

*На правах рукописи*

**Горбунова Анна Сергеевна**

**РОЛЬ БЕЛКОВ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА МИТОХОНДРИЙ В  
ПРОГРЕССИРОВАНИИ АДЕНОКАРЦИНОМЫ ЛЕГКОГО**

1.5.4. – Биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2022

**Работа выполнена** в Лаборатории исследования механизмов апоптоза Факультета фундаментальной медицины Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».

**Научный руководитель:**

кандидат биологических наук

**Копейна Гелина Сергеевна**

**Официальные оппоненты:**

доктор биологических наук, профессор,  
директор Научно-исследовательского  
института канцерогенеза Федерального  
государственного бюджетного учреждения  
«Национальный медицинский исследовательский  
центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства  
здравоохранения Российской Федерации

**Красильников Михаил Александрович**

доктор биологических наук, профессор,  
главный научный сотрудник  
лаборатории клеточных взаимодействий  
Федерального государственного учреждения науки  
«Институт биоорганической химии имени академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» Российской академии наук

**Сапожников Александр Михайлович**

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт теоретической и экспериментальной биофизики» Российской академии наук

Защита диссертации состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.2.058.07 на базе ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова Минздрава России по адресу: 117997, Москва, ул. Островитянова, д.1; и на сайте: <http://rsmu.ru>

Автореферат диссертации разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 года

**Ученый секретарь диссертационного совета:**

доктор медицинских наук, профессор



**Кягова Алла Анатольевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность

По данным Всемирной организации здравоохранения, онкологические заболевания занимают второе место в мире среди основных причин смертности населения от болезней, уступая лишь сердечно-сосудистым заболеваниям. Рак легкого занимает лидирующую позицию среди онкологической смертности в мире: ежегодно от него умирает более 2.2 млн человек [Sung с соавт., 2021]. На основании гистологической классификации рак лёгкого подразделяется на мелкоклеточный 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.

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 ответ на индукцию 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 [Galluzzi с соавт., 2018]. 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 Ddp1 и Mfn2, соответственно, а также посредством митохондриальной аутофагии – митофагии, осуществляемой белками BNIP3, BNIP3/NIX, PINK1 и Parkin [Vara-Perez с соавт., 2019]. 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) [Han с соавт., 2020]. Солидные опухоли развиваются в условиях гипоксии, что способствует адаптации клеток, позволяя им выживать и пролиферировать в 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 как от типа опухолевых клеток, так и от факторов микроокружения (рН, уровень  $O_2$  и т.д.). Более того, промотор *BNIP3* содержит элементы, чувствительные к гипоксии (HRE – hypoxia response elements). Следовательно, BNIP3, модулируя митофагию и гибель клеток, в том числе в условиях гипоксии, является потенциально важным белком участвующим в процессе канцерогенеза и требует дополнительного исследования [Gorbunova с соавт., 2020].

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.

**Целью 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, в том числе и 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 нормальной и опухолевой тканей одних и тех же пациентов. Это позволило наиболее точно оценить изменение уровня анализируемых белков у каждого конкретного пациента. Кроме того, изучено совместное 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 детально выяснена роль одного из членов семейства Bcl-2 и участника митофагии – белка BNIP3, функция которого зависит как от типа опухоли, так и от 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 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, что 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. BNP3 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. 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 РФФ. 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.

#### **Список используемых сокращений**

АКЛ – аденокарцинома лёгкого

АФК – активные формы кислорода

ДИ – доверительный интервал  
КЦХФ – карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон  
миРНК – малая интерферирующая РНК  
НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого  
ОР – отношение риска  
ПААГ – полиакриламидный гель  
ПАРП – поли(АДФ-рибоза)-полимераза  
ПГК – программируемая гибель клеток  
ПМЗО – первично-множественные злокачественные опухоли  
НМИЦ – Национальный медицинский исследовательский центр  
СПК – скорость потребления кислорода  
ЭТЦ – электрон-транспортная цепь  
HRE (hypoxia response elements) – элементы, чувствительные к гипоксии

## **ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **Объекты**

Для изучения роли белков контроля качества митохондрий и вклада клинко-патологических признаков в прогрессирование АКЛ, был собран клинический материал и истории болезней пациентов с данной патологией. В выборку вошли 80 пациентов, проходивших хирургическое лечение АКЛ в Национальном медицинском исследовательском центре (НМИЦ) онкологии им. Н.Н. Блохина. 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 [Amin с соавт., 2017]. Образцы были собраны в соответствии с принципами Комитета по этике НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина (разрешение №04-04-08097).

Для изучения роли BNIP3 в апоптозе были использованы клеточные линии АКЛ – A549 и H23.

### **Методы**

#### ***Экспериментальные процедуры с клеточными линиями***

По достижении клетками 70% конfluenceности убирали кондиционированную среду, далее промывали клетки DPBS и добавляли к ним свежую среду с цисплатином (30 мкМ).

#### ***Трансфекция клеточных линий***

Для получения клеточной культуры с нокаутом по BNIP3, клетки линии A549 трансфицировали вектором CRISPR/Cas9 koBNIP3 Plasmid при помощи липофектамина LTX.

Для получения клеточных линий с нокадауном по BNIP3, клетки A549 и H23 трансфицировали таргетной к мРНК BNIP3 – малой интерферирующей РНК (миРНК), при помощи липофектамина RNAiMAX.

#### ***Получение белковых фракций из тканей и клеточных культур***

Лизирующий буфер 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 на льду с последующим центрифугированием.

Клетки линий A549 и H23 снимали с поверхности культуральных чашек. Затем клетки промывали раствором DPBS, после чего осаждали и лизировали соответствующим буфером.

### ***Вестерн блот анализ***

Разделение белков из клеток проводили с использованием полиакриламидных гелей (ПААГ), сделанных самостоятельно. Разделение белков из образцов тканей пациентов осуществляли с использованием набора ПААГ FastCast TGX (Bio-Rad).

Электрофоретическое разделение белков проводили в камере Bio-Rad с буфером для денатурирующего электрофореза белков по Лэммли. После чего, белки из ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) в соответствующем буфере. Далее мембрану последовательно инкубировали в 5%-ном растворе обезжиренного молока, с первичными антителами и с раствором вторичных антител. Затем сигнал детектировали с помощью ECL субстрата. Регистрацию хемилюминесценции проводили на приборе ChemiDoc (Bio-Rad).

### ***Измерение интенсивности митохондриального дыхания***

Анализ скорости потребления кислорода (СПК) клетками в реальном времени проводили при помощи прибора Seahorse Analyzer согласно инструкции производителя.

### ***Получение цитозольной и митохондриальной фракций белков***

Собранные клетки ресуспендировали в буфере для фракционирования и инкубировали. Затем пробы центрифугировали, что позволяло отделить цитозольную фракцию (надосадочная жидкость) от митохондриальной (осадок). Анализ белков из данных фракций проводили с помощью метода Вестерн блот.

### ***Измерение уровня митохондриальных АФК***

Продукцию митохондриальных АФК в клетках анализировали с использованием MitoSOX Red (Molecular Probes), согласно инструкции производителя.

### ***Оценка гибели клеток по размеру популяции SubG1***

Собранные клетки ресуспендировали в DPBS, затем последовательно добавляли холодный 70%-ный этанол, РНКазу А (100 мкг/мл) и пропиций йодид (50 мкг/мл), инкубировали, после чего анализировали на проточном цитометре FACS Canto II (BD).

### ***Измерение активности каспазы-3***

Измерение каспазной активности в лизатах клеток проводили с использованием флуоресцентного субстрата (40 мкМ DEVD-АМС). Флуоресценцию измеряли с помощью прибора Varioskan Flash.

### ***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) –  $> 0.05$ .

## ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### 1. Характеристика выборки пациентов с АКЛ

Встречаемость клиничко-патологических признаков у 80 пациентов с АКЛ была статистически оценена и приведена в таблице 1. В ходе статистического анализа были объединены группы T1 с T2 и T3 с T4, а также стадии 1 - 2 и 3 - 4, что объясняется небольшим числом пациентов с начальными (T1 и 1 стадия) и поздними (T4 и 4 стадия) стадиями опухолевых процессов. 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).

### 2. Выбор белков для исследования

Для изучения роли контроля качества митохондрий в прогрессировании АКЛ, в дальнейший анализ были включены ключевые регуляторы этого процесса: PINK1, Parkin и BNIP3, BNIP3/NIX (митофагия), Drp1 (деление митохондрий) и Mfn2 (слияние митохондрий). В связи с тем, что нарушение процессов контроля качества митохондрий приводит к аккумуляции АФК, в анализ также вошли участники ферментативной антиоксидантной системы — Sirtuin3 и GPX4.

### 3. Подбор антител к исследуемым белкам

Для постановки Вестерн блота с белковыми фракциями из клинических образцов пациентов с АКЛ были подобраны первичные антитела к исследуемым белкам. Все первичные антитела, за исключением антител против Parkin (данные не приведены), давали достаточный для дальнейшей денситометрической оценки сигнал (рис. 1, а). Из-за недостаточно качественного сигнала при использовании различных антител к Parkin, данный белок был исключен из анализа.

### 4. Сравнительный анализ уровней исследуемых белков в нормальных и опухолевых тканях

Вестерн блот анализ белков BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP3/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. Как показано на рисунке 1 (б), уровни димеров и мономеров BNIP3, а также GPX4 были статистически повышены в опухолевых тканях по сравнению с нормальными. 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*

Таблица 1. Информация о клиничко-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%)

содержит элементы HRE, и его экспрессия активируется в условиях гипоксии [Kothari с соавт., 2003]. Помимо усиления экспрессии генов, содержащих HRE, гипоксия стимулирует накопление АФК, что приводит к окислительному стрессу. Антиоксидантные белки активируются для преодоления разрушительного воздействия АФК [Tafari с соавт., 2016]. В частности, GPX4 конвертирует гидроперекиси липидов в липидные спирты, предотвращая образование токсичных липидных АФК. Таким образом, повышенный уровень BNIP3 и GPX4 может быть объяснен гипоксией и связанной с ней аккумуляцией АФК в тканях АКЛ по сравнению с образцами нормы.

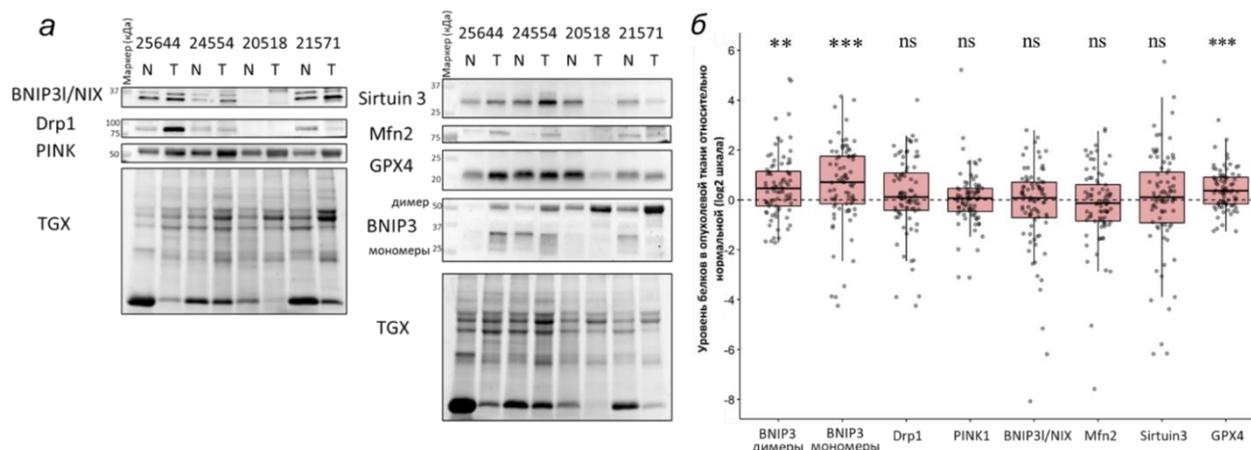


Рис. 1. (а) Репрезентативный Вестерн блот лизатов тканей пациентов с АКЛ для анализа качества окрашивания антителами к PINK1, BNIP3, BNIP3/NIX, Drp1, Mfn2, Sirtuin3 и GPX4. 25644, 24554, 20518, 21571 – номера пациентов после их анонимизации, N – нормальная ткань, T - опухолевая ткань. (б) Денситометрический 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.

Кроме этого, в рамках данного исследования были выявлены ассоциации между уровнями белков BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP3/NIX, Mfn2, Sirtuin3, GPX4 и размером первичной опухоли, наличием/отсутствием метастаз в лимфатических узлах, стадией (рис. 2). Результаты показали, что уровень Sirtuin3 был статистически значимо повышен у пациентов с T1-2, а также у больных АКЛ с N1-2. Следовательно, повышение уровня Sirtuin3 может быть характерно для метастазирующих АКЛ, клетки которых распространяются в лимфатические узлы, не образуя обширный первичный очаг опухоли.

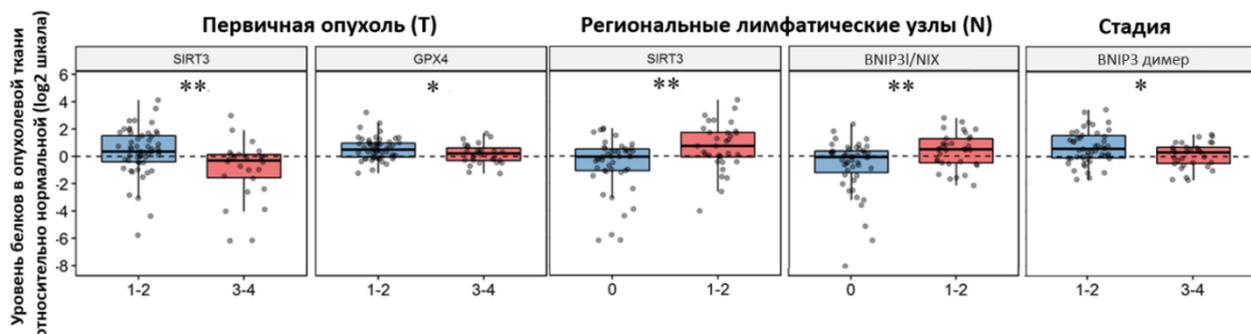


Рис. 2. Уровни Sirtuin3, GPX4, BNIP3/NIX и димерной формы BNIP3, стратифицированных по критериям TN и стадиям, у 80 пациентов с АКЛ.

Как и Sirtuin3, уровень BNIP3/NIX был увеличен у пациентов с метастазами в лимфатических узлах (N1-2). Помимо Sirtuin3 и BNIP3/NIX, была выявлена корреляция между повышением уровня димерной формы BNIP3 и 1-2 стадиями у пациентов с АКЛ. Также увеличение уровня GPX4 статистически значимо обнаруживалось 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.

### 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 2).

Таблица 2. 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	p-значения	N	ОР	95% ДИ	p-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)

Уровни белков BNIP3 (димерной и мономерной форм), Drp1, PINK1, BNIP3/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 связи с тем, что после хирургического лечения пациенты исследуемой выборки подвергались химиотерапевтическому лечению, можно предположить, что снижение риска смерти 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 [Сао с соавт., 2021]. Роль BNIP3 в процессах ПГК и его влияние на выживаемость пациентов неоднозначны. Выявленная корреляция между повышением уровня BNIP3 и положительным прогнозом пациентов с АКЛ согласуется с данными при раке поджелудочной железы, где уменьшение экспрессии BNIP3 способствовало развитию резистентности и было ассоциировано с худшим прогнозом выживаемости [Erkan с соавт., 2005].

В отличие от Sirtuin3 и димерной формы BNIP3, белок Drp1, напротив, коррелировал с повышением риска смерти пациентов исследуемой выборки (OR = 1.38, 95% ДИ = 1.09-1.75,  $p \leq 0.03$ ). Этот результат согласуется с имеющимися данными о взаимосвязи гиперэкспрессии Drp1 с понижением выживаемости пациентов с АКЛ в отличие от плоскоклеточной карциномы, при которой Drp1 не сказывался на риске смерти [Yu с соавт., 2019]. Данное явление подтверждается эффектами, полученными при подавлении Drp1, которое индуцировало 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 [Yu с соавт., 2019]. 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.

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. 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. 3). Таким образом, димерная форма BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 вкпе влияли на прогноз общей выживаемости и позволили разделить пациентов с АКЛ на группы с высоким и низким риском смерти.

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 первично-множественных злокачественных опухолей (ПМЗО), были проанализированы ОР с помощью одномерной и многомерной регрессионных моделей Кокса (таблица 3). 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 (OR = 2.56, 95% ДИ = 1.46-4.49,  $p \leq 0.001$ ) и в многомерной (OR = 4.00, 95% ДИ = 2.18-7.36,  $p \leq 0.001$ ) моделях по сравнению с ранними стадиями, что соответствует существующим сведениям о развитии симптомов, ассоциированных с синдромом анорексии-кахексии (потеря веса, анорексия, дисфагия и ксеростомия), одышкой и некоторыми биологическими факторами

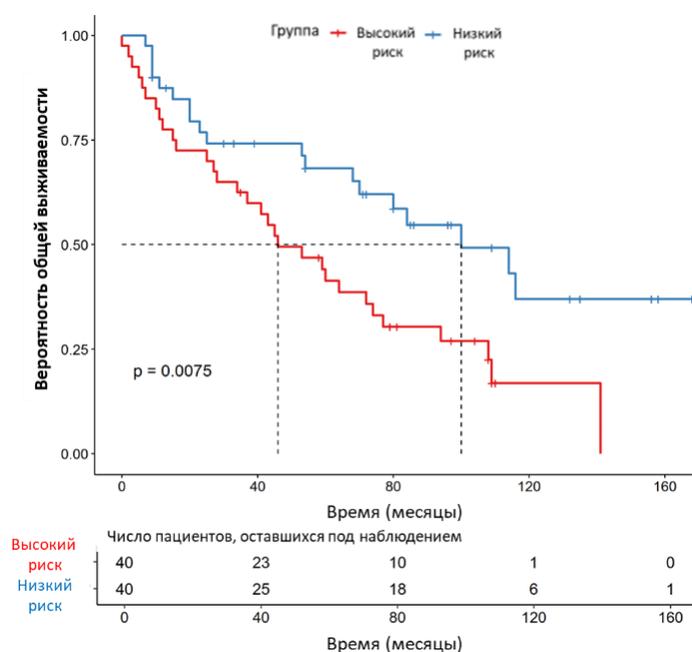


Рис. 3. Кривые Каплана-Мейера общей выживаемости у 80 пациентов с АКЛ с низким и высоким риском смерти в зависимости от уровня димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3. Плюсы на кривой обозначают цензурированные наблюдения.

(лейкоцитоз, лимфоцитопения и увеличение титра С-реактивного белка), которые неблагоприятно влияют на прогноз выживаемости пациентов с поздними стадиями опухолевого процесса [Maltoni с соавт., 2005].

Согласно многомерной регрессионной модели Кокса, пациенты возрастом старше 65 лет имели бóльший риск смерти по сравнению с больными ≤65 лет, 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 [Lu с соавт., 2018].

Кроме этого, одномерная и многомерная модели показали, что 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 3. 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	р	
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 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. 3, а). Предложенная в данном исследовании номограмма показывает прогностическую ценность совокупности исследованных нами факторов и позволит в будущем улучшить имеющиеся подходы к прогнозированию выживаемости пациентов с АКЛ.

Нами был рассчитан объединенный индекс риска, полученный на основе многомерной регрессионной модели Кокса в зависимости от уровней димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3, а также стадии и возраста у 80 пациентов с АКЛ. В соответствии с совокупными индексами риска выборка пациентов была разделена на группы с высоким, низким и средним риском смерти. Вероятности общей выживаемости пациентов данных групп были отображены на кривых Каплана-Мейера, которые продемонстрировали, что пациенты статистически значимо различались по общей выживаемости (рис. 3, б). Таким образом, индексы рисков в зависимости от стадии, возраста и уровней димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3 вкуче влияли на прогноз общей выживаемости.

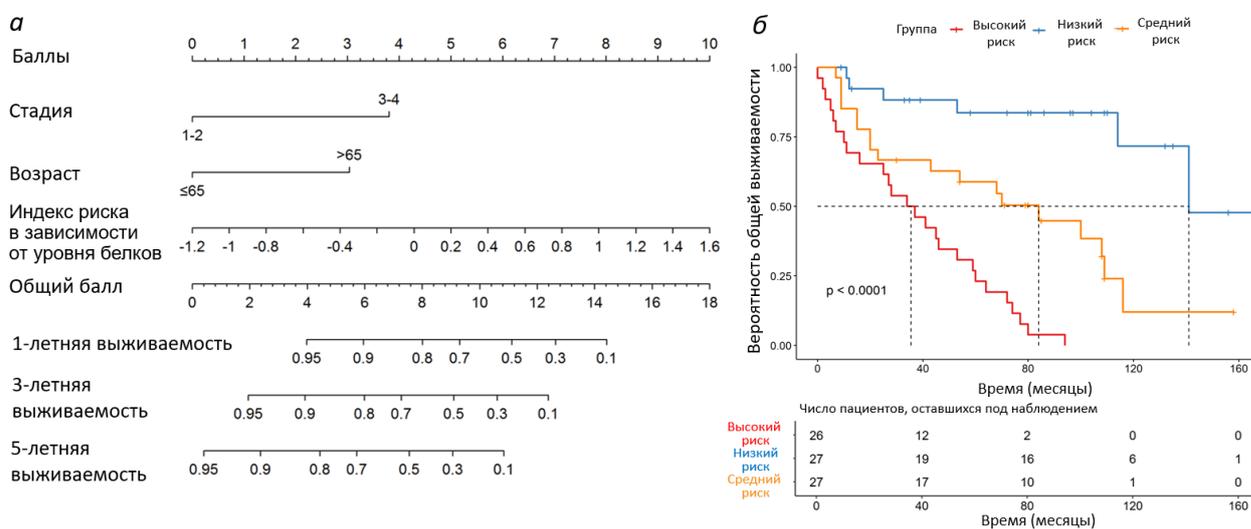


Рис. 3. (а) Номограмма для прогнозирования 1-, 3-, 5-летней выживаемости у пациентов с АКЛ в зависимости от стадии, возраста и индекса риска в зависимости от уровня димерной формы BNIP3, Drp1 и Sirtuin3. (б) Кривые Каплана-Мейера общей выживаемости у 80 пациентов с АКЛ с высоким, средним и низким риском смерти в зависимости от значения риска уровней димерной формы BNIP3, Drp1, Sirtuin3, стадии и возраста. Плюсы на кривой обозначают цензурированные наблюдения.

Следовательно, уровни димерной и мономерной форм BNIP3, а также GPX4 повышались в опухолевых тканях по сравнению с нормальными. Кроме этого, димерная форма BNIP3, Sirtuin3, Drp1, возраст и стадии оказывали влияние на выживаемость пациентов с АКЛ.

Полученные результаты исследования клинических образцов пациентов с АКЛ выявили BNIP3 как единственного белка, уровень которого повышался в опухолевой ткани пациентов с АКЛ, а также влиял на их выживаемость. BNIP3, являясь связующим звеном между процессами прогрессирования АКЛ и контроля качества митохондрий, может потенциально влиять на жизнеспособность клеток АКЛ. В связи с этим, возник вопрос: к чему может привести снижение уровня BNIP3, в том числе в комбинации с цисплатином, который является препаратом первой линии послеоперационной химиотерапии АКЛ?

## 6. Получение клеточных линий АКЛ с нокаутом и нокадауном по *BNIP3*

Для изучения роли белка *BNIP3* в АКЛ были использованы линии клеток A549 и H23, в которых экспрессия *BNIP3* была подавлена с использованием системы CRISPR/Cas9 и миРНК. Как показал Вестерн блот анализ, обе технологии нокаута (ko*Bnip3*) и нокадауна (si*Bnip3*) приводили к значительному снижению уровня белка *BNIP3* (рис. 4, а).

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, было проведено исследование митохондриального дыхания. Как показал анализ, нокаут *BNIP3* приводил к снижению как базального (~ в 2.5 раза), так и максимально возможного, стимулируемого протонофором карбонилцианид-хлорфенилгидразоном (КЦХФ), дыхания (~ в 7 раз) (рис. 4, б, в). Судя по полученным данным, 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.

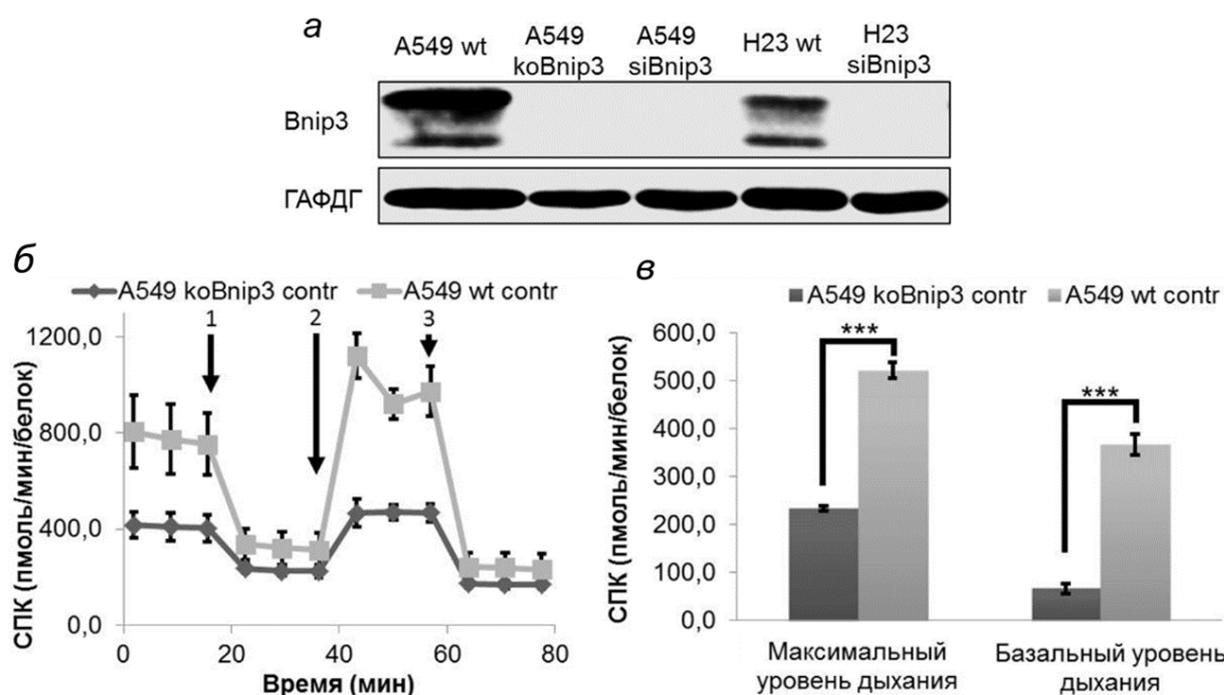


Рис. 4. (а) Вестерн блот анализ содержания белка *BNIP3* в клетках A549 и H23 дикого типа и дефицитных по *BNIP3*. Глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназу (ГАФДГ) использовали в качестве контроля загрузки белка. (б) Оценка потребления  $O_2$  клетками A549 дикого типа и с нокаутом по *BNIP3*. Инъекции олигомицина, КЦХФ и антимицина А с ротеноном отображены стрелками 1, 2 и 3, соответственно; (в) гистограмма, демонстрирующая максимальный (стимулируемый КЦХФ) и базальный уровни дыхания; СПК (пмоль/мин/мг белка) нормализована на общее содержание белка в пробе.

## 7. Влияние *BNIP3* на выход цитохрома с из митохондрий и изменение уровня АФК при индукции цисплатином

Снижение митохондриального дыхания может быть связано с нарушением функционирования электрон-транспортной цепи (ЭТЦ), участником которой является цитохром *c*. Можно предположить, что в клетках со сниженным митохондриальным дыханием появится популяция митохондрий более чувствительная к пермеабиллизации внешней митохондриальной мембраны и выходу цитохрома *c* в условиях стимуляции апоптоза цисплатином.

Оценку выхода цитохрома *c* при апоптозе, индуцированном цисплатином (30 мкМ), исследовали в клетках A549 дикого типа и с нокаутом по *BNIP3*. Результаты эксперимента показали, что выход цитохрома *c* из митохондрий в клетках дефицитных по *BNIP3* был выше по сравнению с клетками дикого типа (рис. 5, а, б).

Выход цитохрома *c* из митохондрий способен вызывать нарушение в функционировании ЭТЦ, что ведет к утечке электронов и образованию супероксида. Действительно, количественная оценка АФК выявила, что в клетках A549 *koBNIP3* уровень АФК после индукции цисплатином был почти в два раза выше по сравнению с клетками дикого типа (рис. 5, в).

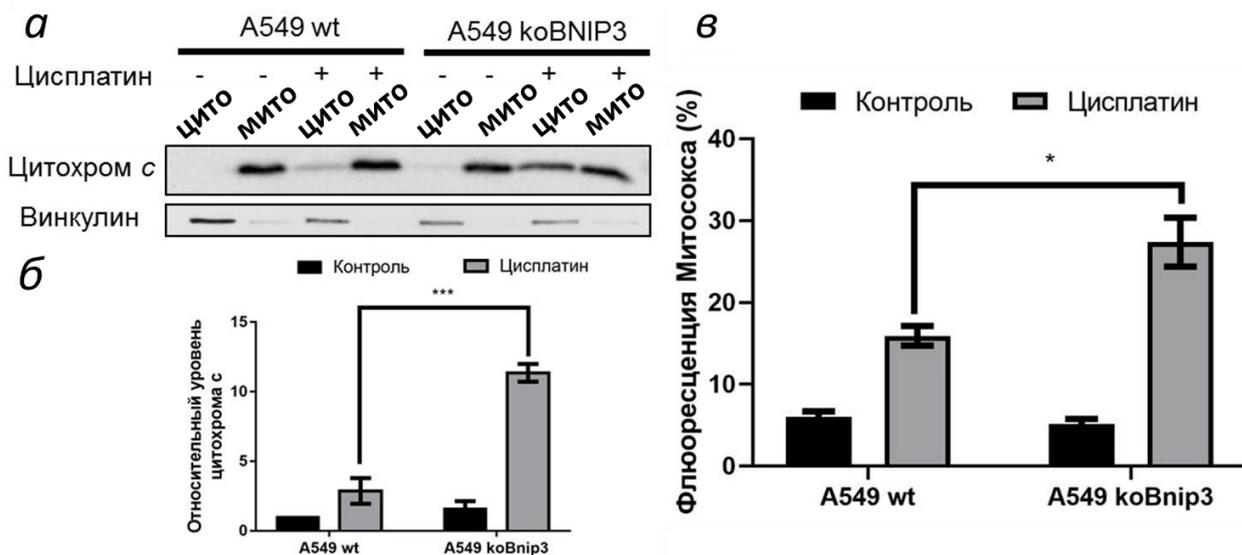


Рис. 5. (а) Вестерн блот уровня цитохрома *c* в цитозольной (циито) и митохондриальной (миито) фракциях линий A549 wt и A549 *koBNIP3* через 24 ч после индукции цисплатином (30 мкМ) и (б) его денситометрический анализ. Винкулин использовался в качестве контроля загрузки белка, на уровень которого нормализовали содержание цитохрома *c*. (в) Гистограмма, отражающая статистический анализ количественной оценки АФК на основе флуоресценции Митосокса в клетках линий A549 wt и A549 *koBNIP3* спустя 16 ч после индукции цисплатином (30 мкМ).

Выход цитохрома *c* из межмембранного пространства митохондрий является одним из ключевых событий апоптоза. Оказавшись в цитозоле, цитохром *c* участвует в формировании апоптосомы, в которой происходит запуск каспазного каскада и активации эффекторной каспазы-3, мишенью которой является белок репарации – поли(АДФ-рибоза)-полимераза (ПАРП). В связи с этим, на следующем этапе был оценен уровень данных маркеров 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. 6, а, б). Активированная каспаза-3 расщепляет ПАРП с появлением фрагмента р89. Оценка р89 ПАРП продемонстрировала большее накопление данного фрагмента в нокаутных клетках по сравнению с диким типом (рис. 6, в, г).

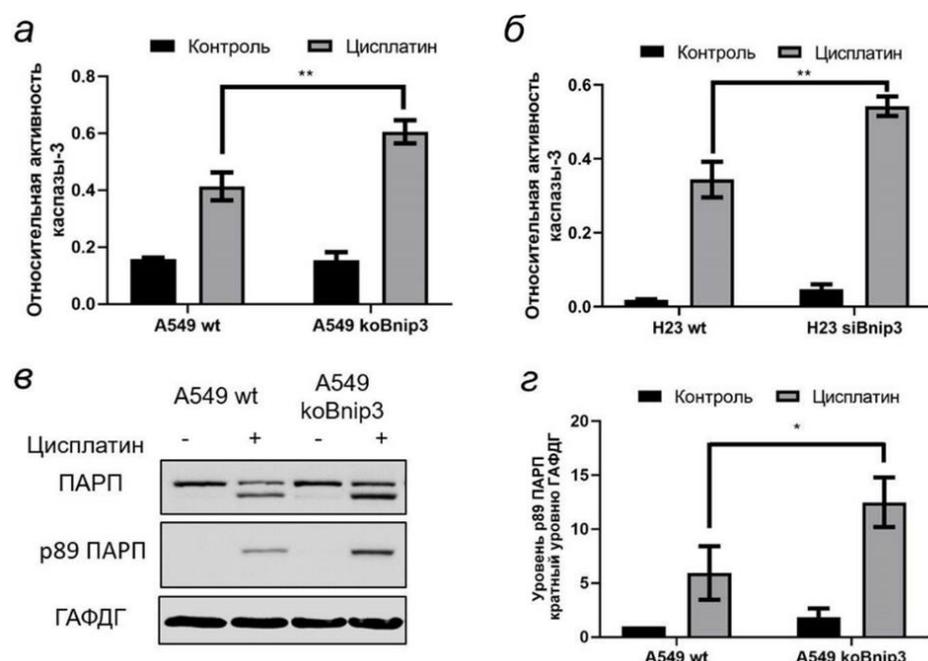


Рис. 6. Анализ активности каспазы-3 в клетках линий A549 (а) и H23 (б) дикого типа и с дефицитом по *BNIP3* через 24 ч после индукции цисплатином (30 мкМ). Активность каспазы-3 нормализовали на уровень белка в пробе. Вестерн блот ПАРП (в) и денситометрический анализ уровня р89 ПАРП (г), в клетках линии 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 р89 ПАРП.

Помимо исследования вышеописанных маркеров апоптоза, был выполнен анализ 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 большую чувствительность к цисплатину по сравнению с клетками дикого типа через 24 ч после индукции апоптоза (рис. 7), что согласуется с данными, полученными при оценке активности каспазы-3 и накопления фрагмента р89 ПАРП.

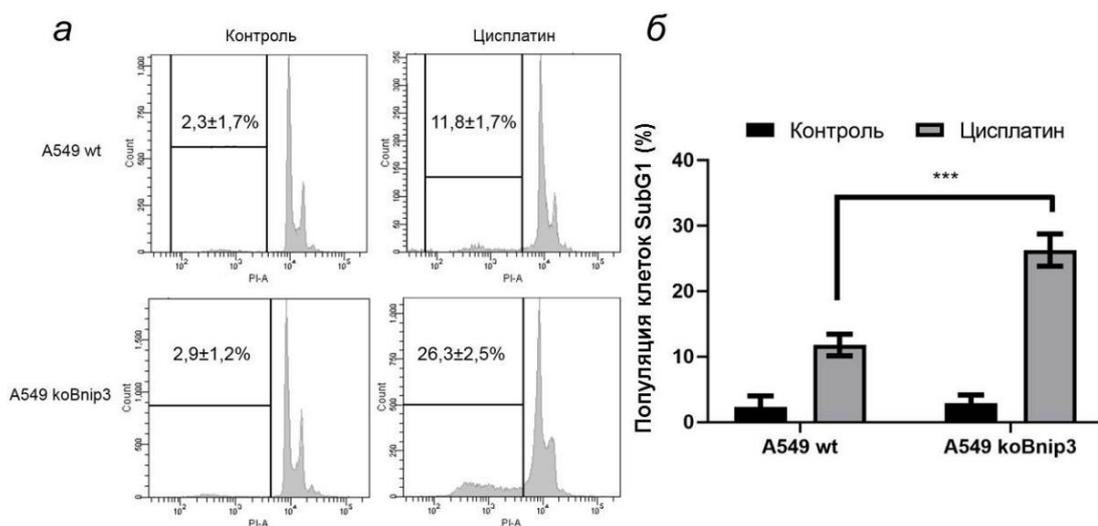


Рис. 7. Цитометрическая оценка уровня апоптотической фракции SubG1 (а) клеток линии A549 wt и A549 koBNIP3 спустя 24 ч после индукции апоптоза цисплатином (30 мкМ) и (б) гистограмма, отражающая статистический анализ полученных результатов.

Таким образом, снижение уровня BNIP3 в клетках АКЛ приводило к появлению дефектных митохондрий, которые проявляли большую 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 ПАРП, при индукции цисплатином по сравнению с клетками дикого типа.

Стоит отметить, что результаты, показанные на клетках АКЛ, согласуются с данными, полученными как на опухолевых, так и на нормальных клетках [Chourasia с соавт., 2015; Tol с соавт., 2016; Vianello с соавт., 2022]. 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 [Forrest с соавт., 1994; Коерке с соавт., 2016; Cocetta с соавт., 2019]. Известно, что выход цитохрома *c* ведет к угнетению переноса электронов и их утечке из дыхательной цепи с образованием супероксидного радикала [Zhu с соавт., 2012]. В рамках данной работы BNIP3 приводил к аккумуляции АФК, вероятно, в результате как блокирования ЭТЦ, так и подавленной митофагии. В ряде исследований было показано, что накопление АФК усиливает клеточную гибель, в том числе и апоптоз [Kleih с соавт., 2019; Fleury с соавт., 2002; Sr с соавт., 2020].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Рак легкого является ведущей причиной онкологической смертности во всем мире. В последние годы заболеваемость АКЛ неуклонно росла, приведя 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, BNIP3/1/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 ПАРП.

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 BNIP3/1/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.

### СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Публикации в научных рецензируемых журналах:

1. **Горбунова, А.С.** BNIP3 как регулятор цисплатин-индуцированного апоптоза / Горбунова, А.С., Денисенко, Т.В., Япрынцева, М.А., Пивнюк, А.Д., Приказчикова, Т.А., Гогвадзе, В.Г., Животовский, Б. // Биохимия. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1464–1473. РИНЦ, ВАК, И.Ф.=3.
2. **Gorbunova, A.S.** BNIP3 in lung cancer: To kill or rescue? / Gorbunova, A.S., Yapryntseva, M.A., Denisenko, T.V., Zhivotovsky, B. // Cancers. – 2020. – Т. 12, №11. – С. 3390. WoS, Scopus, I.F.=6.1.
3. Первушин, Н.В. Дегградация Mcl-1 в условиях недостатка питательных веществ происходит независимо от аутофагии / Первушин, Н.В., Сеничкин, В.В., Капуста, А.А., **Горбунова, А.С.**, Каминский, В.О., Животовский, Б., Копейна, Г.С. // Биохимия. – 2020. – Т. 85, № 10. – С. 1452–1463. РИНЦ, ВАК, И.Ф.=3.
4. Denisenko, T.V. Mitochondrial involvement in migration, invasion and metastasis / Denisenko, T.V., **Gorbunova, A.S.**, Zhivotovsky, B. // Frontiers in Cell and Developmental Biology. – 2019. – Т. 7. – С. e355. WoS, Scopus, I.F.=4.9.
5. Senichkin, V.V. Saga of Mcl-1: regulation from transcription to degradation / Senichkin, V.V., Streletskaia, A.Y., **Gorbunova, A.S.**, Zhivotovsky, B., Kopeina, G.S. // Cell Death and Differentiation. – 2020. – Т. 27, № 2. – С. 405–419. WoS, Scopus, I.F.=12.8.
6. **Gorbunova, A.S.** A balance between autophagy and other cell death modalities in cancer / **Gorbunova, A.S.**, Kopeina, G.S., Zhivotovsky, B. // Methods in Molecular Biology (Autophagy in Cancer). Humana Press New York. – 2022. – Т. 2445. – С. 3–24. Scopus, I.F.=1.4.

#### Тезисы докладов на конференциях:

7. **Горбунова, А.С.** Роль аутофагии и белка BNIP3 в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода / **Горбунова, А.С.**, Денисенко, Т.В. // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2019», г. Москва. – 2019.
8. **Горбунова, А.С.** BNIP3 как регулятор митофагии и эпителиально-мезенхимального перехода / **Горбунова, А.С.**, Денисенко, Т.В., Животовский, Б. // Материалы IV Национального конгресса по регенеративной медицине (научно-практический журнал Гены и Клетки), г. Москва. – 2019 – С. 66. РИНЦ, И.Ф.=0.9.
9. Япрынцева, М.А. Анализ изменения уровней митохондриальных белков при аденокарциноме лёгкого / Япрынцева, М.А., **Горбунова, А.С.** // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2021», г. Москва. – 2021.
10. Сизова, М.А. BNIP3 как регулятор различных типов программируемой гибели клеток аденокарциномы лёгкого / Сизова, М.А., **Горбунова, А.С.** // Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2020», г. Москва. – 2020.