

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

имени М.В. ЛОМОНОСОВА

ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Горбунова Анна Сергеевна

**Роль белков контроля качества митохондрий в прогрессировании
аденокарциномы легкого**

1.5.4 – Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

к.б.н., в.н.с. лаборатории исследования

механизмов апоптоза Копейна Гелина Сергеевна

Москва – 2022

Оглавление

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	8
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	14
1.1. Аденокарцинома легкого	14
1.1.1. Эпидемиология	14
1.1.2. Этиология	15
1.1.2.1 Генетическая предрасположенность	16
1.1.2.2. Табакокурение	19
1.1.2.3. Загрязнения окружающего воздуха	21
1.1.2.4. Хронические заболевания легких	23
1.1.3. Таргетная терапия	25
1.2. Физиологическая значимость контроля качества митохондрий	30
1.2.1. Окислительный стресс	31
1.2.2. Митохондриальная динамика	33
1.2.3. Таргетирование митохондрий	35
1.3. Программируемая гибель клеток (ПГК)	37
1.3.1. Апоптоз	38
1.3.1.1. Внутренний путь апоптоза	40
1.3.1.2. Внешний путь апоптоза	45
1.3.2. Некроптоз.....	47
1.3.3. Аутофагия	49
1.3.3.1. Митофагия	52
1.3.4. Взаимодействие различных путей ПГК	54
1.4. BNIP3	54
1.4.1. Структура и регуляция гена <i>BNIP3</i>	55
1.4.2. Структура и регуляция белка BNIP3	56
1.4.3. Роль BNIP3 в раке легкого	58
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	64
2.1. Материалы	64

2.1.1. Рабочие растворы	64
2.1.2. Химические реактивы	65
2.1.3. Антитела	67
2.1.4. Плазмиды и малые интерферирующие РНК (миРНК)	68
2.1.5. Коммерческие наборы	68
2.1.6. Клеточные линии	69
2.1.7. Среда и растворы для работы с клеточными линиями	69
2.2. Методы	70
2.2.1. Культивирование клеточных линий	70
2.2.2. Заморозка клеточных линий	70
2.2.3. Экспериментальные процедуры с клеточными линиями	71
2.2.4. Транфекция клеточных линий	71
2.2.5. Сбор клинических образцов пациентов с АКЛ	71
2.2.6. Получение белковых фракций из тканей и клеточных культур	72
2.2.7. Вестерн блот анализ	72
2.2.8. Подготовка проб для масс-спектрометрии	73
2.2.9. Измерение интенсивности митохондриального дыхания	74
2.2.10. Получение цитозольной и митохондриальной фракций белков	74
2.2.11. Измерение уровня митохондриальных АФК	74
2.2.12. Оценка гибели клеток по размеру популяции SubG1	75
2.2.13. Измерение активности каспазы-3	75
2.2.14. Статистическая обработка данных	75
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	77
3.1. Роль белков контроля качества митохондрий в прогрессировании АКЛ	77
3.1.1. Характеристика выборки пациентов с АКЛ	77
3.1.2. Выбор белков для исследования	79
3.1.3. Подбор антител к исследуемым белкам	81
3.1.4. Сравнительный анализ уровней исследуемых белков в нормальных и опухолевых тканях	84

3.1.5. Оценка прогноза выживаемости в зависимости от уровня белков контроля качества митохондрий и клинико-патологических признаков пациентов.....	88
3.2. BNIP3 как мишень для модуляции ПГК	96
3.2.1. Получение клеточных линий АКЛ с нокаутом и нокдауном по BNIP3	96
3.2.2. Изменение протеомного профиля клеток нокаутных по BNIP3	98
3.2.3. Влияние BNIP3 на выход цитохрома c из митохондрий и изменение уровня митохондриальных АФК при индукции цисплатином.....	100
3.2.4. Оценка цисплатин-индуцированного апоптоза в линиях клеток со сниженной экспрессией BNIP3	102
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ	105
ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	115
Приложение 1. Белки, чей уровень понижался при нокауте BNIP3 согласно масс-спектрометрическому анализу.	116
Приложение 2. Белки, чей уровень повышался при нокауте BNIP3 согласно масс-спектрометрическому анализу.	118
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	119

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- AhR (aryl hydrocarbon receptor) – рецептор арильных углеводов
- AIF (apoptosis inducing factor) – фактор, индуцирующий апоптоз
- Akt (protein kinase B) – протеинкиназа B
- ALK (anaplastic lymphoma kinase) – киназа анапластической лимфомы
- Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma-2) – антиапоптотический белок, маркер В-клеточной лейкемии/лимфомы-2
- BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3) – белок семейства Bcl-2, подгруппы BH3-only
- cIAP1/2 (cellular IAP 1/2) – клеточный ингибитор апоптотических белков
- EGFR (epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста
- EML4 (echinoderm microtubule-associated protein-like 4) – белок, подобный белку иглокожих, ассоциированного с микротрубочками 4
- ERK (extracellular signal regulated kinases) – киназы, регулируемые внеклеточными сигналами
- FADD (Fas associated via death domain) – Fas-ассоциированный белок, содержащий домен смерти
- FDA (food and drug administration) – управление США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов
- FUZ (fuzzy homolog) – белок планарной клеточной полярности
- HER (human epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста человека
- HIF-1 α (hypoxia-inducible factor 1 α) – индуцируемый гипоксией фактор 1 α
- HRE (hypoxia response elements) – элементы, чувствительные к гипоксии
- HtrA2 (high temperature requirement protein A2) – протеаза, протеин A2, требующий высокой температуры
- IAP (inhibitors of apoptosis proteins) – семейство белков, ингибирующих апоптотические протеазы
- IgG (immunoglobulin G) – иммуноглобулин G

Jak (Janus kinase) – Янус-киназа

KRAS (Kirsten rat sarcoma virus) – вирус саркомы крысы, открытый Кирстеном

LIR (LC3-interacting region) – LC3-взаимодействующий мотив

MAC (4-O-methylascochlorin) – 4-О-метиласкохлорин

MAPK (mitogen-activated protein kinases) – митоген-активируемые протеинкиназы

MEK (MAPK/ERK Kinase) – киназа MAPK/ERK

MLKL (mixed lineage kinase domain-like) – киназный домен смешанной линии, подобный псевдокиназе

NNK (Nicotine-derived nitrosamine ketone) – нитрозаминкетон, полученный из никотина

PARA (proapoptotic receptor agonists) – агонисты проапоптотических рецепторов

PD-1 (programmed cell death 1) – мембранный белок надсемейства иммуноглобулинов

PD-L (programmed cell death 1 ligand) – лиганд PD-1

PI3K (phosphoinositide 3-kinases) – фосфатидилинозитол-3-киназа

PIK3CA – ген, кодирующий PI3K

RAS (rat sarcoma virus) – вирус саркомы крысы

RIP (receptor-interacting protein) – взаимодействующая с рецептором протеинкиназа

SMAC/Diablo (second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI) – второй митохондриальный активатор каспаз/прямой IAP-связывающий белок с низким pI

STAT (signal transducer and activator of transcription) – белок-трансдуктор сигнала и активатор транскрипции

TNF (tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли

TRADD (TNFR1 associated via death domain) – белок домена смерти, ассоциированный с TNF рецептором

TRAF (TNF receptor associated factor) – фактор, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей

АКЛ – аденокарцинома легкого

АФК – активные формы кислорода

ГАФДГ – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа

ДИ – доверительный интервал

миРНК – малые интерферирующие РНК

МРЛ – мелкоклеточный рак легкого

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого

ОР – отношение риска

ПААГ – полиакриламидный гель

ПАРП – поли(АДФ-рибоза)-полимераза

ПВММ – пермеабилзация внешней митохондриальной мембраны

ПГК – программируемая гибель клеток

ПМЗО – первично-множественные злокачественные опухоли

РТК – рецепторная тирозинкиназа

ТКИ – тирозинкиназный ингибитор

ТМ домен – трансмембранный домен

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь легких

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ЭПР – эндоплазматический ретикулум

ЭТЦ – электрон-транспортная цепь

ВВЕДЕНИЕ

АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

По данным ВОЗ, онкологические заболевания занимают второе место в мире среди основных причин смертности населения от болезней, уступая лишь сердечно-сосудистым заболеваниям. Рак легкого, к сожалению, занимает лидирующую позицию среди онкологической смертности в мире: ежегодно от него умирает более 2.2 млн человек. На основании гистологической классификации рак лёгкого подразделяется на мелкоклеточный (МРЛ) и немелкоклеточный (НМРЛ), который, в свою очередь, включает в себя 3 подтипа: плоскоклеточный, крупноклеточный и аденокарциному лёгкого (АКЛ). Последний является одним из самых распространенных и агрессивных подтипов НМРЛ. Результаты многочисленных экспериментально-клинических исследований показали, что АКЛ в большей степени, чем другие виды ассоциирована с генетической предрасположенностью и воздействием внешних факторов среды.

Раскрытие механизмов развития и прогрессирования рака является важной медико-биологической задачей необходимой для разработки новых терапевтических подходов. Повышение эффективности терапии и элиминация опухолевых клеток осуществляются за счет активации механизмов программируемой гибели клеток (ПГК). В последние десятилетия исследователями все большее внимание уделяется роли митохондрий и связанными с ними метаболическими путями в процессе канцерогенеза. Митохондрии также играют ведущую роль в реализации различных типов ПГК, в том числе и апоптоза. Баланс про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2 на внешней мембране данных органелл определяет судьбу клетки. В случае индукции апоптоза, проапоптотические белки олигомеризуются на внешней мембране митохондрий и вызывают ее пермеабиллизацию, что приводит к выходу из межмембранного пространства ряда белков, в том числе цитохрома c, который участвует в формировании

комплекса апоптосомы, активирующего митохондриальный путь апоптоза. Для нормального функционирования клетке необходимо поддерживать популяцию митохондрий способных выполнять возложенные на них функции.

Контроль качества митохондрий достигается с помощью динамических процессов дробления и слияния, регулируемых белками Drp1 и Mfn2, соответственно, а также посредством митохондриальной аутофагии – митофагии, осуществляемой белками BNIP3, BNIP3L/NIX, PINK1 и Parkin. Процессы контроля качества митохондрий не допускают накопление поврежденных органелл в клетке, что, в частности, препятствует аккумуляции активных форм кислорода (АФК), которые, в свою очередь, способны стимулировать развитие опухолей. Защита от разрушительного действия АФК реализуется клетками посредством ферментативной антиоксидантной системы, участниками которой являются митохондриальная деацетилаза Sirtuin3 и глутатионпероксидаза 4 (GPX4). Солидные опухоли развиваются в условиях гипоксии, что способствует адаптации клеток, позволяя им выживать и пролиферировать в данном неблагоприятном микроокружении. Подобная адаптация затрагивает и митохондрии, что, в итоге, подавляет митохондриальный путь апоптоза. Одной из причин устойчивости раковых клеток к противоопухолевым препаратам может быть опосредованная гипоксией стимуляция процессов контроля качества митохондрий.

Роль одного из членов семейства Bcl-2 и участника митофагии – белка BNIP3 – до сих пор недостаточно выяснена, и его функция зависит от типа опухолевых клеток и факторов микроокружения (pH, уровень O₂ и т.д.). Более того, промотор *BNIP3* содержит элементы, чувствительные к гипоксии (HRE – hypoxia response elements). Следовательно, BNIP3, модулируя митофагию и клеточную гибель, в том числе в условиях гипоксии, является потенциально важным белком участвующим в процессе канцерогенеза и требует дополнительного исследования.

Исходя из вышесказанного, детальный анализ роли митохондрий и, в частности, изучение роли белка BNIP3, даст возможность существенно дополнить известные и разработать новые стратегии терапии онкологических заболеваний.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Целью данной работы является изучение роли белков контроля качества митохондрий в прогрессировании АКЛ и процессе гибели этих опухолевых клеток.

ЗАДАЧИ РАБОТЫ

- 1) Оценить уровень белков контроля качества митохондрий в образцах пациентов с АКЛ.
- 2) Исследовать корреляции между клинико-патологическими признаками пациентов с АКЛ и уровнем белков контроля качества митохондрий.
- 3) Изучить влияние клинико-патологических признаков и уровня белков контроля качества митохондрий на выживаемость пациентов с АКЛ.
- 4) Выяснить роль BNIP3 в регуляции цисплатин-индуцированного апоптоза в различных линиях клеток АКЛ.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА РАБОТЫ

Впервые получены данные о роли белков контроля качества митохондрий в прогрессировании АКЛ, используя российскую выборку пациентов. В связи с тем, что в литературе представлены достаточно противоречивые результаты о функциях и прогностической значимости участников митофагии и митохондриальной динамики у пациентов с АКЛ, нами проведено детальное исследование роли белков контроля качества митохондрий в прогрессировании АКЛ с помощью сравнительного анализа образцов как нормальной, так и опухолевой тканей пациентов. Это позволило более точно оценить изменение уровня изучаемых белков у каждого конкретного пациента. Кроме того, изучено влияние уровня белков контроля качества

митохондрий и совокупности клинико-патологических признаков пациентов с АКЛ на их выживаемость, что позволит применить эти данные в онкологической практике. Помимо этого, была выяснена роль в апоптозе клеток АКЛ одного из членов семейства Bcl-2 и участника митофагии – белка BNIP3, функция которого зависит от типа опухоли и факторов микроокружения. В клеточных линиях АКЛ, выключение BNIP3 приводило к угнетению митохондриального дыхания, а также к повышению их чувствительности к апоптозу и накоплению АФК при индукции цисплатином, что свидетельствует об участии BNIP3 в возникновении устойчивости к данному химиотерапевтическому препарату.

ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ

Данная работа демонстрирует значимость изменения уровней белков контроля качества митохондрий и клинико-патологических признаков в оценке риска смерти среди пациентов с АКЛ. Результаты исследований привели к разработке номограммы, которая впоследствии может рассматриваться в качестве модели для совершенствования методов прогнозирования выживаемости пациентов с АКЛ. Помимо этого, результаты настоящего исследования помогут дополнить имеющиеся и получить новые сведения о роли белка BNIP3 в канцерогенезе.

ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ

1. В опухолевой ткани пациентов с АКЛ отмечается повышение уровня белков BNIP3 (димерной и мономерной форм) и GPX4 по сравнению с соответствующими неопухолевыми образцами, выделяя эти белки контроля качества митохондрий в качестве регуляторов данной патологии.

2. У пациентов с первичной опухолью, характеризующейся размером и локализацией для T1-2, обнаружены увеличенные уровни белков Sirtuin3 и GPX4. Повышение уровней Sirtuin3 и BNIP3/NIX коррелирует с наличием метастаз в лимфатических узлах. У больных с 1 и 2 стадиями выявляется

возрастание уровня димерной формы BNIP3. Суммарно это говорит о влиянии процессов контроля качества митохондрий на прогрессирование АКЛ.

3. Количество димерной формы BNIP3 и уровень Sirtuin3 ассоциируется с положительным прогнозом выживаемости, тогда так уровень Drp1, возраст старше 65 лет и наличие 3-4 стадии увеличивает риск смерти пациентов с АКЛ.

4. BNIP3 участвует в регуляции митохондриального пути апоптоза, дефицит по данному белку увеличивает чувствительность клеток АКЛ к индукции гибели цисплатином за счет дисфункции митохондрий.

ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА

Вклад диссертанта заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования. Диссертация А.С. Горбуновой является самостоятельной научно-исследовательской работой, которая свидетельствует о профессиональной компетенции её автора. А.С. Горбунова определила цель и задачи исследований, грамотно подобрала набор методов, соответствующий поставленным задачам, лично осуществила экспериментальную часть работы, статистическую обработку полученных данных, проанализировала результаты исследований и изложила их в выводах.

СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ РАБОТЫ

Приведенные в работе научные положения и выводы по полученным результатам основаны на достоверных данных. Для статистической обработки использовались программные пакеты – R.4.0.1 и GraphPad Prizm 7.

АПРОБАЦИЯ И ВНЕДРЕНИЕ РАБОТЫ

Материалы настоящей работы были представлены на 26-ой, 27-ой и 28-ой ежегодных Международных научных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов», прошедших в 2019, 2020 и 2021 годах, соответственно, а также на IV Национальном конгрессе по регенеративной медицине (2019 г). Апробация работы была проведена на совместном заседании кафедры биохимии и молекулярной медицины, НИЛ генных и

клеточных технологий, НИЛ постгеномных технологий в медицине, НИЛ трансляционной медицины, НИЛ морфогенеза и репарации тканей, НИЛ исследования механизмов апоптоза факультета фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова 20 мая 2022 года, протокол № 22-05-03.

Научные результаты, полученные в ходе выполнения настоящего исследования, были включены в образовательные программы на факультете фундаментальной медицины МГУ имени М.В. Ломоносова, войдя в курсы лекций «Токсикология в медицине» и «Программируемая гибель клеток».

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, в том числе 6 статей в рецензируемых научных журналах, из них: 2 статьи в журнале, входящем в перечень ВАК, 4 статьи в журналах, индексируемых в Web of Science и Scopus, и 4 тезиса докладов научных конференций.

КОНКУРСНАЯ ПОДДЕРЖКА РАБОТЫ

Выполнение этой работы было поддержано грантом конкурса на лучшие проекты фундаментальных научных исследований, выполняемых молодыми учеными, обучающимися в аспирантуре «Аспиранты» 2020 года (РФФИ), а также грантом РНФ. Данное исследование было награждено стипендией МГУ имени М.В. Ломоносова для молодых преподавателей, научных сотрудников, аспирантов в 2021 году, а также премией по программе развития МГУ имени М.В. Ломоносова 2021 года.

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 138 страницах машинописного текста, включает 9 таблиц и 19 рисунков. Список литературы содержит 207 источников, из них 205 зарубежных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Аденокарцинома легкого

1.1.1. Эпидемиология

Заболеваемость раком легкого продолжает расти по всему миру. Согласно ВОЗ, в 2020 году было выявлено 2.2 миллиона новых случаев (11.4% от общего числа новых случаев заболеваемости раком) и 1.8 миллиона смертей, вызванных раком легкого (18% от общего числа смертей от рака). Таким образом, рак легкого является самым распространенным видом рака и самой частой причиной смерти от опухолевых заболеваний во всем мире [1]. В России смертность от рака легкого среди мужчин одна из самых высоких в Европе, но одна из самых низких среди женщин. Данный факт объясняется высоким и низким уровнем табакокурения среди мужчин и женщин, соответственно, в России по сравнению с европейскими странами [2]. Рак легкого гистологически подразделяется на МРЛ и НМРЛ. Количество случаев заболеваемости НМРЛ составляет 80-85% от общего числа случаев рака легкого и, соответственно, преобладает над МРЛ, заболеваемость которым составляет 15-20%. НМРЛ, в свою очередь, подразделяется на три больших подтипа: плоскоклеточная карцинома, крупноклеточная карцинома и АКЛ [3]. До 1990-х годов наиболее распространенным гистологическим подтипом НМРЛ была плоскоклеточная карцинома легкого, особенно среди мужчин. С тех пор заболеваемость АКЛ участилась по сравнению с плоскоклеточной карциномой легкого в США, Канаде, Японии и многих европейских странах. Так, на сегодняшний день АКЛ является наиболее распространенным гистологическим подтипом НМРЛ. Эта тенденция может объясняться тем, что плоскоклеточная карцинома чаще возникает у курильщиков тяжелых видов сигарет, но в последнее время все более популярными становятся сигареты с низким содержанием смол и никотина [4]. Табачный дым таких видов сигарет легче проникает в периферические бронхи, в которых чаще образуется АКЛ [2].

НМРЛ, в том числе и АКЛ, в 75% процентах случаев диагностируется у пациентов с поздними стадиями [5]. Пятилетняя выживаемость больных АКЛ с метастазами составляет всего 6% [6]. Стоит отметить, что женщины имеют больший шанс развития АКЛ *in situ* (неинвазивный тип опухоли), который ассоциирован с лучшим прогнозом пятилетней выживаемости [2].

Медианный возраст пациентов при постановке диагноза АКЛ составляет 58 лет, что является меньше возраста пациентов с плоскоклеточной карциномой (61 год) и с раком легкого в целом (59 лет) [7]. Кривая смертности от рака легкого идет вверх до 85 лет, после чего заболевания сердечно-сосудистой системы становятся превалирующей причиной смерти [8].

1.1.2. Этиология

Наиболее часто развитие АКЛ ассоциировано с генетической предрасположенностью, табакокурением, загрязнением окружающего воздуха и сопутствующими хроническими респираторными заболеваниями (рис. 1). Данные факторы приводят к нарушениям в гомеостазе клеток легких и влияют на канцерогенез данного органа. Более подробно роль этих факторов будет обсуждена ниже.

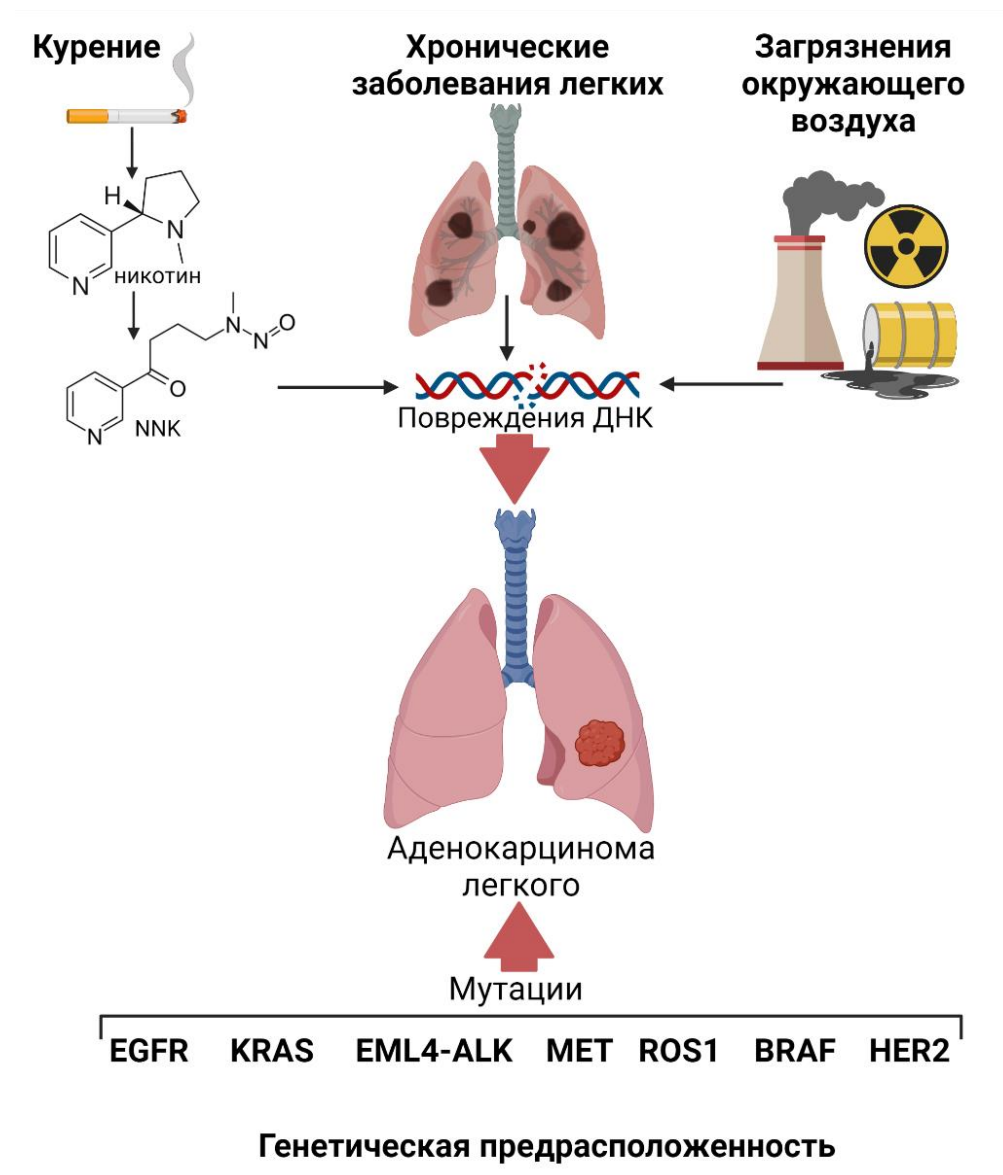


Рис. 1. Этиология аденокарциномы легкого (сделано в Biorender).

1.1.2.1 Генетическая предрасположенность

Несмотря на то, что для постановки диагноза онкологи по-прежнему, в большей степени, опираются на гистологическую характеристику опухоли, недавний прогресс в секвенировании генома позволил детальнее описывать АКЛ, основываясь на накопленных с течением времени мутациях, необходимых для инициации канцерогенеза. Драйверные мутации часто возникают в генах, которые контролируют пролиферацию и выживаемость клеток. Предполагается, что опухолевые клетки зависимы от экспрессии этих онкогенов, что делает их мишенью для таргетного лечения АКЛ [9].

Первой драйверной мутацией, обнаруженной в АКЛ, была мутация в гене рецептора к эпидермальному фактору роста (EGFR – epidermal growth factor receptor), который относится к рецепторным тирозинкиназам (РТК) [10]. EGFR в норме экспрессируется на поверхности клеток многих тканей эпителиального и мезенхимального происхождения, что критически важно для их деления. Лигандами к EGFR служат эпидермальный фактор роста (EGF – epidermal growth factor), трансформирующий фактор роста β (TGF β – transforming growth factor beta), гепарин-связывающий EGF-подобный фактор роста (HB-EGF – heparin-binding EGF-like growth factor) и другие. В отсутствии лиганда EGFR ингибирует собственную киназную активность, а при связывании с лигандом EGFR меняет свою конформацию, гомо- или гетеродимеризуется с другими рецепторами HER-семейства, связывает АТФ и аутофосфорилирует цитоплазматические тирозинкиназные домены, что ведет к запуску сигнальных каскадов MAPK, PI3K/Akt и Jak/STAT [9]. В результате стимулируется митоз, пролиферация клеток и ингибирование апоптоза. Мутации в АТФ-связывающем кармане тирозинкиназного домена ведут к избыточной активации EGFR и неконтролируемому делению клеток, что инициирует канцерогенез.

Мутации в *EGFR* представляют собой либо точечную мутацию L858R в 21 экзоне (29%), либо делецию в 19 экзоне (71%) [11]. Мутации *EGFR* в АКЛ обнаруживаются примерно у 19% пациентов с данной патологией [2,12]. Кроме этого, мутированный *EGFR* в АКЛ чаще встречается у женщин, в особенности у некурящих. Также было показано, что мутация L858R в 21 экзоне ассоциирована с генетическими полиморфизмами, связанными с биосинтезом эстрогена у некурящих пациенток с АКЛ [2]. Помимо половых различий, мутации в *EGFR* чаще диагностируются у пациентов монголоидной расы (38.8-64.0%) по сравнению с европеоидной (4.9-17.4%) [12].

Самым часто распространённым мутированным онкогеном в АКЛ является *KRAS*, кодирующий одноименную ГТФазу, которая участвует в

передаче сигнала для большинства РТК, в том числе EGFR, MET и ALK [13]. Мутации в *KRAS* ведут к нарушению ГТФазной активности и постоянной активации RAS сигнального каскада, таким образом способствуя канцерогенезу [14].

Мутации в *KRAS* обнаруживаются примерно у 30% пациентов с АКЛ. По сравнению с мутациями *EGFR*, *KRAS* чаще мутирован у курильщиков и у пациентов европеоидной расы [2,15]. Около 97% мутаций в *KRAS* возникает в результате аминокислотного замещения в 12 кодоне 2 экзона, в 3-5% случаев мутации происходят в 13 кодоне того же экзона и менее чем в 1% случаев мутации затрагивают 61 кодон 3 экзона [14]. Мутации в *KRAS* практически никогда не возникают вкупе с мутациями в *EGFR* у пациентов с АКЛ [16].

Еще одной достаточно частой мутацией при АКЛ является мутация в *MET*, одноименный белковый продукт которого также принадлежит к РТК. При связывании с его лигандом, гепатоцитарным фактором роста (HGF – hepatocyte growth factor), MET димеризуется и фосфорилируется, что приводит к активации его тирозинкиназного домена и запуску сигнальных путей, отвечающих за пролиферацию, миграцию и инвазивность клеток. Мутации в *MET* ведут к инициации канцерогенеза [9].

В клетках АКЛ *MET* бывает мутирован в 14 экзоне (3-4% случаев), амплифицирован (20% случаев) или оверэкспрессирован (70% случаев) [17,18]. В отличие от *KRAS*, оверэкспрессия *MET* примерно в 70% случаев сочетается с мутациями *EGFR* у пациентов с АКЛ [19].

Другая драйверная мутация, характерная для НМРЛ, в том числе и АКЛ – образование химерного гена путем слияния генов *ALK* и *EML4*. Образование *EML4-ALK* ведет к опосредованной через ALK активации таких сигнальных путей, как PI3K/Akt, Jak/STAT и RAS/RAF/MEK/ERK, и впоследствии к пролиферации и выживаемости клеток АКЛ [20].

EML4-ALK гибрид обнаруживается у 3-13% пациентов с АКЛ [21]. На сегодняшний день идентифицировано не менее 15 вариантов химерного гена *EML4-ALK*, причем некоторые варианты экспрессируются в виде множественных изоформ. Все известные гибриды *EML4-ALK* полностью содержат последовательность киназного домена *ALK*, кодируемую экзонами 20-29, но отличаются точкой слияния с геном *EML4* [20]. *EML4-ALK* чаще диагностируется у некурящих пациентов. Как и мутации в *KRAS*, химерный *EML4-ALK* практически не обнаруживается совместно с мутациями в *EGFR* у пациентов с АКЛ [22].

В процессе изучения АКЛ находятся и другие возможные драйверные мутации, такие как *ROS1* транслокации и точечные мутации в *BRAF* и *HER2*, которые также могут быть важными мишенями для лечения [9].

Стоит отметить, что несмотря на все бóльшую доступность и распространенность молекулярной диагностики, в 40% случаев у пациентов с АКЛ не обнаруживается конкретная драйверная мутация. Важно отметить, что несмотря на то, что факт корреляции некоторых драйверных мутаций в зависимости от статуса курения был неоднократно показан, механизм этой взаимосвязи до конца не понятен. Поэтому изучение других потенциальных сигнальных путей и молекулярных маркеров для подбора стратегии лечения является важной задачей современной медицины.

1.1.2.2. Табакокурение

Курение является основной причиной возникновения рака легкого. У курильщиков вероятность развития рака легкого в 15-30 раз выше по сравнению с некурящими [23]. Относительный риск развития рака легкого у курильщиков определяется никотинозависимостью и количеством лет курения. И хотя современные сигареты, в том числе электронные, содержат меньше никотина и смол, курильщики делают большее количество затяжек с большей глубиной, чтобы удовлетворить свою потребность в никотине. С

более глубоким вдыханием сигаретный дым доходит до периферических бронхов, в которых чаще возникает АКЛ [24].

Хотя никотин сам по себе не является канцерогеном, в сигаретном дыме содержится до 55 веществ, которые являются канцерогенными, включая полициклические ароматические углеводороды (ПАУ) и 4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридил)-1-бутанон (NNK – nicotine-derived nitrosamine ketone). NNK является проканцерогеном, в организме он активируется под действием метаболических ферментов, в частности, цитохрома CYP450. Метаболиты NNK легко связываются с ДНК и образуют ДНК-аддукты, которые инициируют процесс канцерогенеза. NNK способен вызывать полиморфизмы и метилирование генов, участвующих в регуляции клеточного роста, дифференцировки и пролиферации, и может способствовать хромосомной нестабильности [24]. Также, NNK действует как агонист бета-адренергических рецепторов, что в конечном счете влияет на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов в клетках легких, и увеличивает высвобождение из них арахидоновой кислоты, которая может способствовать усилению пролиферации этих клеток [25]. Сравнительный анализ экспрессии генов между курящими и некурящими пациентами с АКЛ выявил увеличение экспрессии *CDK1*, *CCNB1*, *STAT1*, *AURKA* и *CDC20*. Данные гены кодируют белки, которые отвечают за контроль и прохождение клеточного цикла. Таким образом, повышение уровня соответствующих белков у курильщиков с АКЛ указывает на то, что курение вызывает усиление пролиферации клеток, что может способствовать патогенезу данного заболевания [23].

Пассивное курение также может повышать риск развития АКЛ. Известно, что по всему миру 40% детей и 33-35% некурящих взрослых подвергаются воздействию пассивного курения. Пассивные курильщики вдыхают и основной, и побочный дым, который содержит в себе канцерогенные вещества, включая бензпирен, бензол и NNK. Однако, однозначная оценка

влияния пассивного курения затрудняется тем, что в большинстве исследований отсутствует или представляется субъективной информация об интенсивности воздействия пассивного курения. Кроме того, имеет место неконтролируемое остаточное воздействие других факторов риска, таких как профессиональные риски, семейный анамнез и диета [26]. Наибольшее число смертей среди взрослых, подверженных пассивному курению, связано не с раком легкого, а с ишемической болезнью сердца и астмой [2]. Это объясняется тем, что пассивные курильщики испытывают меньшее воздействие курения по сравнению с активными, и экспозиции токсическими веществами дыма недостаточно для развития рака легкого, что снижает статистику смертности от данного заболевания среди пассивных курильщиков. В то же время, окись углерода, вдыхаемая при пассивном курении, связывается с гемоглобином, вызывая гипоксию, что увеличивает количество эритроцитов и, следовательно, вязкость крови, тем самым оказывая пагубное влияние на сердечно-сосудистую систему [27]. Помимо этого, сигаретный дым вызывает хроническое воспаление ткани легких и гиперсекрецию слизи, что способствует развитию астмы. Особенно опасно пассивное курение для текущих астматиков, увеличивая риск смерти для пациентов с этим респираторным заболеванием [28,29].

Индивидуальный риск развития рака легкого определяется балансом между токсическим воздействием NNK, количеством лет активного или пассивного курения, а также системой репарации ДНК и антиоксидантной защитой клеток легких.

1.1.2.3. Загрязнения окружающего воздуха

Факторы риска развития рака легкого, помимо курения, включают загрязнения воздуха окружающей среды и профессиональные вредности на ядерных объектах и асбестовых шахтах [2]. Длительное воздействие загрязненным воздухом увеличивает риск развития рака легких, особенно у лиц с генетической предрасположенностью [30].

Сравнение деревенских и городских жителей выявило более высокую вероятность (на 10-40%) развития рака легкого у последних. Эта тенденция может быть связана с аккумуляцией выхлопных газов дизельных и бензиновых автомобилей в мегаполисах. Было показано, что такое загрязнение воздуха связано с повышением заболеваемости АКЛ у субъектов, которые никогда не курили [31]. Данная корреляция объясняется тем, что выхлопной газ таких двигателей содержит в себе канцерогенные вещества: бензол, формальдегид и 1,3-бутадиен [32].

У жителей сельской местности также может развиваться рак легкого, который потенциально опосредован загрязнением воздуха продуктами сжигания твердого топлива, в том числе угля. Было показано, что загрязнение воздуха в домашних хозяйствах, связанное со сжиганием твердого топлива для отопления и приготовления пищи, является основной причиной респираторных заболеваний. Использование угля и вдыхание продуктов его горения связано с повышением риска развития рака легкого на 30%. Однако риск развития рака легкого, опосредованный загрязнением воздуха, намного меньше, чем риск, ассоциированный с курением [31].

Кроме этого, имеются профессиональные риски развития рака легкого, что отмечено у шахтеров, работающих в урановых рудниках. Радон образуется в процессе природного радиоактивного распада урана, который присутствует в горных породах и почве. Радон является газообразным веществом, концентрация которого в атмосферном воздухе быстро падает до очень низкого уровня и, как правило, не представляет опасности. Однако внутри помещений радон может накапливаться в высоких концентрациях. При повышении содержания радона в жилых помещениях на 100 беккерель/м³ риск развития АКЛ увеличивается на 13% [33]. Воздействие радона наиболее опасно в совокупности с курением [34,35].

Помимо профессионального риска у шахтеров урановых рудников, работа в асбестовых шахтах также связана с развитием АКЛ. Крошечные

волокна асбеста выбрасываются в воздух, аккумулируются в окружающем пространстве и вдыхаются шахтерами в легкие. Волокна асбеста, попав в легкие, могут привести к рубцеванию, воспалению и канцерогенезу данного органа [36]. У пациентов с АКЛ, подвергавшимся воздействию асбеста, была обнаружена одна соматическая мутация в *SDK1*. *SDK1* является молекулой клеточной адгезии, которая активируется клеточным стрессом, в частности, окислительным. Мутация в *SDK1* может привести к нарушению клеточной адгезии при прогрессировании опухоли [37].

Таким образом, для своевременного выявления патологических состояний легких жителям, подверженным различным загрязнениям окружающего воздуха, рекомендуется прохождение профилактических обследований. В то время как состояние здоровья рабочих урановых рудников и асбестовых шахт должно наблюдаться врачами-профпатологами.

1.1.2.4. Хронические заболевания легких

Астма, хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) и туберкулез легких являются самыми распространёнными легочными заболеваниями в мире. Данные хронические заболевания негативно влияют на выживаемость, особенно вкупе друг с другом. Так, пациенты с ХОБЛ, у которых развился туберкулез легких, имели риск смерти в 2 раза выше по сравнению с пациентами только с туберкулезом легких [38].

Хронические заболевания легких могут инициировать развитие в них опухоли. Так, пациенты с туберкулезом, эмфиземой легких и ХОБЛ имели риск развития рака легкого в 11, 2.4 и 1.5 раза выше, соответственно, по сравнению с пациентами без данных хронических заболеваний [39]. Кроме этого, пациенты с астмой также имеют повышенный на 44% риск развития рака легкого [40]. Данная корреляция объясняется тем фактом, что воспаление, вызванное хроническими заболеваниями, может привести к повреждению легочной ткани. В воспаленной ткани увеличивается скорость пролиферации клеток, повышается уровень повреждения ДНК и учащаются клеточные

мутации. Кроме того, воспаление, действуя в качестве инициатора антиапоптотических сигналов, увеличивает вероятность развития рака легкого. Воспаление также может стимулировать ангиогенез, таким образом обеспечивая доставку питательных веществ для роста и распространения опухолевых клеток [41].

Помимо влияния на канцерогенез легких, сопутствующие респираторные заболевания при раке данного органа могут снижать выживаемость пациентов. Смертность от рака легкого увеличивается у некурящих пациентов с сопутствующей астмой [42]. ХОБЛ также связана с худшим прогнозом выживаемости при раке легкого и более высокой частотой рецидива опухоли [43]. Корреляция между наличием хронических респираторных заболеваний и снижением выживаемости пациентов с раком легкого объясняется накоплением воспалительных факторов в опухолевой ткани. Эти факторы в опухолевом микроокружении способствуют аккумуляции АФК, активации путей NF-κB и STAT3, инициируя метастазирование рака легкого и ангиогенез опухоли [41].

В частности, при АКЛ риск смерти повышался у мужчин с астмой (на 20%) и с ХОБЛ (на 32%). Однако, наличие хронических заболеваний легких при АКЛ никак не влияло на смертность у женщин по сравнению с мужчинами. Кроме этого, смертность в случае сочетания различных заболеваний легких была выше у мужчин с астмой, ХОБЛ и туберкулезом легких (на 63%), с астмой и ХОБЛ (на 31%), с ХОБЛ и туберкулезом легких (на 23%). Также, как и в случае с единичными хроническими заболеваниями легких, сочетание данных патологий никак не влияло на выживаемость среди пациенток с АКЛ [43].

Следовательно, сопутствующие заболевания легких при АКЛ могут повышать риск смертности у мужчин, но не у женщин. Данное явление может объясняться курением, т.к. по статистике курильщиков больше среди мужчин,

чем среди женщин. Продолжение курения после постановки диагноза рака легкого связано с повышенным риском смертности [44].

Таким образом, воспаление, вызванное хроническими заболеваниями, может инициировать канцерогенез легких и влиять на выживаемость пациентов с данными респираторными патологиями [43].

1.1.3. Таргетная терапия

Выявление драйверных мутаций позволило разработать более эффективное и таргетное, по сравнению со стандартной химиотерапией, персонализированное лечение рака легкого. Прорывным подходом в терапии рака легкого, в частности НМРЛ и АКЛ, стало использование тирозинкиназных ингибиторов (ТКИ), которые угнетают EGFR-индуцированный сигнальный каскад. Препаратами, нацеленными на EGFR, являются гефитиниб, эрлотиниб, цетуксимаб и панитумумаб. Терапия гефитинибом и эрлотинибом приводит к повышению выживаемости, в том числе общей и безрецидивной, по сравнению со стандартной химиотерапией [45]. Однако, выживаемость пациентов с поздними стадиями НМРЛ не улучшается лечением с помощью EGFR-ТКИ после химиотерапии. Кроме этого, у пациентов с НМРЛ в течение 10-14 месяцев развивается лекарственная устойчивость к EGFR-ТКИ [46].

Лекарственная устойчивость к EGFR-ТКИ первого поколения объясняется приобретением вторичной мутации в тирозинкиназном домене *EGFR* T790M, амплификацией *MET* и мутацией *RAS* [46]. Мутация *EGFR* T790M является наиболее распространенной приобретенной мутацией после лечения EGFR-ТКИ первого поколения среди пациентов с НМРЛ и АКЛ, в частности. Таким образом, вторичная мутация *EGFR* T790M после лечения EGFR-ТКИ первого поколения стала новой мишенью для разработки препаратов EGFR-ТКИ следующего поколения, в том числе осимертиниба. Осимертиниб показал положительную эффективность при лечении АКЛ с мутацией *EGFR* T790M и был одобрен для клинического применения в США

и Японии [47]. Кроме *EGFR* T790M, осимертиниб оказался эффективен в отношении опухолей с первичными мутациями *EGFR* (L858R в 21 экзоне и делеция в 19 экзоне), и таким образом, может применяться в качестве первой линии терапии *EGFR*-мутированных НМРЛ [48].

К сожалению, к осимертинибу также развивается лекарственная устойчивость. У 45 пациентов с НМРЛ после терапии осимертинибом были обнаружены мутации *EGFR* C797S, *PIK3CA*, *KRAS*, *BRAF* и амплификации *MET*. 5-20% пациентов с *EGFR*-мутированными НМРЛ и лекарственной устойчивостью к *EGFR*-ТКИ становятся носителями именно амплификации *MET*. Таким образом, нацеливание на амплифицированный *MET* может повысить эффективность терапии НМРЛ. Ингибиторы *MET* (кризотиниб и SGX532) могут повысить чувствительность к gefитинибу и осимертинибу при лечении НМРЛ [49]. Помимо *MET*, в устойчивых к *EGFR*-ТКИ НМРЛ была выявлена мутация в *KRAS* [46]. Как и в случае с амплификациями *MET*, нацеливание на мутированный *KRAS* может помочь в преодолении лекарственной устойчивости и привести к повышению терапевтической эффективности. На данный момент, препарат соторасиб одобрен FDA (food and drug administration – управление США по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) для пациентов с *KRAS* (G12C)-мутированными НМРЛ [50]. Таким образом, различные терапевтические стратегии, нацеленные на путь *EGFR* и вторичные мутации, могут привести к преодолению лекарственной устойчивости и замедлить прогрессирование НМРЛ.

Кризотиниб, помимо ингибирования *MET*, селективно действует на опухолевые клетки, экспрессирующие продукты слияния *ALK*. Несколько клинических исследований подтвердило эффективность кризотиниба по сравнению со стандартной химиотерапией у пациентов с поздними стадиями *ALK*-мутированных НМРЛ. После лечения кризотинибом в 30% случаев обнаруживаются вторичные мутации в киназном домене *ALK*, что неизбежно

ведет к рецидиву. Самыми распространенными мутациями *ALK* являются L1196M и G1269A, которые стерически затрудняют связывание кризотиниба с *ALK*. Для преодоления L1196M- и G1269A-ассоциированных резистентностей разработано несколько новых *ALK* ингибиторов, такие как церитиниб, алектиниб, бригатииниб и лорлатиниб [51].

Помимо вышеуказанных селективных ингибиторов, в последнее время все большее внимание заслуживает иммунотерапия с помощью моноклональных антител к рецептору программированной клеточной смерти 1 (PD-1 – programmed cell death 1). PD-1 – это клеточный рецептор, который участвует в клеточной дифференцировке иммунных клеток. PD-1 имеет два лиганда: PD-L1 и PD-L2 (PD-L – programmed cell death 1 ligand). Экспрессия PD-L1 наблюдается на поверхности макрофагов, антиген-представляющих клеток, В- и Т-лимфоцитов, эпителиальных, мышечных и эндотелиальных клеток. PD-L2 экспрессируется на активированных дендритных клетках и макрофагах, а сам PD-1 преимущественно экспрессируется на поверхности активированных цитотоксических Т-клеток [52]. Основным индуктором экспрессии PD-L1 *in vivo* является гамма-интерферон (IFN- γ – interferon gamma), который высвобождается CD8⁺ Т-клетками [53]. Экспрессию PD-L2 запускают Th2-цитокины, в частности IL-4 [52]. Лиганды PD-L1 и PD-L2 связываются с рецептором PD-1 на активированных Т-клетках, что предотвращает активное действие последних и приводит к подавлению иммунной системы. Комплексы PD-1–PD-L1 и PD-1–PD-L2 предотвращают аутоиммунный ответ в периферических тканях во время воспаления [53].

Повышенная экспрессия PD-L1 также наблюдается на поверхности различных типов раковых клеток, включая НМРЛ. Считается, что экспрессия PD-L1 позволяет опухолевым клеткам избегать иммунный ответ [54]. Моноклональные антитела в настоящее время успешно используются для ингибирования взаимодействия рецептора PD-1 с лигандом PD-L1. В настоящее время одобренными в качестве монотерапии пациентов с

опухолями, у которых сильно повышена экспрессия PD-L1, являются пембролизумаб, ниволумаб, цемиплимаб, атезолизумаб, дурвалумаб и авелумаб [55]. Эти моноклональные антитела связываются с рецептором PD-1 и делают невозможным связывание PD-L1 с данным рецептором. Когда раковые клетки, экспрессирующие на своей поверхности PD-L1, не способны взаимодействовать с активированными Т-клетками, иммунный ответ остается активным. Результаты доклинических и клинических исследований показали, что моноклональные антитела могут значительно усилить противоопухолевые иммунные реакции пациентов с раком, в том числе легкого [56,57]. Экспрессия PD-L1 наблюдается у 32.6% пациентов с НМРЛ. У пациентов с плоскоклеточной карциномой легкого, уровень экспрессии PD-L1 значимо не связан со стадией опухоли, а у пациентов с АКЛ экспрессия PD-L1 прямо коррелирует с высоким уровнем злокачественности клеток опухоли и с количеством метастаз в лимфатических узлах [53]. Мета-анализ с участием 1653 пациентов с НМРЛ не выявил статистически значимой разницы между экспрессией PD-L1 и прогнозом выживаемости [58]. Однако, при делении НМРЛ на плоскоклеточную карциному и АКЛ обнаруживаются противоречивые корреляции в отношении выживаемости пациентов. В некоторых исследованиях пациенты с плоскоклеточной карциномой и с высокой экспрессией PD-L1 ($\geq 50\%$) характеризовались более длительной выживаемостью [59]. В то время как другие статистические анализы пациентов с данным типом НМРЛ выявляли обратную корреляцию с выживаемостью. Подобное противоречие наблюдается и с АКЛ: некоторые когорты пациентов с АКЛ, имеющие высокую экспрессию PD-L1 ($\geq 50\%$) характеризовались более коротким временем жизни после постановки диагноза [53]. В других исследованиях, пациенты с низким уровнем экспрессии PD-L1 ($\geq 1\%$) также имели меньшую выживаемость при АКЛ [60]. Эти противоречивые данные могут объясняться различной этнической принадлежностью пациентов с НМРЛ и разными шкалами при оценке экспрессии PD-L1.

Как и PD-L1, другой лиганд PD-1 – PD-L2 экспрессируется при многих типах рака, включая НМРЛ. Среди пациентов с АКЛ экспрессия PD-L2 отмечается отрицательной у 73%, слабо положительной у 19% и сильно положительной у 7%. Экспрессия PD-L1 и PD-L2 коррелирует у 60% пациентов с данным типом НМРЛ [61]. Известно, что опухолевые клетки, экспрессирующие PD-L2, устойчивы к лечению только антителом против PD-L1, но эта устойчивость может преодолеваться отдельно от или в комбинации с антителом против PD-L2 [62]. Отличия в чувствительности к антителам, ингибирующим связывание рецептора PD-1 с его лигандами, PD-L1 и PD-L2, объясняются разными механизмами взаимодействия друг с другом. Связывание PD-1 с PD-L1 влечет за собой конформационные изменения рецептора, тогда как взаимодействие с PD-L2 – нет. Этот прямой способ связывания PD-1 с PD-L2, где структурная перестройка не требуется, вероятно, является молекулярной основой для наблюдаемого в 6-10 раз более сильного сродства по сравнению с комплексом PD-1–PD-L1 [63]. В отличие от PD-L1, таргетирование которого широко применяется в иммунотерапии НМРЛ, клиническая значимость экспрессии PD-L2 у пациентов с НМРЛ остается неясной [62]. Изучение роли PD-L2 может привести к разработке препаратов для пациентов с PD-L1-негативными/PD-L2-позитивными НМРЛ. Внедрение таргетных препаратов в клиническую практику значительно улучшило терапию и выживаемость пациентов с раком легких, однако такое лечение всегда связано с развитием резистентности в течение нескольких месяцев. Поэтому для предотвращения развития устойчивости опухолевых клеток к терапии, онкологи назначают комбинированное лечение, включающее как таргетные препараты, так и химиотерапию. На данный момент все более обнадеживающей становится генная терапия, которая позволит персонализировать терапию в зависимости от генетического профиля каждого конкретного пациента. В связи с этим, в настоящее время актуален поиск новых молекулярных мишеней, чей уровень в ту или иную сторону отклонен в опухолевых клетках.

1.2. Физиологическая значимость контроля качества митохондрий

В 1920-х годах немецкий ученый, лауреат Нобелевской премии Отто Варбург высказал гипотезу о роли митохондрий в развитии рака. Он показал, что метаболизм опухолевых клеток характеризуется увеличенной скоростью поглощения глюкозы и ее преимущественной переработкой до лактата даже в присутствии кислорода. В то время как нормальные клетки склонны ферментировать глюкозу до пирувата, который далее окисляется в митохондриях с использованием кислорода. Варбург также предполагал, что переключение с окислительного фосфорилирования на гликолиз может быть вызвано поврежденными митохондриями в опухолевых клетках [64].

В последние десятилетия наблюдается ренессанс в данном направлении. Исследователи все большее внимание уделяют роли митохондрий и связанными с ними метаболическими путями в процессе канцерогенеза. Митохондрии являются высокодинамичными органеллами, которые дробятся (fission) и сливаются (fusion) в ответ на различные вне- и внутриклеточные стимулы [65]. Кроме того, в случае повреждения митохондрий для них характерен процесс элиминации. Подобное «уничтожение» называется митофагией и представляет собой процесс селективной аутофагии митохондрий. Таким образом, митофагия осуществляет контроль качества митохондрий, не допуская накопление данных поврежденных органелл в клетке, и тем самым препятствуя аккумуляции АФК, которые, в свою очередь, регулируют развитие и прогрессирование опухолевых заболеваний [66]. Более подробно митофагия будет описана в разделе 1.3.3.1. Пусковыми сигналами митофагии и дробления/слияния митохондрий в клетке являются: 1) нарушение качества митохондрий; 2) дисбаланс уровня питательных веществ; 3) миграция и инвазия; 4) пролиферативная активность; 5) воздействие внешними стимулами [65,66]. Вышеупомянутые пусковые сигналы тесно взаимосвязаны с путями злокачественной трансформации клетки. Исходя из этого, детальный анализ роли митохондрий и регуляции динамических

процессов этих органелл поможет дополнить известные и выявить новые стратегии терапии онкологических заболеваний.

1.2.1. Окислительный стресс

АФК включают супероксидные радикалы ($O_2^{\bullet-}$), перекись водорода (H_2O_2), гидроксильные радикалы ($\bullet OH$) и синглетный кислород (1O_2). АФК образуются как побочные продукты метаболизма кислорода в митохондриях и выполняют физиологическую роль – передачу внутриклеточных сигналов. Однако, при увеличении производства АФК, развивается окислительный стресс, который оказывает вредное воздействие на важные клеточные структуры, такие как белки, липиды и нуклеиновые кислоты. К накоплению АФК в клетке и, как следствие, к окислительному стрессу приводят неблагоприятное экологическое воздействие, в том числе УФ и ионизирующее излучения, тяжелые металлы, ксенобиотики (например, противоопухолевые препараты) и курение [67]. Чтобы предотвратить развитие окислительного стресса, клетки используют большой спектр антиоксидантов. Некаталитическими антиоксидантами являются эндогенно синтезированный билирубин, α -липоевая кислота, мелатонин, меланин, глутатион и мочевая кислота, а также экзогенно полученные витамины Е и С, β -каротин и растительные полифенолы. Помимо этого, клетки имеют ферментативную антиоксидантную систему, включающую супероксиддисмутазу, каталазу и глутатионпероксидазу [68]. Особого внимания заслуживает глутатионпероксидаза 4 – GPX4, которая, кроме своей роли в нейтрализации АФК, регулирует один из типов ПГК – ферроптоз. GPX4 катализирует превращение гидроперекисей липидов в липидные спирты, не допуская образования токсичных липидных АФК. Инактивация этого белка ведет к аккумуляции липидных пероксидов и развитию ферроптотической гибели [69]. Также клетка может защищаться от АФК с помощью фермента Sirtuin3. Данный белок является митохондриальной деацетилазой и важнейшим регулятором окислительного стресса путем деацетилирования субстратов,

участвующих в производстве АФК и их детоксикации [70]. Окислительный стресс может быть ответственен, с разной степенью важности, за возникновение и/или прогрессирование различных заболеваний: рака, диабета, нарушений обмена веществ, атеросклероза и сердечно-сосудистых заболеваний [67].

Длительное воздействие высокими концентрациями АФК приводит к окислительному повреждению ДНК, которое вместе с последующим образованием гидролизированных оснований ДНК являются пусковыми событиями в канцерогенезе, включая и рак легкого [67]. Образование такого рода аддуктов нарушает нормальный рост клеток, изменяя физиологический транскриптомный профиль и вызывая мутации генов. Окислительный стресс может вызывать и другие модификации структуры ДНК, в том числе повреждение азотистых оснований и дезоксирибозы, образование перекрестных связей ДНК-белок и разрыв цепей ДНК [71].

Самым ярким доказательством того, что АФК и окислительный стресс могут повышать риск развития рака, является установленное при канцерогенезе у мышей с нокаутом по супероксиддисмутазам 1 и 2, конвертирующих $O_2^{\bullet-}$ в кислород и H_2O_2 . Мыши, гомозиготные по цитоплазматической супероксиддисмутазе 1 или гетерозиготные по митохондриальной супероксиддисмутазе 2, демонстрировали признаки серьезного окислительного повреждения и спонтанно развивали рак [72]. Однако, значительный окислительный стресс также способен вызывать активацию различных типов ПГК. Избыточное количество АФК может вызывать высвобождение цитохрома c из митохондрий в цитоплазму и запуск апоптоза, одного из видов ПГК [73]. Так, многие химиотерапевтические препараты, применяемые для лечения рака, повреждают ДНК, а также инициируют окислительный стресс, вкуче приводя к апоптозу опухолевых клеток [74]. Таким образом, существует тонкий баланс уровня АФК, который

направляет клетку либо на путь злокачественного перерождения, либо на ее гибель.

1.2.2. Митохондриальная динамика

Митохондрии являются крайне динамичными органеллами, постоянно претерпевая деление и слияние. Деление митохондрий помогает отделить поврежденную часть данных органоидов, которая, в конечном итоге, будет элиминирована с помощью митофагии. Слияние служит для объединения дефектных митохондрий со здоровыми, что обеспечивает разбавление поврежденных митохондриальных компонентов, предотвращая их удаление. Процессы митохондриальной динамики регулируются высококонсервативными ГТФ-азами семейства динамина. На сегодняшний день известно, что дробление митохондрий контролируется динамин-родственным белком 1 (Drp1), который способствует формированию сжимающегося вокруг митохондрии кольца, что в дальнейшем приводит к разделению данной органеллы. Слияние внешней и внутренней мембраны митохондрий опосредуется митофузинами 1, 2 (Mfn1 и Mfn2) и белком оптической атрофии 1 (Opa1) соответственно (рис. 2) [75].

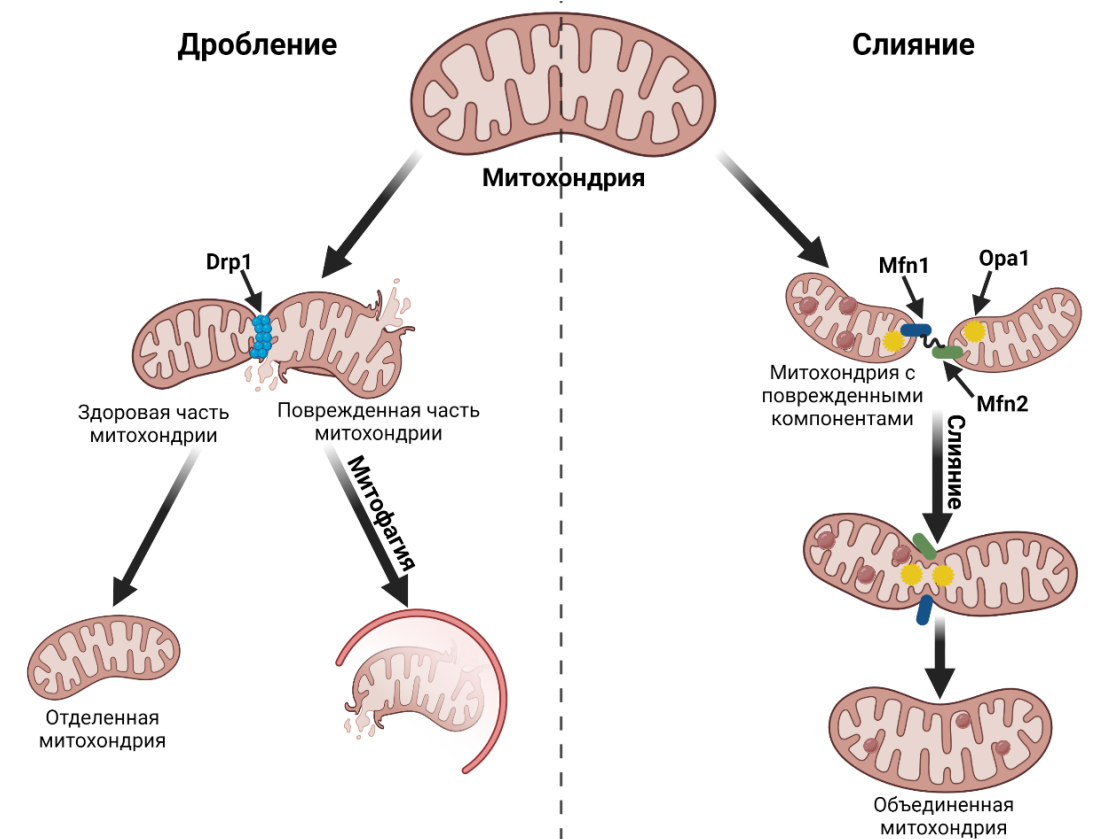


Рис. 2. Схема дробления и слияния митохондрий (сделано в Biorender).

Белок митохондриального дробления Drp1 участвует в регуляции гибели клеток, которая обычно сопровождается фрагментацией митохондрий. Проапоптотические белки семейства Bcl-2, Bax и Bak, стабилизируют Drp1 на митохондриях, повышая проницаемость их мембран [76], а другие проапоптотические белки данного семейства, Noxa и Puma, запускают митохондриальное дробление [77]. Помимо участия в гибели клеток, белки динамики митохондрий оказывают влияние на процессы клеточной миграции и метастазирования. Так, в мигрирующих опухолевых клетках митохондрии локализуются на переднем крае вдоль микротрубочек, где потребность в энергии выше. Тем самым митохондрии обеспечивают необходимое энергоснабжение метастазирующим клеткам [78]. Кроме этого, дробление митохондрий облегчает перемещение данных органелл и способствует хемотаксису лимфоцитов, в то время как митохондриальное слияние тормозит оба процесса [79]. Деление митохондрий также способствует метастазированию клеток рака молочной железы, тогда как слияние

митохондрий препятствует ему [80]. Исследования последних лет показывают, что белки митохондриального дробления (Drp1) и слияния (Mfn1, Mfn2 и Opa1) ассоциированы с развитием различных типов рака, однако, до сих пор окончательно не выяснены механизмы регуляции данными митохондриальными белками процессов канцерогенеза в общем, и развития АКЛ, в частности. Кроме того, неизвестно принимают ли какие-либо другие белки участие в этих процессах [81,82]. Важно отметить, что исследования по анализу уровня белков динамики митохондрий в клинических образцах достаточно противоречивы, что может объясняться неоднородностью когорты пациентов и различием в методах анализа уровня этих белков [66].

1.2.3. Таргетирование митохондрий

Как отмечено выше, митохондрии и связанные с ними такие процессы, как метаболизм, окислительный стресс и их динамические изменения, участвуют в инициации и прогрессировании рака. Следовательно, митохондрии являются мишенью для терапии злокачественных заболеваний. В настоящее время уже существует множество препаратов, нацеленных на митохондрии. Ингибиторы электрон-транспортной цепи (ЭТЦ) митохондрий, а именно метформин, тамоксифен, α -токоферилсукцинат и 3-бромпируват, действуют путем нарушения функции дыхательных комплексов ЭТЦ и продукции АФК. Повышенные уровни АФК, в свою очередь, запускают ПГК [83].

Помимо вышеупомянутых агентов, существуют их производные. Так, МитоТам, производное тамоксифена, ингибирует комплекс I ЭТЦ (НАДН-дегидрогеназа), увеличивает выработку АФК, тем самым вызывая гибель клеток рака молочной железы [84]. Кроме того, MitoVES, аналог сукцината витамина E, ингибирует комплекс II ЭТЦ (сукцинатдегидрогеназа), вызывая апоптоз клеток рака молочной железы, толстой кишки и легкого, тем самым уменьшая рост данных опухолей [85].

Существует также ряд других ингибиторов, которые непосредственно нацелены на дыхательный комплекс I ЭТЦ. Заинтересованность в таргетировании именно НАДН-дегидрогеназы объясняется тем, что данный комплекс является основной точкой входа электронов в ЭТЦ. Исходя из этого, ингибирование дыхательного комплекса I ЭТЦ ограничивает скорость митохондриального дыхания [86]. Низкомолекулярные агенты ME-143 и ME-344 способны значительно ингибировать способность комплекса I окислять НАДН, предотвращая поток электронов через ЭТЦ. Помимо ингибирования комплекса I, ME-344 вызывает генерацию АФК, что приводит к транслокации проапоптотического белка Вах на внешнюю мембрану митохондрий, последующей пермеабилзации внешней митохондриальной мембраны (ПВММ) и запуску апоптоза [87]. Важно отметить, что рандомизированное плацебо-контролируемое исследование ингибитора ME-344 у пациенток с ранними стадиями HER2-негативного рака молочной железы выявило значительную противоопухолевую активность этого ингибитора [88].

Препарат метформин, широко используемый для лечения диабета 2 типа, в настоящее время используется для лечения рака у диабетиков. Известно, что метформин непосредственно воздействует на митохондрии, ограничивая активность цикла трикарбоновых кислот и окислительного фосфорилирования, что продемонстрировано как в изолированных митохондриях, так и в интактных клетках [89]. Метформин влияет на функционирование митохондрий через ингибирование митохондриального комплекса I ЭТЦ, что приводит к снижению митохондриального дыхания. Кроме этого, метформин ингибирует сигнальный путь mTOR (mammalian target of rapamycin – мишень действия рапамицина млекопитающих), контролирующей регуляцию транскрипции и трансляции. Таким образом, угнетение пути mTOR уменьшает синтез белка в опухолевых клетках [90].

Было показано, что лечение метформином вызывает снижение заболеваемости раком легких среди диабетиков и увеличение выживаемости

пациентов с данными патологиями [91]. Однако, у пациентов, принимающих метформин, с НМРЛ, но без диабета, статистически значимых улучшений в общей выживаемости выявлено не было. Позитивным эффектом дополнительного приема метформина в дозе 500 мг в день к химиотерапии гемцитабином и цисплатином было уменьшение частоты тошноты, вызванной химиотерапией, у пациентов с НМРЛ IV стадии [92].

Таким образом, терапия, направленная на регуляцию функций митохондрий, может быть перспективной и поиск новых мишеней, в том числе митохондриальных белков, является актуальной задачей современной медицины.

1.3. Программируемая гибель клеток (ПГК)

ПГК – генетически регулируемый процесс элиминации выполнивших свою функцию, необратимо поврежденных и/или потенциально опасных клеток. ПГК необходима для должного гомеостаза организма, а нарушение данного процесса может привести к развитию патологий [93].

Интересно, что ПГК не является уникальным процессом для многоклеточных организмов, в которых ПГК имеет очевидное преимущество для регуляции гомеостаза организма как в физиологических, так и в патологических условиях, но данный процесс также встречается (в упрощенных формах) среди одноклеточных эукариот, таких как дрожжи, кинетопластидные паразиты (например, *Trypanosoma cruzi*) и водоросли (например, зеленые и диатомовые водоросли, гаптофиты, динофлагелляты) и, по крайней мере, у некоторых прокариот (например, *Escherichia coli* и цианобактерии) [94,95].

По сравнению со случайной гибелью клеток – непреднамеренной и неконтролируемой, когда клетки подверглись серьезным воздействиям физической (например, высокое давление, температура или осмотические силы), химической (например, экстремальные колебания pH) или

механической (например, усилие сдвига) природы – ПГК основывается на генетически запрограммированном молекулярном механизме, который можно модулировать с помощью как фармакологических, так и генетических вмешательств [93,95].

Гибель клеток характеризуется определенными морфологическими изменениями, которые вместе с механизмами, посредством которых элиминируются мертвые клетки и их фрагменты, используются для классификации различных форм гибели. Согласно рекомендациям Номенклатурного комитета по гибели клеток 2018 года, описано более 10 типов гибели, среди которых наиболее изученными являются: 1) апоптоз, характерной чертой которого считается образование апоптотических телец и их дальнейшее фагоцитирование макрофагами; 2) аутофагия, сопровождающаяся обширной вакуолизацией цитоплазмы; и 3) некроптоз, ассоциированный с разрывом мембраны и воспалительной реакцией. Кроме того, на данный момент выделяют такие типы гибели, как некроз, ферроптоз, пироптоз, партанатоз, аноикис и некоторые другие [95]. Многие типы ПГК тесно взаимосвязаны между собой и их баланс в клетке определяет ее судьбу [96]. Глубокое понимание механизмов ПГК и их взаимодействия друг с другом поможет выявить новые терапевтические цели для предупреждения развития и терапии патологических состояний организма.

1.3.1. Апоптоз

Апоптоз – это эволюционно-консервативный и наиболее изученный на данный момент тип ПГК [97]. Для апоптоза характерны конденсация хроматина и его фрагментация, межнуклеосомные разрывы ДНК, дегидратационное сжатие клеток, утеря межклеточных контактов, разрушение цитоскелета, экспонирование фосфатидилсерина на внешней поверхности цитоплазматической мембраны и образование фрагментов клетки (апоптотических телец) [95]. Именно экспонирование фосфатидилсерина на внешней поверхности клеточной мембраны способствует распознаванию

макрофагами апоптотических телец [98]. Своевременное поглощение фрагментов апоптотической клетки макрофагами предотвращает развитие воспалительного процесса, что является отличительной чертой апоптоза [99].

Одними из важнейших ферментов, которые участвуют в запуске и развитии апоптоза, является семейство каспаз, представляющих собой цистеиновые протеазы, гидролизующие свои субстраты после остатков аспартата. Семейство апоптотических каспаз функционально подразделяется на две подгруппы: инициаторные (каспазы-2, -8, -9 и -10) и эффекторные (каспазы-3, -6 и -7). Первой описанной мишенью эффекторных каспаз был фермент репарации – поли(АДФ-рибоза)полимераза (ПАРП). Расщепление ПАРП и появление фрагмента р89 является характерным биохимическим признаком апоптотической гибели клетки. Помимо апоптоза, некоторые каспазы принимают участие в регуляции иммунного ответа, а именно каспазы-1, -4, -5 и -11 [99].

Апоптотическая гибель клетки может протекать по одному из двух путей – внешнему либо внутреннему. Внешний путь апоптоза запускается стимуляцией рецепторов смерти, расположенных на поверхности клеток, а внутренний путь – при поступлении внутриклеточных сигналов, концентрирующихся на уровне митохондрий (рис. 3) [95].

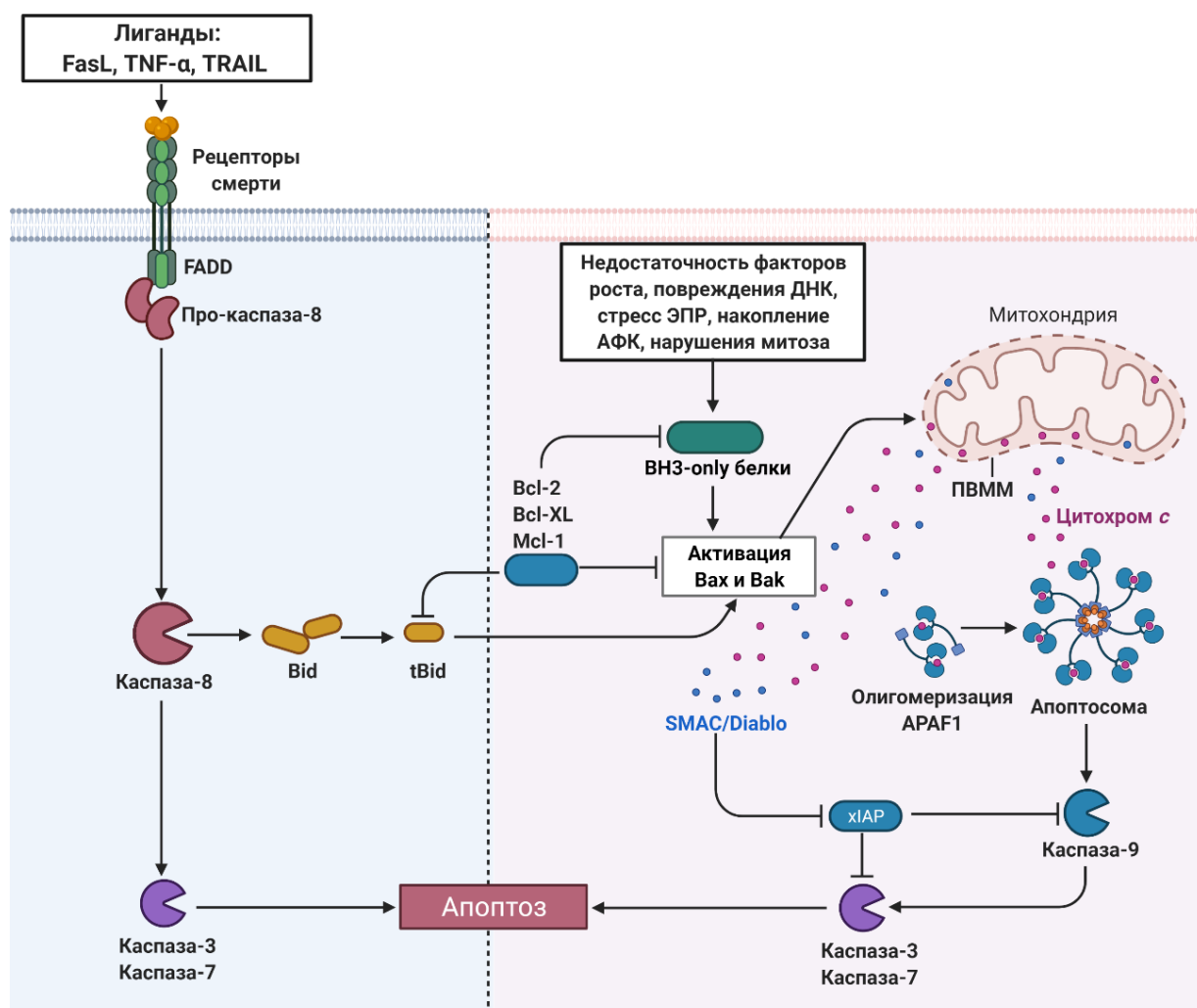


Рис. 3. Общая схема апоптоза (модифицировано из Biorender).

Таким образом, процесс апоптоза можно условно разделить на три фазы: инициаторную и эффекторную, которые регулируются соответствующими каспазами, а также последующий фагоцитоз апоптотических телец.

1.3.1.1. Внутренний путь апоптоза

Внутренний путь апоптоза запускается такими изменениями клеточного микроокружения, как недостаточность факторов роста, повреждения ДНК, стресс эндоплазматического ретикулума (ЭПР), накопление АФК, нарушения митоза и другие [95].

Центральными регуляторами внутреннего пути апоптоза являются митохондрии, в межмембранном пространстве которых в норме локализуются различные проапоптотические факторы, такие как цитохром с, SMAC/Diablo

(second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP binding protein with low pI – второй митохондриальный активатор каспаз/прямой IAP-связывающий белок с низким pI) и другие. В нормальных условиях эти белки выполняют несвязанные с апоптозом функции. Однако, выход данных факторов из митохондрий в цитоплазму ведет к инициации каспазного каскада и последующей гибели, поэтому целостность внешней мембраны митохондрий имеет ключевое значение для запуска апоптоза [97].

Считается, что точкой невозврата для внутреннего пути апоптоза является ПВММ, которая контролируется про- и антиапоптотическими белками семейства Bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma-2 – антиапоптотический белок, маркер В-клеточной лейкемии/лимфомы-2). Отличительной особенностью белков данного семейства является наличие одного или нескольких доменов гомологии Bcl-2 (BH – Bcl-2 homology domain) – BH1-BH4 [100].

Функционально проапоптотические белки можно разделить на три группы: 1) порообразующие Bak и Bax; 2) их непосредственные активаторы (Bid, Bim и Puma); 3) а также белки, которые выполняют свою проапоптотическую функцию за счет связывания с антиапоптотическими членами Bcl-2 семейства, нейтрализуя их (Bad, Noxa, Bmf). Кроме этого, проапоптотические белки можно разделить по их структуре: порообразующие Bax и Bak являются мультидоменными, в своем составе они имеют 3 домена (BH1-BH3), в то время как Bid, Bim, Puma, Bad, Noxa и Bmf содержат только один BH3 домен, в связи с чем их называют BH3-only белками [97]. Одним из BH3-only представителем Bcl-2 семейства является белок BNIP3 (Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3), участвующий в регуляции различных видов клеточной гибели, включая апоптоз и аутофагию. Однако его роль в процессах ПГК остается до конца не изученной и обусловлена типом раковых клеток и факторами среды [3,101]. Более подробно функции этого белка будут рассмотрены в разделе 1.4.

Важное значение в регуляции как внешнего, так и внутреннего путей апоптоза имеет белок Bid. Кроме того, что его проапоптотическая функция регулируется посттрансляционно, данный белок может расщепляться до активной усечённой формы tBid каспазой-8, -2 или гранзимом Б. tBid, Bim и Puma связывают и активируют один или оба из проапоптотических порообразующих белков Bax и Bak. Активация Bax или Bak на поверхности митохондрий приводит к аллостерическим изменениям в этих белках, позволяя им олигомеризоваться и инициировать ПВММ. В неапоптотических условиях, Bax постоянно перемещается между внешней митохондриальной мембраной и цитоплазмой, где он находится в форме мономера или неактивного димера. Bak, напротив, неизменно находится на внешней мембране митохондрий [97]. Долгое время преобладало мнение, что локализации Bak способствует взаимодействие с потенциал-зависимым анионным каналом VDAC2. Однако, исследование последних лет показало, что VDAC2 не несет исключительной ответственности за локализацию Bak в митохондриях. Свойства, присущие самому Bak, такие как его С-концевой участок или другие факторы на внешней мембране митохондрий, могут действовать независимо от VDAC2, способствуя локализации Bak в митохондриях и, следовательно, его апоптотической активности [102]. Другие BH3-only белки – Bad, Noxa, Bmf – играют проапоптотическую роль, не взаимодействуя с Bax или Bak. Они связываются с антиапоптотическими белками семейства Bcl-2, ограничивая их доступность для подавления Bax и Bak [100].

Антиапоптотическими белками семейства Bcl-2 являются: сам Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Bfl-1 и Mcl-1. Эти белки содержат все домены BH (BH1-BH4). Кроме этого, Mcl-1 отличается от остальных антиапоптотических белков семейства Bcl-2 наличием более длинного N-концевого домена, что делает его бóльшим по молекулярному весу. N-концевой домен данного белка также содержит последовательности PEST, которые обогащены пролином (P),

глутаминовой кислотой (E), серином (S) и треонином (T). Данные последовательности таргетируют Mcl-1 для быстрой деградации в пределах 1 часа [103]. Ранее нами было показано, что деградация Mcl-1 в условиях ограничения питательных веществ происходит посредством протеасомного расщепления независимо от аутофагии [104]. Эти результаты могут быть полезны для исследования подходов, направленных на корректировку питания или использование миметиков ограничения питательных веществ, которые применяются при терапии опухолевых заболеваний [105].

Антиапоптотические белки семейства Bcl-2 могут блокировать апоптоз путем связывания и изоляции активированных Bax или Bak, или других проапоптотических белков. Эти специфические взаимодействия происходят посредством связывания между BH3 доменом проапоптотических белков и гидрофобной канавкой, образованной доменами BH1-BH3 антиапоптотических белков. Для осуществления апоптоза в клетке, функции антиапоптотических белков должны быть подавлены, а Bax и/или Bak, наоборот, активированы [97]. Таким образом, запуск апоптоза регулируется балансом между про- и антиапоптотическими белками семейства Bcl-2. ПВММ ведет к высвобождению апоптогенных молекул, включая цитохром c, SMAC/Diablo, сериновую протеазу HtrA2 (high temperature requirement protein A2 – протеаза, протеин A2, требующий высокой температуры)/Omi и AIF (apoptosis inducing factor – фактор, индуцирующий апоптоз), из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму. Цитохром c связывается с APAF1 (apoptotic protease activating factor 1 – фактор, активирующий апоптотическую протеазу 1) в присутствии дАТФ с образованием апоптосомы, которая служит платформой для активации каспазы-9. В свою очередь, каспаза-9 активирует эффекторные каспазы-3 и -7. Активация данных эффекторных каспаз вызывает характерные для апоптоза морфологические и биохимические изменения, подготавливая клетку к последующему фагоцитозу [97].

Активация каспаз может быть заблокирована ингибитором апоптоза семейства IAP – белком xIAP (X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein – ассоциированный с X-хромосомой ингибитор апоптотических белков), который, в свою очередь, ингибируется высвобождаемыми из митохондрий белками SMAC/Diablo и HtrA2/Omi [99].

Кроме этого, клетка может погибнуть по каспазо-независимому внутреннему пути апоптоза, который осуществляется с помощью белка AIF. В физиологических условиях этот белок локализуется в межмембранном пространстве митохондрий. Однако, как сказано выше, стимуляция апоптоза приводит к высвобождению AIF из митохондрий в цитоплазму, и далее к перемещению в ядро. В ядре данный белок связывается с ДНК посредством электростатических взаимодействий, способствуя конденсации хроматина и деградации ДНК, что приводит к гибели клетки. Сам AIF не обладает какой-либо очевидной нуклеазной активностью, он, в основном, функционирует для привлечения и модуляции активности эндонуклеазы, которая непосредственно расщепляет ДНК [106].

Таким образом, ключевыми регуляторами внутреннего пути апоптоза являются каспазы и белки семейства Bcl-2. В связи с тем, что инициация апоптоза опосредуется балансом про- и антиапоптотических белков семейства Bcl-2, становится понятным, что развитие и прогрессирование опухолей в значительной степени зависят от их взаимодействий друг с другом. Ингибирование взаимодействий белков данного семейства между собой может достигаться с помощью ВНЗ-миметиков, соединений, специфически связывающихся с гидрофобной канавкой антиапоптотических белков Bcl-2 и, таким образом, функционально напоминающих ВНЗ-only белки, что ведет к блокировке антиапоптотической функции белков семейства Bcl-2 и, соответственно, запуску апоптоза.

Первым созданным ВНЗ-миметиком был АВТ-737, который способен связываться с Bcl-2, Bcl-xL и Bcl-w, но не может ингибировать Mcl-1.

Появление АВТ-737 сопровождалось разработкой следующего ВНЗ-миметика – АВТ-263/навитоклакс, который демонстрировал аналогичный профиль связывания с антиапоптотическими белками, но более благоприятную фармакокинетику. Навитоклакс был первым ВНЗ-миметиком, успешно прошедшим клинические испытания на гематологических злокачественных новообразованиях и солидных опухолях. Однако токсическое действие навитоклакса на зрелые тромбоциты привело к разработке другого более безопасного ВНЗ-миметика – АВТ-199/венитоклакс, который показал хорошие результаты в клинических испытаниях, что привело к его быстрому одобрению FDA для лечения лейкозов [107]. Клетки солидных опухолей, в целом, обладают более низкой восприимчивостью к индукции апоптоза ВНЗ-миметиками по сравнению с гемопоэтическими клетками [108]. Для усиления терапевтического действия ВНЗ-миметиков было предложено их комбинирование с химиотерапевтическими препаратами. Комбинированная терапия направлена на то, чтобы вызвать проапоптотический сигнал, который затем усиливается дополнительным ингибированием антиапоптотических белков семейства Bcl-2 с помощью ВНЗ-миметиков. Например, комбинация навитоклакса с ДНК-повреждающими агентами, а также с антимитотическими препаратами в различных солидных опухолевых клетках *in vitro* и *in vivo*, приводила к снижению Mcl-1 и/или повышению Bim, уменьшая выживаемость клеток и замедляя рост опухоли. Аналогичным образом навитоклакс эффективно усиливал реакцию клеток НМРЛ на таксаны [107].

1.3.1.2. Внешний путь апоптоза

Внешний путь апоптоза запускается рецепторами смерти, которые расположены на плазматической мембране и активируются при связывании с соответствующими лигандами.

Рецепторы смерти являются членами суперсемейства генов рецепторов фактора некроза опухоли (TNF – tumor necrosis factor), которые имеют сходные внеклеточные домены, богатые цистеином, а также

цитоплазматический домен, состоящий примерно из 80 аминокислот, называемый доменом смерти, играющим решающую роль в передаче сигналов с поверхности клетки на внутриклеточные пути. На сегодняшний день наиболее охарактеризованными лигандами и соответствующими рецепторами смерти являются пары FasL и FasR, TNF- α и TNFR1, TRAIL (Apo2L) и два его рецептора – TRAILR1 (DR4) и TRAILR2 (DR5) [109].

Последовательность событий во внешнем пути апоптоза лучше всего описана на моделях FasL и FasR, а также TNF- α и TNFR1. Рецепторы смерти расположены на поверхности клетки в виде гомотримеров, связывание с лигандами приводит к конформационным изменениям их внутриклеточных участков, что позволяет доменам смерти рекрутировать адаптерные белки. Так, связывание Fas лиганда с соответствующим рецептором приводит к привлечению адаптерного белка FADD (Fas associated via death domain – Fas-ассоциированный белок, содержащий домен смерти). В то время как, связывание лиганда TNF- α с соответствующим рецептором – к рекрутированию адаптерного белка TRADD (TNFR1-associated death domain protein – белок домена смерти, ассоциированный с TNF рецептором), а затем FADD и RIP1 (receptor-interacting protein 1 – взаимодействующая с рецептором протеинкиназа). В последствии FADD связывается с прокаспазой-8 посредством димеризации эффекторного домена смерти. В этот момент образуется комплекс DISC (death-inducing signaling complex – сигнальный комплекс, индуцирующий клеточную гибель), приводящий к автокаталитической активации прокаспазы-8. Активированная каспаза-8 приводит к развитию апоптоза через расщепление эффекторных каспаз-3 и -7, запускающих, как и в случае внутреннего пути апоптоза, фазу деградации клетки [109]. Помимо регуляции эффекторных каспаз, активированная каспаза-8 может также расщеплять Bid до его усеченной формы tBid [110]. Таким образом, каспазы-3, -7 и Bid являются связующими звеньями внешнего и внутреннего путей апоптоза.

Внешний путь апоптоза может быть ингибирован белком с-FLIP, который способен связываться с FADD и каспазой-8, предотвращая их активацию [111]. Другим потенциальным регулятором внешнего пути апоптоза является белок Toso, блокирующий Fas-индуцированный апоптоз в Т-клетках посредством ингибирования процессинга каспазы-8 [112].

По сравнению с внутренним путем апоптоза, который может быть простимулирован широким спектром химиотерапевтических препаратов (цисплатин, доксорубицин, паклитаксел и т.д.), а также ВНЗ-миметиками, инициация внешнего пути апоптоза представляется затруднительной в клинической практике. Попытки запустить внешний путь апоптоза предпринимались с помощью агонистов проапоптотических рецепторов PARA (proapoptotic receptor agonists – агонисты проапоптотических рецепторов). Многообещающая эффективность PARA на доклинических моделях рака стала основанием для тестирования этих агентов в клинике. Было проведено около 30 клинических испытаний первой и второй фаз для оценки PARA при различных видах рака, включая НМРЛ. Важно отметить, что в отличие от агонистов к рецептору лиганда FasL – Fas, агонисты к рецепторам лиганда TRAIL (Apo2L) – TRAILR1 (DR4) и TRAILR2 (DR5), переносились относительно хорошо. Однако эти препараты не показали значительной эффективности ни в качестве монотерапии, ни в комбинации с обычной химиотерапией [113]. Отсутствие положительных эффектов агонистов рецепторов смерти может быть связано с их низкой стабильностью и растворимостью, а также с развитием резистентности опухолевых клеток.

1.3.2. Некроптоз

Некроптоз – форма некротической ПГК, регуляторами которой являются белки RIP3 и его субстрат – MLKL (mixed lineage kinase domain-like – киназный домен смешанной линии, подобный псевдокиназе). Кроме этого, в некроптозе, как и во внешнем пути апоптоза, участвует киназа RIP1. Как и в случае апоптоза, некроптоз может быть вызван внешним и внутренним

путями. Внешний путь вовлекает такие рецепторы, как FasR, TNFR, TRAILR и Toll-подобные. Внутренний путь инициируется метаболическим и генотоксическим стрессами [114]. Таким образом, стимулы, вызывающие некроптоз, схожи с апоптогенными. Важным условием для переключения с апоптоза на некроптоз является ингибирование каспаз. Инактивация каспаз достигается либо химическим способом с помощью определенных ингибиторов, либо патологическими факторами, например, инфекциями. Некроптоз рассматривается в качестве защитного механизма от внутриклеточных патогенов, когда активация апоптоза невозможна, в том числе и по причине ингибирования каспаз под влиянием инфекционных агентов [115]. Морфологически некроптоз характеризуется набуханием клеток с последующим разрывом плазматической мембраны.

Некроптоз, опосредованный TNF α , является наиболее изученным. TNF α связывается с комплементарным рецептором, приводя к образованию короткоживущего мембранного сигнального комплекса (известного как комплекс I), содержащего TRADD, FADD, RIP1, TRAF2/5 (TNF receptor associated factor 2/5 – фактор 2/5, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей) и cIAP1/2 (cellular IAP 1/2 – клеточный ингибитор апоптотических белков). TRADD рекрутирует RIP1 к TNFR1, затем в комплекс I входят cIAP и TRAF2/3/5. Активация cIAP1/2 и TRAF2/5 опосредует убиквитинирование RIP1, что ведет к его взаимодействию с MAPK киназами (TAK1, TAB2/3), которые вместе активируют NF- κ B путь. Данный транскрипционный фактор способствует выживанию клетки за счет повышения экспрессии антиапоптотических генов [116].

Таким образом, комплекс I является важнейшей контрольной точкой для выживания клеток и некроптоза. Переключение с апоптоза на некроптоз достигается через ингибирование каспазы-8 с помощью c-FLIP. Инактивация каспазы-8 ведет к невозможности расщепления RIP1 и RIP3, что приводит к формированию комплекса II. В комплексе II, RIP1 и RIP3 ауто- и транс-

фосфорилируются, стимулируя образование некрсомы, которая далее инициирует передачу сигналов, запускающих некроптоз. Хотя и RIP3, и RIP1 необходимы для индукции некроптоза, RIP3 сам по себе может вызывать некроптоз, в случае повышения его экспрессии. Активированная киназа RIP3 фосфорилирует псевдокиназу MLKL. Фосфорилированный MLKL образует олигомер и связывается с N-концами фосфоинозитолфосфатов плазматической мембраны, вызывая приток ионов Na^+ и Ca^{2+} через соответствующие ионные каналы, что ведет к повышению осмотического давления внутри клетки, и она погибает из-за нарушения целостности мембраны [115,116].

Следовательно, некроптоз – это альтернативный способ гибели клеток в случае ингибирования апоптоза. На данный момент имеются подходы для инициации данного типа ПГК. Низкомолекулярные SMAC-миметики могут нацелено ингибировать белки cIAP, индуцируя деубиквитинирование RIP1 в комплексе I, формирование комплекса II и запуск некроптоза. Эти агенты показали противоопухолевую активность в различных моделях клеточных линий солидных опухолей [117]. Поэтому некроптоз может рассматриваться как потенциальный способ модуляции гибели клеток апоптоз-резистентных опухолей.

1.3.3. Аутофагия

Аутофагия – это внутриклеточный программируемый процесс, участвующий в катаболической деградации поврежденных белков и органелл, а также в уничтожении клеточных патогенов. Первоначально аутофагия рассматривалась как механизм, способствующий выживанию клетки в условиях различных стрессов, включая голодание, гипоксию и ишемию. Однако, последующие исследования аутофагии выявили функции, способствующие гибели клетки. В настоящее время признано, что нарушения процесса аутофагии ведут к развитию ряда заболеваний [96]. Между различными типами ПГК имеется тесная связь, так, взаимодействие аутофагии

с апоптозом осуществляется через BH3 домен Bcl-2 и гидрофобный карман антиапоптотических белков семейства Bcl-2, включая сам Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w и Mcl-1 [118], связь аутофагии с некроптозом – через Atg5, опосредующий TRAIL-индуцированную активацию некрсомы [119], а также с помощью Bcl-2, который способен связываться с MLKL для предотвращения олигомеризации этого белка, ингибируя некроптоз [120].

Аутофагия подразделяется на несколько функциональных типов, а именно макроаутофагию, микроаутофагию и шаперон-зависимую аутофагию (рис. 4). Под аутофагией обычно подразумевается макроаутофагия, если не указано иное. Макроаутофагия представляет собой процесс, опосредованный аутофагосомами, которые способны поглощать большую часть цитоплазмы с ее клеточным содержимым, включая нерастворимые долгоживущие поврежденные белки и их агрегированные формы, а также органеллы и внутриклеточные патогены. Слияние аутофагосом с лизосомами приводит к образованию аутофаголизосом, в которых происходит катаболическая переработка содержимого лизосомальными ферментами. Макроаутофагия, в свою очередь, также подразделяется на подтипы, которые дифференцированы в зависимости от поглощения определенных внутриклеточных компартментов: митофагия нацелена на митохондрии, пексофагия – на пероксисомы, рибофагия – на рибосомы и так далее [121].

Во время микроаутофагии лизосомы разрушают неправильно свернутые белки без образования аутофагосом. Кроме этого, микроаутофагия может происходить опосредованно через эндосомы, которые поглощают целевые белки, а затем сливаются с лизосомой. Этот тип называется эндосомальной микроаутофагией. Микроаутофагия также подразделяется на подтипы в зависимости от механизма поглощения поврежденных белков лизосомой. Так называемый fission-type происходит через инвагинацию лизосомальной мембраны и захват цитоплазматической фракции. Тогда как fusion-type опосредуется рецепторами SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive

attachment protein receptors – растворимые белковые рецепторы прикрепления N-этилмалеимид-чувствительного фактора) с образованием фагофороподобных структур на мембране лизосомы, за которым следует поглощение целевых белков [122].

Кроме макро- и микроаутофагии, существует шаперон-опосредованная аутофагия. Данный тип регулируется белком теплового шока HSC70 (heat shock protein 70 – белок теплового шока 70), который импортирует белки с KFERQ-подобным мотивом в лизосому путем связывания с белком LAMP-2A (lysosomal-associated membrane protein 2A – ассоциированный с лизосомой мембранный белок типа 2A) [123].

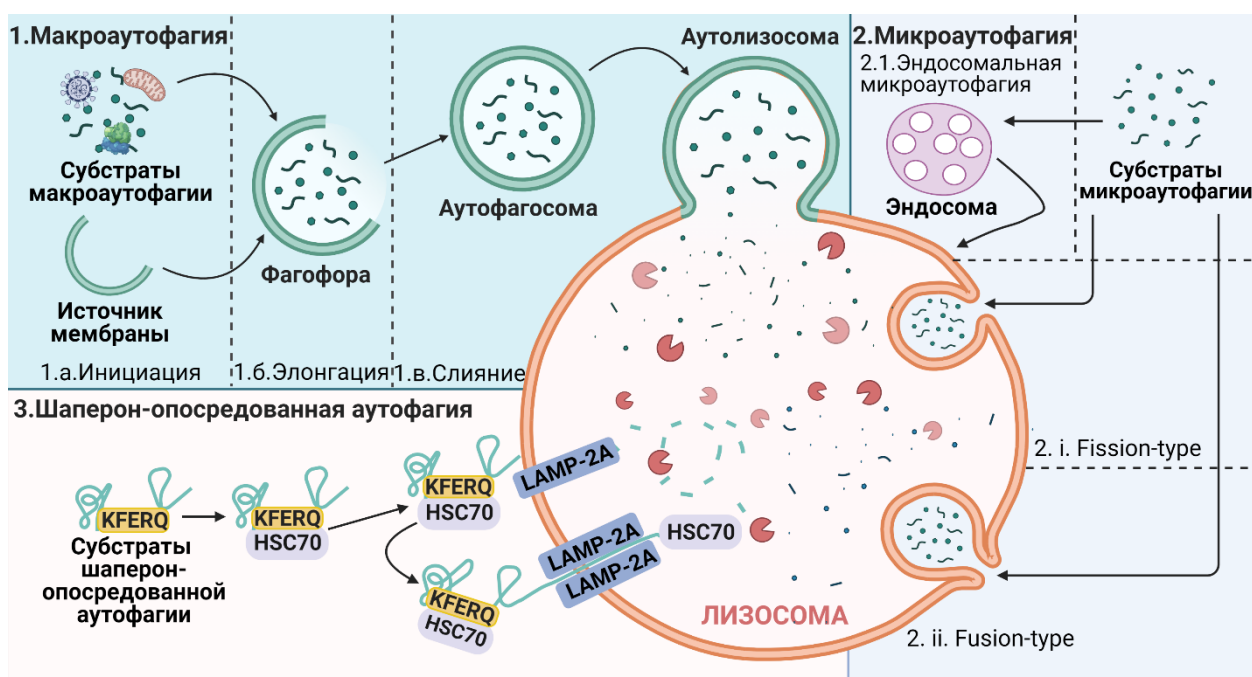


Рис. 4. Схемы макро-, микро- и шаперон-опосредованной аутофагии (модифицировано из [96]).

Благодаря своей клиренсной функции аутофагия опосредует клеточный гомеостаз, и ее нарушение связано с патогенезом различных заболеваний. В процессе канцерогенеза аутофагия играет противоречивую роль. С одной стороны, аутофагия способна подавлять рост опухоли путем устранения потенциально онкогенных полипептидов и поврежденных органелл. С другой стороны, аутофагия может способствовать росту опухоли за счет

рециркуляции метаболитов для стимулирования метаболизма и выживания раковых клеток. Предполагается также, что аутофагия способна функционировать как цитопротекторный механизм в ответ на противоопухолевые препараты.

В терапевтических целях подавление аутофагии может быть достигнуто с использованием лизосомальных ингибиторов и их производных, включая хлорокин и гидроксихлорокин. Однако угнетение аутофагии имеет ограничения, которые объясняются тем фактом, что аутофагия ответственна за удаление поврежденных клеточных компартментов, а выключение данного процесса ведет к накоплению токсических компонентов, вызывая воспаление и повреждение тканей [124]. Поэтому для устранения побочных эффектов и внедрения в клиническую практику ингибиторов аутофагии необходимы дальнейшие исследования этих препаратов.

1.3.3.1. Митофагия

Как сказано выше, митофагия представляет собой подтип аутофагии, который нацелен на элиминацию митохондрий. Запускается митофагия с распознавания повреждённых митохондрий. Ключевую роль в этом процессе играет серин-треониновая киназа PINK1, которая фосфорилирует и активирует лигазу Parkin. Активированный Parkin способствует полиубиквитинилированию ряда митохондриальных белков, в том числе Mfn1 и Mfn2, приводя к сборке аутофагосомы вокруг поврежденной митохондрии и к дальнейшей ее утилизации [125]. Кроме того, митофагия может запускаться рецепторами митофагии – такими белками внешней митохондриальной мембраны, как BNIP3 и его гомологом – BNIP3L/NIX, а также FUNDC1, которые способны напрямую связываться с белком аутофагосомы LC3, стимулируя ее сборку вокруг митохондрии (рис. 5) [66].

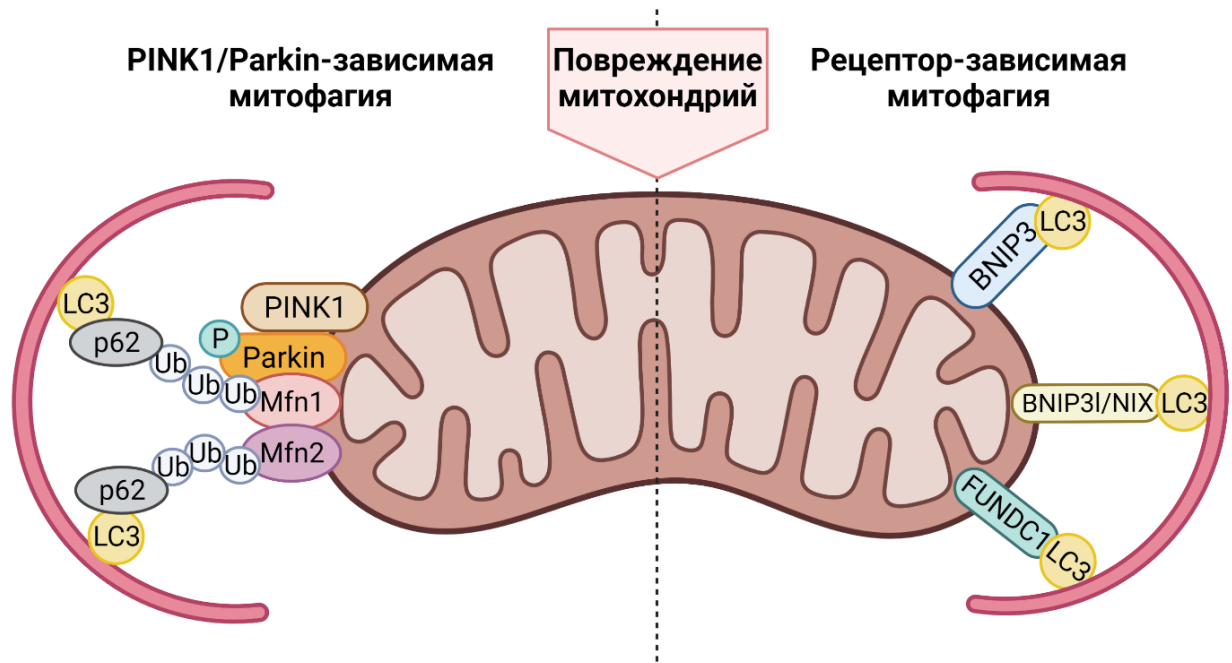


Рис. 5. Схематичное изображение PINK1/Parkin- и рецептор-зависимых путей митофагии (сделано с использованием Biorender).

Среди всех белков митофагии, таких как PINK1, Parkin, BNIP3, BNIP3/NIX и FUNDC1, на данный момент четко установлены роль лигазы Parkin, подавление которой ассоциировано с развитием различных типов рака [126], и значение белка внешней митохондриальной мембраны FUNDC1, экспрессия гена которого увеличивается при раке шейки матки, молочной железы и гортани [66]. Parkin регулирует протеасомную деградацию циклина Е и циклина D1, которые контролируют клеточный цикл. Потеря Parkin приводит к увеличению экспрессии вышеперечисленных циклинов и усилению пролиферации опухолевых клеток [127]. FUNDC1, стимулируя выход Ca^{2+} из ЭПР в цитозоль, активирует Ca^{2+} -зависимый ядерный фактор активированных Т-клеток NFATC1, который, в свою очередь, запускает транскрипцию онкогена Bmi1, что ведет к развитию и прогрессированию опухолей [128]. Изучение остальных белков митофагии в процессах канцерогенеза активно проводится, но их уровень в опухолях и роль в канцерогенезе до сих пор остаются не до конца выясненными, что может объясняться зависимостью от типа рака и факторов микроокружения опухоли.

Из описанного выше совершенно ясно, что митофагия обеспечивает необходимое клетке качественное функционирование данных органелл. Роль митохондрий в механизмах развития и прогрессирования злокачественных заболеваний несомненна. Опухолевые клетки приспосабливаются к постоянно меняющемуся микроокружению за счет изменений в работе митохондрий, которые участвуют в ответе на гипоксический и окислительный стресс, регулируя метаболизм и способствуя прогрессированию опухоли [129]. Таким образом, исследование роли митохондрий и регуляции митофагии в возникновении и развитии АКЛ является актуальной и важной задачей онкологии.

1.3.4. Взаимодействие различных путей ПГК

Апоптоз, некроптоз и аутофагия совместно регулируют судьбу опухолевых клеток. Апоптоз и некроптоз неизменно ведут к гибели клеток, в то время как аутофагия может играть двойственную роль, способствуя либо выживанию, либо элиминации опухолевых клеток. Кроме этого, некоторые белки, в частности, Beclin1 и Atg5, являются связующими звеньями между указанными типами ПГК. Поэтому нацеленная модуляция апоптоза, некроптоза и аутофагии может достигаться через таргетирование уникальных регуляторов данных путей. Изучение белков и сигнальных каскадов, контролирующих различные типы ПГК, является актуальной задачей современной онкологии. Разработка таргетных препаратов, запускающих определенный путь клеточной гибели, может помочь в преодолении приобретенной резистентности к одному из них.

1.4. BNIP3

BNIP3 представляет собой проапоптотический BH3-only белок семейства Bcl-2. Первоначально BNIP3 был описан как один из медиаторов индуцированного гипоксией апоптоза в кардиомиоцитах и нейронах. Помимо апоптоза, BNIP3 играет важную роль в процессах, оказывающих влияние на выживаемость клеток, а именно в аутофагии и митофагии. Действие BNIP3

тканеспецифично: он по-разному экспрессируется в нормальных и опухолевых клетках. Данный белок может оказывать влияние на метаболические пути, связанные с развитием и прогрессированием различных типов опухолей, в том числе рака легкого и, в частности, АКЛ [3]. Таким образом, BNIP3 может выступать в качестве потенциального связующего звена между гибелью и выживанием нормальных и злокачественных клеток. Изучение функций белка BNIP3 в канцерогенезе легких может также помочь в разработке новых терапевтических подходов.

1.4.1. Структура и регуляция гена *BNIP3*

Ген *BNIP3* расположен в локусе 10q26.3 и включает в себя шесть экзонов. Его размер составляет около 14 000 пар оснований. Промотор *BNIP3* имеет элементы HRE. В условиях гипоксии индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α – hypoxia-inducible factor 1 α) связывается с HRE и провоцирует активацию промотора *BNIP3*. Это приводит к повышению уровня мРНК *BNIP3* и накоплению соответствующего белка [130]. Дефектность белка-онкосупрессора Фон Гиппеля-Линдау (например, в клеточной линии почечной карциномы RCC4) приводит к конститутивной экспрессии HIF-1 α и последующей гиперэкспрессии *BNIP3* [131]. Кроме того, стабилизация HIF-1 α может достигаться в нормоксических условиях с помощью обработки CoCl_2 и дефероксамином, что также индуцирует экспрессию *BNIP3* [132].

Активность промотора *BNIP3* может быть подавлена метилированием и деацетилизацией гистонов. Эти изменения происходят при различных типах рака и могут играть решающую роль в их развитии. Так, промотор *BNIP3* метилируется при колоректальной карциноме [133], аденокарциноме поджелудочной железы [134] и нескольких типах гемопоэтических злокачественных новообразований [135], а возобновление экспрессии *BNIP3* с помощью ингибитора метилтрансферазы способствует гибели клеток, индуцируемой гипоксией. Экспрессия *BNIP3* подавляется деацетилизацией гистонов при карциноме почек [136] и гемопоэтических раках [135].

Ингибирование деацетилирования гистонов также приводило к восстановлению экспрессии *BNIP3* и последующей гибели клеток. Пониженный уровень *BNIP3* может привести к устойчивости к клеточной гибели и, таким образом, стимулировать выживаемость опухолевых клеток.

1.4.2. Структура и регуляция белка BNIP3

Белок BNIP3 состоит из 194 аминокислот и имеет молекулярную массу 21.5 кДа. BNIP3 представлен в клетке как мономер и гомодимер. Данный белок включает в себя четыре основных домена (рис. 6).

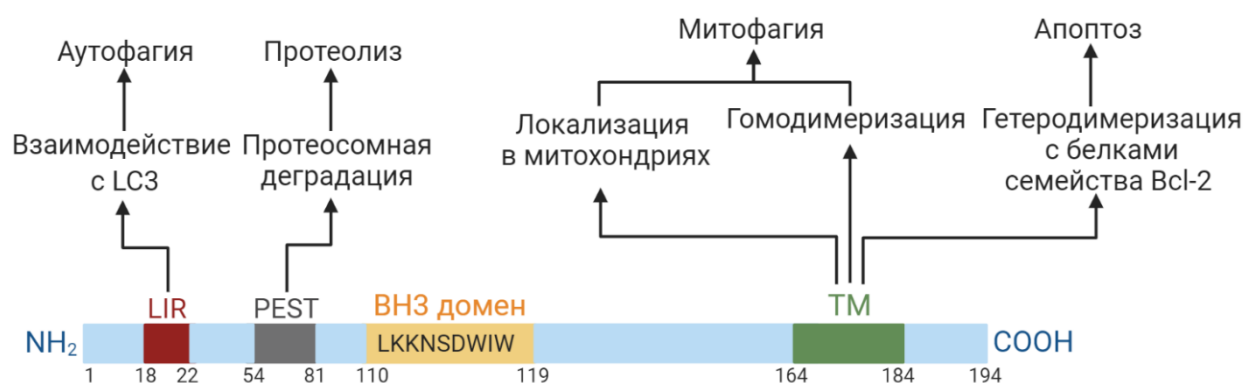


Рис. 6. Структура белка BNIP3 (модифицировано из [3]).

N-концевой домен содержит LC3-взаимодействующий (LIR – LC3-interacting region) мотив, который обеспечивает взаимодействие BNIP3 с LC3, закрепленного в мембране фагофора. Гомодимеризация BNIP3 способствует этому взаимодействию. LIR-мотив опосредует функцию BNIP3 в качестве рецептора аутофагии [137]. N-концевая область также содержит PEST-последовательности, которые окружены аминокислотными остатками гистидина и аргинина/лизина и ответственны за деградацию BNIP3 протеасомами [138].

Вторым доменом является ВНЗ-домен. Как правило, ВНЗ-домен проапоптотических белков семейства Bcl-2 опосредует их гетеродимеризацию с антиапоптотическими членами данного семейства. Однако у BNIP3 его ВНЗ-домен является нетипичным: он содержит остаток триптофана вместо остатка

аспарагиновой или глутаминовой кислоты по сравнению с другими BH3-only белками. Возможно, остаток триптофана может снижать селективность во взаимодействиях с антиапоптотическими белками Bcl-2, что влияет на проапоптотическую функцию BNIP3 [139]. Исследования апоптотической функции BH3-домена на различных клеточных линиях демонстрируют противоречивые результаты [140–142]. Таким образом, роль BH3-домена в функционировании BNIP3 является спорной. Более того, проапоптотическое действие BNIP3 является слабым по сравнению с другими BH3-only белками.

С-конец BNIP3 содержит трансмембранный (TM) домен, который отвечает за локализацию BNIP3 в митохондриях, а также обеспечивает его гомодимеризацию. Кроме этого, этот домен необходим для функционирования BNIP3 в качестве регулятора клеточной гибели [143]. BNIP3, лишенный TM домена, не способен локализоваться в митохондриях, гомодимеризоваться и вызывать апоптоз. Делеция С-концевого TM домена также приводит к невозможности гетеродимеризации BNIP3 с антиапоптотическими белками семейства Bcl-2, что снижает проапоптотическую активность BNIP3 [140,144]. Фосфорилирование этого домена киназами, например, протеинкиназой А, может ингибировать действие BNIP3, способствующее митофагии и гибели клетки [145]. Однако, предотвращение гомодимеризации не ингибирует апоптотическую функцию BNIP3, в случае если он все так же локализован в митохондриях [141,146]. Следовательно, только субклеточная локализация, но не гомодимеризация, необходима для BNIP3-зависимого апоптоза. Напротив, BNIP3-зависимая аутофагия определяется как локализацией, так и гомодимеризацией. Мутации в белке BNIP3, лишаящие его митохондриальной локализации и приводящие к нарушенной гомодимеризации, ассоциированы с неспособностью индуцировать митофагию с помощью данного белка. BNIP3 также может быть локализован на мембране ЭПР, где он индуцирует ЭПР-фагию (аутофагическое удаление ЭПР) [137]. Следовательно, не только

митохондриальная, но и ЭПР-локализация BNIP3 имеет решающее значение для его функционирования.

1.4.3. Роль BNIP3 в раке легкого

Основываясь на базе данных Human Protein Atlas, экспрессия BNIP3 повышена примерно у 80% пациентов с раком легких [147]. Кроме этого, оверэкспрессия BNIP3 обнаруживается у 70% пациентов с некоторыми подтипами рака легких, такими как АКЛ и плоскоклеточная карцинома. Несколько исследовательских групп также показали увеличение экспрессии BNIP3 в опухолевых тканях примерно у 57% пациентов с НМРЛ [148,149]. Несмотря на высокую частоту оверэкспрессии BNIP3 в образцах опухоли, его наличие не коррелирует с уровнем 5-летней выживаемости у пациентов с различными стадиями рака легких и его подтипами, включая АКЛ и плоскоклеточную карциному [147]. Однако в когорте пациентов только с ранними стадиями НМРЛ высокая экспрессия BNIP3 связана с плохим прогнозом выживаемости [148,150]. Противоречия в прогностической роли BNIP3 на разных стадиях рака легких могут быть объяснены неоднозначным действием аутофагии и митофагии, в том числе регулируемых BNIP3. Не исключено, что BNIP3-зависимые аутофагия и митофагия, в большей степени, стимулируют выживаемость клеток рака легких на ранних стадиях, что потенциально приводит к формированию более агрессивного фенотипа. На более поздних стадиях рака легких образуются изолированные популяции клеток, в которых аутофагия и митофагия функционируют одновременно как факторы повышения выживаемости и гибели клеток, тем самым нивелируя прогностическую роль BNIP3. Стоит отметить, что в образцах подгруппы пациентов с НМРЛ была обнаружена исключительно ядерная локализация BNIP3 [149,150]. Такая локализация BNIP3 может исключить его вклад в регуляцию митохондриально-зависимой гибели клеток, провоцируя прогрессирование рака. Было показано, что наличие BNIP3 в ядре связано с плохим прогнозом выживаемости при НМРЛ на ранних стадиях [149,150].

Однако исследование с участием когорты пациентов с различными стадиями рака не подтвердило негативную прогностическую роль ядерно-локализованного BNIP3 у пациентов с НМРЛ [149]. Противоречивые результаты могут быть объяснены небольшим количеством пациентов с раком легких с исключительно ядерной локализацией BNIP3, что снижает возможность достоверных выводов. Кроме того, механизм транслокации BNIP3 в ядро до сих пор не определен, что ограничивает способность делать однозначные выводы о прогностической роли ядерного BNIP3.

BNIP3 был включен в группу биомаркеров для прогнозирования выживаемости у пациентов с АКЛ и плоскоклеточной карциномой легких наряду с другими пятью генами, связанных с аутофагией, такими как *EIF4EBP1*, *TP63*, *ATIC*, *ERO1A* и *FADD*. Мета-анализ экспрессии генов из различных баз данных выявил эту группу генов в качестве эффекторов развития и прогноза выживаемости у пациентов с НМРЛ на разных стадиях [151]. Идентификация этого генетического паттерна, связанного с аутофагией, предоставляет клиницистам бесценную возможность определить уровень риска среди пациентов с АКЛ и плоскоклеточной карциномой легких и применить эти знания для разработки таргетной терапии.

Аутофагия может вызываться гипоксией, которая, в свою очередь, увеличивает экспрессию *BNIP3* [152]. Таким образом, BNIP3 является связующим звеном между гипоксией и аутофагией. Действительно, синхронное увеличение уровней BNIP3 и HIF-1 α наблюдается в клинических образцах пациентов с НМРЛ [150]. Эти данные *in vivo* коррелируют с результатами, полученными на клеточных линиях НМРЛ и МРЛ, где гипоксия приводила к повышению уровня BNIP3, опосредованного накоплением HIF-1,2 α [153–155]. Более того, индуцированный гипоксией HIF-1 α стимулирует BNIP3-зависимую аутофагию в клетках НМРЛ [153]. Активация HIF-1 α , вызванная 4-О-метиласкохлорином (MAC – 4-O-methylascochlorin), без стимуляции гипоксии, также способствует гиперэкспрессии BNIP3. В

лейкозных клетках МАС усиливал апоптотическую гибель; однако в клеточных линиях НМРЛ МАС активировал аутофагию и незначительно снижал выживаемость клеток [156]. Использование МАС на разных клеточных линиях показывает двойственную связь между гибелью клеток и BNIP3-зависимой аутофагией.

Ингибирование аутофагии, в том числе опосредованной BNIP3, является многообещающим инструментом для повышения чувствительности к гибели клеток за счет исключения аутофагических эффектов, способствующих выживанию. Как упоминалось в разделе 1.2.1., развитие рака легкого связано с мутациями в гене *EGFR*. Эти факты привели к созданию экспериментальной комбинации, включающей ингибиторы тирозинкиназы EGFR (лапатиниб) и АТФазы вакуольного типа (ВАТФазы), включая ингибиторы аутофагии (бафиломицин А1 и конканамицин А). Комбинация этих агентов приводила к усилению клеточной гибели за счет подавления HIF-1 α и BNIP3 в клетках НМРЛ [157]. Антиметаболит пиримидина, гемцитабин, был одобрен FDA для лечения рака; однако его длительное применение вызывает резистентность к гибели клеток. Гемцитабин вызывает аутофагию, связанную с BNIP3, и приводит к снижению гибели клеток рака легких, что может способствовать приобретению резистентности к гемцитабину [158]. В клетках рака мочевого пузыря подавление регулируемой BNIP3 аутофагии повышает апоптоз, индуцированный гемцитабином, и улучшает эффективность данного препарата [159]. Возможно, комбинация гемцитабина и ингибиторов аутофагии может помочь в преодолении резистентности к гемцитабину в клетках рака легких. Помимо лекарственной чувствительности и резистентности, аутофагия и BNIP3 влияют на реакцию к лечению ионизирующим излучением. Ингибитор аутофагии, Lys05 (димерная форма хлорокина), снижал экспрессию гена *BNIP3* и аутофагию, что повышало радиочувствительность клеток НМРЛ [160]. Разработка химических агентов для таргетирования BNIP3 может стать перспективной стратегией

преодоления радиорезистентности, приобретенной во время терапии неоперабельных опухолей. В дополнение к аутофагии, BNIP3 участвует в цисплатин-индуцированной гибели клеток, включая апоптоз [154,161]. Обработка цисплатином повышает уровень белка BNIP3; однако, его комбинация с гипоксией снижает BNIP3 в клеточных линиях рака легкого. Обработка цисплатином в условиях гипоксии стимулировала аутофагию и снижала гибель клеток. Таким образом, комбинация цисплатина и гипоксии приводит к повышению выживаемости клеток за счет включения BNIP3-независимой аутофагии [154].

Ингибитор гистондеацетилаз – панобиностат, LBH589, является многообещающим средством для терапии рака легких за счет нарушения деацетилирования гистонов и последующего ослабления транскрипции генов, особенно онкогенов. Комбинация LBH589 и цисплатина стимулирует внедрение BNIP3 в митохондриальную мембрану, что, в конечном итоге, способствует образованию АФК и снижению потенциала мембраны митохондрий, приводя к апоптотической гибели клеток рака легких [161]. Молекулярный дизайн лекарств для стимуляции встраивания ТМ домена BNIP3 в митохондрии может стать эффективным инструментом для повышения чувствительности к апоптозу.

Участие BNIP3 в аутофагии и контроле качества митохондрий позволяет ему способствовать таким энергозатратным процессам, как эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и метастазирование. BNIP3 активируется транскрипционным фактором, регулирующим клеточный цикл, и онкосупрессором p53. Совместная гиперэкспрессия p53 и BNIP3 приводит к усилению апоптоза в клеточных линиях рака легкого с высокой степенью метастазирования по сравнению с клетками с низким уровнем этого процесса. Предполагается, что повышенный апоптоз в клетках с большей подвижностью обусловлен способностью BNIP3 стимулировать гибель у клеток с поврежденными митохондриями. Исключение слабых клеток из популяции с

высокой метастатической способностью приводит к приобретению еще более агрессивного фенотипа опухоли [162]. Следовательно, BNIP3 может выступать в качестве связующего звена между гибелью клеток рака легкого и их распространением.

BNIP3 также регулируется рецептором арильных углеводов (AhR – aryl hydrocarbon receptor), связанным с аутофагией и метаболизмом ксенобиотиков, в том числе полициклических ароматических углеводов, из сигаретного дыма. Помимо этих функций, AhR оказывает влияние на миграцию и распространение клеток, но его влияние различно и зависит от типа опухолевых клеток [163]. Было продемонстрировано, что AhR усиливает убиквитинирование BNIP3 для его последующей деградации протеасомами, что приводит к подавлению аутофагии и снижению ЭМП клеток НМРЛ *in vivo* и *in vitro* [164]. Следовательно, BNIP3 может также быть связующим звеном между метаболизмом экзогенных соединений и ЭМП клеток рака легкого.

В дополнение к AhR, BNIP3 контролируется белком планарной клеточной полярности (FUZ – fuzzy homolog) в клеточных линиях НМРЛ. Нокдаун FUZ снижал уровень белка BNIP3, но не влиял на уровень мРНК BNIP3, что исключает роль FUZ как фактора, влияющего на экспрессию гена *BNIP3*. BNIP3 и FUZ совместно локализованы и взаимодействуют друг с другом, сохраняя обоюдную стабильность. FUZ стимулирует ЭМП и способствует пролиферации клеточных линий рака легкого. Более того, FUZ связан с плохим прогнозом у пациентов с НМРЛ [165].

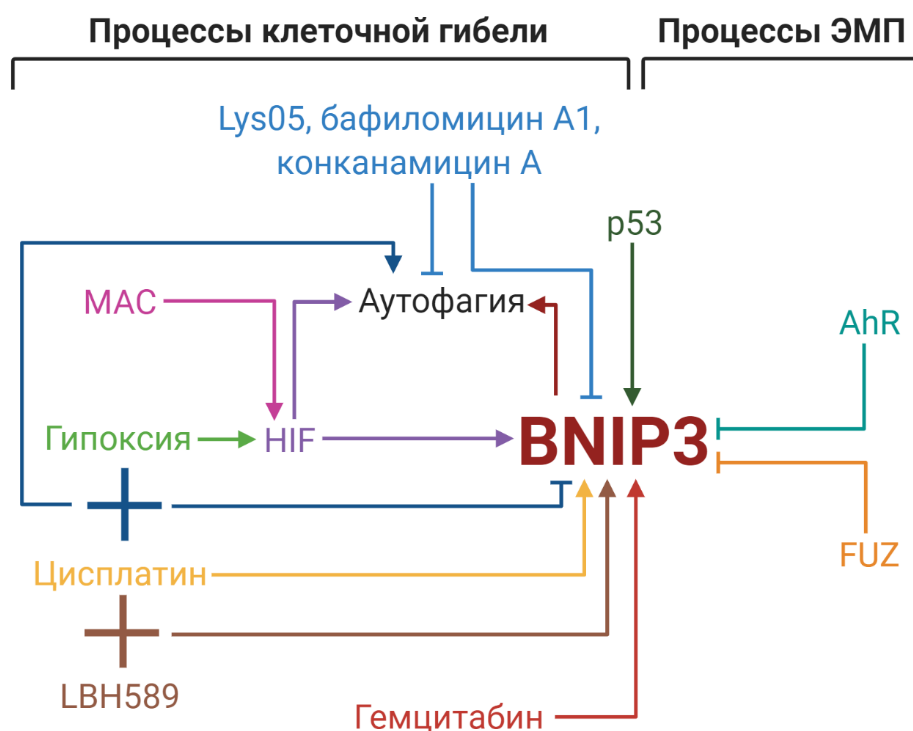


Рис. 7. Влияние BNIP3 на процессы клеточной гибели и ЭМП при раке легкого (модифицировано из [3]).

Таким образом, BNIP3 участвует в процессах аутофагии, апоптоза и ЭМП при раке легкого (рис. 7). BNIP3 был установлен как один из прогностических факторов в группе биомаркеров, связанных с аутофагией, для АКЛ. Этот факт позволяет предположить, что BNIP3 заслуживает дополнительного изучения в качестве прогностического маркера вне группы в данном типе рака легкого. BNIP3-зависимая аутофагия влияет на чувствительность и резистентность клеток к гибели; поэтому, нацеливание на этот тип гибели является многообещающим подходом в терапии рака. Ассоциация BNIP3 с белками, связанными с ЭМП, позволяет ему влиять на распространение и метастазирование раковых клеток. Так, принимая во внимание все вышеупомянутые функции BNIP3, имеет смысл провести гораздо более глубокие исследования роли этого белка в раке легкого и АКЛ, в частности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Рабочие растворы

В процессе работы использовали следующие растворы:

- 1) RIPA-буфер (25 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 150 мМ NaCl, 1мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), 0.1%-ный додецилсульфат натрия, 0.5%-ный дезоксихолат натрия, 1% Тритон X100, коктейль ингибиторов протеаз cOmplete);
- 2) 5X Лэммли буфер (250 мМ Трис-НСl (рН 6.8), 10%-ный додецилсульфат натрия, 50%-ный глицерин, 0.01%-ный бромфеноловый синий);
- 3) Раствор для приготовления одного (5 мл) 12%-ного разделяющего полиакриламидного геля (ПААГ) (1.4 мл H₂O, 1.25 мл Трис-НСl (1.5 М, рН 8.8), 1.4 мл 40%-ного раствора акриламида, 0.8 мл 2%-ного раствора бис-акриламида, 50 мкл 10%-ного додецилсульфата натрия, 2.5 мкл тетраметилэтилендиамина (ТЕМЕД) и 25 мкл 10%-ного персульфата аммония (ПСА));
- 4) Раствор для приготовления одного (2.5 мл) 4%-ного концентрирующего ПААГ (1.78 мл H₂O, 210 мкл Трис-НСl (500 мМ, рН 6.8), 240 мкл 40%-ного раствора акриламида, 130 мкл 2%-ного раствора бис-акриламида, 25 мкл 10%-ного додецилсульфата натрия, 2.5 мкл ТЕМЕД и 12.5 мкл 10%-ного ПСА);
- 5) Буфер для денатурирующего электрофореза белков по Лэммли (25 мМ Трис-НСl, 250 мМ глицин, 0,1%-ный додецилсульфат натрия);
- 6) Буфер для переноса белков с ПААГ на мембрану (25 мМ Трис-НСl, 192 мМ глицин, 20%-ный этанол);
- 7) Раствор Ponceau S (0.1% Ponceau S, 5%-ная ледяная уксусная кислота);
- 8) Буфер TBST (20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 0.05%-ный Твин 20, рН 7.4);
- 9) Буфер для разведения первичных антител (TBST, 2.5%-ный бычий сывороточный альбумин, 0.02%-ный азид натрия);

- 10) Буфер для измерения активности каспазы-3 (100 мМ ХЕПЕС, 10%-ная сахараза, 0,1%-ный CHAPS, 5 мМ дитиотрейтол (ДТТ), 0,001%-ный NP40, флуоресцентный субстрат (40 мкМ DEVD AMC));
- 11) Буфер для фракционирования клеток (150 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 5 мМ Трис-HCl, 0.5 мМ этиленгликольдиаминтетрауксусная кислота (ЭГТА), 0.01%-ный дигитонин, pH 7.5);
- 12) TEAB-буфер (5% додецилсульфата натрия, 50 мМ TEAB);
- 13) S-Trap буфер (9 частей 96%-ного этанола и 1 часть 1М TEAB).

2.1.2. Химические реактивы

Информация о реактивах, использованных в рамках исследования, приведена в Таблице 1.

Таблица 1. Реактивы, использованные в исследовании.

Название реактива	Производитель
Цисплатин	Тева
Тролокс	Roche
MitoSOX Red	Invitrogen
Пропидий йодид	Molecular Probes
Коктейль ингибиторов протеаз cOmplete	Roche
40%-ный раствор акриламида	Bio-Rad
2%-ный раствор бис-акриламида	Bio-Rad
Тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД)	Хеликон
Трис-аминометан	Хеликон
Ponceau S	Sigma
Тритон X100	Хеликон
Бычий сывороточный альбумин	Boval BioSolutions
Твин 20	Хеликон
Додецилсульфата натрия	Хеликон
NaCl	Хеликон

Название реактива	Производитель
Этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА)	Хеликон
Этиленгликольтетрауксусная кислота (ЭГТА)	Amresco
Глицин	ПанЭко
Дигитонин	Sigma
KCl	Amresco
MgCl ₂	Хеликон
Дитиотрейтол (ДТТ)	Thermo Fisher Scientific
NP40	Хеликон
ХЕПЕС	AppliChem
CHAPS	Amresco
Сахароза	Amresco
Персульфат аммония (ПСА)	Amresco
Ледяная уксусная кислота	AppliChem
Глицерин	Хеликон
Бромфеноловый синий	ПанЭко
Азид натрия	Хеликон
Диметилсульфоксид (ДМСО)	Amresco
Обезжиренное молоко	AppliChem
DEVD AMC	Peptanova
Белковый маркер Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad
РНКаза А	Thermo Fisher Scientific
Глюкоза	Хеликон
Олигомицин	Sigma
Карбонилцианид-м-хлорфенилгидразон (КЦХФ)	Sigma
Ротенон	Sigma
Антимицин А	Sigma
TEAB	Sigma

Название реактива	Производитель
Бензоназа	Thermo Fisher Scientific
Йодацетамид	Sigma
Аммония бикарбонат	Sigma

2.1.3. Антитела

Информация об антителах, использованных в рамках исследования, приведена в Таблице 2.

Таблица 2. Антитела, использованные в работе.

Первичные антитела		
Целевой белок	Животное- продуцент	Каталожный номер, производитель
ГАФДГ	Кролик	5174, Cell Signaling Technology
Винкулин	Кролик	129002, Abcam
p89 ПАРП	Кролик	9541, Cell Signaling Technology
ПАРП	Кролик	7150, Santa Cruz Biotechnology
BNIP3	Кролик	44060, Cell Signaling Technology
Цитохром c	Кролик	11940, Cell Signaling Technology
BNIP3I/NIX	Кролик	8399, Abcam
PINK	Кролик	6946, Cell Signaling Technology
Parkin	Кролик	AB5112, Millipore
Parkin	Мышь	4211, Cell Signaling Technology
Drp1	Кролик	8570, Cell Signaling Technology
Mfn2	Кролик	124773, Abcam
GPX4	Кролик	125066, Abcam
Sirtuin 3	Кролик	2627, Cell Signaling Technology
Вторичные антитела		
Целевой белок		Каталожный номер, производитель

Мышиный IgG	ab205719, Abcam
Кроличий IgG	ab205718, Abcam
Мышиный IgG	7076, Cell Signaling Technology
Кроличий IgG	7074, Cell Signaling Technology

Разведения антител были выбраны в соответствии с рекомендациями производителей.

2.1.4. Плазмиды и малые интерферирующие РНК (миРНК)

Информация о плаزمидах и миРНК, использованных в рамках исследования, приведена в Таблице 3.

Таблица 3. Плазмиды и миРНК, использованные в работе.

Название	Каталожный номер, производитель
Плаزمида CRISPR/Cas9 KoBNIP3	400985, Santa Cruz Biotechnology
миРНК к BNIP3 антисмысловая цепь: 5'-CUCGGUUUCUAUUUAUAUTsT-3'; смысловая цепь: 5'-AUUAUAAAUAGAAACCGAG-3'	Предоставлены лабораторией проф. Т.С. Зацепина (МГУ имени М.В. Ломоносова)
Неспецифичная (контрольная) миРНК антисмысловая цепь: 5'-UCGAAGUACUCAGCGUAAGTsT-3'; смысловая цепь: 5'-CUUACGCUGAGUACUUCGATsT-3'.	

2.1.5. Коммерческие наборы

Информация о коммерческих наборах, использованных в рамках исследования, приведена в Таблице 4.

Таблица 4. Коммерческие наборы, используемые в работе.

Название	Производитель
Липофектамин RNAiMAX для трансфекции миРНК	Thermo Fisher Scientific

Название	Производитель
Липофектамин LTX для трансфекции плазмидами	Thermo Fisher Scientific
Набор для измерения концентрации белка BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific
Набор хемилюминесцентных субстратов для пероксидазы хрена Clarity Western ECL substrate	Bio-Rad
Набор для ПААГ TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit, 12%	Bio-Rad
Набор для тестирования на микоплазму MycoReport	Евроген

2.1.6. Клеточные линии

Информация о клеточных культурах, использованных в рамках исследования, приведена в Таблице 5.

Таблица 5. Клеточные линии, используемые в исследовании.

Название	Орган изъятия, патология
A549	АКЛ человека
H23	

Данные клеточные линии любезно предоставлены Отделением токсикологии Каролинского института (Стокгольм, Швеция).

2.1.7. Среды и растворы для работы с клеточными линиями

Информация о средах и растворах для работы с клеточными линиями, использованных в рамках исследования, приведена в Таблице 6.

Таблица 6. Информация о средах и растворах.

Название	Производитель
Среда RPMI 1640	Gibco
Раствор трипсина-ЭДТА	Gibco
Сыворотка эмбриональная телячья	Gibco

Название	Производитель
DPBS (натрий-фосфатный буфер в модификации Дульбекко)	ПанЭко
Раствор Версена	ПанЭко
Пируват натрия	ПанЭко
Глутамин	Gibco
Антибиотик/антимикотик: пенициллин (10.000 ед/мл), стрептомицин (10.000 мкг/мл), амфотерицин В (25 мкг/мл)	Gibco
Среда Seahorse XF	Делали самостоятельно (25 мМ глюкозы, 2 мМ глутамина и 1 мМ пирувата натрия; pH 7.4)

2.2. Методы

2.2.1. Культивирование клеточных линий

Клетки АКЛ человека линий A549 и H23 культивировали в стерильных условиях в среде RPMI 1640, содержащей 10%-ную эмбриональную телячью сыворотку, 1%-ный пируват натрия, смесь антибиотика/антимикотика – пенициллин (100 ед/мл), стрептомицин (100 мкг/мл), амфотерицин В (0.25 мкг/мл), в атмосфере 5%-ной CO₂ при температуре 37°C. Для пересадки клетки промывали раствором Версена, после чего к ним добавляли 0.15% раствора трипсина-ЭДТА. Концентрацию клеток определяли с помощью счетчика Beckman Z2 Coulter counter. Клеточные линии регулярно проверяли на наличие микоплазмы с помощью набора MycoReport.

2.2.2. Заморозка клеточных линий

Клетки снимали, как описано выше, далее открепленные клетки осаждали центрифугированием при 100 g 4 мин. После чего клеточный осадок ресуспендировали в среде для культивирования с добавлением 5%-ного

ДМСО и переносили в криопробирки, которые помещали в камеру для заморозки с изопропанолом на $-80^{\circ}\text{C} \sim 16$ часов, после чего переносили в сосуд Дьюара с жидким азотом.

2.2.3. Экспериментальные процедуры с клеточными линиями

По достижении клетками 70% конфлюентности убирали кондиционированную среду, далее промывали клетки раствором DPBS и добавляли к ним свежую среду с индуктором клеточной гибели – цисплатином.

2.2.4. Трансфекция клеточных линий

Для получения стабильной клеточной культуры с нокаутом по BNIP3, клетки линии A549 трансфицировали вектором CRISPR/Cas9 KoBNIP3 Plasmid при помощи липофектамина LTX. Далее проводили отбор GFP-флуоресцирующих клонов, содержащих вектор CRISPR/Cas9 KoBNIP3, на клеточном сортере FACS Aria III (BD) и осуществляли их дальнейшее культивирование.

Для получения клеточных линий с нокдауном по BNIP3, клетки A549 и H23 трансфицировали таргетной к мРНК BNIP3 – миРНК, при помощи липофектамина RNAiMAX. Качество нокаута и нокдауна по BNIP3 оценивали по результатам Вестерн блот анализа.

2.2.5. Сбор клинических образцов пациентов с АКЛ

Образцы тканей были собраны от 80 пациентов, проходивших хирургическое лечение АКЛ в Национальном медицинском исследовательском центре (НМИЦ) онкологии им. Н.Н. Блохина в период 1989-2018 годов. После хирургического удаления клинические образцы замораживали и хранили в жидком азоте. Диагнозы пациентов были подтверждены с помощью патологоанатомического исследования. Соответствующие нормальные (неопухолевые) ткани располагались как можно дальше от злокачественной опухоли и были гистологически подтверждены как нормальные эпителиальные клетки. Опухоли были охарактеризованы на основе TNM классификации 8-го издания

Международного союза по борьбе с раком [166]. Общая выживаемость (ОВ) определяли как интервал между операцией и смертью или между операцией и последним наблюдением у выживших пациентов.

Образцы были собраны в соответствии с принципами Комитета по этике НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (разрешение №04-04-08097). Данные пациентов анализировали анонимно.

2.2.6. Получение белковых фракций из тканей и клеточных культур

0.5 мл лизирующего RIPA буфера с протеазным коктейлем cOmplete добавляли в пробирки с образцами тканей, которые гомогенизировали с использованием пробирок с шариками BashingBead (Zymo Research) и гомогенизатора Precellys 24 (Bertin Technologies). После этого образцы инкубировали в течение 30 мин на льду с последующим центрифугированием (15 000 g, 30 мин, +4°C).

Клетки линий A549 и H23 снимали с поверхности культуральных чашек с помощью скребка и переносили в пробирки. Затем клетки осаждали (1000 g, 5 мин, +4°C), удаляли из пробирок надосадочную жидкость и промывали раствором DPBS, после чего вновь центрифугировали. Полученный осадок клеток лизировали RIPA буфером с протеазным коктейлем cOmplete.

Для расчета концентраций белка из образцов тканей и клеток использовали набор Pierce BCA. Далее белковые образцы смешивали с Лэммли буфером и инкубировали при 95°C в течение 5 мин.

2.2.7. Вестерн блот анализ

Разделение белков из клеток проводили с использованием ПААГ, сделанных самостоятельно по составу, который указан в разделе 2.1.1.

Разделение белков из образцов тканей пациентов осуществляли с использованием набора ПААГ FastCast TGX, преимущество которых заключается во флуоресцентном детектировании всего пула белков в гелях с помощью гель-документирующих систем без дополнительного окрашивания. Выбор данных гелей был аргументирован корректностью использования для денситометрического анализа белков из образцов пациентов с последующей

нормализацией именно на общий пул белка, а не на уровень стандартно-используемых маркеров загрузки, таких как ГАФДГ, винкулин, β -актин и т.д. Это объясняется варьированием уровня этих общепринятых маркеров в нормальной и опухолевой ткани одного пациента из-за различий в метаболическом/генетическом/протеомном профилях нормальных и злокачественных клеток.

Электрофоретическое разделение белков проводили в камере Bio-Rad с буфером для денатурирующего электрофореза белков по Лэммли. После разделения белки из ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) с помощью системы Trans-Blot (Bio-Rad) в соответствующем буфере.

Далее мембрану инкубировали в 5%-ном растворе обезжиренного молока, растворенного в TBST, для блокирования неспецифических сайтов связывания с антителами. После чего мембраны отмывали в TBST и инкубировали с первичными антителами. Затем мембраны отмывали в TBST и инкубировали с раствором вторичных антител в 2.5%-ном обезжиренном молоке. Далее мембрану вновь отмывали в TBST и сигнал детектировали с помощью ECL субстрата. Регистрация хемилюминесценции и анализ изображения проводили на приборе ChemiDoc (Bio-Rad).

2.2.8. Подготовка проб для масс-спектрометрии

Клетки лизировали в SDS-TEAB-буфере с добавлением бензоназы в течение 30 мин на льду. Далее образцы центрифугировали 5 мин при 16000 g. Для восстановления дисульфидных связей в образцы добавляли 5 мМ ДТТ на 100 мкл лизата и инкубировали 35 мин при +56°C. После в пробы вносили 14 мМ йодацетамид и инкубировали 30 мин в темном месте при комнатной температуре. Затем в образцы вновь добавляли 5 мМ ДТТ и инкубировали их 15 мин в темном месте при комнатной температуре. Далее на 100 мкл лизата вносили 5 мкл 12%-ной H_3PO_4 , добавляли 7 частей S-Trap буфера на 1 часть лизата, смесь наносили на колонку и откручивали при 4000 g 30-60 сек. Далее колонку промывали 3 раза 400 мкл S-Trap буфера. Для трипсинизации белков,

на колонку добавляли 125 мкл 50 мМ аммония бикарбоната, содержащего трипсин из расчета 1 часть трипсина на 25-100 частей белка. Затем колонки инкубировали 24 ± 6 часов во влажной камере при $+37^{\circ}\text{C}$. После чего пептиды элюировали 50 мМ раствором аммония бикарбоната, 0.2%-ным раствором муравьиной кислоты и 50% ацетонитрилом с 0.2%-ным содержанием муравьиной кислоты. Полученный пептидный элюат анализировали с помощью масс-спектрометра.

2.2.9. Измерение интенсивности митохондриального дыхания

По 12 000 клеток рассаживали на лунки 96-луночного планшета (Seahorse Bioscience) в стандартной среде RPMI 1640. По достижении 70%-ной конфлюентности клеток, кондиционированную среду удаляли и заменяли ее на среду Seahorse XF. Анализ скорости потребления кислорода (СПК) клетками в реальном времени проводили при помощи прибора Seahorse XF Extracellular Flux Analyzer. В процессе оценки дыхания к клеткам добавляли последовательно 1.25 мкМ олигомицина, 1.25 мкМ карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразона (КЦХФ) и 1.25 мкМ ротенона/антимидина А, что позволяло оценить исходную скорость дыхания, связанную с синтезом АТФ, протонную проводимость митохондриальной мембраны и резервную емкость дыхательной цепи, соответственно. Полученные данные нормализовали на общее содержание белка в каждой лунке.

2.2.10. Получение цитозольной и митохондриальной фракций белков

Собранные клетки ресуспендировали в буфере для фракционирования и инкубировали в нем 15 мин при комнатной температуре. Затем пробы центрифугировали при 15 000 g 10 мин, что позволяло отделить цитозольную фракцию (надосадочная жидкость) от митохондриальной (осадок). Анализ белков из данных фракций проводили с помощью Вестерн блоттинга.

2.2.11. Измерение уровня митохондриальных АФК

Продукцию митохондриальных АФК в клетках анализировали с использованием красителя MitoSOX Red, согласно инструкции

производителя. Сигнал оценивали с помощью проточного цитофлуориметра FACS Canto II (BD).

2.2.12. Оценка гибели клеток по размеру популяции SubG1

Собранные клетки ресуспендировали в DPBS, затем добавляли холодный 70%-ный этанол по капле при непрерывном перемешивании, после чего инкубировали не менее 1 часа при -20°C . Затем клетки центрифугировали, ресуспендировали в DPBS, добавляли к ним РНКазу А (100 мкг/мл) и пропиций йодид (50 мкг/мл), инкубировали 15 мин, после чего анализировали на проточном цитометре FACS Canto II (BD).

2.2.13. Измерение активности каспазы-3

Собранные клетки центрифугировали, полученный осадок ресуспендировали в 100 мкл DPBS и переносили по 25 мкл в 3 лунки 96-луночного планшета. В оставшихся 25 мкл измеряли концентрацию белка для последующей нормализации полученных значений активности каспазы-3. К суспензии клеток добавляли 75 мкл буфера, содержащего флуоресцентный субстрат (40 мкМ DEVD AMC) для измерения активности каспазы-3. Флуоресценцию измеряли с помощью прибора Varioskan Flash, длина волны испускания – 460 нм, длина волны поглощения – 380 нм. Измерения проводили в течение 30 мин с интервалом в 1 мин при 37°C .

2.2.14. Статистическая обработка данных

Денситометрический анализ результатов вестерн-блоттинга проводили с использованием программы ImageJ 4.1. Уровень белков в клинических образцах был нормализован на суммарный уровень белков в пробе на основании сигнала от TGX геля. Для дальнейшего анализа использовали соотношение $\log_2(\text{нормированный уровень белка в опухолевой ткани} / \text{нормированный уровень белка в неопухолевой ткани})$. Для оценки влияния изменения уровня белков контроля качества митохондрий и клинико-патологических признаков на выживаемость пациентов с АКЛ была создана модель пропорциональных рисков Кокса. Выбор ковариат для построения многомерной регрессионной модели Кокса осуществлялся с помощью

алгоритма пошагового включения. На основании регрессионной модели Кокса построена номограмма для прогнозирования 1, 3, 5-летней выживаемости пациентов. Прогностическая способность номограммы была оценена с использованием калибровочных кривых.

Эксперименты с клеточными линиями были выполнены в трех повторностях, результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение. Сравнение результатов проводили с использованием two-way ANOVA.

Для статистического анализа все данные были проверены на однородность дисперсии и нормальность с использованием тестов Левена и Шапиро-Уилка, соответственно. Для статистической обработки данных использовались программные пакеты – R.4.0.1 и GraphPad Prizm 7. Статистическая значимость была показана как $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$, $***p \leq 0.001$, ns (not significant) – >0.05 .

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Роль белков контроля качества митохондрий в прогрессировании АКЛ

3.1.1. Характеристика выборки пациентов с АКЛ

Для изучения роли белков контроля качества митохондрий и вклада фенотипических признаков в прогрессирование АКЛ, был собран клинический материал и истории болезней пациентов с данной патологией. В выборку вошли 80 пациентов, проходивших хирургическое лечение в НМИЦ онкологии им. Блохина при диагнозе АКЛ в 1989-2018 годах. Из-за стадирования опухолевых процессов различными изданиями TNM в течение указанного периода, для получения достоверных результатов диагностики пациентов были пересмотрены на основе их историй болезней в соответствии с классификацией TNM 8-го издания Международного союза по борьбе с раком. Встречаемость клинико-патологических признаков у 80 пациентов с АКЛ была статистически оценена и приведена в таблице 7. В ходе статистического анализа были объединены группы T1 с T2 и T3 с T4, а также стадии 1 со 2 и 3 с 4, что объясняется небольшим числом пациентов с начальными (T1 и 1 стадия) и терминальными (T4 и 4 стадия) стадиями опухолевых процессов. Как правило, на ранних стадиях АКЛ симптоматически не проявляется и тем самым число пациентов с данными фенотипическими признаками в выборке снижается. В свою очередь, пациенты с поздними стадиями АКЛ не всегда подвергаются хирургическому лечению, что также уменьшает вероятность попадания больных с этими признаками в исследование. Кроме этого, была объединена группа пациентов с метастазами в региональных лимфатических узлах (N1 с N2), что также может объясняться редкостью операций у пациентов с метастатическими процессами в ипсилатеральных медиастинальных или бифуркационных лимфоузлах (N2). В исследуемой выборке число мужчин (64%) значительно больше по сравнению с женщинами (36%), что коррелирует с общей тенденцией заболеваемости раком легкого и АКЛ, в частности. Всего 7.5%

пациентов исследуемой выборки имели первично-множественные злокачественные опухоли (ПМЗО), что соотносится с вероятностью возникновения данной патологии во всем мире (0.73-11.7% популяции) [167]. Таким образом, в рамках данного исследования выборка пациентов являлась гетерогенной и статистическое превалирование некоторых показателей над другими может объясняться известными тенденциями о возникновении АКЛ.

Таблица 7. Информация о клинико-патологических признаках 80 пациентов с АКЛ.

Признак	N = 80
Время слежения, месяцы (медиана, интерквартильные размахи)	56 (20, 94)
Статус выживаемости	
Жив	30 (38%)
Умер	50 (62%)
Возраст, годы	
≤ 65	50 (62%)
> 65	30 (38%)
Пол	
Женский	29 (36%)
Мужской	51 (64%)
T	
1, 2	54 (68%)
3, 4	26 (32%)
N	
0	47 (59%)
1, 2	33 (41%)
M	
0	77 (96%)
1	3 (3.8%)
Стадия	
1, 2	50 (62%)
3, 4	30 (38%)
Дифференцировка	
1, 2	24 (30%)
3, 4	45 (56%)
Смешанная	11 (14%)
Первично-множественные злокачественные опухоли	
Присутствуют	6 (7.5%)
Отсутствуют	74 (92%)

На рисунке 8 показаны вероятности общей выживаемости для исследуемой выборки пациентов с АКЛ. Медиана выживаемости составила 70 месяцев.

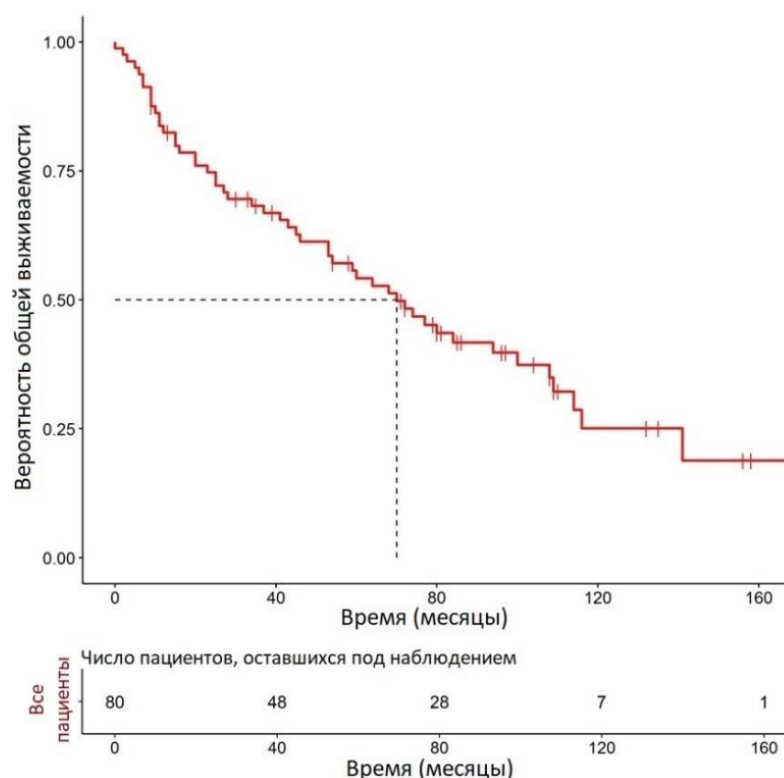


Рис. 8. Кривая общей выживаемости Каплана-Мейера для выборки пациентов с АКЛ. Число пациентов, оставшихся под наблюдением, указано ниже. Красные плюсы на кривой обозначают цензурированные наблюдения.

3.1.2. Выбор белков для исследования

Как упоминалось в литературном обзоре, митохондрии влияют на развитие и прогрессирование рака легкого. Правильное функционирование митохондрий зависит от качества этих органоидов, которое поддерживается митофагией и динамическими процессами деления и слияния. Для изучения роли данных процессов в прогрессировании АКЛ, в дальнейший анализ были включены ключевые участники контроля качества митохондрий: PINK1, Parkin и BNIP3, BNIP3/NIX (митофагия), Drp1 (деление) и Mfn2 (слияние). Помимо слияния митохондрий, Mfn2 регулирует сайты контактов между мембранами ЭПР и митохондрий, а также влияет на экспрессию различных субъединиц ЭТЦ [168].

В свою очередь, митофагия и митохондриальная динамика поддерживают здоровую популяцию митохондрий, предотвращая накопление АФК. Sirtuin3 является митохондриальной деацетилазой и важнейшим регулятором ответа на окислительный стресс, поэтому этот белок был также включен в последующий анализ. Следует отметить, что митохондриальный метаболизм и окислительный стресс тесно связаны с ферроптозом. Глутатионпероксидаза 4 (GPX4) представляет собой фермент антиоксидантной системы, который участвует в регуляции ферроптоза, а также оказывает влияние на защиту митохондрий и комплексов ЭТЦ от окислительного повреждения [169].

Таким образом, в анализ были включены следующие белки – PINK1, Parkin, BNIP3, BNIP3L, Drp1, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4. Детальный анализ с помощью базы данных STRING выявил взаимосвязи этих белков друг с другом, отображенные в виде линий между ними, которые указывают как на функциональные, так и на физические ассоциации белков. Толщина линий демонстрирует разную степень достоверности взаимосвязей (рис. 9). Наибольшей достоверностью характеризуются взаимосвязи между PINK1 и Parkin (PARK2)/Mfn2/Drp1 (DNM1L), а также между Mfn2 и Drp1 (DNM1L)/Parkin (PARK2), Drp1 (DNM1L) с Parkin (PARK2) и BNIP3 с BNIP3L/NIX. Наименьшую достоверность взаимосвязей демонстрировали Sirt3 и GPX4 с остальными исследуемыми белками. Таким образом, белки, прямо контролирующие процессы митохондриальной динамики и митофагии, взаимосвязаны сильнее опосредованных регуляторов митохондриального гомеостаза.

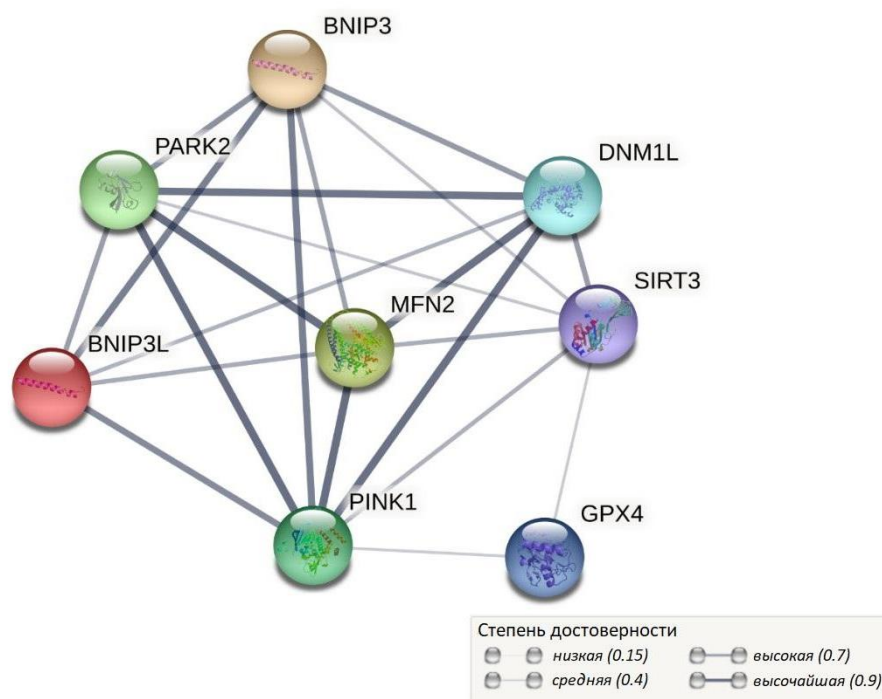


Рис. 9. Карта взаимосвязей между PINK1, Parkin (PARK2), BNIP3, BNIP3L/NIX, Drp1 (DNM1L), Mfn2, Sirt3 и GPX4 у *Homo Sapiens*. Линии отображают взаимосвязи между белками (достоверность взаимосвязей указана в легенде). Сделано в базе данных STRING.

3.1.3. Подбор антител к исследуемым белкам

Для постановки Вестерн блота с экстрактами из клинических образцов пациентов с АКЛ были подобраны первичные антитела к исследуемым белкам. Все первичные антитела, упомянутые в разделе 2.1.3., за исключением антител против Parkin, давали сильный или средний сигнал при детекции хемилюминесценции, который был достаточен для дальнейшей денситометрической оценки (рис. 10, а). Однако, из-за недостаточно качественного сигнала при использовании различных антител к Parkin, данный белок был исключен из дальнейшего анализа (рис. 10, б). Факт того, что вторичные антитела могут вступать в реакцию с эндогенным иммуноглобулином G (IgG – immunoglobulin G) из тканей, заставил нас провести серию контрольных экспериментов с использованием лизатов клинических образцов. Для этого нитроцеллюлозную мембрану с

перенесенными на нее белками, блокировали 5%-ным обезжиренным молоком и затем инкубировали со вторичными антителами от Abcam и Cell Signaling Technology (CST). В результате после окрашивания вторичным антителом от Abcam в лизатах пациентов была обнаружена полоса около 50 кДа, которая отсутствовала при анализе лизата клеток A549 и при использовании вторичного антитела от CST. Таким образом, ввиду неспецифического связывания вторичных антител от Abcam с IgG из лизатов тканей, в последующих экспериментах с клиническими образцами в качестве вторичных были использованы антитела от CST (рис. 10, в).

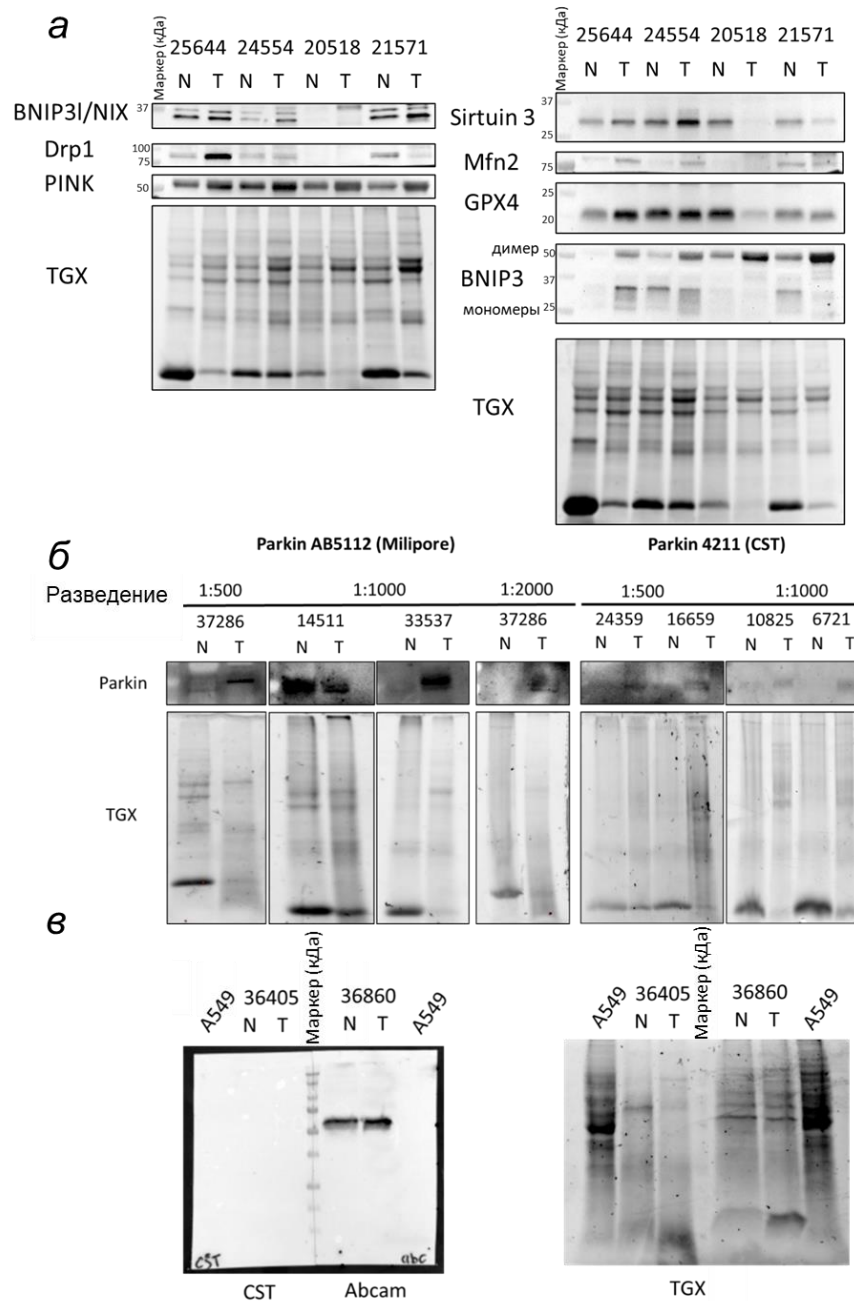


Рис. 10. (а) Репрезентативный Вестерн блот лизатов тканей пациентов с АКЛ для анализа качества окрашивания антителами к PINK1, BNIP3, BNIP3/NIX, Drp1, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4. (б) Окрашивание антителами против Parkin от Milipore и CST в различных разведениях. (в) Проверка вторичных антител от CST и Abcam на нитроцеллюлозной мембране (слева) и соответствующий TGX гель (справа). 25644, 24554, 20518, 21571, 37286, 14511, 33537, 24359, 16659, 10825, 6721, 36405 и 36860 – номера пациентов после их анонимизации, N – нормальная ткань, T – опухолевая ткань.

Стоит отметить, что белок BNIP3 хорошо детектировался в форме мономеров и димеров. Предполагается, что димеризация BNIP3 регулирует активацию митофагии. Кроме этого, только с помощью метода Вестерн-блот можно детектировать димерную форму данного белка. Таким образом, в ходе денситометрического анализа мог быть исследован статус митофагии в тканях пациентов с АКЛ.

3.1.4. Сравнительный анализ уровней исследуемых белков в нормальных и опухолевых тканях

Вестерн блот анализ белков BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP3/1/NIX, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4 был проведен с использованием лизатов опухолевых и соответствующих нормальных тканей, полученных от 80 пациентов с АКЛ. Уровень вышеуказанных белков был затем определен с помощью денситометрии. Для их нормализации на общий пул белка, дополнительно проводили денситометрический анализ TGX гелей. Примечательно, что в ходе проявки TGX гелей детектировали интенсивную по окраске полосу белков массой ~15 кДа (рис. 10). У большинства пациентов данная полоса количественно превалировала в нормальной ткани по сравнению с опухолевой. Для выяснения того, что представляют эти белки, кусочки геля, соответствующие их массе, вырезали и анализировали с помощью масс-спектрометрии. Данный комплекс белков содержал α , β и δ субъединицы гемоглобина. Повышенный уровень гемоглобина в нормальных образцах ткани по сравнению с опухолевыми может объясняться ограниченной васкуляризацией последних. Поэтому сигнал от этих полос не учитывался в денситометрическом анализе при нормализации уровней исследуемых белков в опухолевых и нормальных тканях, что нивелировало вклад различного кровенаполнения в образцах. Соотношение опухоль/норма для каждого белка рассчитывалось в логарифмическом масштабе.

Как показано на рисунке 11 (а), уровни димеров ($p \leq 0.004$) и мономеров ($p \leq 0.001$) BNIP3, а также GPX4 ($p \leq 0.0001$) были статистически повышены в

опухолевых тканях по сравнению с нормальными. В отличие от BNIP3 и GPX4, уровни белков Drp1, PINK1, BNIP3/NIX, Mfn2 и Sirtuin3 статистически не изменялись в опухолевых и неопухолевых образцах. Стоит отметить, что значения уровня белка Sirtuin3 располагаются в широком диапазоне, эта тенденция может указывать на его гетерогенность у пациентов исследуемой выборки. В то же время значения уровней BNIP3/NIX, Mfn2, Drp1 и PINK1 разбросаны незначительно, что позволяет предположить их неизменный уровень в раковых и нормальных тканях у пациентов с АКЛ в исследуемой когорте.

Помимо сравнения уровней белков в нормальных и опухолевых тканях, были изучены корреляции между BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP3/NIX, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4 (рис. 11, б). Большинство исследуемых белков напрямую и статистически значимо коррелировало между собой. Более того, GPX4, который преимущественно локализуется в цитозоле, прямо коррелировал с Sirtuin3, Drp1, BNIP3/NIX, а также с димерной и мономерной формами BNIP3, что указывает на GPX4 как на важного регулятора митохондриального гомеостаза. Всего две обратные корреляции были выявлены у белка PINK1 с Drp1 и с GPX4.

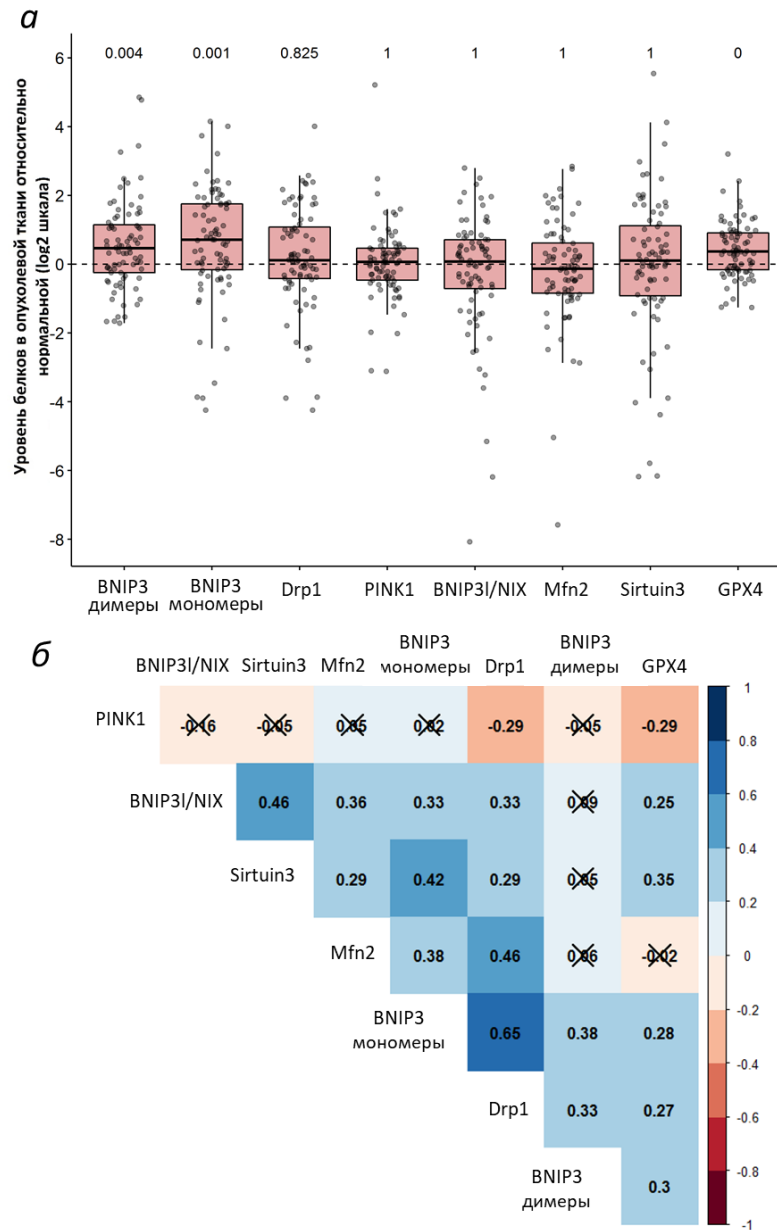


Рис. 11. (а) Денситометрический анализ уровней белков BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP3/NIX, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4 в опухолевых тканях относительно неопухолевых, нормализованных на общий пул белка, в логарифмическом масштабе. р-значения расположены над соответствующими бокс-плотами. (б) Карта корреляций между белками BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP3/NIX, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4. Корреляции указаны для каждой пары белков на основе коэффициентов корреляции Спирмена. Зачеркнутые значения отображают статистически незначимые ($p > 0.05$) коэффициенты корреляции. $N = 80$ пациентов.

Кроме этого, в рамках данного исследования были выявлены ассоциации между уровнями белков BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP31/NIX, Mfn2, Sirtuin3, GPX4 и некоторыми клинико-патологическими признаками пациентов исследуемой выборки (рис. 12). Результаты показали, что уровень Sirtuin3 был статистически значимо повышен у пациентов с T1-2 ($p \leq 0.0087$), а также у больных АКЛ с N1-2 ($p \leq 0.0096$) (рис. 12, а, б). Как и Sirtuin3, уровень BNIP31/NIX был увеличен у пациентов с метастазами в лимфатических узлах (N1-2) ($p \leq 0.0069$) (рис. 12, б). Помимо Sirtuin3 и BNIP31/NIX, была выявлена корреляция между повышением уровня димерной формы BNIP3 и 1-2 стадиями у пациентов с АКЛ ($p \leq 0.037$) (рис. 12, в). Также увеличение уровня GPX4 статистически значимо обнаруживалось у пациентов с T1-2 ($p \leq 0.047$) (рис. 12, а). Таким образом, уровень белков контроля качества митохондрий может изменяться в зависимости от размера и локализации первичной опухоли, наличия/отсутствия метастаз в лимфатических узлах и стадии, оказывая влияние на прогрессирование АКЛ.

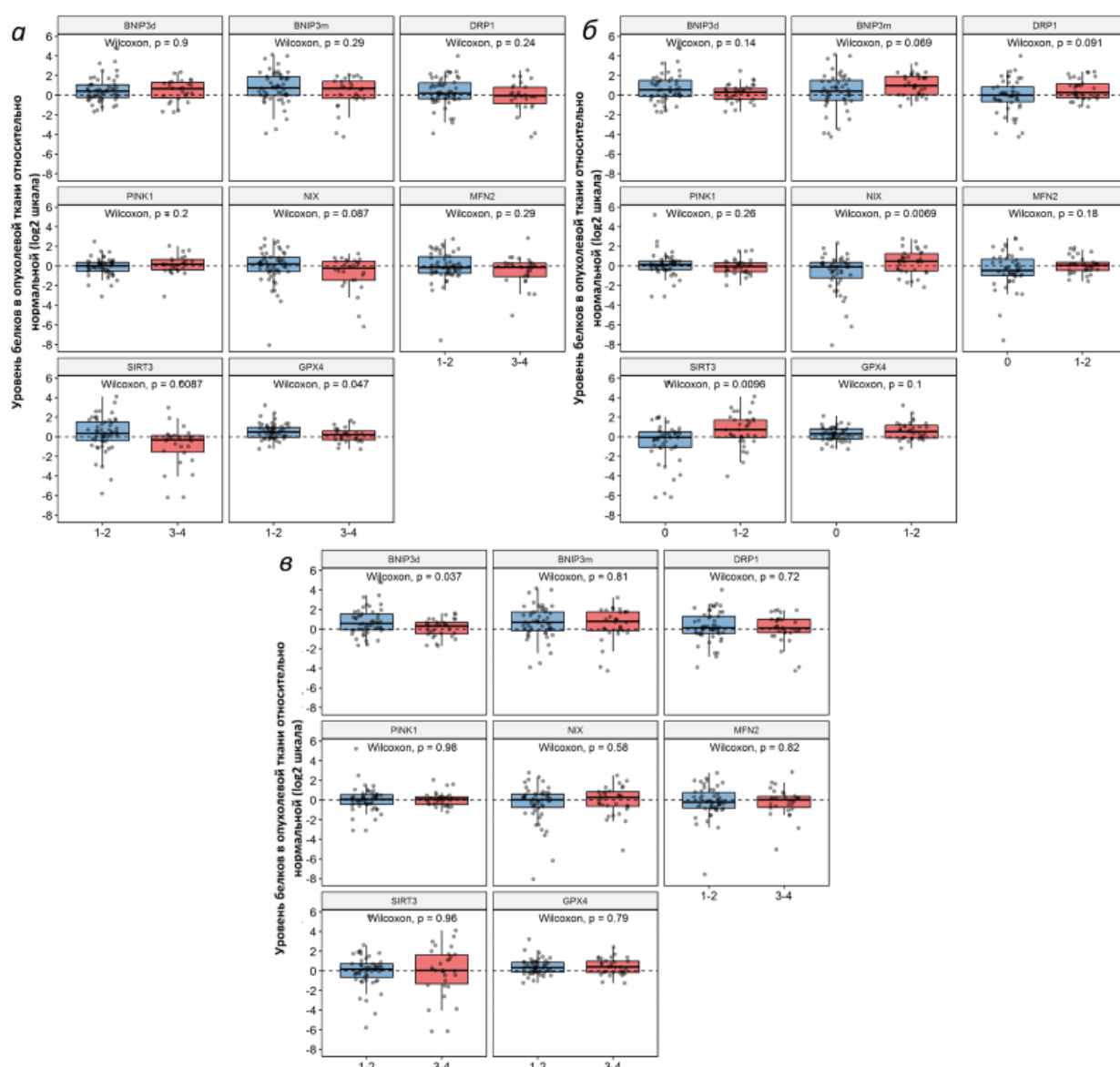


Рис. 12. Уровни белков BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP31/NIX, Mfn2, Sirtuin3, GPX4, стратифицированных по критериям Т (а) и N (б), а также стадиям (в), у 80 пациентов с АКЛ.

3.1.5. Оценка прогноза выживаемости в зависимости от уровня белков контроля качества митохондрий и клинико-патологических признаков пациентов

Для оценки прогностической роли белков контроля качества митохондрий, были проанализированы ОР с помощью одномерной и многомерной регрессионных моделей Кокса (таблица 8). Уровни белков BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP31/NIX, Mfn2,

Sirtuin3 и GPX4 в опухолевой ткани относительно нормальной в log2 шкале использовались для расчета ОР и 95% ДИ у 80 пациентов с АКЛ. Анализ показал, что уровень Sirtuin3 был статистически связан с понижением риска смерти в одномерной (ОР = 0.87, 95% ДИ = 0.76-0.99, $p \leq 0.035$) и в многомерной (ОР = 0.81, 95% ДИ = 0.71-0.94, $p \leq 0.005$) моделях. Помимо Sirtuin3, многомерная модель Кокса также выявила связь между димерной формой BNIP3 и снижением риска смерти у пациентов с АКЛ (ОР = 0.77, 95% ДИ = 0.60-0.97, $p \leq 0.03$). В отличие от Sirtuin3 и димерной формы BNIP3, белок Drp1, напротив, коррелировал с повышением риска смерти у пациентов исследуемой выборки (ОР = 1.38, 95% ДИ = 1.09-1.75, $p \leq 0.03$). Согласно одномерной и многомерной регрессионным моделям Кокса, у мономерной формы BNIP3, PINK1, BNIP3/NIX, Mfn2 и GPX4 не было обнаружено статистически значимого вклада в общую выживаемость пациентов с АКЛ.

Таблица 8. Одномерная и многомерная регрессионные модели Кокса для BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP3/NIX, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4 у 80 пациентов с АКЛ.

Характеристика	Одномерная модель				Многомерная модель			
	N	ОР	95% ДИ	р-значения	N	ОР	95% ДИ	р-значения
BNIP3 димеры	80	0.85	0.68, 1.05	0.13	80	0.77	0.60, 0.97	0.030
BNIP3 мономеры	80	0.95	0.80, 1.12	0.5				
DRP1	80	1.07	0.89, 1.30	0.5	80	1.38	1.09, 1.75	0.008
PINK1	80	1.11	0.83, 1.48	0.5				
NIX	80	0.96	0.84, 1.09	0.5				
MFN2	80	1.01	0.85, 1.19	>0.9				
SIRT3	80	0.87	0.76, 0.99	0.035	80	0.81	0.71, 0.94	0.005
GPX4	80	0.82	0.56, 1.19	0.3				

ОР = отношение риска, ДИ = доверительный интервал

Тест Вальда = 14.4 ($p = 0.002$); N событий = 50; индекс конкордантности = 0.645 (стандартная ошибка среднего = 0.043)

Далее был рассчитан объединенный индекс риска на основе уровня значимых для выживаемости белков, а именно димерной формы BNIP3, Drp1

и Sirtuin3 ($\log_2$ рак/норма), и коэффициентов регрессии, полученных в ходе многомерной регрессионной модели Кокса. В соответствии с полученными индексами пациенты были разделены на группы высокого ($N = 40$) и низкого риска ($N = 40$), используя медиану индекса риска (рис. 13, а). Кроме этого, для подтверждения наибольшего вклада димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 в разделение выборки на группы высокого и низкого риска, были проанализированы и ранжированы в соответствии с индексами риска все исследуемые белки для каждого пациента с АКЛ (рис. 13, б). Как видно из диаграммы, действительно, димерная форма BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 влияют на разделение выборки сильнее остальных белков. Далее были построены кривые Каплана-Мейера, продемонстрировавшие, что пациенты в группе высокого риска смерти имели статистически значимо ($p \leq 0.0075$) худший прогноз общей выживаемости по сравнению с группой низкого риска у исследуемой выборки пациентов с АКЛ (рис. 13, в). Медиана выживаемости пациентов группы высокого риска составила 46 месяцев, что в 2.2 раза меньше, чем у больных АКЛ из группы низкого риска (100 месяцев). Таким образом, димерная форма BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 вкуче влияли на прогноз общей выживаемости и позволили разделить пациентов с АКЛ на группы с высоким и низким риском смерти.

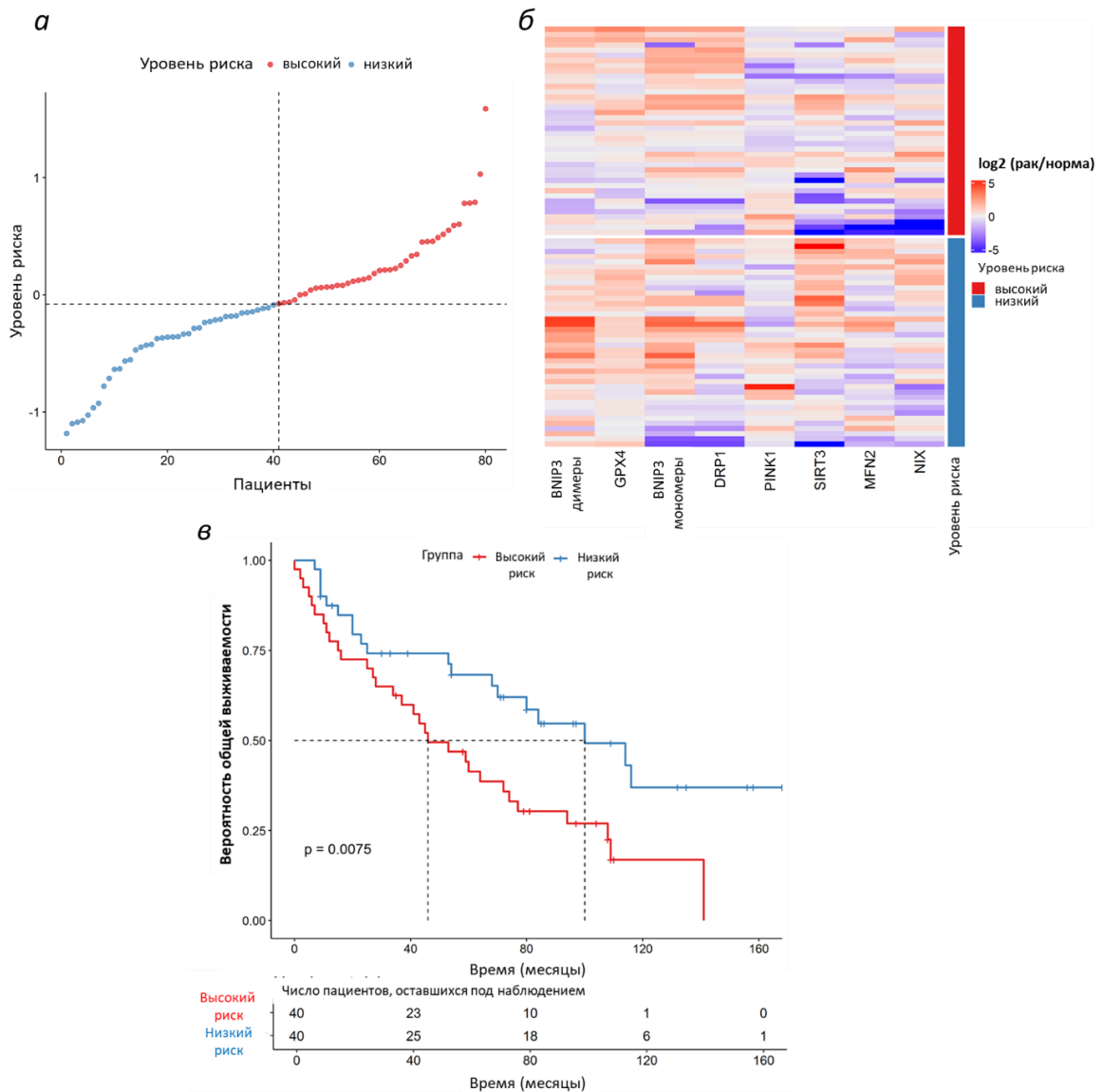


Рис. 13. (а) Распределение объединенных индексов риска, полученных на основе многомерной регрессионной модели Кокса в зависимости от уровня димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3, у 80 пациентов с АКЛ. Пунктирная линия представляет собой медиану индекса риска, разделяющую пациентов на группы низкого и высокого риска. (б) Heat-map уровня белков BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP3/NIX, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4 в зависимости от низкого и высокого риска. (в) Кривые Каплана-Мейера общей выживаемости у 80 пациентов с АКЛ с низким и высоким риском смерти в зависимости от уровня димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3. Плюсы на кривой обозначают цензурированные наблюдения.

В связи с наличием у димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 значимой предсказательной способности, следующим этапом исследования стала разработка совмещенной модели по оценке выживаемости на основе индекса риска данных белков и различными клинико-патологическими признаками у 80 пациентов с АКЛ. Для оценки прогностической роли TNM, дифференцировки, стадий, пола, возраста и ПМЗО, были проанализированы ОР с помощью одномерной и многомерной регрессионных моделей Кокса (таблица 9). ОР и 95% ДИ данных категориальных признаков рассчитывались относительно референсов (в таблице отмечены –) у 80 пациентов с АКЛ. Основываясь на данном анализе, 3-4 стадии были статистически связаны с повышением риска смерти пациентов в одномерной (ОР = 2.56, 95% ДИ = 1.46-4.49, $p \leq 0.001$) и в многомерной (ОР = 4.00, 95% ДИ = 2.18-7.36, $p \leq 0.001$) моделях по сравнению с ранними стадиями. Согласно многомерной регрессионной модели Кокса, пациенты возрастом старше 65 лет имели бóльший риск смерти по сравнению с больными ≤ 65 лет. Кроме этого, одномерная и многомерная модели показали, что более повышение индекса риска по димерной форме BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 коррелировал с более высокой частотой смерти (одномерная модель, ОР = 2.74, 95% ДИ = 1.63-4.61, $p \leq 0.001$; многомерная модель, ОР = 3.68, 95% ДИ = 1.99-6.81, $p \leq 0.001$).

Таблица 9. Одномерная и многомерная регрессионные модели Кокса для TNM, дифференцировки, стадий, пола, возраста, ПМЗО и индекса риска в зависимости от уровней димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 у 80 пациентов с АКЛ.

Характеристика	Одномерная модель					Многомерная модель				
	N	ОР	95%	ДИ	p	N	ОР	95%	ДИ	p
Т										
1-2	54	—	—							
3-4	26	2.06	1.13, 3.79		0.019					
N										
0	47	—	—							
1-2	33	1.74	0.99, 3.05		0.055					
M										
0	77	—	—							
1	3	3.33	1.01, 10.9		0.047					
Дифференцировка										
1-2	23	—	—							
3-4	46	0.55	0.29, 1.04		0.066					
Смешанная	11	1.08	0.48, 2.45		0.8					
Стадия										
1-2	50	—	—			50	—	—		
3-4	30	2.56	1.46, 4.49		0.001	30	4.00	2.18, 7.36		<0.001
Пол										
женский	29	—	—							
мужской	51	1.07	0.60, 1.90		0.8					
Возраст										
≤65	50	—	—			50	—	—		
>65	30	1.69	0.97, 2.96		0.065	30	3.02	1.65, 5.53		<0.001
Первично-множественные злокачественные опухоли										
Отсутствуют	74	—	—							
Присутствуют	6	1.95	0.69, 5.47		0.2					
Индекс риска в зависимости от уровня белков	80	2.74	1.63, 4.61		<0.001	80	3.68	1.99, 6.81		<0.001
ОР = отношение риска, ДИ = доверительный интервал Тест Вальда = 36.2 (p = 0.000); N событий = 50; индекс конкордантности = 0.732 (стандартная ошибка среднего = 0.036)										

Одним из наиболее используемых онкологами инструментов для прогнозирования выживаемости пациентов является номограмма. В связи с этим, следующей задачей нашего исследования стала разработка номограммы, объединяющей в себе индекс риска в зависимости от уровней димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 с клиническими факторами прогноза (возраст и

стадия), выявленными в ходе одномерных и многомерных регрессионных моделей Кокса (рис. 14, а). Каждый фактор риска соответствует баллу, который определяется путем проведения вертикальной линии от соответствующей фактору графы к верхней шкале «Баллы». Сумма баллов факторов риска соотносится со шкалой «Общий балл» и позволяет определить 1-, 3-, 5-летнюю выживаемость. Соответствующее значение умножается на 100 для определения процентной вероятности выживаемости пациентов. Предложенная в данном исследовании номограмма показывает прогностическую ценность совокупности изученных нами факторов и позволит в будущем улучшить имеющиеся подходы к прогнозированию выживаемости пациентов с АКЛ.

Далее для анализа прогностической достоверности номограммы, построенной на основе стадий, возраста и объединенный индекс риска в зависимости от уровней белков (димерная форма BNIP3, Drp1 и Sirtuin3), были сопоставлены индексы конкордантности данных факторов по отдельности и совместно (рис. 14, б). С помощью проведенного анализа было выяснено, что наибольшей прогностической достоверностью обладает совокупность признаков, а именно стадии, возраст и индекс риска в зависимости от уровней белков. В соответствии с полученными совокупными индексами риска, выборка пациентов была разделена на группы с высоким ($N = 26$), низким ($N = 27$) и средним ($N = 27$) риском смерти. Далее, вероятности общей выживаемости пациентов данных групп были отображены на кривых Каплана-Мейера, которые продемонстрировали статистически значимое различие пациентов по продолжительности жизни ($p \leq 0.0001$) (рис. 14, в). Медиана общей выживаемости пациентов группы высокого риска составила 35.5 месяцев, что в 2.4 раза меньше, чем у больных из группы среднего риска (84 месяцев), и в 4 раза меньше по сравнению с группой низкого риска (141 месяц). Таким образом, стадии, возраст и индекс риска в зависимости от уровней димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 вкуче влияли на прогноз общей

выживаемости и позволили разделить 80 пациентов с АКЛ на группы с высоким, средним и низким риском смерти после постановки диагноза.

Следовательно, уровни димерной и мономерной форм BNIP3, а также GPX4 повышались в опухолевых тканях по сравнению с нормальными, в то время как димерная форма BNIP3, Sirtuin3, Drp1, возраст и стадии оказывали влияние на выживаемость пациентов с АКЛ. Таким образом, единственным белком чей уровень увеличивался и сказывался на выживаемости пациентов был BNIP3.

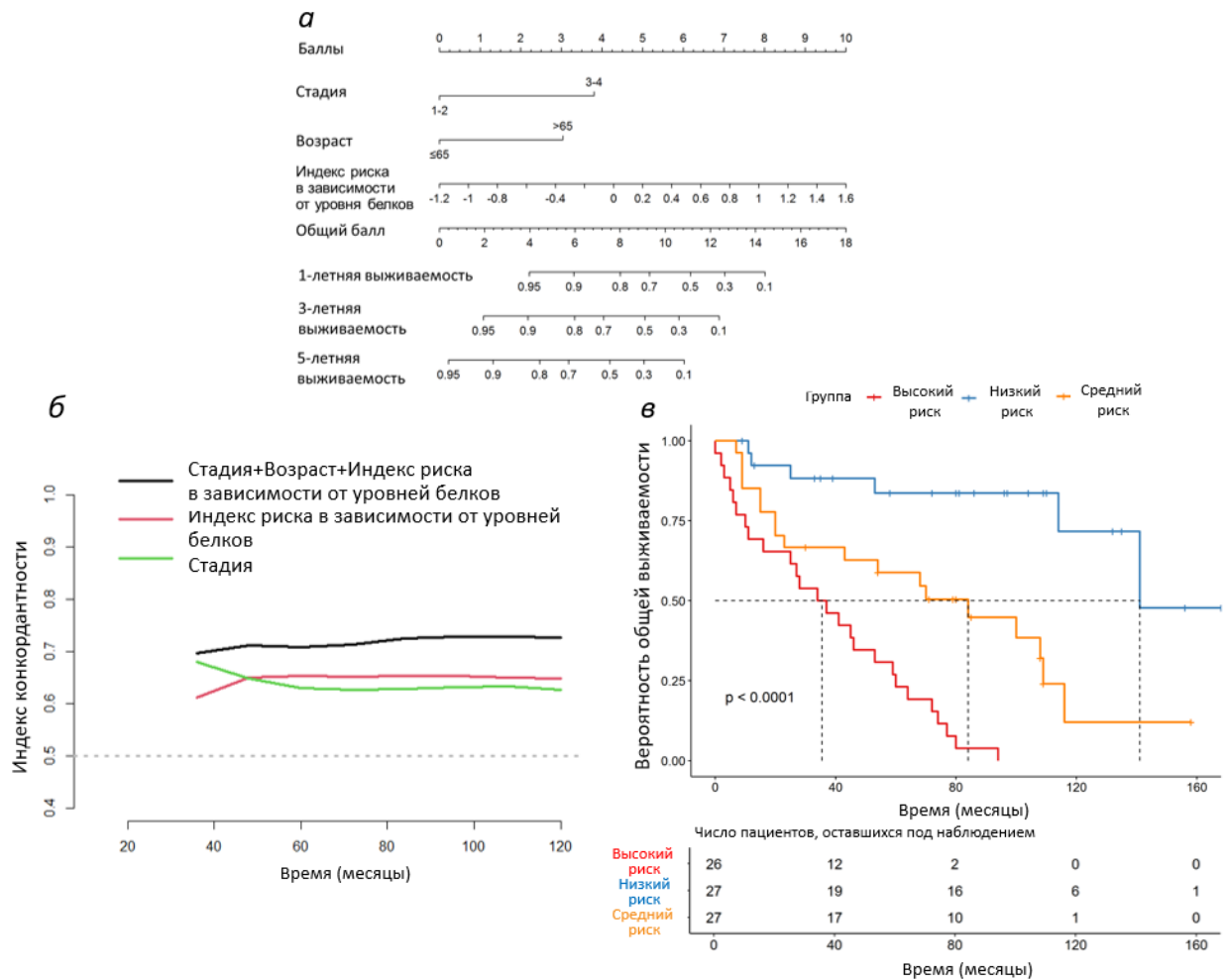


Рис. 14. (а) Номограмма для прогнозирования 1-, 3-, 5-летней выживаемости у пациентов с АКЛ на основе стадии, возраста и индекса риска в зависимости от уровней димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3. (б) Сравнение совокупных и отдельных индексов конкордантности стадии, возраста и индекса риска в зависимости от уровней димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3. (в) Кривые Каплана-Мейера общей выживаемости у 80 пациентов с АКЛ с высоким,

средним и низким риском смерти в зависимости от объединенного индекса риска, рассчитанного на основе уровней димерной формы BNIP3, Drp1, Sirtuin3, стадии и возраста. Плюсы на кривой обозначают цензурированные наблюдения.

3.2. BNIP3 как мишень для модуляции ПГК

Полученные результаты исследования клинических образцов пациентов с АКЛ выявили BNIP3 как одного из важных регуляторов данной патологии. Как известно, одним из 10 физиологических изменений, ведущих к возникновению опухоли является нарушение процессов ПГК, а успехи в элиминации опухоли связаны с их эффективностью. Наиболее детально в данном направлении изучен апоптоз и его внутренний (митохондриальный) путь. В клинической практике стимулирование апоптоза достигается при помощи ДНК-повреждающих препаратов, например, цисплатина. BNIP3, являясь связующим звеном между процессами прогрессирования АКЛ и контроля качества митохондрий, может потенциально влиять на жизнеспособность клеток АКЛ, особенно при совместном действии с цисплатином. В связи с тем, что уровень BNIP3 повышался в опухолевой ткани пациентов с АКЛ, возник вопрос: к чему может привести снижение уровня BNIP3, в том числе в комбинации с цисплатином?

3.2.1. Получение клеточных линий АКЛ с нокаутом и нокдауном по BNIP3

Для изучения роли белка BNIP3 в АКЛ были созданы линии клеток A549 и H23, в которых экспрессия *BNIP3* была подавлена с использованием системы CRISPR/Cas9. Для исключения нецелевых эффектов данного метода ввиду неспецифической активности эндонуклеазы Cas9 эксперименты также проводили при подавлении синтеза белка с применением таргетной миРНК к BNIP3. Как показал Вестерн блот анализ, оба подхода позволяли добиться значительного снижения уровня белка BNIP3 (рис. 15, а). Стоит отметить, что BNIP3 на 56% гомологичен другому представителю семейства Bcl-2 – BNIP3L/NIX [170]. Однако используемые нами способы нокаута и нокдауна

BNIP3 не сказывались на изменении уровня BNIP3/NIX (рис. 15, б, в), что позволило направленно изучать роль BNIP3.

Как было упомянуто ранее, BNIP3 является ключевым участником митофагии, осуществляя контроль качества митохондрий. Поэтому логично предположить, что снижение уровня BNIP3 может привести к угнетению митофагии и, как следствие, к накоплению поврежденных митохондрий, неспособных поддерживать должное энергообеспечение клетки. Для проверки этой гипотезы, был проведен анализ функциональной активности митохондрий, в частности дыхания этих органелл с помощью прибора Seahorse Analyzer, который позволяет оценить потребление O_2 митохондриями в клетке *in situ*. Как показал анализ, нокаут BNIP3 приводил к снижению как базального (~ в 2.5 раза), так и максимально возможного, стимулированного протонофором КЦХФ, дыхания (~ в 7 раз) (рис. 15, г, д). Судя по всему, угнетение потребления O_2 клетками после нокаута BNIP3 обусловлено не уменьшением содержания митохондрий в клетке, а подавлением митофагии, в результате чего поврежденные и плохо функционирующие митохондрии накапливаются и вносят вклад в снижение дыхательной способности клеток.

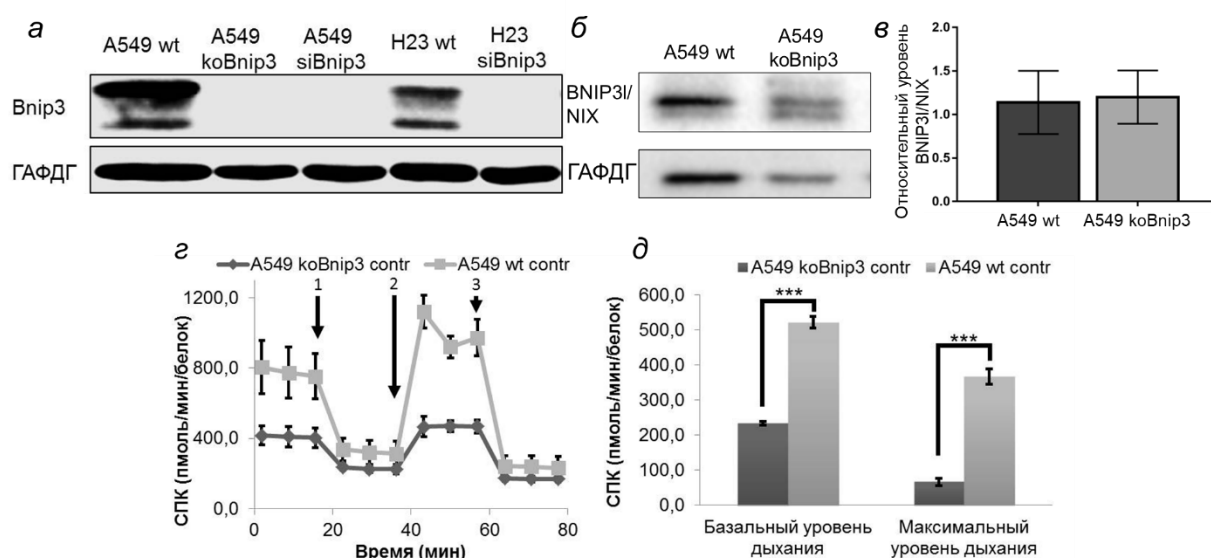


Рис. 15. (а) Вестерн блот анализ содержания белка BNIP3 в клетках A549 и H23 дикого типа и дефицитных по BNIP3. (б) Вестерн блот содержания BNIP3/NIX и (в) его денситометрический анализ в клетках A549 дикого типа

и нокаутных по BNIP3. ГАФДГ использовался в качестве контроля загрузки белка, на уровень которого нормализовали содержание BNIP3; (г) оценка потребления O_2 клетками A549 дикого типа и с нокаутом по BNIP3. Инъекции олигомицина, КЦХФ и антимицина А с ротеноном отображены стрелками 1, 2 и 3 соответственно; (д) гистограмма, демонстрирующая максимальный (стимулируемый КЦХФ) и базальный уровни дыхания; СПК (пмоль/мин/мг белка) – скорость потребления кислорода, нормализованная на общее содержание белка в пробе.

3.2.2. Изменение протеомного профиля клеток нокаутных по BNIP3

В связи с полученными результатами стало понятно, что BNIP3 действительно влияет на митохондриальный гомеостаз клеток АКЛ, и его выключение может привести к изменению работы митохондрий в процессе развития и прогрессирования данной патологии. Поэтому на следующем этапе работы для уточнения функций BNIP3 в канцерогенезе легкого, был проведен протеомный анализ с использованием масс-спектрометрического подхода клеток A549 с нокаутом по данному белку и без него. Белки, чей уровень изменялся в зависимости от дефицита BNIP3, приведены в приложении 1, 2. Биоинформатический анализ с использованием базы данных STRING выявил взаимосвязи между белками с разной степенью достоверности (рис. 16). В ходе исследования в нокаутной по BNIP3 линии было обнаружено статистически значимое уменьшение уровня митохондриальных белков, ассоциированных с поддержанием качества митохондрий на разном уровне, в том числе экзонуклеазы 1, поддерживающей митохондриальный геном (MGME1 – mitochondrial genome maintenance exonuclease 1) и АДФ-рибозогликогидролазы MACROD1, по сравнению с клетками без нокаута. Клетки дефицитные по BNIP3 также демонстрировали пониженную экспрессию белков, ответственных за метаболизм ксенобиотиков, а именно УДФ-глюкуронозилтрансфераза 1A9, УДФ-глюкуронозилтрансфераза 1-6 и цитохром P450 4F11. Кроме этого, нокаутные по BNIP3 клетки имели

повышенный уровень белков, связанных с регуляцией метаболизма нуклеозидов, РНК-интерференции и -процессинга. Пуриновая нуклеозидфосфорилаза контролирует метаболизм пуринов, тогда как белок, содержащий домен стафилококковой нуклеазы (SND1/TSN), отвечает за процессинг мРНК и РНК-интерференцию. Ранее нами было продемонстрировано, что клетки A549 с нокаутом по SND1/TSN показывали увеличение экспрессии BNIP3, это может указывать на их взаимозамещающую регуляцию [171]. Таким образом, данные масс-спектрометрического анализа согласуются с результатами, полученными ранее, что дает основание предполагать их достоверность. Протеомный профиль клеток A549 нокаутных по BNIP3 дал основание предположить их потенциальную чувствительность к метаболизму ксенобиотиков, в том числе химиотерапевтическим препаратам, а также к поддержанию здоровой популяции митохондрий.

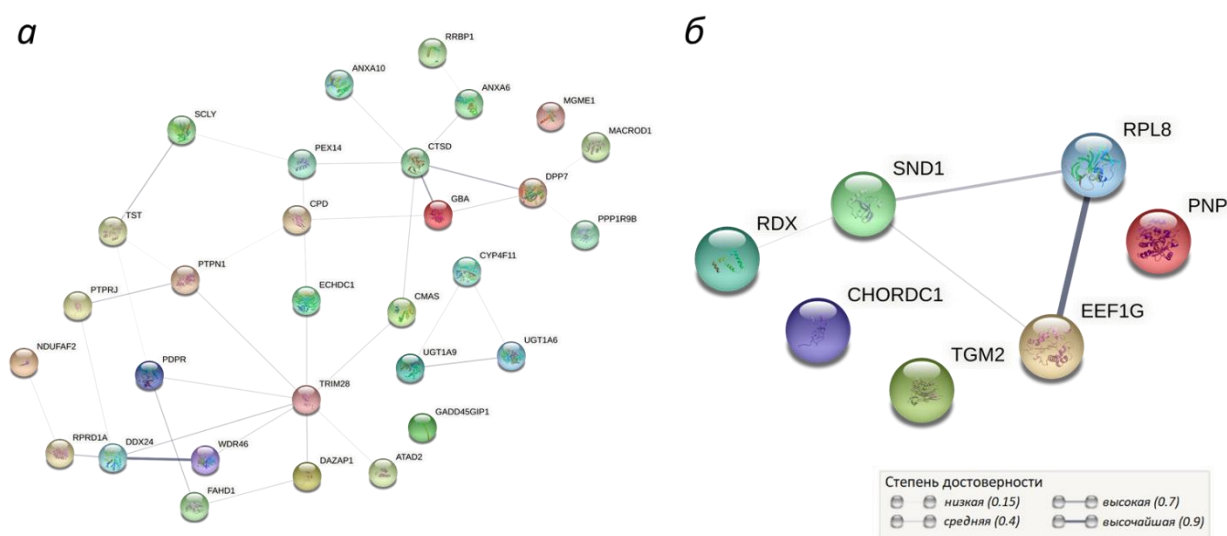


Рис. 16. Карта взаимосвязей между белками, чья экспрессия была понижена (а) и повышена (б) в клетках A549 с нокаутом по BNIP3 у *Homo Sapiens*. Линии отображают взаимосвязи между белками (достоверность взаимосвязей указана в легенде). Сделано в базе данных STRING.

3.2.3. Влияние BNIP3 на выход цитохрома *c* из митохондрий и изменение уровня митохондриальных АФК при индукции цисплатином

Можно предположить, что в клетках с уменьшенным уровнем BNIP3 появится популяция митохондрий более чувствительная к ПВММ в условиях стимуляции апоптоза химиотерапевтическим препаратом цисплатином. Как обсуждалось ранее, одним из ключевых событий апоптоза является выход цитохрома *c* из межмембранного пространства митохондрий и формирование апоптосомы, в которой происходит запуск каспазного каскада. Оценку выхода цитохрома *c* при апоптозе, индуцированном цисплатином (30 мкМ), исследовали в клетках A549 дикого типа и со сниженным уровнем BNIP3 – с нокаутом (A549 KoBNIP3) и нокдауном (A549 siBNIP3). Результаты эксперимента показали, что выход цитохрома *c* из митохондрий в клетках с нокаутом и нокдауном по BNIP3 был выше по сравнению с контрольными клетками (рис. 17, а-г). Стоит отметить, что разницы по выходу цитохрома *c* между клетками с нокаутом и с нокдауном по BNIP3 не наблюдалось, поэтому дальнейшие эксперименты проводили на нокаутной линии A549 KoBNIP3 со стабильно подавленной экспрессией *BNIP3*.

Выход цитохрома *c* из митохондрий способен вызывать нарушение в функционировании ЭТЦ, что ведет к утечке электронов и образованию супероксида. Более того, цисплатин может приводить к генерации митохондриальных активных форм кислорода (мТАФК) в результате непосредственного воздействия на митохондрии [172]. Это, в свою очередь, может влиять на стимуляцию клеточной гибели. Действительно, количественная оценка мТАФК с помощью окрашивания флуоресцентным красителем MitoSox Red и детекции его сигнала посредством проточной цитометрии выявила, что в клетках A549 KoBNIP3 уровень мТАФК после индукции цисплатином был почти в два раза выше по сравнению с клетками дикого типа (рис. 17, д, е). Стоит отметить, что клетки обеих линий без обработки цисплатином не показывали статистически значимого различия в

уровне мтАФК. Оценку мтАФК проводили спустя 6, 12, 16 и 24 ч после индукции апоптоза цисплатином. Для репрезентативности была выбрана точка 16 ч, так как именно в эту временную точку наблюдалась максимальная разница в уровне мтАФК между линиями A549 wt и A549 KoBNIP3.

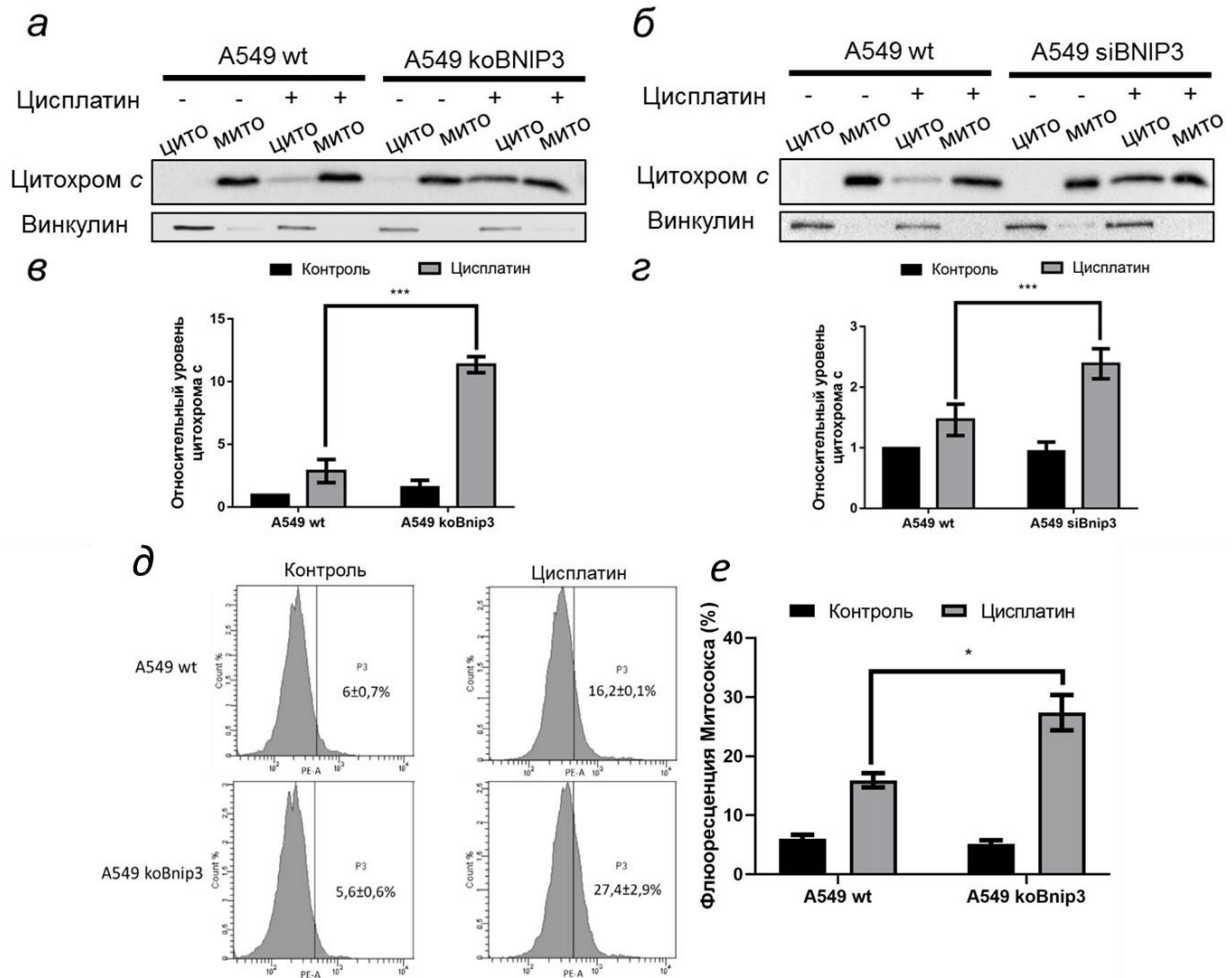


Рис. 17. (а) Вестерн блот уровня цитохрома *c* в цитозольной (цито) и митохондриальной (мито) фракциях линий A549 wt и A549 KoBNIP3, (б) A549 wt и A549 siBNIP3 через 24 ч после индукции цисплатином (30 мкМ), и (в, г) их денситометрический анализ. Винкулин использовался в качестве контроля загрузки белка, на уровень которого нормализовали содержание цитохрома *c*. (д) Количественная оценка мтАФК в клетках линий A549 wt и A549 KoBNIP3 спустя 16 ч после индукции цисплатином (30 мкМ) и (е) гистограмма, отражающая статистический анализ полученных результатов.

3.2.4. Оценка цисплатин-индуцированного апоптоза в линиях клеток со сниженной экспрессией BNIP3

Выход цитохрома *c* из митохондрий приводит к запуску каспазного каскада и активации эффекторной каспазы-3, что ведет к появлению биохимических и морфологических признаков апоптоза. Выяснилось, что в клетках линий A549 и H23 с подавленной экспрессией *BNIP3* активность каспазы-3, определяемая по расщеплению специфического субстрата, была значимо выше по сравнению с клетками дикого типа спустя 24 ч после индукции апоптоза цисплатином (рис. 18, а, б). Одной из мишеней каспазы-3 является белок ПАРП, который расщепляется с появлением фрагмента р89. Оценка р89 ПАРП продемонстрировала большее накопление данного фрагмента в нокаутных клетках по сравнению с диким типом (рис. 18, в, г).

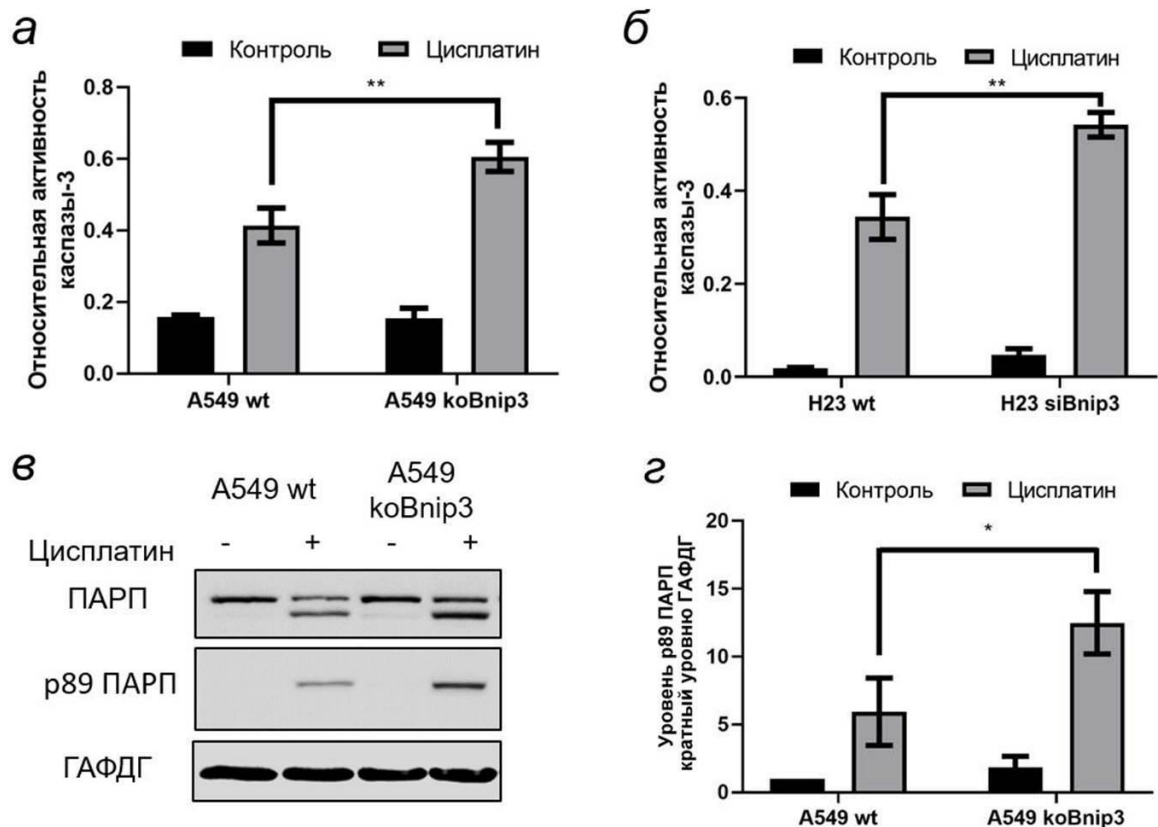


Рис. 18. Анализ активности каспазы-3 в клетках линий A549 (а) и H23 (б) дикого типа и с подавленной экспрессией *BNIP3*. Активность каспазы-3 нормализовали на уровень белка в пробе. Вестерн блот биохимического маркера апоптоза – ПАРП (в) и денситометрический анализ уровня р89 ПАРП

(г), в клетках линии A549 wt и A549 KoBNIP3 спустя 24 ч после индукции апоптоза цисплатином (30 мкМ). ГАФДГ использовали как контроль загрузки белка, на уровень которого нормализовали содержание p89 ПАРП.

Помимо исследования вышеописанных маркеров апоптоза, был выполнен анализ уровня популяции SubG1 в клетках A549 wt и A549 KoBNIP3 с помощью проточной цитометрии. Фракция SubG1 отражает апоптотическую популяцию клеток, содержащих фрагментированную ДНК. Анализ выявил, что в клетках дикого типа популяция SubG1 составляла $11.8 \pm 1.7\%$, в то время как в нокаутной по BNIP3 линии она была в два раза выше – $26.3 \pm 2.5\%$. Таким образом, дефицитные по BNIP3 клетки проявляли бо́льшую чувствительность к цисплатину по сравнению с клетками дикого типа через 24 ч после индукции апоптоза (рис. 19), что согласуется с данными, полученными при оценке активности каспазы-3 и накопления фрагмента p89 ПАРП.

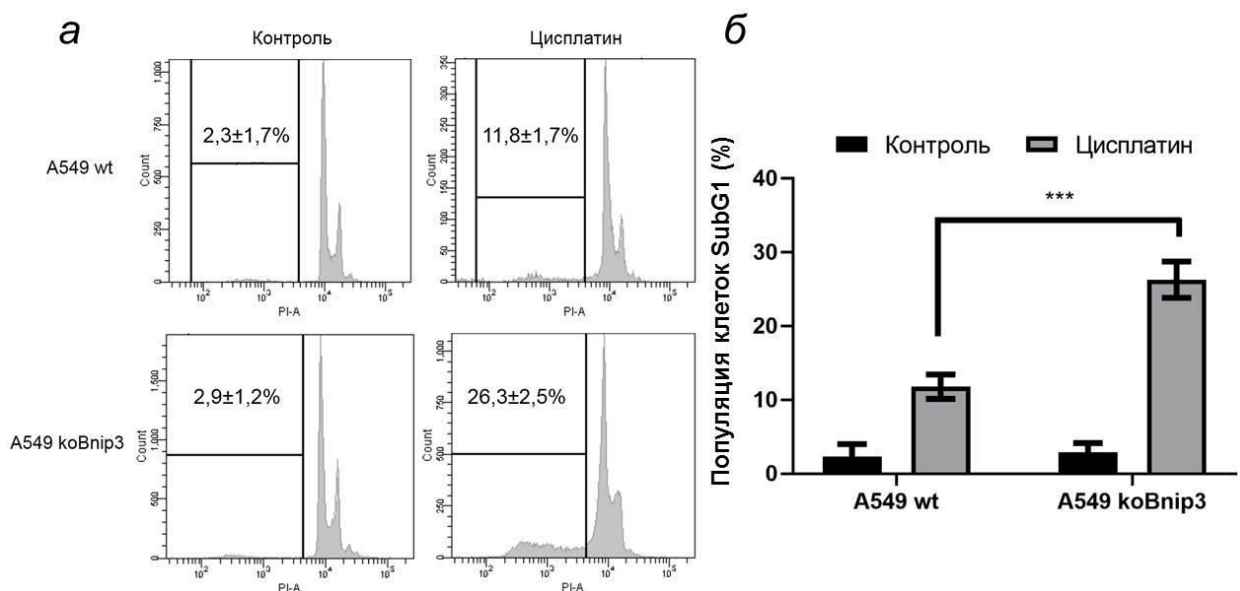


Рис. 19. Цитометрическая оценка уровня апоптотической фракции SubG1 (а) клеток линии A549 wt и A549 KoBNIP3 спустя 24 ч после индукции апоптоза цисплатином (30 мкМ) и гистограмма, отражающая статистический анализ полученных результатов (б).

Таким образом, снижение уровня BNIP3 в клетках АКЛ приводило к появлению дефектных митохондрий, которые проявляли бо́льшую

чувствительность к цисплатин-индуцированному апоптозу. Клетки АКЛ дефицитные по BNIP3 демонстрировали повышенный уровень выхода цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму, что запускало последующие этапы апоптозного каскада, в частности активацию каспазы-3 и расщепление PARP, при индукции цисплатином по сравнению с клетками дикого типа.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

АКЛ является одним из наиболее агрессивных типов рака легкого, который обычно симптоматически не проявляется вплоть до терминальных стадий. Кроме того, АКЛ может рецидивировать даже у пациентов, перенесших как хирургическое, так и стандартное химиотерапевтическое лечение [173]. Таким образом, имеется необходимость усовершенствовать способы прогнозирования выживаемости пациентов и персонализировать лечение больных с высоким риском смерти. Появляющиеся данные о функционировании митохондрий демонстрируют их влияние на развитие и прогрессирование рака легкого и АКЛ, в частности [174]. В настоящей работе была исследована прогностическая значимость совокупности клинко-патологических признаков и белков контроля качества митохондрий, включая BNIP3 (димерная и мономерная формы), Drp1, PINK1, BNIP3/NIX, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4, у пациентов с АКЛ. Помимо этого, была детально изучена роль одного из участников митофагии, белка BNIP3, функция которого зависит от типа рака и факторов опухолевого микроокружения.

В связи с тем, что в имеющихся исследованиях, посвященных оценке уровня белков контроля качества митохондрий у пациентов с АКЛ, часто представлены достаточно противоречивые данные [66], в рамках настоящей работы были собраны и проанализированы образцы как нормальной, так и опухолевой тканей, что позволило релевантно оценить изменение уровня изучаемых белков у каждого конкретного пациента с данным типом рака легкого. В ходе исследования выяснилось, что уровни димеров и мономеров BNIP3, а также GPX4 были статистически повышены в опухолевых тканях пациентов по сравнению с соответствующими нормальными (рис. 11, а). Развитие солидных опухолей непременно сопровождается гипоксией, что связано с быстрым ростом злокачественного образования, который опережает ангиогенез и, как следствие, приводит к ограниченному поступлению кислорода в ткань. Промотор *BNIP3* содержит элементы HRE, и его экспрессия

активируется в условиях гипоксии. Действительно, взаимное увеличение уровней BNIP3 и HIF-1 α продемонстрировано в тканях пациентов с НМРЛ с помощью иммуногистохимии [175]. Более того, предполагается, что индуцированная гипоксией экспрессия BNIP3 способствует некрозу опухоли [131]. Некроз с помощью внутриклеточных сигналов, включая молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждением (DAMPs – damage-associated molecular patterns), способствует росту опухоли [176]. Помимо положительного влияния на некроз, BNIP3 отрицательно регулирует апоптоз. BNIP3 может транслоцироваться в ядро и подавлять экспрессию *AIF*, что предотвращает гибель клеток и, как следствие, демонстрирует его онкогенную функцию [177]. Эти данные согласуются с результатами, полученными в ходе настоящей работы на клеточных линиях АКЛ с нокаутом и нокдауном BNIP3. Подавление BNIP3 приводило к усилению цисплатин-индуцированного апоптоза по сравнению с клетками дикого типа [101]. Более подробно, эти результаты будут обсуждены ниже. Таким образом, повышенный уровень BNIP3 может быть объяснен гипоксией, некрозом ткани и негативной регуляцией апоптоза в тканях АКЛ по сравнению с образцами нормы.

Помимо усиления экспрессии генов, содержащих HRE, гипоксия стимулирует накопление АФК, что приводит к окислительному стрессу. Антиоксидантные белки активируются для преодоления разрушительного воздействия АФК. В частности, GPX4 конвертирует гидроперекиси липидов в липидные спирты, предотвращая образование токсичных липидных АФК. Оверэкспрессия GPX4 препятствует гибели клеток, вызванной окислительным стрессом в мышинной модели, что демонстрирует GPX4 в качестве онкогенного белка [178]. Более того, нокдаун GPX4 приводит к усилению апоптоза и ингибирует пролиферацию нормальных и раковых клеток [179–181]. Таким образом, оверэкспрессия GPX4, возможно, связана с избыточной продукцией АФК, снижением апоптоза и усилением пролиферации в опухолевых тканях по сравнению с неопухолевыми.

Уровни большинства изучаемых белков, а именно BNIP3 (димерная и мономерная формы), Drp1, PINK1, BNIP3/NIX, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4, напрямую коррелируют друг с другом, демонстрируя их совместное действие в поддержании здоровой популяции митохондрий. Всего две обратные корреляции были обнаружены между PINK1 и Drp1, а также между PINK1 и GPX4 (рис. 11, б). Действительно, уровни белков PINK1 и Drp1 могут отрицательно коррелировать, что было показано на клеточной линии с нокдауном PINK1 и гетерозиготной модели мышей Drp1^{+/-} [182,183]. Эти данные потенциально объясняются взаимозаменяемой экспрессией PINK1 и Drp1 для возмещения функций друг друга и поддержания целостности митохондрий. Отрицательная корреляция PINK1 и GPX4 объясняется их участием в метаболизме железа и ферроптозе. Рецептор трансферрина TFR (transferrin receptor) регулирует поступление железа клетками, при этом избыточный приток железа способен вызывать окислительный стресс, в частности перекисное окисление липидов, приводя сначала к запуску PINK1-зависимой митофагии, а затем и к ферроптозу. Процесс ферроптоза регулируется белком ACSL4, который усиливает деградацию GPX4 [184]. Известно, что многие опухоли характеризуются увеличенным уровнем рецептора трансферрина TFR, экспрессия которого запускается протоонкогеном с-Мус, а также HIF-1 α [185]. Следовательно, обратная корреляция между PINK1 и GPX4, возможно, опосредуется повышенным поступлением железа, ассоциированного с гипоксией.

При прогрессии опухолевых заболеваний уровень белков, контролирующих качество митохондрий, может меняться, помогая раковым клеткам приспосабливаться к изменяющимся условиям микроокружения. В связи с этим, в ходе данного исследования были выявлены ассоциации между уровнями белков BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP3/NIX, Mfn2, Sirtuin3, GPX4 с размером и локализацией первичной опухоли (T), с наличием метастаз в лимфатических узлах (N), а также со

стадией заболевания (рис. 12). Результаты показали, что уровень Sirtuin3 статистически значимо повышен у пациентов с первичной опухолью размером от 1 до 5 см в наибольшем измерении и/или локализацией, характерной для T1-2, а также у больных АКЛ с метастазами в лимфатических узлах (N1-2). Следовательно, повышение уровня Sirtuin3 характерно для метастазирующих АКЛ, клетки которых распространяются в лимфатические узлы, не образуя обширный первичный очаг опухоли. Роль Sirtuin3 в метастазировании неоднозначна и зависит от типа злокачественной опухоли. При раке предстательной железы Sirtuin3 подавляет процессы ЭМП и метастазирование через регуляцию транскрипционного фактора FOXO3A и сигнального пути Wnt/ β -катенин [186]. Однако, при раке яичника Sirtuin3, модулируя активность супероксиддисмутазы 2 и гликолиз, способствует выживаемости открепившихся от первичной опухоли клеток и их распространению [187]. При раке легкого и, в частности НМРЛ, сведения о корреляции уровня Sirtuin3 и наличии метастаз в лимфатических узлах противоречат друг другу [188,189], что может быть связано с отсутствием в исследованиях для каждого пациента наличием неопухолевых тканей, соответствующих опухолевому, а также с тем, что в выборку входили пациенты с различными типами рака легкого.

Как и Sirtuin3, уровень BNIP3/NIX был увеличен у пациентов с метастазами в лимфатических узлах (N1-2). Повышение уровня BNIP3/NIX обнаруживается в метастазах мышинной модели рака поджелудочной железы [190]. Известно, что экспрессия BNIP3/NIX регулируется транскрипционным фактором HIF-1 α , который модулирует гликолиз и окислительный стресс, стимулируя выживаемость открепившихся клеток и метастазирование [191].

Помимо Sirtuin3 и BNIP3/NIX, в ходе исследования была выявлена корреляция между повышением уровня димерной формы BNIP3 и 1-2 стадиями у пациентов с АКЛ. Кроме того, статистически значимое увеличение уровня GPX4 обнаружено у пациентов с T1-2. Данный эффект не сохранялся на поздних стадиях опухолевых процессов (3-4 стадии и T3-4), что может

объясняться неоднозначным действием BNIP3-зависимой митофагии и GPX4-регулируемого окислительного стресса на разных этапах канцерогенеза. На ранних неопластических стадиях антиоксидантная активность клетки снижена, что приводит к аккумуляции АФК, которые могут способствовать опухолеобразованию через окислительное повреждение и мутации в проонкогенах и генах-супрессорах опухолей, таких как *RAS* и *TP53*, соответственно [192]. В конечном счете, в только сформировавшейся опухоли развивается окислительный стресс, ведущий, вероятно, к опосредованному повреждению митохондрий, что потенциально способно активировать BNIP3-зависимую митофагию и запускать экспрессию белков-антиоксидантов, в том числе GPX4. В то время как, на более поздних стадиях рака легкого образуются различные популяции клеток, в которых уровень данных белков может отличаться в разных участках опухоли.

Одной из важных задач современной онкологии является усовершенствование, в том числе с помощью молекулярных факторов, способов прогнозирования выживаемости пациентов. В данной работе было обнаружено, что повышенные уровни Sirtuin3 и димерной формы BNIP3 в опухоли были ассоциированы с положительным прогнозом выживаемости больных с АКЛ (таблица 8). В связи с тем, что после хирургического лечения пациенты исследуемой выборки подвергались химиотерапевтическому лечению, можно предположить, что увеличение времени жизни больных ассоциировано с чувствительностью к препаратам опухолевых клеток, имеющих повышенные уровни Sirtuin3 и димерной формы BNIP3. Это согласуется с имеющимися данными о том, что оверэкспрессия Sirtuin3 подавляет резистентность клеток рака легкого к цисплатину, снижая их выживаемость. Тогда как, подавление Sirtuin3 уменьшало уровень расщепленной формы каспазы-3 при индукции цисплатином [193].

Роль BNIP3 в процессах ПГК и его влияние на выживаемость пациентов неоднозначны. Выявленная корреляция между повышением уровня BNIP3 и

положительным прогнозом пациентов с АКЛ (таблица 8) согласуется с данными при раке поджелудочной железы, где уменьшение экспрессии BNIP3 способствовало развитию резистентности и было ассоциировано с худшим прогнозом выживаемости [194]. Однако, эта тенденция противоречит результатам, полученными в рамках настоящей работы, когда нокаут и нокдаун BNIP3 сенситизировал клетки АКЛ к цисплатин-индуцированному апоптозу [101]. Можно предположить, что радикальное подавление BNIP3 методами нокаута и нокдауна приводит к существенной дестабилизации митохондрий, что делает дефицитные по BNIP3 клетки более чувствительными к индукции апоптоза цисплатином. В то время как повышение уровня данного белка в опухолевых тканях пациентов уменьшает риск смерти, вероятно, за счет улучшения функций митофагии и поддержания должного функционирования митохондрий.

В ходе исследования, единственным белком, чей повышенный уровень в опухоли негативно влиял на выживаемость, был Drp1 (таблица 8). Этот результат согласуется с имеющимися данными о корреляции гиперэкспрессии Drp1 с понижением выживаемости пациентов с АКЛ в отличие от плоскоклеточной карциномы, при которой Drp1 не сказывался на риске смерти [195]. Данное явление подтверждается эффектами, полученными при подавлении Drp1, которые индуцировали апоптоз опухолевых клеток. Drp1-опосредованное дробление митохондрий необходимо для правильного прохождения клеточного цикла. Отсутствие должного митохондриального дробления усиливает стресс при репликации, приводя к задержке G2/M, хромосомной нестабильности и повреждению ДНК, что, в конечном итоге, тормозит деление клеток и запускает апоптоз [195]. Таким образом, при повышении уровня Drp1, вероятно, в клетках АКЛ не происходит торможение апоптоза даже при наличии дефектов, что может стимулировать рост и формирование более агрессивной опухоли, снижая выживаемость пациентов.

Помимо молекулярных факторов, клинико-патологические признаки, в том числе возраст и стадия, оказывают влияние на выживаемость пациентов (таблица 9). Больные АКЛ возрастом старше 65 лет имели повышенный риск смерти, что согласуется с имеющимися данными об учащении послеоперационных осложнений и наличии сопутствующих заболеваний с увеличением возраста, что в совокупности негативно сказывается на выживаемости онкологических пациентов [196]. Кроме возраста, 3 и 4 стадии связаны с понижением выживаемости больных АКЛ, что также соответствует существующим сведениям о развитии симптомов, ассоциированных с синдромом анорексии-кахексии (потеря веса, анорексия, дисфагия и ксеростомия), одышкой и некоторыми биологическими факторами (лейкоцитоз, лимфоцитопения и увеличение титра С-реактивного белка), которые неблагоприятно влияют на прогноз выживаемости пациентов с поздними стадиями опухолевого процесса [197]. Более того, в рамках диссертационной работы было показано, что наилучшей прогностической достоверностью обладает совокупность признаков, а именно стадии, возраст и объединенный индекс риска в зависимости от уровней Sirtuin3, димерной формы BNIP3 и Drp1. Стоит отметить, хотя вестерн блот анализ не распространён в клинико-лабораторной практике, он позволяет оценить посттрансляционные модификации белков, в том числе их димеризованные формы, изменение уровня которых обладает предсказательной способностью, как было показано в работе. Это служит предпосылкой для потенциального рассмотрения данного метода в диагностических целях. Предложенная в исследовании номограмма на основе совокупности изученных факторов позволит онкологам рассмотреть новые подходы для более эффективного прогнозирования выживаемости и персонализировать подходы к лечению пациентов с АКЛ.

В связи с тем, что уровень участника митофагии, BNIP3, был повышен в опухолевой ткани пациентов с АКЛ, возник вопрос: к чему может привести

выключение данного белка? Клетки, нокаутные по BNIP3, имели уменьшенный уровень митохондриального дыхания по сравнению с клетками дикого типа вследствие того, что «неисправные» митохондрии не элиминировались из них (рис. 15 г, д). Кроме этого, дефицитные по BNIP3 клетки характеризовались снижением уровня митохондриальных белков, ассоциированных с поддержанием качества этих органелл, а именно митохондриальной экзонуклеазы MGME1 и АДФ-рибозогликогидролазы MACROD1 (рис. 16). Помимо этого, клетки дефицитные по BNIP3 характеризовались пониженным уровнем белков, ответственных за метаболизм ксенобиотиков, а именно УДФ-глюкуронозилтрансфераза 1A9, УДФ-глюкуронозилтрансфераза 1-6 и цитохром P450 4F11 (рис. 16). Таким образом, снижение данных белков потенциально приводит к увеличению чувствительности клеток к различным агентам, в том числе и химиотерапевтическим препаратам.

Протеомный профиль клеток A549 дефицитных по BNIP3 дал основание предположить их потенциальную чувствительность к метаболизму химиотерапевтических препаратов, а также к поддержанию здоровой популяции митохондрий, что может сказываться на митохондриальном пути апоптоза. В связи с тем, что одним из препаратов, широко используемых в послеоперационном лечении АКЛ, является цисплатин, для проверки чувствительности данной клеточной линии к индукции апоптоза был выбран именно этот ДНК-повреждающий агент.

Действительно, нокаут и нокадаун по BNIP3 и, как следствие, угнетение BNIP3-регулируемой митофагии, значимо стимулировали выход цитохрома *c* из митохондрий в условиях индукции цисплатином (рис. 17, а-г). Это усиливало каспазную активность, которая оценивалась как непосредственно, так и по уровню расщепления одной из мишеней каспазы-3 – PARP и накоплению фрагмента p89 PARP, в нокаутной линии по сравнению с диким типом (рис. 18).

Стоит отметить, что результаты, показанные на клетках АКЛ, согласуются с данными, полученными как на опухолевых, так и на нормальных клетках [198–200]. Клетки с поврежденными митохондриями и сниженным уровнем дыхания, более чувствительны к стимуляции апоптоза, что объясняется дестабилизацией ЭТЦ и упрощению выхода цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму [201–203]. Известно, что выход цитохрома *c* ведет к угнетению переноса электронов и их утечке из дыхательной цепи с образованием супероксидного радикала [204]. В рамках данной работы BNIP3 приводил к аккумуляции мтАФК в результате как блокирования ЭТЦ, так и подавленной митофагии (рис. 17, д, е). В ряде исследований было показано, что накопление АФК усиливает ПГК, в том числе и апоптоз [205–207].

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак легкого является ведущей причиной онкологической смертности во всем мире. В последние годы заболеваемость АКЛ неуклонно росла, приводя к тому, что АКЛ стала наиболее распространенным типом НМРЛ. Таким образом, существует необходимость усовершенствовать модель для прогнозирования развития АКЛ, чтобы разработать более эффективные стратегии диагностики и лечения данной патологии.

В ходе диссертационной работы, был оценен уровень белков контроля качества митохондрий (BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP3L/NIX, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4) в опухолевых и нормальных тканях у 80 пациентов с АКЛ. Димерная и мономерная формы BNIP3, а также GPX4 были повышены в опухолевых образцах. Кроме этого, было исследовано влияние изучаемых белков и клинико-патологических признаков (TNM, дифференцировки, стадий, пола, возраста и ПМЗО) на выживаемость пациентов с АКЛ. Изменение уровней димерной формы BNIP3, Sirtuin3 и Drp1 в опухоли по сравнению с нормальной тканью, а также возраст и стадии по отдельности и совместно влияли на выживаемость больных. На основе полученных данных была разработана номограмма для предсказания 1-, 3- и 5-летней выживаемости пациентов с АКЛ.

В рамках исследования была изучена роль белка BNIP3. Подавление BNIP3 приводило к появлению поврежденных митохондрий, более чувствительных к деструктивным изменениям, в процессе цисплатин-индуцированного апоптоза. Это облегчало выход цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму, усиливая последующие этапы апоптозного каскада, в частности активацию каспазы-3 и расщепление PARP.

Учитывая значимость BNIP3 в регуляции канцерогенеза, процессах ПГК и митофагии, полученные в данной диссертационной работе результаты позволяют внести вклад в усовершенствование подходов противоопухолевой терапии АКЛ.

ВЫВОДЫ

- 1) Клеточные линии АКЛ, дефицитные по белку BNIP3, имеют повышенную чувствительность к апоптозу, индуцированному цисплатином, по сравнению с диким типом.
- 2) Уровни димерной и мономерной форм BNIP3, а также GPX4 повышены в опухолевых образцах АКЛ по сравнению с неопухолевыми.
- 3) Уровни Sirtuin3 и GPX4 были увеличены у пациентов с T1-2. Повышение уровней Sirtuin3 и BNIP3/NIX коррелировали с наличием метастаз в лимфатических узлах. Повышение количества димерной формы BNIP3 выявлялось у пациентов с 1 и 2 стадиями.
- 4) На основе индексов риска в зависимости от уровней BNIP3, Sirtuin3 и Drp1, а также возраста и стадий была разработана модель для прогнозирования выживаемости пациентов с АКЛ.

Приложение 1. Белки, чей уровень понижался при нокауте BNIP3 согласно масс-спектрометрическому анализу.

№	Название белка
1	ATPase family AAA domain-containing protein 2
2	Annexin A10
3	Ethylmalonyl-CoA decarboxylase
4	UDP-glucuronosyltransferase 1A9
5	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex assembly factor 2
6	Growth arrest and DNA damage-inducible proteins-interacting protein 1
7	UDP-glucuronosyltransferase 1-6
8	DAZ-associated protein 1
9	Neurabin-2
10	Cytochrome P450 4F11
11	Pyruvate dehydrogenase phosphatase regulatory subunit, mitochondrial
12	Receptor-type tyrosine-protein phosphatase eta
13	N-acylneuraminate cytidyltransferase
14	Ribosome-binding protein 1
15	Annexin A6
16	ATP-dependent RNA helicase DDX24
17	ADP-ribose glycohydrolase MACROD1
18	Mitochondrial genome maintenance exonuclease 1
19	Carboxypeptidase D
20	Lysosomal acid glucosylceramidase

21	Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 1A
22	WD repeat-containing protein 46
23	Dipeptidyl peptidase 2
24	Peroxisomal membrane protein PEX14
25	Thiosulfate sulfurtransferase
26	Cathepsin D
27	Acylpyruvase FAHD1, mitochondrial
28	Transcription intermediary factor 1-beta
29	Cluster of Serine/arginine-rich splicing factor 2
30	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 1
31	Selenocysteine lyase

Приложение 2. Белки, чей уровень повышался при нокауте BNIP3 согласно масс-спектрометрическому анализу.

№	Название белка
1	Elongation factor 1-gamma
2	Cysteine and histidine-rich domain-containing protein 1
3	60S ribosomal protein L8
4	Protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2
5	Radixin
6	Purine nucleoside phosphorylase
7	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sung H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2021. – Т. 71, № 3. – С. 209–249.
2. Barta J.A., Powell C.A., Wisnivesky J.P. Global Epidemiology of Lung Cancer // *Annals of Global Health*. – 2019. – Т. 85, № 1.
3. Gorbunova A.S. et al. BNIP3 in Lung Cancer: To Kill or Rescue? // *Cancers (Basel)*. – 2020. – Т. 12, № 11. – С. 3390.
4. Lee P.N. et al. Time trends in never smokers in the relative frequency of the different histological types of lung cancer, in particular adenocarcinoma // *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. – 2016. – Т. 74. – С. 12–22.
5. Chen H.J. et al. Long-term survival of advanced lung adenocarcinoma by maintenance chemotherapy followed by EGFR-TKI // *Medicine*. – 2021. – Т. 100, № 6. – С. e24688.
6. Cunha J.P. Is Adenocarcinoma of the Lung an Aggressive Cancer? [Электронный ресурс] // eMedicineHealth. – 2021. URL: https://web.archive.org/web/20220321083027/https://www.emedicinehealth.com/is_a_denocarcinoma_of_the_lung_an_aggressive_cancer/article_em.htm (Дата обращения: 21.03.2022).
7. Zhang L. et al. Time Trends in Epidemiologic Characteristics and Imaging Features of Lung Adenocarcinoma: A Population Study of 21,113 Cases in China // *PLOS ONE*. – 2015. – Т. 10, № 8. – С. e0136727.
8. dela Cruz C.S., Tanoue L.T., Matthay R.A. Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and Prevention // *Clinics in Chest Medicine*. – 2011. – Т. 32, № 4. – С. 605–644.
9. Denisenko T. v., Budkevich I.N., Zhivotovsky B. Cell death-based treatment of lung adenocarcinoma // *Cell Death & Disease*. – 2018. – Т. 9, № 2. – С. 117.
10. Sharma S. v. et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer // *Nature Reviews Cancer*. – 2007. – Т. 7, № 3. – С. 169–181.

11. Li A.R. et al. EGFR Mutations in Lung Adenocarcinomas // *The Journal of Molecular Diagnostics*. – 2008. – T. 10, № 3. – C. 242–248.
12. Yoon H.-Y. et al. Clinical significance of EGFR mutation types in lung adenocarcinoma: A multi-centre Korean study // *PLOS ONE*. – 2020. – T. 15, № 2. – C. e0228925.
13. Riely G.J., Marks J., Pao W. KRAS Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer // *Proc Am Thorac Soc*. – 2009. – T. 6, № 2. – C. 201–205.
14. Ghimessy A. et al. Current therapy of KRAS-mutant lung cancer // *Cancer and Metastasis Reviews*. – 2020. – T. 39, № 4. – C. 1159–1177.
15. Guibert N. et al. KRAS Mutations in Lung Adenocarcinoma: Molecular and Epidemiological Characteristics, Methods for Detection, and Therapeutic Strategy Perspectives // *Current Molecular Medicine*. – 2015. – T. 15, № 5. – C. 418–432.
16. Colombino M. et al. EGFR, KRAS, BRAF, ALK, and cMET genetic alterations in 1440 Sardinian patients with lung adenocarcinoma // *BMC Pulmonary Medicine*. – 2019. – T. 19, № 1. – C. 209.
17. Socinski M.A., Pennell N.A., Davies K.D. MET Exon 14 Skipping Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: An Overview of Biology, Clinical Outcomes, and Testing Considerations // *JCO Precision Oncology*. – 2021. № 5. – C. 653–663.
18. Tsuta K. et al. c-MET/Phospho-MET Protein Expression and MET Gene Copy Number in Non-small Cell Lung Carcinomas // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2012. – T. 7, № 2. – C. 331–339.
19. Lei H. et al. EGFR mutation is positively correlated with C-Met protein expression: a study of 446 resected lung adenocarcinoma // *Translational Cancer Research*. – 2021. – T. 10, № 1. – C. 233–240.
20. Sabir S. et al. EML4-ALK Variants: Biological and Molecular Properties, and the Implications for Patients // *Cancers (Basel)*. – 2017. – T. 9, № 9. – C. 118.
21. Kwak E.L. et al. Anaplastic Lymphoma Kinase Inhibition in Non-Small-Cell Lung Cancer // *New England Journal of Medicine*. – 2010. – T. 363, № 18. – C. 1693–1703.

22. Wu S.-G. et al. EML4-ALK Translocation Predicts Better Outcome in Lung Adenocarcinoma Patients with Wild-Type EGFR // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2012. – Т. 7, № 1. – С. 98–104.
23. Hu Y., Chen G. Pathogenic mechanisms of lung adenocarcinoma in smokers and non-smokers determined by gene expression interrogation // *Oncology Letters*. – 2015. – Т. 10, № 3. – С. 1350–1370.
24. Tang M. et al. Electronic-cigarette smoke induces lung adenocarcinoma and bladder urothelial hyperplasia in mice // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2019. – Т. 116, № 43. – С. 21727–21731.
25. Schuller H.M., Porter B., Riechert A. Beta-adrenergic modulation of NNK-induced lung carcinogenesis in hamsters // *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. – 2000. – Т. 126, № 11. – С. 624–630.
26. Kim C.H. et al. Secondhand Tobacco Smoke Exposure and Lung Adenocarcinoma In Situ/Minimally Invasive Adenocarcinoma (AIS/MIA) // *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. – 2015. – Т. 24, № 12. – С. 1902–1906.
27. Lee W. et al. The association between smoking or passive smoking and cardiovascular diseases using a Bayesian hierarchical model: based on the 2008-2013 Korea Community Health Survey // *Epidemiology and Health*. – 2017. – Т. 39. – С. e2017026.
28. Asthma Initiative of Michigan. Tobacco Smoke, E-cigarettes and Asthma [Электронный ресурс]. URL: <https://web.archive.org/web/20220506192715/https://getastmahelp.org/asthma-tobacco.aspx> (Дата обращения: 06.05.2022).
29. Korsbæk N., Landt E., Dahl M. Second-Hand Smoke Exposure Associated with Risk of Respiratory Symptoms, Asthma, and COPD in 20,421 Adults from the General Population // *Journal of Asthma and Allergy*. – 2021. – Т. Volume 14. – С. 1277–1284.
30. Huang Y. et al. Air Pollution, Genetic Factors, and the Risk of Lung Cancer: A Prospective Study in the UK Biobank // *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. – 2021. – Т. 204, № 7. – С. 817–825.

31. Groen H.J.M., Hiltermann T.J.N. Air Pollution and Adenocarcinoma in Never-Smokers // *Journal of Thoracic Oncology*. – 2019. – T. 14, № 5. – C. 761–763.
32. Lubin J.H., Boice J.D. Lung Cancer Risk From Residential Radon: Meta-analysis of Eight Epidemiologic Studies // *JNCI Journal of the National Cancer Institute*. – 1997. – T. 89, № 1. – C. 49–57.
33. Li C. et al. Residential Radon and Histological Types of Lung Cancer: A Meta-Analysis of Case–Control Studies // *International Journal of Environmental Research and Public Health*. – 2020. – T. 17, № 4. – C. 1457.
34. Cohen A.J. et al. Estimates and 25-year trends of the global burden of disease attributable to ambient air pollution: an analysis of data from the Global Burden of Diseases Study 2015 // *The Lancet*. – 2017. – T. 389, № 10082. – C. 1907–1918.
35. Pope III C.A. Lung Cancer, Cardiopulmonary Mortality, and Long-term Exposure to Fine Particulate Air Pollution // *JAMA*. – 2002. – T. 287, № 9. – C. 1132.
36. Mollo F. et al. Lung adenocarcinoma and indicators of asbestos exposure // *International Journal of Cancer*. – 2006. – T. 60, № 3. – C. 289–293.
37. Ma L. et al. *SDK1-ALK Fusion in a Lung Adenocarcinoma Patient With Excellent Response to ALK Inhibitor Treatment: A Case Report* // *Frontiers in Oncology*. – 2022. – T. 12.
38. Yu Y.-H. et al. Increased lung cancer risk among patients with pulmonary tuberculosis: a population cohort study. // *J Thorac Oncol*. – 2011. – T. 6, № 1. – C. 32–37.
39. Brenner D.R. et al. Previous Lung Diseases and Lung Cancer Risk: A Pooled Analysis From the International Lung Cancer Consortium // *American Journal of Epidemiology*. – 2012. – T. 176, № 7. – C. 573–585.
40. Qu Y.-L. et al. Asthma and the risk of lung cancer: a meta-analysis // *Oncotarget*. – 2017. – T. 8, № 7. – C. 11614–11620.
41. Tan Z. et al. The Role of Tumor Inflammatory Microenvironment in Lung Cancer // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – T. 12. – C. 688625.
42. Brown D.W. et al. Asthma and Risk of Death from Lung Cancer: NHANES II Mortality Study // *Journal of Asthma*. – 2005. – T. 42, № 7. – C. 597–600.

43. Jian Z.-H. et al. Impact of coexisting pulmonary diseases on survival of patients with lung adenocarcinoma: a STROBE-compliant article. // *Medicine*. – 2015. – T. 94, № 4. – C. e443.
44. Florou A.N. et al. Clinical significance of smoking cessation in subjects with cancer: a 30-year review. // *Respir Care*. – 2014. – T. 59, № 12. – C. 1924–1936.
45. Aguilar A. et al. Impact of Targeted Therapy on the Survival of Patients With Advanced-Stage Non-small Cell Lung Cancer in Oncosalud - AUNA // *Cancer Control*. – 2022. – T. 29. – C. 107327482110686.
46. Yuan M. et al. The emerging treatment landscape of targeted therapy in non-small-cell lung cancer // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2019. – T. 4, № 1. – C. 61.
47. Saito M. et al. Treatment of lung adenocarcinoma by molecular-targeted therapy and immunotherapy // *Surgery Today*. – 2018. – T. 48, № 1. – C. 1–8.
48. Wu Y.-L. et al. Osimertinib in Resected EGFR-Mutated Non-Small-Cell Lung Cancer // *New England Journal of Medicine*. – 2020. – T. 383, № 18. – C. 1711–1723.
49. Kuang Y. et al. A rapid and durable response to cabozantinib in an osimertinib-resistant lung cancer patient with MET D1228N mutation: a case report // *Annals of Translational Medicine*. – 2021. – T. 9, № 16. – C. 1354–1354.
50. Nakajima E.C. et al. FDA Approval Summary: Sotorasib for KRAS G12C-Mutated Metastatic NSCLC // *Clinical Cancer Research*. – 2021. – T. 28, № 8. – C. 1482-1486.
51. Pan Y. et al. The Resistance Mechanisms and Treatment Strategies for ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer // *Frontiers in Oncology*. – 2021. – T. 11. – C. 713530.
52. Rozali E.N. et al. Programmed Death Ligand 2 in Cancer-Induced Immune Suppression // *Clinical and Developmental Immunology*. – 2012. – T. 2012. – C. 1–8.
53. Pawelczyk K. et al. Role of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer and Their Prognostic Significance according to Clinicopathological Factors and

Diagnostic Markers // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – T. 20, № 4. – C. 824.

54. Shimoji M. et al. Clinical and pathologic features of lung cancer expressing programmed cell death ligand 1 (PD-L1) // Lung Cancer. – 2016. – T. 98. – C. 69–75.

55. Al-Showbaki L. et al. Network Meta-analysis Comparing Efficacy, Safety and Tolerability of Anti-PD-1/PD-L1 Antibodies in Solid Cancers // J Cancer. – 2021. – T. 12, № 14. – C. 4372–4378.

56. Pardoll D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy // Nature Reviews Cancer. – 2012. – T. 12, № 4. – C. 252–264.

57. Onoi K. et al. Immune Checkpoint Inhibitors for Lung Cancer Treatment: A Review // Journal of Clinical Medicine. – 2020. – T. 9, № 5. – C. 1362.

58. Zhong A. et al. Prognostic value of programmed cell death-ligand 1 expression in patients with non-small-cell lung cancer: evidence from an updated meta-analysis // OncoTargets and Therapy. – 2015. – C. 3595.

59. Cooper W.A. et al. PD-L1 expression is a favorable prognostic factor in early stage non-small cell carcinoma // Lung Cancer. – 2015. – T. 89, № 2. – C. 181–188.

60. Zhou C. et al. PD-L1 expression as poor prognostic factor in patients with non-squamous non-small cell lung cancer // Oncotarget. – 2017. – T. 8, № 35. – C. 58457–58468.

61. Takamochi K. et al. Clinical relevance of PD-L2 expression in surgically resected lung adenocarcinoma // Lung Cancer. – 2022. – T. 168. – C. 50–58.

62. Sumitomo R. et al. Differential expression of PD-L1 and PD-L2 is associated with the tumor microenvironment of TILs and M2 TAMs and tumor differentiation in non-small cell lung cancer // Oncology Reports. – 2022. – T. 47, № 4. – C. 73.

63. Miao Y.R. et al. Neutralization of PD-L2 is Essential for Overcoming Immune Checkpoint Blockade Resistance in Ovarian Cancer // Clinical Cancer Research. – 2021. – T. 27, № 15. – C. 4435–4448.

64. Gogvadze V., Zhivotovsky B., Orrenius S. The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells // Molecular Aspects of Medicine. – 2010. – T. 31, № 1. – C. 60–74.

65. Trotta A.P., Chipuk J.E. Mitochondrial dynamics as regulators of cancer biology // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2017. – T. 74, № 11. – C. 1999–2017.
66. Vara-Perez M., Felipe-Abrio B., Agostinis – C. Mitophagy in Cancer: A Tale of Adaptation // *Cells*. – 2019. – T. 8, № 5. – C. 493.
67. Pizzino G. et al. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2017. – T. 2017. – C. 1–13.
68. Hayes J.D., Dinkova-Kostova A.T., Tew K.D. Oxidative Stress in Cancer // *Cancer Cell*. – 2020. – T. 38, № 2. – C. 167–197.
69. Imai H. et al. Lipid Peroxidation-Dependent Cell Death Regulated by GPx4 and Ferroptosis. – 2016. – C. 143–170.
70. Bause A.S., Haigis M.C. SIRT3 regulation of mitochondrial oxidative stress // *Experimental Gerontology*. – 2013. – T. 48, № 7. – C. 634–639.
71. Pizzino G. et al. Oxidative stress and DNA repair and detoxification gene expression in adolescents exposed to heavy metals living in the Milazzo-Valle del Mela area (Sicily, Italy) // *Redox Biology*. – 2014. – T. 2. – C. 686–693.
72. Gill J.G., Piskounova E., Morrison S.J. Cancer, Oxidative Stress, and Metastasis // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. – 2016. – T. 81. – C. 163–175.
73. Zhang J. et al. ROS and ROS-Mediated Cellular Signaling // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – T. 2016. – C. 1–18.
74. Han Y.K. et al. Cisplatin induces lung cell cilia disruption and lung damage via oxidative stress // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2021. – T. 177. – C. 270–277.
75. van der Bliek A.M., Shen Q., Kawajiri S. Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2013. – T. 5, № 6. – C. a011072–a011072.
76. Wasiak S., Zunino R., McBride H.M. Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death // *Journal of Cell Biology*. – 2007. – T. 177, № 3. – C. 439–450.

77. Wang J.X., Li Q., Li P.F. Apoptosis repressor with caspase recruitment domain contributes to chemotherapy resistance by abolishing mitochondrial fission mediated by dynamin-related protein-1 // *Cancer Research*. – 2009. – T. 69, № 2. – C. 492–500.
78. Denisenko T. V., Gorbunova A.S., Zhivotovsky B. Mitochondrial Involvement in Migration, Invasion and Metastasis // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2019. – T. 7. – C. e355.
79. Campello S. et al. Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics // *Journal of Experimental Medicine*. – 2006. – T. 203, № 13. – C. 2879–2886.
80. Zhao J. et al. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells // *Oncogene*. – 2013. – T. 32, № 40. – C. 4814–4824.
81. Anderson G.R. et al. Dysregulation of mitochondrial dynamics proteins are a targetable feature of human tumors // *Nature Communications*. – 2018. – T. 9, № 1. – C. 1677.
82. Lima A.R. et al. Dynamin-Related Protein 1 at the Crossroads of Cancer // *Genes (Basel)*. – 2018. – T. 9, № 2. – C. 115.
83. Dong L., Neuzil J. Targeting mitochondria as an anticancer strategy // *Cancer Communications*. – 2019. – T. 39, № 1. – C. 63.
84. Rohlenova K. et al. Selective Disruption of Respiratory Supercomplexes as a New Strategy to Suppress Her2 Breast Cancer // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2017. – T. 26, № 2. – C. 84–103.
85. Dong L.-F. et al. Mitochondrial targeting of α -tocopheryl succinate enhances its pro-apoptotic efficacy: A new paradigm for effective cancer therapy // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2011. – T. 50, № 11. – C. 1546–1555.
86. Ghosh – C. et al. Mitochondria Targeting as an Effective Strategy for Cancer Therapy // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2020. – T. 21, № 9. – C. 3363.

87. Lim S.C., Carey K.T., McKenzie M. Anti-cancer analogues ME-143 and ME-344 exert toxicity by directly inhibiting mitochondrial NADH: ubiquinone oxidoreductase (Complex I). // *Am J Cancer Res.* – 2015. – T. 5, № 2. – C. 689–701.
88. Quintela-Fandino M. et al. Randomized Phase 0/I Trial of the Mitochondrial Inhibitor ME-344 or Placebo Added to Bevacizumab in Early HER2-Negative Breast Cancer // *Clinical Cancer Research.* – 2020. – T. 26, № 1. – C. 35–45.
89. Andrzejewski S. et al. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics // *Cancer & Metabolism.* – 2014. – T. 2, № 1. – C. 12.
90. Brancher S. et al. Metformin use and lung cancer survival: a population-based study in Norway // *British Journal of Cancer.* – 2021. – T. 124, № 5. – C. 1018–1025.
91. Xiao K. et al. The effect of metformin on lung cancer risk and survival in patients with type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis // *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics.* – 2020. – T. 45, № 4. – C. 783–792.
92. Sayed R. et al. Metformin Addition to Chemotherapy in Stage IV Non-Small Cell Lung Cancer: an Open Label Randomized Controlled Study // *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* – 2015. – T. 16, № 15. – C. 6621–6626.
93. Cui J. et al. Regulated cell death: discovery, features and implications for neurodegenerative diseases // *Cell Communication and Signaling.* – 2021. – T. 19, № 1. – C. 120.
94. Aguilera A. et al. Cell Death in Cyanobacteria: Current Understanding and Recommendations for a Consensus on Its Nomenclature // *Frontiers in Microbiology.* – 2021. – T. 12. – C. e631654.
95. Galluzzi L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // *Cell Death & Differentiation.* – 2018. – T. 25, № 3. – C. 486–541.
96. Gorbunova A.S., Kopeina G.S., Zhivotovsky B. A Balance Between Autophagy and Other Cell Death Modalities in Cancer // *Methods in Molecular Biology (Autophagy in Cancer).* – 2022. – C. 3–24.

97. Singh R., Letai A., Sarosiek K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2019. – Т. 20, № 3. – С. 175–193.
98. Fadok V.A. et al. The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes // *Cell Death & Differentiation*. – 1998. – Т. 5, № 7. – С. 551–562.
99. van Opdenbosch N., Lamkanfi M. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease // *Immunity*. – 2019. – Т. 50, № 6. – С. 1352–1364.
100. Shamas-Din A. et al. Mechanisms of Action of Bcl-2 Family Proteins // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2013. – Т. 5, № 4. – С. a008714–a008714.
101. Горбунова А.С. и др. BNIP3 как регулятор цисплатин-индуцированного апоптоза // *Биохимия*. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1464–1473.
102. Chin H.S. et al. VDAC2 enables BAX to mediate apoptosis and limit tumor development // *Nature Communications*. – 2018. – Т. 9, № 1. – С. 4976.
103. Senichkin V. v. et al. Saga of Mcl-1: regulation from transcription to degradation // *Cell Death & Differentiation*. – 2020. – Т. 27, № 2. – С. 405–419.
104. Первушин Н.В. и др. Деграция Mcl-1 в условиях недостатка питательных веществ происходит независимо от аутофагии // *Биохимия*. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1452–1463.
105. Kopeina G.S., Senichkin V. v., Zhivotovsky B. Caloric restriction - A promising anti-cancer approach: From molecular mechanisms to clinical trials // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. – 2017. – Т. 1867, № 1. – С. 29–41.
106. Candé C. et al. Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all // *Cell Death & Differentiation*. – 2004. – Т. 11, № 6. – С. 591–595.
107. Kehr S., Vogler M. It's time to die: BH3 mimetics in solid tumors // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. – 2021. – Т. 1868, № 5. – С. 118987.
108. Senichkin V. v. et al. Bak and Bcl-xL Participate in Regulating Sensitivity of Solid Tumor Derived Cell Lines to Mcl-1 Inhibitors // *Cancers (Basel)*. – 2021. – Т. 14, № 1. – С. 181.

109. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death // *Toxicologic Pathology*. – 2007. – T. 35, № 4. – C. 495–516.
110. Billen L.P., Shamas-Din A., Andrews D.W. Bid: a Bax-like BH3 protein // *Oncogene*. – 2008. – T. 27, № S1. – C. S93–S104.
111. Scaffidi C. et al. The Role of c-FLIP in Modulation of CD95-induced Apoptosis // *Journal of Biological Chemistry*. – 1999. – T. 274, № 3. – C. 1541–1548.
112. Hitoshi Y. et al. Toso, a Cell Surface, Specific Regulator of Fas-Induced Apoptosis in T Cells // *Immunity*. – 1998. – T. 8, № 4. – C. 461–471.
113. Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptotic pathway in cancer: lessons learned and future directions // *Journal of Clinical Investigation*. – 2015. – T. 125, № 2. – C. 487–489.
114. van Raam B.J. et al. Intrinsic cleavage of receptor-interacting protein kinase-1 by caspase-6 // *Cell Death & Differentiation*. – 2013. – T. 20, № 1. – C. 86–96.
115. Linkermann A., Green D.R. Necroptosis // *New England Journal of Medicine*. – 2014. – T. 370, № 5. – C. 455–465.
116. Dhuriya Y.K., Sharma D. Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death // *Journal of Neuroinflammation*. – 2018. – T. 15, № 1. – C. 199.
117. Mezzatesta C., Bornhauser B.C. Exploiting Necroptosis for Therapy of Acute Lymphoblastic Leukemia // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2019. – T. 7. – C. e40.
118. Maiuri M.C. et al. Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1 // *The EMBO Journal*. – 2007. – T. 26, № 10. – C. 2527–2539.
119. Goodall M.L. et al. The Autophagy Machinery Controls Cell Death Switching between Apoptosis and Necroptosis // *Developmental Cell*. – 2016. – T. 37, № 4. – C. 337–349.
120. Seo J. et al. Beclin 1 functions as a negative modulator of MLKL oligomerisation by integrating into the necrosome complex // *Cell Death & Differentiation*. – 2020. – T. 27, № 11. – C. 3065–3081.

121. Abdrakhmanov A., Gogvadze V., Zhivotovsky B. To Eat or to Die: Deciphering Selective Forms of Autophagy // Trends in Biochemical Sciences. – 2020. – T. 45, № 4. – C. 347–364.
122. Schuck S. Microautophagy – distinct molecular mechanisms handle cargoes of many sizes // Journal of Cell Science. – 2020. – T. 133, № 17. – C. jcs246322.
123. Boya P., Reggiori F., Codogno C. Emerging regulation and functions of autophagy // Nature Cell Biology. Nature Publishing Group. – 2013. – T. 15, № 7. – C. 713–720.
124. Yang Y., Klionsky D.J. Autophagy and disease: unanswered questions // Cell Death & Differentiation. – 2020. – T. 27, № 3. – C. 858–871.
125. Nguyen T.N., Padman B.S., Lazarou M. Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy // Trends in Cell Biology. – 2016. – T. 26, № 10. – C. 733–744.
126. Bernardini J.P., Lazarou M., Dewson G. Parkin and mitophagy in cancer // Oncogene. – 2017. – T. 36, № 10. – C. 1315–1327.
127. Williams J.A., Ding W.-X. Mechanisms, pathophysiological roles and methods for analyzing mitophagy – recent insights // Biological Chemistry. – 2018. – T. 399, № 2. – C. 147–178.
128. Wu L. et al. FUN14 domain-containing 1 promotes breast cancer proliferation and migration by activating calcium-NFATC1-BMI1 axis // EBioMedicine. – 2019. – T. 41. – C. 384–394.
129. Altieri D.C. Mitochondrial dynamics and metastasis // Cellular and Molecular Life Sciences. – 2019. – T. 76, № 5. – C. 827–835.
130. Guo K. et al. Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3 // Cell Death and Differentiation. – 2001. – T. 8, № 4. – C. 367–376.
131. Sowter H.M. et al. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. // Cancer Res. – 2001. – T. 61, № 18. – C. 6669–6673.

132. Bruick R.K. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2000. – T. 97, № 16. – C. 9082–9087.
133. Kamino H. et al. Mieap-regulated mitochondrial quality control is frequently inactivated in human colorectal cancer // *Oncogenesis*. – 2016. – T. 5, № 1. – C. e181–e181.
134. Okami J., Simeone D.M., Logsdon C.D. Silencing of the Hypoxia-Inducible Cell Death Protein BNIP3 in Pancreatic Cancer // *Cancer Research*. – 2004. – T. 64, № 15. – C. 5338–5346.
135. Murai M. et al. Aberrant DNA methylation associated with silencing BNIP3 gene expression in haematopoietic tumours // *British Journal of Cancer*. – 2005. – T. 92, № 6. – C. 1165–1172.
136. Shao Y. et al. Expression and epigenetic regulatory mechanism of BNIP3 in clear cell renal cell carcinoma // *International Journal of Oncology*. – 2018. – C. 348–360.
137. Hanna R.A. et al. Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) Interacts with Bnip3 Protein to Selectively Remove Endoplasmic Reticulum and Mitochondria via Autophagy // *Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – T. 287, № 23. – C. 19094–19104.
138. Rogers S., Wells R., Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. // *Science*. – 1986. – T. 234, № 4774. – C. 364–368.
139. Aouacheria A., Brunet F., Gouy M. Phylogenomics of Life-Or-Death Switches in Multicellular Animals: Bcl-2, BH3-Only, and BNip Families of Apoptotic Regulators // *Molecular Biology and Evolution*. – 2005. – T. 22, № 12. – C. 2395–2416.
140. Yasuda M. et al. Adenovirus E1B-19K/BCL-2 Interacting Protein BNIP3 Contains a BH3 Domain and a Mitochondrial Targeting Sequence // *Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – T. 273, № 20. – C. 12415–12421.

141. Ray R. et al. BNIP3 Heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-XL and Induces Cell Death Independent of a Bcl-2 Homology 3 (BH3) Domain at Both Mitochondrial and Nonmitochondrial Sites // *Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – T. 275, № 2. – C. 1439–1448.
142. Kim J.-Y. et al. The Carboxy Terminal C-Tail of BNip3 Is Crucial in Induction of Mitochondrial Permeability Transition in Isolated Mitochondria // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2002. – T. 398, № 2. – C. 147–152.
143. Vasagiri N., Kutala V.K. Structure, function, and epigenetic regulation of BNIP3: A pathophysiological relevance // *Molecular Biology Reports*. – 2014. – T. 41, № 11. – C. 7705–7714.
144. Chen G. et al. The E1B 19K/Bcl-2-binding Protein Nip3 is a Dimeric Mitochondrial Protein that Activates Apoptosis // *Journal of Experimental Medicine*. – 1997. – T. 186, № 12. – C. 1975–1983.
145. Liu K.E., Frazier W.A. Phosphorylation of the BNIP3 C-terminus inhibits mitochondrial damage and cell death without blocking autophagy // *PLoS ONE*. – 2015. – T. 10, № 6. – C. 1–28.
146. Frazier D.P. et al. Acidosis Regulates the Stability, Hydrophobicity, and Activity of the BH3-Only Protein Bnip3 // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2006. – T. 8, № 9–10. – C. 1625–1634.
147. The Human Protein Atlas [Электронный ресурс]. URL: <https://web.archive.org/web/20201001145147/https://www.proteinatlas.org/ENSG00000176171-BNIP3/pathology/lung+cancer> (Дата обращения: 01.10.2020).
148. Karpathiou G. et al. Autophagy and Bcl-2/BNIP3 death regulatory pathway in non-small cell lung carcinomas // *APMIS*. – 2013. – T. 121, № 7. – C. 592–604.
149. Überall I. et al. The immunohistochemical expression of BNIP3 protein in non-small-cell lung cancer: a tissue microarray study // *APMIS*. – 2010. – T. 118, № 8. – C. 565–570.
150. Giatromanolaki A. et al. BNIP3 Expression Is Linked with Hypoxia-Regulated Protein Expression and with Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer // *Clinical Cancer Research*. – 2004. – T. 10, № 16. – C. 5566–5571.

151. Zhu J., Wang M., Hu D. Development of an autophagy-related gene prognostic signature in lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma // *PeerJ*. – 2020. – T. 8. – C. e8288.
152. Bellot G. et al. Hypoxia-Induced Autophagy Is Mediated through Hypoxia-Inducible Factor Induction of BNIP3 and BNIP3L via Their BH3 Domains // *Molecular and Cellular Biology*. – 2009. – T. 29, № 10. – C. 2570–2581.
153. Chaachouay H. et al. AMPK-independent autophagy promotes radioresistance of human tumor cells under clinical relevant hypoxia in vitro // *Radiotherapy and Oncology*. – 2015. – T. 116, № 3. – C. 409–416.
154. Wu H.-M. et al. Hypoxia-induced autophagy mediates cisplatin resistance in lung cancer cells // *Scientific Reports*. – 2015. – T. 5, № 1. – C. 12291.
155. Munksgaard Persson M. et al. HIF-2 α Expression Is Suppressed in SCLC Cells, Which Survive in Moderate and Severe Hypoxia When HIF-1 α Is Repressed // *The American Journal of Pathology*. – 2012. – T. 180, № 2. – C. 494–504.
156. Seok J.-Y. et al. Upregulation of AMPK by 4-O-methylascochlorin promotes autophagy via the HIF-1 α expression // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2018. – T. 22, № 12. – C. 6345–6356.
157. Jin H.-O. et al. Combined effects of EGFR tyrosine kinase inhibitors and vATPase inhibitors in NSCLC cells // *Toxicology and Applied Pharmacology*. – 2015. – T. 287, № 1. – C. 17–25.
158. Wu H.-M. et al. Gemcitabine-Induced Autophagy Protects Human Lung Cancer Cells from Apoptotic Death // *Lung*. – 2016. – T. 194, № 6. – C. 959–966.
159. Yang X. et al. Hypoxia-induced autophagy promotes gemcitabine resistance in human bladder cancer cells through hypoxia-inducible factor 1 α activation // *International Journal of Oncology*. – 2018. – T. 53, №1. – C. 215–224.
160. Cechakova L. et al. A Potent Autophagy Inhibitor (Lys05) Enhances the Impact of Ionizing Radiation on Human Lung Cancer Cells H1299 // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – T. 20, № 23. – C. 5881.

161. Chung L. et al. Platinum-based combination chemotherapy triggers cancer cell death through induction of BNIP3 and ROS, but not autophagy // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. – 2020. – T. 24, № 2. – C. 1993–2003.
162. Yan J. et al. Upregulation of BNIP3 promotes apoptosis of lung cancer cells that were induced by p53 // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2006. – T. 346, № 2. – C. 501–507.
163. Murray I.A., Patterson A.D., Perdew G.H. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe // *Nature Reviews Cancer*. – 2014. – T. 14, № 12. – C. 801–814.
164. Tsai C.-H. et al. The inhibition of lung cancer cell migration by AhR-regulated autophagy. // *Sci Rep*. – 2017. – T. 7. – C. 41927.
165. He M. et al. In vitro study of FUZ as a novel potential therapeutic target in non-small-cell lung cancer // *Life Sciences*. – 2018. – T. 197. – C. 91–100.
166. Amin M.B. et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging // *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. – 2017. – T. 67, № 2. – C. 93–99.
167. Zhang L. et al. Multiple primary malignant neoplasms: A case report and literature review // *Oncology Letters*. – 2019. – T. 18, №4. – C. 4210-4220.
168. Sharma A. et al. Mitochondrial dynamics and mitophagy in lung disorders // *Life Sciences*. – 2021. – T. 284. – C. 119876.
169. Cole-Ezea – C. et al. Glutathione peroxidase 4 has a major role in protecting mitochondria from oxidative damage and maintaining oxidative phosphorylation complexes in gut epithelial cells // *Free Radical Biology and Medicine*. – 2012. – T. 53, № 3. – C. 488–497.
170. Matsushima M. et al. Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. // *Genes Chromosomes Cancer*. – 1998. – T. 21, № 3. – C. 230–235.

171. Zagryazhskaya A. et al. Tudor staphylococcal nuclease drives chemoresistance of non-small cell lung carcinoma cells by regulating S100A11 // *Oncotarget*. – 2015. – T. 6, № 14. – C. 12156–12173.
172. Marullo R. et al. Cisplatin Induces a Mitochondrial-ROS Response That Contributes to Cytotoxicity Depending on Mitochondrial Redox Status and Bioenergetic Functions // *PLoS ONE*. – 2013. – T. 8, № 11. – C. e81162.
173. Xu Q. et al. Identification of Master Regulators Driving Disease Progression, Relapse, and Drug Resistance in Lung Adenocarcinoma // *Frontiers in Bioinformatics*. – 2022. – T. 2. – C. e813960.
174. Fitzgerald K.E. et al. The Bioenergetic Role of Mitochondria in Lung Cancer // *A Global Scientific Vision - Prevention, Diagnosis, and Treatment of Lung Cancer*. InTech. – 2017.
175. Giatromanolaki A. BNIP3 Expression Is Linked with Hypoxia-Regulated Protein Expression and with Poor Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer // *Clinical Cancer Research*. – 2004. – T. 10, № 16. – C. 5566–5571.
176. Karsch-Bluman A. et al. Tissue necrosis and its role in cancer progression // *Oncogene*. – 2019. – T. 38, № 11. – C. 1920–1935.
177. Burton T.R. et al. BNIP3 acts as transcriptional repressor of death receptor-5 expression and prevents TRAIL-induced cell death in gliomas // *Cell Death & Disease*. – 2013. – T. 4, № 4. – C. e587–e587.
178. Ran Q. et al. Transgenic Mice Overexpressing Glutathione Peroxidase 4 Are Protected against Oxidative Stress-induced Apoptosis // *Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – T. 279, № 53. – C. 55137–55146.
179. Ding Y. et al. Identification of a small molecule as inducer of ferroptosis and apoptosis through ubiquitination of GPX4 in triple negative breast cancer cells // *Journal of Hematology & Oncology*. – 2021. – T. 14, № 1. – C. 19.
180. Sakai O. et al. Role of Glutathione Peroxidase 4 in Conjunctival Epithelial Cells // *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. – 2015. – T. 56, № 1. – C. 538–543.

181. Fukuda M. et al. Down-regulation of Glutathione Peroxidase 4 in Oral Cancer Inhibits Tumor Growth Through SREBP1 Signaling // *Anticancer Research*. – 2021. – T. 41, № 4. – C. 1785–1792.
182. Lutz A.K. et al. Loss of Parkin or PINK1 Function Increases Drp1-dependent Mitochondrial Fragmentation // *Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – T. 284, № 34. – C. 22938–22951.
183. Kandimalla R. et al. A partial reduction of Drp1 improves cognitive behavior and enhances mitophagy, autophagy and dendritic spines in a transgenic tau mouse model of Alzheimer disease. // *Hum Mol Genet*. – 2021. – T.31, №11. – C. 1788-1805.
184. Zhang L. et al. Transferrin receptor-mediated reactive oxygen species promotes ferroptosis of KGN cells via regulating NADPH oxidase 1/PTEN induced kinase 1/acyl-CoA synthetase long chain family member 4 signaling // *Bioengineered*. – 2021. – T. 12, № 1. – C. 4983–4994.
185. Candelaria – C. v. et al. Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents // *Frontiers in Immunology*. – 2021. – T. 12. – C. e607692.
186. Li R., Quan Y., Xia W. SIRT3 inhibits prostate cancer metastasis through regulation of FOXO3A by suppressing Wnt/ β -catenin pathway // *Experimental Cell Research*. – 2018. – T. 364, № 2. – C. 143–151.
187. Kim Y.S. et al. Context-dependent activation of SIRT3 is necessary for anchorage-independent survival and metastasis of ovarian cancer cells // *Oncogene*. – 2020. – T. 39, № 8. – C. 1619–1633.
188. Tao F. et al. SIRT3 acts as a novel biomarker for the diagnosis of lung cancer // *Medicine*. – 2021. – T. 100, № 27. – C. e26580.
189. Yang G.-C. et al. The Expression and Related Clinical Significance of SIRT3 in Non-Small-Cell Lung Cancer // *Disease Markers*. – 2017. – T. 2017. – C. 1–8.
190. Humpton T.J. et al. Oncogenic KRAS Induces NIX-Mediated Mitophagy to Promote Pancreatic Cancer // *Cancer Discovery*. – 2019. – T. 9, № 9. – C. 1268–1287.
191. Poole L.P., Macleod K.F. Mitophagy in tumorigenesis and metastasis // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2021. – T. 78, № 8. – C. 3817–3851.

192. Assi M. The differential role of reactive oxygen species in early and late stages of cancer // *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. – 2017. – T. 313, № 6. – C. R646–R653.
193. Cao Y. et al. SIRT3 promotion reduces resistance to cisplatin in lung cancer by modulating the FOXO3/CDT1 axis // *Cancer Medicine*. – 2021. – T. 10, № 4. – C. 1394–1404.
194. Erkan M. et al. Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis // *Oncogene*. – 2005. – T. 24, № 27. – C. 4421–4432.
195. Yu L. et al. The expression and prognostic significance of Drp1 in lung cancer // *Medicine*. – 2019. – T. 98, № 48. – C. e18228.
196. Lu C.-H. et al. Older age impacts on survival outcome in patients receiving curative surgery for solid cancer // *Asian Journal of Surgery*. – 2018. – T. 41, № 4. – C. 333–340.
197. Maltoni M. et al. Prognostic factors in advanced cancer patients: evidence-based clinical recommendations--a study by the Steering Committee of the European Association for Palliative Care. // *J Clin Oncol*. – 2005. – T. 23, № 25. – C. 6240–6248.
198. Chourasia A.H. et al. Mitophagy defects arising from BNip3 loss promote mammary tumor progression to metastasis. // *EMBO Rep*. – 2015. – T. 16, № 9. – C. 1145–1163.
199. Tol M.J. et al. A PPAR γ -Bnip3 Axis Couples Adipose Mitochondrial Fusion-Fission Balance to Systemic Insulin Sensitivity // *Diabetes*. – 2016. – T. 65, № 9. – C. 2591–2605.
200. Vianello C. et al. Cisplatin resistance can be curtailed by blunting Bnip3-mediated mitochondrial autophagy // *Cell Death & Disease*. – 2022. – T. 13, № 4. – C. 398.
201. Forrest V.J. et al. Oxidative stress-induced apoptosis prevented by Trolox. // *Free Radic Biol Med*. – 1994. – T. 16, № 6. – C. 675–684.

202. Koepke S.J., Watkins J.J., Minter S.D. Understanding the Role of Mitochondrial Health in the Mechanism of Mitochondrial Bioelectrocatalysis // *Journal of The Electrochemical Society*. – 2016. – T. 163, № 5. – C. H292–H298.
203. Cocetta V., Ragazzi E., Montopoli M. Mitochondrial Involvement in Cisplatin Resistance // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2019. – T. 20, № 14. – C. 3384.
204. Zhu Y. et al. Caspase cleavage of cytochrome c1 disrupts mitochondrial function and enhances cytochrome c release // *Cell Research*. – 2012. – T. 22, № 1. – C. 127–141.
205. Kleih M. et al. Direct impact of cisplatin on mitochondria induces ROS production that dictates cell fate of ovarian cancer cells // *Cell Death & Disease*. – 2019. – T. 10, № 11. – C. 851.
206. Fleury C., Mignotte B., Vayssière J.-L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling // *Biochimie*. – 2002. – T. 84, № 2–3. – C. 131–141.
207. Sp N. et al. Tannic Acid Promotes TRAIL-Induced Extrinsic Apoptosis by Regulating Mitochondrial ROS in Human Embryonic Carcinoma Cells // *Cells*. – 2020. – T. 9, № 2. – C. 282.