастатической меланомы кожи и не являются фактором чувствительности к аранозе.

2. Отсутствует связь между делециями короткого плеча 17-й хромосомы и чувствительностью клеточных линий метастатической меланомы кожи к аранозе.

3. Уровень экспрессии мРНК *TP53*, *MyD88*, *NFkB2*, *PD-L1* в клетках меланомы не имел статистически значимых различий между воздействиями «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» и «липосомальной» аранозы.

4. В воздействии «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» и «липосомальной» аранозы на клеточные линии меланомы человека имеются отличия, выявляющие преимущества липосомальной формы.

5. Уровень экспрессии мРНК *MDM2* в клетках меланомы после воздействия аранозы «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» выше по сравнению с «липосомальной» формой ( $p=0,0464$ ).

6. Уровень экспрессии мРНК *NFkB1* в клетках меланомы после воздействия «липосомальной» формы аранозы выше по сравнению с «лиофилизатом для приготовления раствора для инъекций» ( $p=0,0331$ ).

7. Уровень экспрессии мРНК *PD-L2* в клетках меланомы после воздействия аранозы «лиофилизата для приготовления раствора для инъекций» выше по сравнению с «липосомальной» формой ( $p=0,0164$ ).

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ЛА – липосомальная араноза;
- МЛУ – множественная лекарственная устойчивость;
- ПЛ – пустые липосомы;
- ПЦР – полимеразная цепная реакция;
- ТЭС – телячья эмбриональная сыворотка;
- АВС-транспортеры (adenosine triphosphate-binding cassette transporters) – семейство АТФ-зависимых транспортных белков;
- АКТ (AKT8 virus oncogene cellular homolog);
- Араf1 (Apoptotic protease activating factor 1);
- Bcl-2 (B-cell lymphoma 2);
- BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B);
- FISH (fluorescence in situ hybridization) – флуоресцентная гибридизация in situ;
- GST (glutathione S-transferases) – глутатион-S-трансферазы;
- МАРК (mitogen-activated protein kinase) – митоген-активированная протеинкиназа;
- MDM2 (murine double minute 2);
- MGMT – Об-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза;
- MGMT (Об-methylguanine-DNA methyltransferase);
- MMR (mismatch repair) – репарация ошибочно спаренных нуклеотидов;
- MRP (multidrug resistance protein) – белок множественной лекарственной устойчивости;
- MyD88 (англ. Myeloid differentiation primary response gene 88);
- NF-κB (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) – ядерный фактор «каппа-би»;
- PD-L1 (Programmed death-ligand 1);
- Pgp (P-glycoprotein) – Р-гликопротеин;
- STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3);
- TLR (Toll-like receptor) – толл-подобные рецепторы;

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Афанасьева, Д.А. Липосомальная араноза не индуцирует аутофагию / Д.А. Афанасьева, М.А. Барышникова, Ю.А. Хоченкова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2015. – Т. 14, № 1. – С. 15–18.
2. Афанасьева, Д.А. Изменение уровня экспрессии гена CD95/FAS в клетках линий меланомы под воздействием липосомальной аранозы / Д.А. Афанасьева, В.А. Мисюрин, А.В. Пономарев и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2016. – Т.15, №3. – С. 34–39.
3. Барышников, А.Ю. Программированная клеточная смерть (апоптоз) / А.Ю. Барышников, Ю.В. Шишкин // Российский онкологический журнал. – 1996. – № 1. – С. 58.
4. Барышникова, М.А. Взаимодействие липидных капсул с клеткой / М.А. Барышникова, М.Т. Зангиева, А.Ю. Барышников // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. – Т. 12, № 1. – С. 11–15.
5. Барышникова, М.А. Роль CD95/Fas рецептора в индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами / М.А. Барышникова, Н.В. Грищенко, О.С. Бурова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 3. – С. 3–8.
6. Грищенко, Н.В. Липосомальные противоопухолевые препараты не используют CD95-зависимый сигнальный путь апоптоза / Н.В. Грищенко, М.А. Барышникова, А.П. Полозкова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 37–42.
7. Грищенко, Н.В. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм противоопухолевых препаратов из класса нитрозомочевины / Н.В. Грищенко, Б. Альбассит, М.А. Барышникова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 1. – С. 49–53.
8. Давыдов М.И. Экспериментальная онкология на рубеже веков / под ред. М.И. Давыдова, А.Ю. Барышникова // М.: издательская группа РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2003. – 552 с.

9. Клаан, Н.К. Ядерный фактор каппа в (NF- $\kappa$ B) в качестве мишени для действия природных противоопухолевых соединений / Н.К.Клаан, Т.А. Пронина, Л.П. Акиньшина и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т.13, №1. – С. 3 - 8.
10. Ключагина, Ю.И. Роль рецептора PD1 и его лигандов PDL1 и PDL2 в иммунотерапии опухолей / Ю.И Ключагина., З.А. Соколова, М.А. Барышникова // Онкопедиатрия. – 2017–Т.4, №1 – С. 49–55.
11. Козеев Г.С. Разработка липосомальной лекарственной формы противоопухолевого препарата араноза: Автореф. ... дисс. к.фарм.н. – М., 2013.
12. Козеев, С.Г. Разработка наноструктурированной липосомальной формы аранозы / С.Г. Козеев, М.А. Барышникова, С.А. Полозкова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2012– Т.11, №2. – С. 24.
13. Козеев, С.Г. Сравнение цитотоксического действия двух лекарственных форм аранозы / С.Г. Козеев, М.А. Барышникова, Д.А. Афанасьева и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2012. – Т.11, №2. – С. 24.
14. Копнин, Б.П. Многоликий p53: разнообразие форм, функций, опухольсупрессирующих и онкогенных активностей / Копнин Б.П., Копнин П. Б., Хромова Н. В. и др. // Клиническая онкогематология. – 2008. – Т.1, №1.– С. 2-9.
15. Корман, Д.Б. Основы противоопухолевой терапии / Д.Б. Корман // Практическая медицина. – 2006. – С.512.
16. Маянский, А.Н. Нуклеарный фактор- $\kappa$ B и воспаление / А.Н. Маянский, Н.А. Маянский, М.И. Заславская // Цитокины и воспаление. – 2007. – Т.6, № 2. – С. 3-9.
17. Михайлова, И.Н. Клеточные линии меланомы – основа для создания противоопухолевых вакцин / И.Н. Михайлова, М.И. Лукашина, А.Ю. Барышников и др. // Вестник РАМН. – 2005. – №7. – С. 37-40.
18. Михайлова, И.Н. Экспрессия раково-тестикулярных антигенов в клетках меланомы человека / И.Н. Михайлова, Д.А. Ковалевский, О.С. Бурова и др. // Сибирский онкологический журнал. – 2010. – Т.37, №1. – С. 29-39.

19. Михайлова, И. Н. Клеточные линии меланомы человека / Под общ. ред. И. Н. Михайловой, М. М. Давыдова // Издательство «Научные технологии» (Санкт-Петербург), 2017. – 174 с.
20. Моисеенко, В.М. Практические рекомендации по лекарственному лечению злокачественных опухолей (RUSSCO) / под редакцией: В.М. Моисеенко. – М. Общероссийская общественная организация «Российское общество клинической онкологии», 2016. – 524 с.
21. Переводчикова, Н.И. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний / Н.И. Переводчикова, В.А. Горбунова // М.: Практическая медицина, 2014. – 686 с.
22. Рябая, О.О. Влияние активирующих мутаций V600 гена B-RAF на способность клеток меланомы к аутофагии / О.О. Рябая, И.В. Цыганова, Т.И. Сидорова и др. // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2013. – №3. – С. 68–72.
23. Шоуа, И.Б. Действие липосомального доксорубина на клетки линии, экспрессирующие активный Pgp170 / И.Б. Шоуа, А.П. Полозкова, Н.А. Оборотова и др. // Российский биотерапевтический журнал. – 2004. – Т.3, №1. – С. 20–23.
24. Ahmadzadeh, M. Tumor antigen-specific CD8 T cells infiltrating the tumor express high levels of PD-1 and are functionally impaired / M. Ahmadzadeh, L.A. Johnson, B. Heemskerk et al. // Blood. – 2009. – 114(8). – P. 1537-1544.
25. Amiri, K.I. Role of nuclear factor-kappa B in melanoma / K.I. Amiri, A. Richmond // Cancer Metastasis Rev. – 2005 – 24(2). – P. 301-13.
26. Anvekar, R.A. Sensitization to the mitochondrial pathway of apoptosis augments melanoma tumor cell responses to conventional chemotherapeutic regimens / R.A. Anvekar, J.J. Asciolla, E. Lopez-Rivera // Cell Death Dis. – 2012. – 3. – e420.
27. Ascierto, P.A. Future perspectives in melanoma research: Meeting report from the "Melanoma Bridge". Napoli, December 1st-4th 2015 / P.A. Ascierto, S. Agarwala, G. Botti et al. // J Transl Med. – 2016. – 14(1). – P. 313.

28. Ashcroft, M. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53 / M. Ashcroft, Y. Taya, K.H. Vousden // *Mol Cell Biol.* –2000. – 20(9). – P. 3224–3233.
29. Atefi, M. Effects of MAPK and PI3K pathways on PD-L1 expression in melanoma / M. Atefi, E. Avramis, A. Lassen et al. // *Clin Cancer Res.* – 2014.– 20(13). – P. 3446-57.
30. Avery-Kiejda, K.A. P53 in human melanoma fails to regulate target genes associated with apoptosis and the cell cycle and may contribute to proliferation. / K.A. Avery-Kiejda, N.A. Bowden, A.J. Croft et al. // *BMC Cancer.* – 2011. – 11. – P. 203.
31. Barbieri, E. MDM2 inhibition sensitizes neuroblastoma to chemotherapy-induced apoptotic cell death / E. Barbieri, P. Mehta, Z. Chen et al. // *Mol Cancer Ther.* – 2006. –5(9). – P. 2358-2365.
32. Becker, K. Targeted expression of human O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in transgenic mice protects against tumor initiation in two-stage skin carcinogenesis / K. Becker, J. Dosch, C.M. Gregel et al. // *Cancer Res.* – 1996. – 56(14). – P. 3244-3249.
33. Becker, K. The DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase protects against skin tumor formation induced by antineoplastic chloroethylnitrosourea / K. Becker, C.M. Gregel, B. Kaina // *Cancer Res.* – 1997. – 57(16). – P. 3335-3338.
34. Beranek, D.T. A comprehensive quantitative analysis of methylated and ethylated DNA using high pressure liquid chromatography / D.T. Beranek, C.C. Weis CC, D.H. Swenson // *Carcinogenesis.* – 1980. – 1(7). – P. 595-606.
35. Beranek, D.T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents / D.T. Beranek // *Mutat Res.* – 1990. – 231(1). – P. 11-30.
36. Berger, W. Possible role of the multidrug resistance-associated protein (MRP) in chemoresistance of human melanoma cells / W. Berger, E. Hauptmann, L. Elbling, et al. // *Int J Cancer.* – 1997. – 71(1). – P. 108-115.



37. Biroccio, A. Glutathione influences c-Myc-induced apoptosis in M14 human melanoma cells / A. Biroccio, B. Benassi, G. Filomeni, et al. // *J Biol Chem.* – 2002. – 277(46). – P. 43763-43770.
38. Blagosklonny, M.V. Loss of function and p53 protein stabilization / M.V. Blagosklonny // *Oncogene.* – 1997. – 15(16). – P. 1889–1893.
39. Bogdan, I. Heterogeneity of allelic deletions within melanoma metastases / Bogdan I., Xin H., Burg G., Boni R. // *Melanoma Res.* – 2001. – 11(4). – P. 349-54.
40. Boni, R. Chromosomal allele loss in primary cutaneous melanoma is heterogeneous and correlates with proliferation / R. Boni, D. Matt, A. Voetmeyer et al. // *J Invest Dermatol.* – 1998. – 110(3). – P. 215-217.
41. Borner, C. Mutated N-ras upregulates Bcl-2 in human melanoma in vitro and in SCID mice / C. Borner, H. Schlagbauer Wadl, I. Fellay et al. // *Melanoma Res.* – 1999. – 9(4). – P. 347-350.
42. Bowden, N.A. Nucleotide excision repair gene expression after Cisplatin treatment in melanoma / N.A. Bowden, K.A. Ashton, K.A. Avery-Kiejda et al. // *Cancer Res.* – 2010. – 70(20). – P. 7918-7926.
43. Buolamwini, J.K. Small molecule antagonists of the MDM2 oncoprotein as anticancer agents / J.K. Buolamwini, J. Addo, S. Kamath et al. // *Curr Cancer Drug Targets.* – 2005. – 5(1). – P. 57–68.
44. Campaign, J.A. Acquisition of multiple copies of a mutant topoisomerase IIalpha allele by chromosome 17 aneuploidy is associated with etoposide resistance in human melanoma cell lines / J.A. Campaign, M.L. Slovak, P.V. Schoenlein, et al. // *Somat Cell Mol Genet.* – 1995. – 21(6). – P. 451-471.
45. Cao, C. Radiosensitization of lung cancer by nutlin, an inhibitor of murine double minute 2 / C. Cao, E.T. Shinohara, T.K. Subhawong et al. // *Mol Cancer Ther.* – 2006. – 5(2). – P. 411-417.
46. Cao, S. NF-kappaB1 (p50) homodimers differentially regulate pro- and anti-inflammatory cytokines in macrophages / S. Cao, X. Zhang, J.P. Edwards, D.M. Mosser // *J Biol Chem.* – 2006. – 281(36). – P. 26041-26050.

47. Chen M.F. The role of PD-L1 in the radiation response and prognosis for esophageal squamous cell carcinoma related to IL-6 and T-cell immunosuppression / M.F. Chen, P.T. Chen, W.C. Chen et al. // *Oncotarget*. –2016. – 7(7). – P. 7913-7924.
48. Chen, K.G. Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma / K.G. Chen, J.C. Valencia, J.P. Gillet, et al. // *Pigment Cell Melanoma Res*. – 2009. – 22(6). – P. 740-749.
49. Chen, Y. Expression of B7-H1 in inflammatory renal tubular epithelial cells / Y. Chen, J. Zhang, J. Li et al. // *Nephron Exp Nephrol*. – 2006. – 102(3-4). – e81-92.
50. Chomczynski, P. The singlestep method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: Twenty something years on / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Nat Protoc*. – 2006. –1(2). – P. 581–5.
51. Christmann, M. Acquired resistance of melanoma cells to the antineoplastic agent fotemustine is caused by reactivation of the DNA repair gene MGMT / M. Christmann, M. Pick, H. Lage et al. // *Int J Cancer*. – 2001. – 92(1). – P. 123-129.
52. Christmann, M. O(6)-Methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) in normal tissues and tumors: enzyme activity, promoter methylation and immunohistochemistry / M. Christmann, B. Verbeek, W.P. Roos, B. Kaina // *Biochim Biophys Acta*. – 2011. – 1816(2). – P. 179-190.
53. Coll-Mulet, L. MDM2 antagonists activate p53 and synergize with genotoxic drugs in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells / L. Coll-Mulet, D. Iglesias-Serret, A.F. Santidrian et al. *Blood*. – 2006. – 107(10). – P. 4109–4114.
54. Concetti, J. NFKB1 and Cancer: Friend or Foe? / J. Concetti, C.L. Wilson // *Cells*. – 2018. – 7(9). – pii: E133.
55. Darwiche, N. Expression profile of skin papillomas with high cancer risk displays a unique genetic signature that clusters with squamous cell carcinomas and predicts risk for malignant conversion / N. Darwiche, A. Ryscavage, R. Perez-Lorenzo et al. // *Oncogene*. – 2007. – 26(48). – P. 6885-6895.

56. Daud, A.I. Potentiation of a topoisomerase I inhibitor, karenitecin, by the histone deacetylase inhibitor valproic acid in melanoma: translational and phase I/II clinical trial / A.I. Daud, J. Dawson, R.C. DeConti, et al. // *Clin Cancer Res.* – 2009. – 15(7). – P. 2479-2487.
57. Davis, J.L. Liposomal-encapsulated Ascorbic Acid: Influence on Vitamin C Bioavailability and Capacity to Protect Against Ischemia-Reperfusion Injury / J.L. Davis, H.L. Paris, J.W. Beals et al. // *Nutr. Metab. Insights.* – 2016. – 9. – P. 25-30.
58. Day, R.S. 3rd. Defective repair of alkylated DNA by human tumour and SV40-transformed human cell strains / R.S. Day 3rd, C.H. Ziolkowski, D.A. Scudiero et al. // *Nature.* – 1980. – 288(5792). – P. 724-727.
59. Deben, C. The MDM2-inhibitor Nutlin-3 synergizes with cisplatin to induce p53 dependent tumor cell apoptosis in non-small cell lung cancer / C. Deben, A. Wouters, K. Op de Beeck et al. // *Oncotarget.* – 2015. – 6(26). – P 22666-22679.
60. Deng, C.X. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? / C.X. Deng // *Int J Biol Sci.* – 2009. – 5(2). – P. 147-52.
61. Deshpande, P.P. Current trends in the use of liposomes for tumor targeting / P.P. Deshpande, S. Biswas, V.P. Torchilin // *Nanomedicine.* – 2013. – 8(9). – P. 1509-1528.
62. DiDonato, J.A. NF- $\kappa$ B and the link between inflammation and cancer / J.A. DiDonato, F. Mercurio, M. Karin // *Immunol Rev.* – 2012. – 246(1). – P. 379-400.
63. Dong, H. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion / H. Dong, G. Zhu, K. Tamada, L. Chen // *Nat Med.* – 1999. – 5(12). – P. 1365-1369.
64. Dong, H. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion / H. Dong, S.E. Strome, D. R. Salomao et al. // *Nat Med.* – 2002. – 8(8). – P. 793-800.
65. Drozd, E. Intracellular glutathione level and efflux in human melanoma and cervical cancer cells differing in doxorubicin resistance / E. Drozd, B. Gruber, J. Marczevska, et al. // *Postepy Hig Med Dosw (Online).* – 2016. – 70. – P. 319-328.

66. Drummond, D. C. Optimizing liposomes for delivery of chemotherapeutic agents to solid tumors / D.C. Drummond, O. Meyer, K. Hong, D.B. Kirpotin, D. Papahadjopoulos // *Pharmacological reviews*. – 1999. – 51(4). – P. 691–744.
67. Ea, C.K. EHMT1 protein binds to nuclear factor- $\kappa$ B p50 and represses gene expression / C.K. Ea, S. Hao, K.S. Yeo, D. Baltimore // *J Biol Chem*. – 2012. – 287(37). – P. 31207-31217.
68. Eggermont, A.M. Re-evaluating the role of dacarbazine in metastatic melanoma: what have we learned in 30 years? / A.M. Eggermont, J.M. Kirkwood // *Eur J Cancer*. – 2004. – 40(12). – P. 1825-1836.
69. Elliott A.M. ABCB8 mediates doxorubicin resistance in melanoma cells by protecting the mitochondrial genome / A.M. Elliott, M.A. Al-Hajj // *Mol Cancer Res*. – 2009. – 7(1). – P. 79-87.
70. Elsharkawy, A.M. The NF-kappaB p50:p50:HDAC-1 repressor complex orchestrates transcriptional inhibition of multiple pro-inflammatory genes / A.M. Elsharkawy, F. Oakley, F. Lin et al. // *J Hepatol*. – 2010. – 53(3). – P. 519-527.
71. Fofaria, N.M. Overexpression of Mcl-1 confers resistance to BRAFV600E inhibitors alone and in combination with MEK1/2 inhibitors in melanoma / N.M. Fofaria, D.T. Frederick, R.J. Sullivan et al. // *Oncotarget*. – 2015. – 6(38). – P. 40535-40556.
72. Forssen, E.A. Fluorescence imaging studies for the disposition of daunorubicin liposomes (DaunoXome) within tumor tissue / E.A. Forssen, R. Malé-Brune, J.P. Adler-Moore et al. // *Cancer Res*. – 1996. – 56(9). – P. 2066-2075.
73. Frank, N.Y. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma / N.Y. Frank, A. Margaryan, Y. Huang, et al. // *Cancer Res*. – 2005. – 65(10). – P. 4320-4333.
74. Franklin, C. Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions / C. Franklin, E. Livingstone, A. Roesch et al. // *Eur J Surg Oncol*. – 2017. – 43(3) – P. 604-611.

75. Fritsche, M.K. Cisplatin fails to induce puma mediated apoptosis in mucosal melanomas / M.K. Fritsche, V. Metzler, K. Becker et al. // *Oncotarget*. – 2015. – 6(12). – P. 9887-9896.
76. Fu, D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents / D. Fu, J.A. Calvo, L.D. Samson // *Nat Rev Cancer*. – 2012. – 12(2). – P. 104-120.
77. Fuertes, M.A. Cisplatin biochemical mechanism of action: from cytotoxicity to induction of cell death through interconnections between apoptotic and necrotic pathways / M.A. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, J.M. Perez // *Curr Med Chem*. – 2003. – 10(3). – P. 257-266.
78. Fukunaga-Kalabis, M. Beyond ABC: another mechanism of drug resistance in melanoma side population / Fukunaga-M. Kalabis, M. Herlyn // *J Invest Dermatol*. – 2012. – 132(10). – P. 2317-2319.
79. Galluzzi, L. Molecular mechanism of cisplatin resistance / L. Galluzzi, L. Senovilla, I. Vitale et al. // *Oncogene*. – 2012. – 31. – P. 1869–1883. 85.
80. Galluzzi, L. System biology of cisplatin resistance: past, present and future / L. Galluzzi, I. Vitale, J. Michels et al. // *Cell Death and Disease*. – 2014. – 5. – e1257.
81. Gerson, S.L. MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics / S.L. Gerson // *Nat Rev Cancer*. – 2004. – 4(4). – P. 296-307.
82. Ghebeh, H. Doxorubicin downregulates cell surface B7-H1 expression and upregulates its nuclear expression in breast cancer cells: role of B7-H1 as an anti-apoptotic molecule / H. Ghebeh, C. Lehe, E. Barhoush et al. // *Breast Cancer Res*. – 2010. – 12(4). – R48.
83. Glantz, M.J. A randomized controlled trial comparing intrathecal sustained-release cytarabine (DepoCyt) to intrathecal methotrexate in patients with neoplastic meningitis from solid tumors / M.J. Glantz, K.A. Jaeckle, M.C. Chamberlain et al. // *Clin Cancer Res*. – 1999. – 5(11). – P. 3394-3402.
84. Goldszmid, R.S. The price of immunity / R.S. Goldszmid, G. Trinchieri // *Nat Immunol*. – 2012. – 13(10). – P. 932-938.

85. Goto, Y. Activation of Toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors / Y. Goto, T. Arigami, M. Kitago et al. // *Mol Cancer Ther.* – 2008. – 7(11). – P. 3642-53.
86. Gotwals, P. Prospects for combining targeted and conventional cancer therapy with immunotherapy / P. Gotwals, S. Cameron, D. Cipelletta et al. // *Nat Rev Cancer.* – 2017 – Mar 24.
87. Grabie, N. Endothelial programmed death-1 ligand 1 (PD-L1) regulates CD8+ T-cell mediated injury in the heart / N. Grabie, I. Gotsman, R. DaCosta et al. // *Circulation.* – 2007. – 116(18). – P. 2062-2071.
88. Guan, X. The Efficacy and Safety of Programmed Cell Death 1 and Programmed Cell Death 1 Ligand Inhibitors for Advanced Melanoma: A Meta-Analysis of Clinical Trials Following the PRISMA Guidelines / X. Guan H. Wang, F. Ma et al. // *Medicine (Baltimore).* – 2016. –95(11). – e3134.
89. Gurunathan S. Nanoparticle-Mediated Combination Therapy: Two-in-One Approach for Cancer / S. Gurunathan, M.H. Kang, M. Qasim, J.H. Kim // *Int J Mol Sci.* – 2018. – 19(10). – 3264.
90. Gwosdz, C. Comprehensive analysis of the p53 status in mucosal and cutaneous melanomas / C. Gwosdz, K. Scheckenbach, O. Lieven et al. // *Int J Cancer.* – 2006 – 118(3). – P. 577–582.
91. Harris, S.J. Immuno-oncology combinations: raising the tail of the survival curve / S.J. Harris, J. Brown, J. Lopez, et al. // *Cancer Biol Med.* – 2016. – 13(2). – P. 171-93.
92. Hasan, U.A. Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblasts / U.A. Hasan, G. Trinchieri, J. Vlach // *J Biol Chem.* – 2005. – 280(21). – P. 20620-20627.
93. Healy, E. Allelotypes of primary cutaneous melanoma and benign melanocytic nevi / E. Healy, C.E. Belgaid, M. Takata et al. // *Cancer Res.* – 1996. – 56(3). – P. 589-593.

94. Heimerl, S. Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells / S. Heimerl, A.K. Bosserhoff, T. Langmann et al. // *Melanoma Res.* – 2007. – 17(5). – P. 265-273.
95. Helmbach, H. Drug resistance towards etoposide and cisplatin in human melanoma cells is associated with drug-dependent apoptosis deficiency / H. Helmbach, M.A. Kern, E. Rossmann et al. // *J Invest Dermatol.* – 2002. – 118(6). – P. 923-932.
96. Hientz, K. The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy / K. Hientz, A. Mohr, D. Bhakta-Guha et al. // *Oncotarget.* – 2017. – 8(5). – P. 8921–8946.
97. Hong, H. Suppression of induced pluripotent stem cell generation by the p53-p21 pathway / H. Hong, K. Takahashi, T. Ichisaka // *Nature.* – 2009. – 460(7259). – P. 1132-1135.
98. Houben, R. High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays / R. Houben, S. Hesbacher, C.P. Schmid et al. // *PLoS One.* – 2011 – 6(7). – e22096.
99. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000077150-NFKB2/pathology/tissue/melanoma.html>
100. Hussein, M.R. Apoptosis and melanoma: molecular mechanisms / M.R. Hussein, A.K. Haemel, G.S. Wood // *J Pathol.* – 2003. – 199(3). – P. 275-288.
101. Hussein, M.R. p53-related pathways and the molecular pathogenesis of melanoma / M.R. Hussein, A.K. Haemel, G.S. Wood // *Eur J Cancer Prev.* – 2003. – 12(2). – P. 93-100.
102. Ichihashi, N. Chemotherapy induces or increases expression of multidrug resistance-associated protein in malignant melanoma cells / N. Ichihashi, Y. Kitajima // *Br J Dermatol.* – 2001. – 144(4). – P. 745-50.
103. Iimuro, Y. Role of innate immune response in liver regeneration / Y. Iimuro, E. Seki, G. Son et al. // *J Gastroenterol Hepatol.* – 2007. – Suppl 1. S57-8.
104. Ishikawa, H. Chronic inflammation and susceptibility to bacterial infections in mice lacking the polypeptide (p)105 precursor (NF-kappaB1) but

expressing p50 / H. Ishikawa, E. Claudio, D. Dambach et al. // *J Exp Med.* – 1998. – 187(7). – P. 985-996.

105. Je, E.M. Mutational and expressional analyses of MYD88 gene in common solid cancers / E.M. Je, S.S. Kim, N.J. Yoo, S.H. Lee // *Tumori.* – 2012. – 98(5). – P. 663-669.

106. Jiang, X. The activation of MAPK in melanoma cells resistant to BRAF inhibition promotes PD-L1 expression that is reversible by MEK and PI3K inhibition. / X. Jiang, J. Zhou, A. Giobbie-Hurder et al. // *Clin Cancer Res.* – 2013. – 19(3). – P. 598-609.

107. Johannessen, C.M. COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation / C.M. Johannessen, J.S. Boehm, S.Y. Kim et al. // *Nature.* – 2010. – 468(7326). – P. 968-72.

108. Judson, I. Randomised phase II trial of pegylated liposomal doxorubicin (DOXIL/CAELYX) versus doxorubicin in the treatment of advanced or metastatic soft tissue sarcoma: A study by the EORTC Soft Tissue and Bone Sarcoma Group / I. Judson, J.A. Radford, M. Harris et al. // *Eur J Cancer.* – 2001. – 37(7). – P. 870-877.

109. Jung, Y. Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage / Y. Jung, S. Lippard // *Chemical Rev.* – 2006. – P. 107.

110. Kaina, B. Transfection and expression of human O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents / B. Kaina, G. Fritz, S. Mitra, T. Coquerelle // *Carcinogenesis.* – 1991. – 12(10). – P. 1857-1867.

111. Kalal, B.S. Chemotherapy Resistance Mechanisms in Advanced Skin Cancer / B.S. Kalal, D. Upadhyaya, V.R. Pai // *Oncol Rev.* – 2017. – 11(1). – P. 326.

112. Karran, P. DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability / P. Karran, M. Bignami // *Bioessays.* – 1994. – 16(11). – P. 833-839.

113. Keir, M.E. PD-1 and its ligands in tolerance and immunity / M.E. Keir, M.J. Butte, G.J. Freeman, A.H. Sharpe // *Annu Rev Immunol.* – 2008. – 26. – P. 677-704.



114. Klein, C. Targeting the p53-MDM2 interaction to treat cancer / C. Klein, L.T. Vassilev // *Br J Cancer*. – 2004. – 91(8). – P. 1415-1419.
115. Kobayashi, T. Effect of transferrin receptor-targeted liposomal doxorubicin in P-glycoprotein-mediated drug resistance tumor cells / T. Kobayashi, T. Ishida, Y. Okada et al. // *Int J. Pharm.* – 2007. – 329(1-2). – P. 94-102.
116. Koblisch, H.K. Benzodiazepinedione inhibitors of the Hdm2:p53 complex suppress human tumor cell proliferation in vitro and sensitize tumors to doxorubicin in vivo / H.K. Koblisch, S. Zhao, C.F. Franks et al. // *Mol Cancer Ther.* – 2006. – 5(1). – P. 160-169.
117. Koch, M. Overcoming chemotherapy resistance of ovarian cancer cells by liposomal cisplatin: Molecular mechanisms unveiled by gene expression profiling / M. Koch, M.L. Krieger, D. Stolting et al. // *Biochemical Pharmacology*. – 2013. – 85(8). – P. 1077-1090.
118. Koetz-Ploch, L. MicroRNA-125a promotes resistance to BRAF inhibitors through suppression of the intrinsic apoptotic pathway / L. Koetz-Ploch, D. Hanniford, I. Dolgalev et al. // *Pigment Cell Melanoma Res.* – 2017. – 30(3). – P. 328-338.
119. Krauthammer, M. Exome sequencing identifies recurrent mutations in NF1 and RASopathy genes in sun-exposed melanomas / M. Krauthammer, Y. Kong, A. Bacchiocchi et al. // *Nat Genet.* – 2015. – 47(9). – P. 996-1002.
120. Kravtsova-Ivantsiv, Y. KPC1-mediated ubiquitination and proteasomal processing of NF- $\kappa$ B1 p105 to p50 restricts tumor growth / Y. Kravtsova-Ivantsiv, I. Shomer, V. Cohen-Kaplan et al. // *Cell*. – 2015. – 161(2). – P. 333-347.
121. Kreiger, M.L. Overcoming cisplatin resistance of ovarian cancer cells by targeted liposomes in vitro / M.L. Kreiger, N. Eckstein, V. Schneider et al. // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2010. – 389(1-2). – P. 10-17.
122. Lage, H. Modulation of DNA topoisomerase II activity and expression in melanoma cells with acquired drug resistance / H. Lage, H. Helmbach, M. Dietel, D. Schadendorf // *Br J Cancer*. – 2000. – 82(2). – P. 488-491.

123. Latchman, Y. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation / Y. Latchman, C.R. Wood, T. Chernova et al. // *Nat Immunol.* – 2001. – 2(3). – P. 261-268.
124. Lavin, M.F. The complexity of p53 stabilization and activation / M.F. Lavin, N. Gueven // *Cell Death Differ.* – 2006 – 13(6). – P. 941–950.
125. Lee, K.D. Recognition of liposomes by cells: In vitro binding and endocytosis mediated by specific lipid head groups and surface charge density / K.D. Lee, K. Hong, D. Papahadiopoulos // *Biochim Biophys Acta.* – 1992. – 1103(2). – P. 185-197.
126. Legha, S.S. Treatment of metastatic melanoma with combined chemotherapy containing cisplatin, vinblastine and dacarbazine (CVD) and biotherapy using interleukin-2 and interferon-alpha / S.S. Legha, S. Ring, A. Bedikian et al. // *Ann Oncol.* – 1996. – 7. – P. 827–835.
127. Li, W. The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma / W. Li, A. Sanki, R.Z. Karim et al. // *Pathology.* – 2006. – 38(4). – P. 287-301.
128. Liedert, B. Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin / B. Liedert, V. Materna, D. Schadendorf, et al. // *J Invest Dermatol.* – 2003. – 121(1). – P. 172-176.
129. Lienlaf, M. Essential role of HDAC6 in the regulation of PD-L1 in melanoma / M. Lienlaf, P. Perez-Villarroel, T. Knox et al. // *Mol Oncol.* – 2016. – 10(5). – P. 735-750.
130. Liu, Y. A novel BH3 mimetic efficiently induces apoptosis in melanoma cells through direct binding to anti-apoptotic Bcl-2 family proteins, including phosphorylated Mcl-1 / Y. Liu, M. Xie, T. Song // *Pigment Cell Melanoma Res.* – 2015. – 28(2). – P. 161-170.
131. Loke, P. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells / P. Loke, J.P. Allison // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2003. – 100(9). – P. 5336-5341.

132. Lu, X. The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop / X. Lu, O. Ma, T.A. Nguyen et al. // *Cancer Cell*. – 2007. – 12(4). – P. 342-354.
133. Lu, Y.C. LPS/TLR4 signal transduction pathway / Y.C. Lu, W.C. Yeh, P.S. Ohashi // *Cytokine*. – 2008. – 42(2). – P. 145-51.
134. Luo, Y. Side population cells from human melanoma tumors reveal diverse mechanisms for chemoresistance / Y. Luo, L.Z. Ellis, K. Dallaglio, et al. // *J Invest Dermatol*. – 2012. – 132(10). – P. 2440-2450.
135. Ma, S. Analysis of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in melanoma tumours in patients treated with dacarbazine-based chemotherapy / S. Ma, S. Egyhazi, G. Martenhed et al. // *Melanoma Res*. – 2002. – 12(4). – P. 335-342.
136. Macedo, L. Wound healing is impaired in MyD88-deficient mice: a role for MyD88 in the regulation of wound healing by adenosine A2A receptors / L. Macedo, G. Pinhal-Enfield, V. Alshits // *Am J Pathol*. – 2007. – 171(6). – P. 1774-1788.
137. Mannervik, B. Expression of class Pi glutathione transferase in human malignant melanoma cells / B. Mannervik, V.M. Castro, U.H. Danielson, et al. // *Carcinogenesis*. – 1987. – 8(12). – P. 1929-1932.
138. Mazanet, M.M. B7-H1 is expressed by human endothelial cells and suppresses T cell cytokine synthesis / M.M. Mazanet, C.C. Hughes // *J Immunol*. – 2002. – 169(7). – P. 3581-3588.
139. Meikrantz, W. O6-alkylguanine DNA lesions trigger apoptosis / W. Meikrantz, M.A. Bergom, A. Memisoglu, L. Samson // *Carcinogenesis*. – 1998. – 19(2). – P. 369-372.
140. Michael D. The p53 and Mdm2 families in cancer / D. Michael, M. Oren // *Curr Opin Genet Dev*. – 2002 – 12(7). – P. 53–59.
141. Michael, D. The p53-Mdm2 module and the ubiquitin system / D. Michael, M. Oren // *Semin Cancer Biol*. – 2003. – 13(1). – P. 49–58.
142. Mickisch, G.H. Increased effectiveness of liposome-encapsulated doxorubicin in multidrug-resistance-transgenic mice compared with free doxorubicin / G.H. Mickisch, A. Ranman, I. Pastan et al. // *J Natl Cancer Inst*. – 1992. – P. 84. 121.

143. Middleton, M.R. O6-methylguanine-DNA methyltransferase in pretreatment tumour biopsies as a predictor of response to temozolomide in melanoma / M.R. Middleton, J.M. Lunn, C. Morris et al. // *Br J Cancer*. – 1998. – 78(9). – P. 1199-1202.
144. Middleton, M.R. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma / M.R. Middleton, J.J. Grob, N. Aaronson et al. // *J Clin Oncol*. – 2000. – 18(1). – P. 158-166.
145. Moore, F.R. Quantitative BCR-ABL1 RQ-PCR fusion transcript monitoring in chronic myelogenous leukemia / F.R. Moore, C.B. Rempfer, R.D. Press // *Press Methods Mol Biol*. – 2013. – 999. – P. 1–23.
146. Moral, A. Immunohistochemical study of alpha, mu and pi class glutathione S transferase expression in malignant melanoma. MMM Group. Multidisciplinary Malignant Melanoma Group / Moral A, Palou J, Lafuente A, et al. // *Br J Dermatol*. – 1997. – 136(3). – P. 345-350.
147. Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mossman // *J. Immunol. Meth*. – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63.
148. Muller, A.J. Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase / A.J. Muller, M.D. Sharma, P.R. Chandler et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2008. – 105(44). – P. 17073-17078.
149. Nag, S. The MDM2-p53 pathway revisited / S. Nag, J. Qin, K.S. Srivenugopal et al. // *J Biomed Res*. – 2013. – 27(4). – P. 254-271.
150. Naumann, S.C. Temozolomide- and fotemustine-induced apoptosis in human malignant melanoma cells: response related to MGMT, MMR, DSBs, and p53 / S.C. Naumann, W.P. Roos, E. Jost et al. // *Br J Cancer*. – 2009. – 100(2). – P. 322-333.
151. Ngo, V.N. Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma / V.N. Ngo, R.M. Young, R. Schmitz et al. // *Nature*. – 2011. – 470(7332). – P.115-119.

152. Nissan, M.H. Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence / M.H. Nissan, C.A. Pratilas, A.M. Jones et al. // *Cancer Res.* – 2014. – 74(8). – P. 2340-2350.

153. O'Brien, M.E.R. Reduced cardiotoxicity and comparable efficacy in a phase III trial of pegylated liposomal doxorubicin HCl (Caelyx/Doxil) versus conventional doxorubicin for first-line treatment of metastatic breast cancer / M.E.R. O'Brien, N. Wigler, M. Inbar et al. *Ann Oncol.* – 2004. – 5(3). – P. 440-449.

154. Ogawara, K. In vivo anti-tumour effect of PEG liposomal doxorubicin (DOX) in DOXresistant tumour-bearing mice: Involvement of cytotoxic effect on vascular endothelial cells / K. Ogawara, K. Un, K. Tanaka et al. // *J. Controlled Release.* – 2009. – 133(1). – P. 4–10.

155. Ohigashi, Y. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer / Y. Ohigashi, M. Sho, Y. Yamada // *Clin Cancer Res.* – 2005. – 11(8). – P. 2947-2953.

156. Panzer, U. Resolution of renal inflammation: a new role for NF-kappaB1 (p50) in inflammatory kidney diseases / U. Panzer, O.M. Steinmetz, J.E. Turner et al. // *Am J Physiol Renal Physiol.* – 2009. – 297(2). – F429-39.

157. Pappalardo, F. Computational Modeling of PI3K/AKT and MAPK signaling pathways in melanoma cancer / F. Pappalardo, G. Russo, S. Candido et al. // *PLoS One.* – 2016. – 11(3). – e0152104.

158. Paraiso, K.H. PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression / K.H. Paraiso, Y. Xiang, V.W. Rebecca et al. // *Cancer Res.* – 2011. – 71(7). – P. 2750-2760.

159. Patel, S.P. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy / S.P. Patel, R. Kurzrock // *Mol Cancer Ther.* – 2015. – 14(4). – P. 847-56.

160. Pattni, B.S. New Developments in Liposomal Drug Delivery / B.S. Pattni, V.V. Chupin, V.P. Torchilin // *Chem. Rev.* – 2015. – 115(19). – P. 10938–10966.

161. Pauken, K.E. Overcoming T cell exhaustion in infection and cancer / K.E. Pauken, E.J. Wherry // *Trends Immunol.* – 2015. – 36(4). – P. 265–276.

162. Pegg, A.E. Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase / A.E. Pegg, M.E. Dolan, R.C. Moschel // *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* – 1995. – 51. – P. 167-223.
163. Qi, F. Clinical and Prognostic Significance of O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase Promoter Methylation in Patients with Melanoma: A Systematic Meta-Analysis / F. Qi, Z. Yin, G. Wang, S. Zeng // *Ann Dermatol.* – 2018.– 30(2). – P. 129-135.
164. Rakoff-Nahoum, S. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis // S. Rakoff-Nahoum, J. Paglino, F. Eslami-Varzaneh et al. // *Cell.* – 2004. – 118(2). – P. 229-241.
165. Rakoff-Nahoum, S. Toll-like receptors and cancer / S. Rakoff-Nahoum, R. Medzhitov // *Nat Rev Cancer.* – 2009. – 9(1). – P. 57-63.
166. Riganti, C. Liposome-encapsulated doxorubicin reversed drug resistance by inhibiting P-glycoprotein in human cancer cells / C. Riganti, C. Voena, J. Kapecka et al. // *Molecular Pharmaceutics.* – 2011. – 8(3). – P. 683-700.
167. Ritprajak, P. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma / P. Ritprajak, M. Azuma // *Oral Oncol.* – 2015. – 51(3). – P. 221-228.
168. Rodig, N. Endothelial expression of PD-L1 and PD-L2 down-regulates CD8+ T cell activation and cytolysis / N. Rodig, T. Ryan, J.A. Allen et al. *Eur J Immunol.* – 2003. – 33(11). –P. 3117-3126.
169. Roemer, K. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators / K. Roemer // *Biol Chem.* – 1999. – 380(7-8). – P. 879-887.
170. Rohaman, A.M. Anthracyclin-induced cardiotoxicity and the cardiac-sparing effect of liposomal formulation / A.M. Rohaman, S.W. Yusuf, M.S. Ewer // *Int J Nanomed.* – 2007. – 2(4). – P. 567–583.
171. Roos, W.P. Apoptosis in malignant glioma cells triggered by the temozolomide-induced DNA lesion O6-methylguanine / W.P. Roos, L.F. Batista, S.C. Naumann et al. // *Oncogene.* – 2007. – 26(2). – P. 186-197.

172. Rudolf, K. Dual inhibition of topoisomerases enhances apoptosis in melanoma cells / K. Rudolf, M. Cervinka, E. Rudolf // *Neoplasma*. – 2010. – 57(4). – P. 316-324.

173. Runger, T.M. Alterations of DNA repair in melanoma cell lines resistant to cisplatin, fotemustine, or etoposide / T.M. Runger, S. Emmert, D. Schadendorf et al. // *J Invest Dermatol*. – 2000. – 114(1). – P. 34-39.

174. Rusetskaya, N.V. Distribution and accumulation of liposomal form of doxorubicin in breast cancer cells of MCF-7 line / N.V. Rusetskaya, N. Khariton, V.F. Chekhun, O.V. Yuchenco, // *Experimental Oncology*. – 2011. – 33(2). – P. 2.

175. Salaun, B. Toll-like receptors' two-edged sword: when immunity meets apoptosis / B. Salaun, P. Romero, S. Lebecque // *Eur J Immunol*. – 2007. – 37(12). – P. 3311-3318.

176. Sarris, A.H. Liposomal vincristine in relapsed non-Hodgkin's lymphomas: early results of an ongoing phase II trial / A.H. Sarris, F. Hagemester, J. Romaguera et al. *Ann Oncol*. – 2000. – 11(1). – P. 69-72.

177. Satherley, K. dSL. Relationship between expression of topoisomerase II isoforms and chemosensitivity in choroidal melanoma / K. dSL. Satherley, M.H. Neale, R.A. Alexander, et al. // *J Pathol*. – 2000. – 192(2). – P. 174-181.

178. Schadendorf, D. Glutathione and related enzymes in tumor progression and metastases of human melanoma / D. Schadendorf, K. Jurgovsky, C.M. Kohlmus, B.M. Czarnetzki // *J Invest Dermatol*. – 1995. – 105(1). – P. 109-112.

179. Schadendorf, D. Membrane transport proteins associated with drug resistance expressed in human melanoma / D. Schadendorf, A. Makki, C. Stahr, et al. // *Am J Pathol*. – 1995. – 147(6). – P. 1545-1552.

180. Schadendorf, D. P-glycoprotein expression in primary and metastatic malignant melanoma / D. Schadendorf, R. Herfordt, B.M. Czarnetzki // *Br J Dermatol*. – 1995. – 132(4). – P. 551-555.

181. Schats, K.A. Validated programmed cell death ligand 1 immunohistochemistry assays (E1L3N and SP142) reveal similar immune cell staining

patterns in melanoma when using the same sensitive detection system / K.A. Schats, E.A. Van Vré, S. De Schepper et al. // *Histopathology*. – 2017. – 70(2). – P. 253-263.

182. Schmitt, A.M. p50 (NF- $\kappa$ B1) is an effector protein in the cytotoxic response to DNA methylation damage / A.M. Schmitt, C.D. Crawley, S. Kang et al. // *Mol Cell*. – 2011. – 44(5). – P. 785-796.

183. Secchiero, P. Recent advances in the therapeutic perspectives of Nutlin-3 / P. Secchiero, R. Bosco, C. Celeghini, G. Zauli // *Curr Pharm Des*. – 2011. – 17(6). – P. 569-577.

184. Selzer, E. Expression of Bcl-2 family members in human melanocytes, in melanoma metastases and in melanoma cell lines / E. Selzer, H. Schlagbauer-Wadl, I. Okamoto et al. // *Melanoma Res*. – 1998. – 8(3). – P. 197-203.

185. Sha, W.C. Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses / W.C. Sha, H.C. Liou, E.I. Tuomanen, D. Baltimore // *Cell*. – 1995. – 80(2). – P. 321-330.

186. Shahjahani, M. Molecular basis of chronic lymphocytic leukemia diagnosis and prognosis / M. Shahjahani, J. Mohammadiasl, F. Noroozi et al. // *Cell Oncol (Dordr)*. – 2015. – 38(2). – P. 93-109.

187. Sheng, J. Expression of programmed death ligand-1 on tumor cells varies pre and post chemotherapy in non-small cell lung cancer / J. Sheng, W. Fang, J. Yu et al. // *Sci Rep*. – 2016. – 6. – 20090.

188. Shi, H. Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy / H. Shi, W. Hugo, X. Kong et al. // *Cancer Discov*. – 2014. – 4(1). – P. 80-93.

189. Simeone, E. Combination Treatment of Patients with BRAF-Mutant Melanoma: A New Standard of Care / E. Simeone, A.M. Grimaldi, L. Festino et al. // *BioDrugs*. – 2017. – 31(1). – P. 51-61.

190. Soengas, M.S. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma / M.S. Soengas, P. Capodiecici, D. Polsky et al. // *Nature*. – 2001. – 409(6817). – P. 207-121.



191. Soengas, M.S. Apoptosis and melanoma chemoresistance / M.S. Soengas, S.W. Lowe // *Oncogene*. – 2003. – 22(20). – P. 3138-3151.
192. Sokolovskaya, A.A. CD95-deficient cells of Jurkat/A4 subline are resistant to drug-induced apoptosis / A.A. Sokolovskaya, T.N. Zabolina, D.Yu. Blokhin et al. // *Experimental Oncology*. – 2001. – 23(3). – P. 175–181.
193. Sokolovskaya, A.A. Comparative analysis of apoptosis induced by various anticancer drugs in Jurkat cells / A.A. Sokolovskaya, T.N. Zabolina, D.Yu. Blokhin et al. // *Experimental Oncology*. – 2001. – 23(1). – P. 46–50.
194. Soto, J.L. Mutation analysis of genes that control the G1/S cell cycle in melanoma: TP53, CDKN1A, CDKN2A, and CDKN2B / J.L. Soto, C.M. Cabrera, S. Serrano et al. // *BMC Cancer*. – 2005. – 5. – P. 36.
195. Soussi, T. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome/ T. Soussi, C. Beroud // *Nat Rev Cancer*. – 2001. – 1(3). – P.233–240.
196. Sparrow, L.E. p53 gene mutation and expression in naevi and melanomas / L.E. Sparrow, R. Soong, H.J. Dawkins et al. // *Melanoma Res*. – 1995 – 5(2). – P. 93–100.
197. Steiniche, T. PD-L1 expression and survival among melanoma patients treated with standard immunotherapy or chemotherapy / T. Steiniche, A. Vestergaard Danielsen, Z. Wang et al. // *J Eur Acad Dermatol Venereol*. – 2017. – 31(7). – e319-e321.
198. Stojic, L. Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase / L. Stojic, N. Mojas, P. Cejka et al. // *Genes Dev*. – 2004. – 18(11). – P. 1331-1344.
199. Stolting, D. Liposomal cisplatin can overcome chemotherapy resistance of A2780 ovarian cancer cells by inducing the extrinsic apoptotic pathway / D. Stolting, M. Koch, M. Wiese et al. // *Int J Clin Pharmacol and Therap*. – 2014. – 52(1). – P. 78-81.
200. Supiot, S. Nutlin-3 radiosensitizes hypoxic prostate cancer cells independent of p53 / S. Supiot, R.P. Hill, R.G. Bristow // *Mol Cancer Ther*. – 2008. – 7(4). – P. 993-999.

201. Swann, J.B. Demonstration of inflammation-induced cancer and cancer immunoediting during primary tumorigenesis / J.B. Swann, M.D. Vesely, A. Silva et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2008. – 105(2). – P. 652-656.
202. Szakacs, G. Targeting multidrug resistance in cancer / G. Szakacs, J.K. Paterson, J.A. Ludwig, et al. // *Nat Rev Drug Discov.* – 2006 – 5(3). – P. 219-34.
203. Takazawa, Y. Toll-like receptor 4 signaling promotes the migration of human melanoma cells / Y. Takazawa, Y. Kiniwa, E. Ogawa et al. // *Tohoku J Exp Med.* – 2014. – 234(1). – P. 57-65.
204. Taube, J.M. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape / J.M. Taube, R.A. Anders, G.D. Young et al. // *Sci Transl Med.* – 2012. – 4(127). – 127ra37.
205. Thiery, A.R. Modulation of doxorubicin resistance in multidrug resistant cells by liposomes / A.R. Thiery, D. Vige, S. Coughlin et al. // *FASEB J.* – 1993. – 7(6). – P. 572-579.
206. Tonsing-Carter, E. Potentiation of Carboplatin-Mediated DNA Damage by the Mdm2 Modulator Nutlin-3a in a Humanized Orthotopic Breast-to-Lung Metastatic Model / E. Tonsing-Carter, B.J. Bailey, M.R. Saadatzadeh et al. // *Mol Cancer Ther.* – 2015. – 14(12). – P. 2850-2863.
207. Topalian, S.L. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer / S.L. Topalian, F.S. Hodi, J.R. Brahmer et al. // *N Engl J Med.* – 2012. – 366(26). – P. 2443-2454.
208. Topalian, S.L. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity / S.L. Topalian, C.G. Drake, D.M. Pardoll // *Current Opinion in Immunology.* – 2012. – 24(2). – P. 207–212.
209. Townsend, D.M. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance / D.M. Townsend, K.D. Tew // *Oncogene.* – 2003. – 22(47). – P. 7369-7375.
210. Traverso, N. Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance / Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, et al. // *Oxid Med Cell Longev.* – 2013. – 2013. – 972913.

211. Treon, S.P. MYD88 L265P somatic mutation in Waldenström's macroglobulinemia / S.P. Treon, L. Xu, G. Yang et al. // *N Engl J Med.* – 2012. – 367(9). – P. 826-833.
212. Trucco, L.D. Downregulation of adaptor protein MyD88 compromises the angiogenic potential of B16 murine melanoma / L.D. Trucco, E. Roselli, P. Araya et al. // *PLoS One.* 2017. – 12(6). –e0179897.
213. Trunzer, K. Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma / K. Trunzer, A.C. Pavlick, L. Schuchter et al. // *J Clin Oncol.* – 2013. – 31(14). – P. 1767-1774.
214. Tseng, S.Y. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells / S.Y. Tseng, M. Otsuji, K. Gorski et al. // *J Exp Med.* 2001. 193(7). P. 839-846.
215. Ueda, Y. NF-kappaB activation in melanoma / Y. Ueda, A. Richmond // *Pigment Cell Res.* – 2006. – 19(2). – P.112-24.
216. Van Allen, E.M. The genetic landscape of clinical resistance to RAF inhibition in metastatic melanoma / E.M. Van Allen, N. Wagle, A. Sucker et al. // *Cancer Discov.* – 2014. – 4(1). – P. 94-109.
217. Vassilev, L.T. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2 / L.T. Vassilev, B.T. Vu, B. Graves et al. // *Science.* – 2004. – 303(5659). – P. 844–848.
218. Villano, J.L. Temozolomide in malignant gliomas: current use and future targets / J.L. Villano, T.E. Seery, L.R. Bressler // *Cancer Chemother Pharmacol.* – 2009. – 64(4). – P. 647-655.
219. Voce, D.J. Nfkb1 is a haploinsufficient DNA damage-specific tumor suppressor / D.J. Voce, A.M. Schmitt, A. Uppal et al. // *Oncogene.* – 2015. – 34(21). – P. 2807-2813.
220. Vogelstein, B. Surfing the p53 network / B. Vogelstein, D. Lane, A.J. Levine // *Nature.* – 2000. – 408(6810). – P. 307-310.
221. Voinea, M. Designing of 'intelligent' liposomes for efficient delivery of drugs / M. Voinea, M. Simionescu // *J Cell Mol Med.* – 2002. – 6(4). – P. 465-474.

222. Vousden, K.H. Blinded by the light: the growing complexity of p53 / K.H. Vousden, C. Prives // *Cell*. – 2009. – 137(3). – P. 413-431.
223. Wang, S. Targeting the MDM2-p53 Protein-Protein Interaction for New Cancer Therapeutics / S. Wang, Y. Zhao, D. Bernard et al. *Top Med Chem*. – 2012. – 8. – P. 57–80.
224. West, A.P. Recognition and signaling by toll-like receptors / A.P. West, A.A. Koblansky, S. Ghosh // *Annu Rev Cell Dev Biol*. – 2006. – 22. – 409-437.
225. Whittaker, S.R. A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition / S.R. Whittaker, J.P. Theurillat, E. Van Allen et al. // *Cancer Discov*. – 2013. – 3(3). – 350-362.
226. Wilson, C.L. NFκB1 is a suppressor of neutrophil-driven hepatocellular carcinoma / C.L. Wilson, D. Jurk, N. Fullard et al. // *Nat Commun*. – 2015. – 6. – 6818.
227. Winder, M. Mechanisms of Drug Resistance in Melanoma / M. Winder, A. Viros // *Handb Exp Pharmacol*. 2017.
228. Xu, B. Meta-analysis of clinical trials comparing the efficacy and safety of liposomal cisplatin versus conventional nonliposomal cisplatin in nonsmall cell lung cancer (NSCLC) and squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) / B. Xu, M. Zeng, J. Zeng et al. // *Medicine (Baltimore)*. – 2018. –97(46). – e13169.
229. Yamini, B. Inhibition of nuclear factor-kappaB activity by temozolomide involves O6-methylguanine induced inhibition of p65 DNA binding / B. Yamini, X. Yu, M.E. Dolan et al. // *Cancer Res*. – 2007. – 67(14). – P. 6889-6898.
230. Yeo, S.K. Opposing roles of Nfkb2 gene products p100 and p52 in the regulation of breast cancer stem cells / S.K. Yeo, R. French, F. Spada, R. Clarkson // *Breast Cancer Res Treat*. – 2017. – 162(3). – P. 465-477.
231. Youngnak-Piboonratanakit, P. The expression of B7-H1 on keratinocytes in chronic inflammatory mucocutaneous disease and its regulatory role / P. Youngnak-Piboonratanakit, F. Tsushima, N. Otsuki et al. // *Immunol Lett*. – 2004. – 94(3). – P. 215-222.

232. Yusuf, N. Protective role of Toll-like receptor 4 during the initiation stage of cutaneous chemical carcinogenesis / N. Yusuf, T.H. Nasti, J.A. Long et al. // *Cancer Res.* – 2008. – 68(2). – P. 615-622.

233. Zha, Yy. Negative regulation of T-cell function by PD-1 / Yy. Zha, C. Blank, T.F. Gajewski // *Crit Rev Immunol.* – 2004. – 24(4). – P. 229-237.

234. Zhang, P. Chemopreventive agents induce programmed death-1-ligand 1 (PD-L1) surface expression in breast cancer cells and promote PD-L1-mediated T cell apoptosis / P. Zhang, D.M. Su, M. Liang, J. Fu // *Mol Immunol.* – 2008. – 45(5). – P. 1470-1476.

235. Zhang, Q. Targeting p53-MDM2-MDMX loop for cancer therapy / Q. Zhang, S.X. Zeng, H. Lu // *Subcell Biochem.* – 2014. – 85. – P. 281-319.

236. Zhong, H. The phosphorylation status of nuclear NF-kappa B determines its association with CBP/p300 or HDAC-1 / H. Zhong, M.J. May, E. Jimi, S. Ghosh // *Mol Cell.* – 2002. – 9(3). – P. 625-636.