

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL STUDIES

Терафтал (натриевая соль 4,5-октакарбокситалочанина кобальта) снижает чувствительность опухолевых клеток к антрациклиновым антибиотикам и митоксантрону *in vitro*

Teraphtal (sodium salt of cobalt 4,5-carboxyphthalocyanine) Decreases Sensitivity of Tumor Cells to Anthracycline Antibiotics and Mitoxantrone *in Vitro*

Т.А. Сидорова¹, О.О. Рябая¹, В.В. Татарский¹,
Д.А. Хоченков¹, Е.С. Иванова¹, О.Л. Калия²

TA Sidorova¹, OO Ryabaya¹, VV Tatarskii¹,
DA Khochenkov¹, ES Ivanova¹, OL Kaliya²

¹ ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478

¹ NN Blokhin National Medical Cancer Research Center, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478

² ФГУП ГНЦ «НИОПИК», ул. Б. Садовая, д. 1, корп. 4, Москва, Российская Федерация, 123995

² State Research Center NIOPIC, 1 bld. 4 B. Sadovaya str., Moscow, Russian Federation, 123995

РЕФЕРАТ

ABSTRACT

Обоснование. Антрациклиновые антибиотики (АА) широко используются в клинической онкогематологии. Известно, что цитотоксичность АА снижается в присутствии гемина (FePPIX), эндогенного металлопорфирина.

Background. Anthracycline antibiotics (AA) are widely used in clinical oncohematology. As is well known AA cytotoxicity diminishes in the presence of hemin (FePPIX), an endogenous metalloporphyrine.

Цель. Выяснить влияние терафтала (ТФ) и его структурного аналога FePPIX на степень цитотоксичности препаратов «антрахинонового» ряда — АА и митоксантрона (MiTOX) — *in vitro*.

Aim. To study effect of teraphtal (TPh) and its structural analog FePPIX on cytotoxicity of “anthraquinone” drugs AA and mitoxantrone (MiTOX) *in vitro*.

Материалы и методы. В работе были использованы лейкозные клетки человека линии K562 и клетки аденокарциномы линии HCT 116. Способность ТФ защищать опухолевые клетки от гибели, индуцированной АА, оценивали с помощью МТТ-метода, проточной цитометрии, световой микроскопии, цитохимического метода определения экспрессии β-галактозидазы с использованием в качестве субстрата X-Gal, ДНК-электрофореза, выхода ЛДГ, ОТ-ПЦР в реальном времени, радиометрического метода.

Materials & Methods. The study was performed using human leukemia cells of K562 line and HCT 116 adenocarcinoma cell line. TPh ability to prevent AA-induced tumor cell death has been estimated by the following methods: MTT assays, flow cytometry, light microscopy, cytochemical method for determination of β-galactosidase expression using X-Gal substrate, DNA electrophoresis, LDH release, real time RT-PCR, and radiometric method.

Результаты. По нашим данным, в присутствии ТФ (10 мкмоль/л) цитотоксичность АА и MiTOX снижается в среднем в 4 и 20 раз соответственно. Защитные свойства ТФ зависят от химической структуры АА. В присутствии ТФ токсичность акларубина не меняется. В основе защиты ТФ/FePPIX от цитотоксичности АА может участвовать один и тот же механизм, который связан со снижением способности клеток, в т. ч. опухолевых при лейкозе, «накапливать» АА в присутствии модуляторов. ТФ/FePPIX «защищают» опухолевые клетки человека от гибели, индуцированной АА: апоптоза, некроза и преждевременного старения (AS). AS-сценарий, индуцированный в лейкозных клетках линии K562 комбинацией АА + ТФ/FePPIX, завершается появлением колоний суспензионных «маленьких» клеток. *Beclin*-лизосомальный путь аутофагии не участвует в механизме снижения токсичности АА для клеток линии K562 в присутствии ТФ.

Results. In the presence of TPh (10 μM) the AA and MiTOX cytotoxicity diminishes approximately 4- and 20-fold respectively. The TPh protective potency is dependent on the AA chemical structure. In the presence of TPh aclarubicin toxicity remains constant. The TPh/FePPIX protection from the AA cytotoxicity can involve the same mechanism reducing the ability of the cells, including the leukemia tumor cells, to accumulate AA in the presence of modulators. TPh/FePPIX protects human tumor cells from AA-induced death, such as apoptosis, necrosis, and accelerated senescence (AS). AS in K562 leukemia cell line induced by AA + TPh/FePPIX results in cell-suspension-derived-small-cell colonies. *Beclin*-lysosomal pathway of autophagy is not engaged in reducing of the AA toxicity of K562 cells in the presence of TPh.

Заключение. Снижение цитотоксичности АА и возобновление роста популяции опухолевых клеток в присутствии ТФ и FePPIX следует учитывать при использовании гематопорфиринов и фталочанинов, близких по структуре к ТФ, в качестве сенсibilизаторов в клинических протоколах.

Conclusion. Reducing of the AA toxicity and revival of cell population growth in the presence of TPh/FePPIX should be taken into consideration when using hematoporphyrins and phthalocyanines having a structure similar to TPh as sensitizers in the chemotherapy protocols.

Ключевые слова: антрациклиновые антибиотики, митоксантрон, терафтал, гемин, опухолевые клетки человека, препарат-индуцированное старение, аутофагия.

Keywords: anthracycline antibiotics, mitoxantrone, teraphthal, hemin, human tumor cells, drug induced senescence, autophagy.

Получено: 2 июля 2017 г.

Принято в печать: 13 ноября 2017 г.

Received: July 2, 2017

Accepted: November 13, 2017

Для переписки: Татьяна Александровна Сидорова, канд. мед. наук, Каширское ш., д. 24, Москва, Российская Федерация, 115478; e-mail: tatsid@yahoo.com

For correspondence: Tat'yana Aleksandrovna Sidorova, PhD, 24 Kashirskoye sh., Moscow, Russian Federation, 115478; e-mail: tatsid@yahoo.com

Для цитирования: Сидорова Т.А., Рябая О.О., Татарский В.В. и др. Терафтал (натриевая соль 4,5-октакарбокситаллоцианина кобальта) снижает чувствительность опухолевых клеток к антрациклиновым антибиотикам и митоксантрону in vitro. Клиническая онкогематология. 2018;11(1):10–25.

For citation: Sidorova TA, Ryabaya OO, Tatarskii VV, et al. Teraphthal (sodium salt of cobalt 4,5-carboxyphthalocyanine) Decreases Sensitivity of Tumor Cells to Anthracycline Antibiotics and Mitoxantrone in Vitro. Clinical oncohematology. 2018;11(1):10–25.

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-10-25

DOI: 10.21320/2500-2139-2018-11-1-10-25

ВВЕДЕНИЕ

Антрациклиновые антибиотики (АА) — эффективные препараты с широким спектром противоопухолевой

активности, включающим солидные опухоли и онкогематологические заболевания [1]. Стандартные протоколы лечения острых миелоидных лейкозов и других опухолей системы крови включают следующие АА: доксорубин (DOX), даунорубин (DNR),

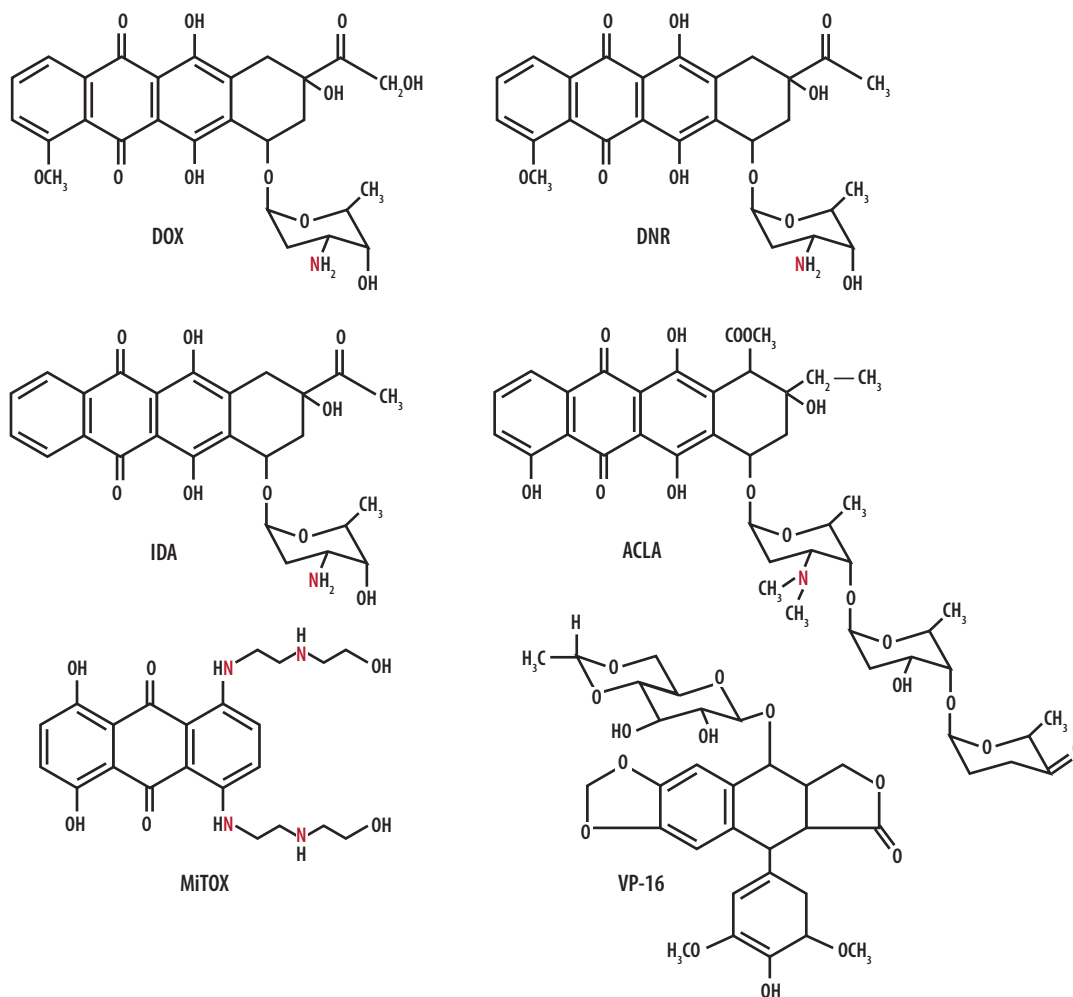


Рис. 1. Химическая структура различных антрациклиновых антибиотиков, митоксантрона и этопозида
ACLA — акларубин; DNR — даунорубин; DOX — доксорубин; IDA — идарубин; MITOX — митоксантрон; VP-16 — этопозид.

Fig. 1. Chemical structure of various anthracycline antibiotics, mitoxantrone and etoposide
ACLA — aclarubicin; DNR — daunorubicin; DOX — doxorubicin; IDA — idarubicin; MITOX — mitoxantrone; VP-16 — etoposide.

эпирубицин (EPI), идарубицин (IDA), акларубицин (ACLA). Различия в биологической активности (противоопухолевой и специфической органной токсичности, включая кардиотоксичность) препаратов этой группы определяют особенности химической структуры — «антрахинонового» хромофора и аминокликозида (рис. 1).

Эффективность АА в первую очередь зависит от чувствительности опухолевых клеток, природу которых определяет тип и количество внутриклеточных препарат-специфических мишеней. В основе механизма действия АА, как полагают, лежит их взаимодействие с макромолекулами митохондрий и ядра клеток [2]. Молекулярные мишени АА в митохондриях и ядре представлены на рис. 2.

Все АА имеют высокое сродство к митохондриям. «Антрахиноновый» хромофор АА за счет имитации субстрата, фермента I комплекса дыхательной цепи митохондрий — оксидоредуктазы НАДН-дегидрогеназы, позволяет им включаться в биоэнергетический синтез АТФ [3]. На этом этапе АА превращаются в высокореактивный радикал семихинон, который в присутствии кислорода и железа вступает в цикл окисления-восстановления с освобождением активных форм кислорода (АФК): супероксида — $O_2^{\cdot -}$ и гидроксила $OH\cdot$ [3, 4]. Кроме

того, будучи «антрахинонами», АА обладают высоким сродством к кардиолипину (CL) — уникальному фосфолипиду митохондрий, необходимому для структурной организации и оптимального функционирования «ансамбля» дыхательных ферментов [5, 6]. Образование комплекса АА-CL нарушает функцию наиболее чувствительных к CL ферментов III–IV комплекса дыхательной цепи: убихинон-цитохром С (cytC) оксидоредуктазы и cytC-оксидазы (COX) [7], что ведет к угнетению окислительного фосфорилирования [8]. В присутствии АА на фоне снижения экспрессии ферментов антиоксидантной системы [9] в митохондриях создается высокий уровень АФК, при котором изменяется функциональная активность ферментов дыхательной цепи. Оксидантная активность COX, необходимая для переноса электронов дыхательной цепи, приобретает свойства пероксидазы, запускающей перекисное окисление CL [10]. Окисление CL и белков, участвующих в организации высокопроводных пор (mPTP) и нарушении способности митохондрий накапливать кальций, приводит к открытию mPTP, выходу проапоптотических белков (cytC и др.), запуску программ гибели клеток по механизмам апоптоза и некроза [11, 12].

Описанный сценарий гибели клеток в большей степени гипотетический, поскольку вопрос о роли АФК

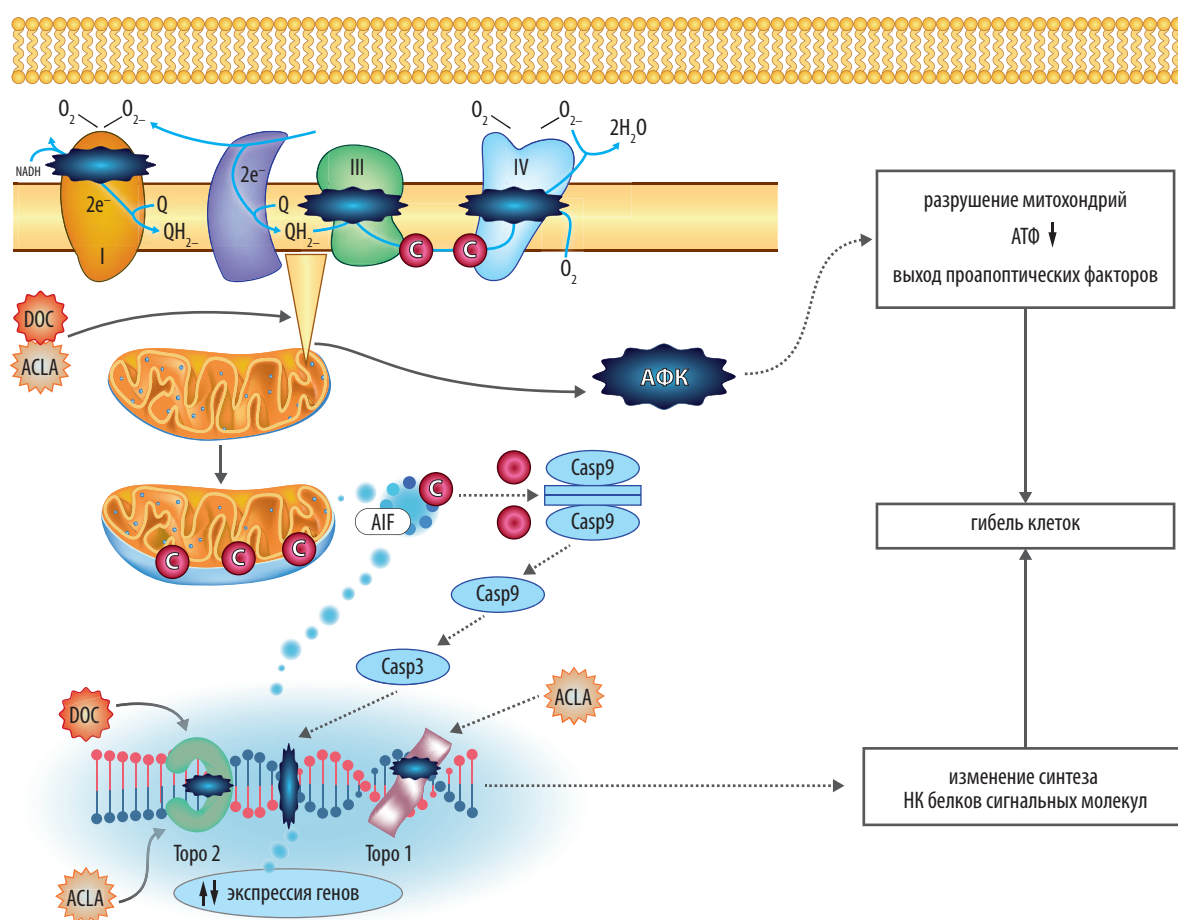


Рис. 2. Молекулярные мишени антрациклиновых антибиотиков разной химической структуры доксорубина/акларубицина (DOX/ACLA) в митохондриях и ядрах клеток

I, II, III, IV — блоки/ферменты дыхательной цепи митохондрий; AIF — фактор индукции апоптоза; C — цитохром C; Casp9/3 — каспазы 9/3; Торо — топоизомераза; АТФ — аденозинтрифосфат; АФК — активные формы кислорода; НК — нуклеиновая кислота.

Fig. 2. Molecular targets of anthracycline antibiotics from doxorubicin/aclarubicin (DOX/ACLA) group in mitochondria and nuclei

I, II, III, IV — blocks/enzymes of mitochondrial respiratory chain; AIF — apoptosis induction factor; C — cytochrome C; Casp9/3 — caspases 9/3; Topo — topoisomerase; АТФ — adenosine triphosphate; АФК — reactive oxygen species; НК — nucleic acid.

в цитотоксичности АА до сих пор остается открытым. Основные доказательства в пользу АФК в развитии окислительного стресса получены в условиях высоких концентраций АА (> 10 мкмоль/л), когда создается уровень АФК, необходимый для окисления макромолекул (ДНК, липидов, белков), а также нарушения экспрессии генов и последующей гибели клеток [2]. Возможно ли образование АФК при концентрациях АА, достигаемых в клинике (≤ 1 мкмоль/л) [13], — неизвестно. Тем не менее роль АФК в токсичности АА признается для ряда нормальных клеток, включая кардиомиоциты [14] и тромбоциты [15], и остается гипотетической для опухолевых клеток человека, растущих *in vitro* [14, 16, 17].

Ядерный компонент механизма действия АА реализуется за счет их способности интеркалировать в ДНК независимо от химической структуры препаратов [2, 18]. Встраиваясь между парами оснований, АА могут образовывать с макромолекулой сшивки, которые препятствуют процессу репликации ДНК и индуцируют гибель клеток [19, 20]. Однако, поскольку все эти данные получены при высоких концентрациях АА [2] или в присутствии химических стимуляторов [20], они свидетельствуют лишь о том, что при определенных условиях ДНК служит потенциальной мишенью для препаратов этого класса. В то же время доказано, что классические АА (DOX, DNR, IDA) являются ингибиторами ДНК-топоизомеразы II (Торо II), вовлеченной в репликацию, репарацию и поддержание гомеостаза ДНК [21]. Изоформы Торо II (α , β) вносят вклад в клеточно-специфический биологический эффект АА. Связывание АА с изоформой Торо II α существенно для противоопухолевого эффекта, а взаимодействие с изоформой Торо II β отвечает за кардиотоксичность [22].

ACLA (акларубицин) в отличие от классических АА является непрямым ингибитором каталитической активности двух топоизомераз (Торо II/Торо I), но при этом не индуцирует разрывы ДНК [23, 24]. Такой механизм действия обусловлен тем, что ACLA, встраиваясь между нитями ДНК, нарушает доступ Торо II/Торо I к ДНК, что, с одной стороны, приводит к стабилизации ковалентного комплекса Торо I с ДНК [22], а с другой — к угнетению каталитической активности Торо II [25] (см. рис. 2).

АА при взаимодействии с опухолевыми клетками запускают разные механизмы их гибели: апоптоз [26–28], некроз [27, 28], преждевременное старение [29–32]. Часто сценарий гибели клеток развивается по смешанному механизму [33, 34]. Это, по-видимому, связано с разной чувствительностью клеток к АА в популяции. Данные литературы свидетельствуют о том, что механизм гибели клеток, индуцированной АА, зависит от их типа, химической структуры, концентрации и времени воздействия АА [27, 33, 34]. Для стандартных АА (DOX, DNR, IDA) характерен препарат-специфический тип гибели клеток по механизму преждевременного (усиленного) старения. Повреждения ДНК (сшивки-разрывы), вызванные АА, являются сигналами для развития признаков, характерных для стареющих клеток (фенотип SLC) [26]. В отличие от стандартных АА в присутствии ACLA, не способного вызывать разрывы ДНК [23, 24], в опухо-

левых клетках запускается только процесс апоптоза и/или некроза [34]. Фенотип SLC индуцируется при воздействии DOX, DNR как в нормальных [35, 36], так и в опухолевых клетках различного гистогенеза [29, 37–39], включая гемопоэтическое происхождение [31, 32, 40, 41]. Для клеток с фенотипом SLC характерны морфологические (увеличение размера, разбухание ядер, появление микроядер) и биохимические (увеличение активности β -галактозидазы лизосом) признаки и сохранение жизнеспособности [29]. Развитие фенотипа SLC сопровождается остановкой клеток в фазе G2/M митотического цикла и арестом их пролиферации [31]. Фенотип SLC, как этап необратимого ареста пролиферации, заканчивается гибелью клеток по типу «митотической катастрофы» [38]. В то же время выживание отдельных клеток, избежавших терминального ареста, может служить предпосылкой для восстановления роста популяции [42].

Одновременно с индукцией SLC запускается программа аутофагии, процесс деградации поврежденных белков и их компонентов с помощью ферментов лизосом [43]. В условиях стресса в клетке за счет катаболизма этих структур пополняются энергия и предшественники метаболических путей. Установлено, что среди многочисленных участников аутофагии критическую роль играет белок Beclin-1 и его сигнальный путь, регулирующий активность лизосом [44]. В настоящее время полагают, что индукция в опухолевых клетках как фенотипа SLC, так и аутофагии является механизмом их защиты от стресса, вызванного повреждением АА митохондрий, ДНК и других компонентов клетки [45].

Эндогенные вещества и фармакологические препараты различной природы могут влиять на эффективность АА. Так, токсичность АА снижается в присутствии эндогенного пигмента меланина [46], витамина С [47], гемина (FePPIX) [48–52]. При этом механизмы, лежащие в основе снижения цитотоксичности АА, могут быть разными: образование комплекса меланина с АА и улавливание АФК, генерируемых АА [46], активация антиоксидантной системы (витамин С) [47]. Снижение токсичности АА в присутствии гемина обусловлено как прямым взаимодействием FePPIX с АА [48, 53], угнетением транспорта АА в клетку [48, 53], селективным ингибированием активности COX, фермента дыхательной цепи митохондрий [48, 49], так и влиянием на экспрессию (усиление) гена *Nrf2* и опосредованную через него активацию антиоксидантной системы клетки [52]. К сожалению, во всех этих немногочисленных работах исследователи в качестве АА не использовали ACLA [48–52], поэтому неизвестно, зависит ли способность FePPIX снижать токсичность АА от химической структуры этих препаратов и на каком этапе происходит его вмешательство в механизм действия АА.

Ранее мы показали, что чувствительность к DOX опухолевых клеток животных разного гистогенеза, растущих *in vitro*, снижается в присутствии ТФ, компонента противоопухолевого средства — бинарной каталитической системы (ТФ + аскорбиновая кислота) [54]. Цели настоящей работы: 1) выяснить, влияет ли ТФ на цитотоксичность препаратов «антрахинонового» ряда — АА и митоксантрона (MitOX) — в

отношении лейкозных клеток человека линии K562; 2) определить, существует ли зависимость защитных свойств ТФ от химической структуры АА в ряду DOX, DNR, IDA, ACLA; 3) сравнить эффективность двух модуляторов токсичности АА: ТФ и FePPIX; 4) оценить способность ТФ защищать лейкозные клетки от гибели, индуцированной АА по механизму апоптоза, некроза, преждевременного старения; 5) исследовать влияние ТФ на способность клеток накапливать АА как возможный механизм снижения токсичности этих препаратов в присутствии модулятора.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе были использованы следующие химические реактивы: Трис-ОН, Трис-НСl, РНКазы А, ДМСО, NP-40, пропидия йодид (PI), $K_3Fe(CN)_6$, $K_4Fe(CN)_6$, X-Gal, МТТ, хлорохин (CQ) — компании Sigma. Этидия бромид, магния хлорид, дитиотреитол, натрия ацетат, Tween 20, глутаральдегид получены от компании Serva. Фенол, хлороформ, борная кислота, натрия хлорид — компании «Реахим», квалификация «хч»; агароза компании Helicon, квалификация «Biothech grade»; маркеры молекулярной массы ДНК ($\times 100$ bp) компании Fermentas (Литва). Ферменты: обратная транскриптаза M-MuLV, полимераза Tag, реакционные буферы, маркеры молекулярной массы ДНК с длиной фрагментов 100 п. н. получены из Fermentas (Литва); смесь дезоксирибонуклеотидов, гексамеры, праймеры для генов синтезированы в компании «Литех» (Россия).

Химиопрепараты: DOX (Bristol-Myers Squibb); DNR, IDA, ACLA (Sigma); MiTOX (Jelfa); этопозид (VP-16; Sandoz, Швейцария). Терафтал-лио (ТФ) (серии 051298) — препарат совместного производства ФГУП ГНЦ «НИОПИК» и ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. FePPIX получен из компании Sigma; ^{14}C -даунорубин (^{14}C -DNR; удельная активность 1,67 ГБк/ммоль) — компании Amersham (Великобритания).

FePPIX, ACLA, DNR, IDA, CQ растворяли в ДМСО; DOX, MiTOX, VP-16, ТФ — в воде. Стоковые растворы в аликвотах (20 мкл) хранили при температуре $-60^\circ C$ и размораживали в каждой новой серии опытов.

Культуры клеток

В исследовании использовали культуры опухолевых клеток: эритробластного лейкоза линии K562, аденокарциномы толстой кишки линии HCT 116, аденокарциномы молочной железы MCF-7. Для поддержания линий и проведения исследований лейкозные клетки культивировали в питательной среде, содержащей RPMI 1640, 10 % FCS, 2 ммоль/л глутамин и антибиотики (стрептомицин + пенициллин). Клетки, растущие в виде монослоя (HCT 116, MCF-7), культивировали в среде, содержащей DMEM, 10 % FCS, 2 ммоль/л глутамин и антибиотики.

Исследование жизнеспособности опухолевых клеток *in vitro* МТТ-методом

Для изучения цитотоксической активности препаратов был использован МТТ-метод, подробно описанный ранее [55]. Величина IC_{50} (концентрация

50%-го ингибирования) была вычислена с помощью метода численных решений по трем экспериментальным точкам с максимальными значениями модуля первой производной экспериментальной кривой выживаемости клеток и представлена в виде $M \pm m$. Для оценки эффективности модулятора (M) в комбинации с препаратами использован индекс резистентности (IR), равный отношению:

$$IR = IC_{50}(\text{препарат} + M) / IC_{50}(\text{препарат}).$$

Величина $IR > 1,0$ в присутствии нетоксических концентраций модулятора (выживаемость клеток не менее 80 % по сравнению с контрольными клетками) свидетельствовала о снижении чувствительности клеток к химиопрепарату. В экспериментах по изучению цитотоксичности с целью фармакологически снизить препарат-индуцированную аутофагию клетки предварительно инкубировали с CQ (25 мкмоль/л) в течение 40 мин с последующим воздействием DOX \pm ТФ (25 мкмоль/л).

Исследование клеточного цикла методом проточной флюориметрии

Клетки линии K562 ($10^6/3$ мл питательной среды в лунке) инкубировали в 6-луночных планшетах с DOX в присутствии и без модулятора в течение 48 ч. Затем клетки осаждали, промывали PBS и инкубировали в течение 30 мин в растворе, содержащем 0,1 % натрия цитрата, 0,3 % NP-40, 50 мкг/мл PI, 50 мг/мл рибонуклеазы А. Клеточную суспензию анализировали на проточном цитофлюориметре BD FACS Canto II в каналах Pe-A и PerCP-Cy5.5, накапливали 30 000 событий. Анализ митотического цикла был выполнен на клетках, меченных PI, а содержание в популяции клеток в фазах subG1, G1, S и G2/M было вычислено из гистограмм в программе FACS Diva и представлено в процентах.

Определение активности лизосомальной β -галактозидазы в клетках

Экспрессию β -галактозидазы в клетках определяли согласно методике [56] с некоторыми модификациями. Клетки лейкоза K562 рассеивали в лунки 12-луночного планшета в концентрации $2,5 \times 10^5/2$ мл питательной среды и инкубировали с DOX ($2,5 \times 10^{-7}$; $1,25 \times 10^{-7}$; $6,25 \times 10^{-8}$ M) в присутствии и без ТФ/FePPIX (20 мкмоль/л) в течение 48 ч. По окончании инкубации суспензии клеток переносили в пробирки и отмывали от питательной среды в PBS дважды путем центрифугирования (1800 об./мин, 5 мин). В этих же пробирках фиксировали клетки смесью 2% формалин + 0,2% глутаральдегид в PBS в течение 5–10 мин при комнатной температуре. После фиксации клетки промывали от фиксатора 3 раза в PBS (2 мл), суспендировали в растворе (250 мкл), содержащем субстрат X-Gal, для проявления активности β -галактозидазы (40 ммоль/л раствора лимонной кислоты в PBS, 150 ммоль/л натрия хлорида, 2 ммоль/л магния хлорида, 5 ммоль/л $K_3Fe(CN)_6$, 5 ммоль/л $K_4Fe(CN)_6$, 1 мг/мл X-Gal; pH 6,0) и переносили в лунки 12-луночного планшета. Планшет помещали в термостат (без CO_2), клетки инкубировали при температуре $37^\circ C$ в течение 7–12 ч. Окрашенные «синие» клетки фотографировали с помощью фотокамеры Canon 60D при световой микроскопии на инвертированном микроскопе Leica DMIL и увеличении 200 раз.

Регистрация гибели клеток путем апоптоза методом электрофореза ДНК в агарозном геле

Для оценки способности АА индуцировать в клетках апоптоз, сопровождаемый межнуклеосомной деградацией ДНК, использовали методику, описанную в работе У.Н. Ling и соавт. [57]. Для этой цели клетки линии НСТ 116 рассаживали в лунки 6-луночного планшета в концентрации $4 \times 10^5/3$ мл питательной среды и помещали в CO_2 -термостат для прикрепления их к подложке. Через 6–8 ч к клеткам добавляли DNR в присутствии модулятора и без него и инкубировали в течение 48 ч. Клетки лизировали в 0,5 мл буфера, содержащего 20 ммоль/л Трис-НCl, pH 7,4, 0,35 ммоль/л натрия хлорида, 0,5 % NP-40, 2 ммоль/л магния хлорида, 1 ммоль/л дитиотреитола при температуре 4 °С в течение 40 мин. ДНК экстрагировали смесью фенола и хлороформа (1:1) и осаждали этанолом (98 %) в присутствии 0,3 ммоль/л натрия ацетата при температуре –20 °С. Осадок ДНК промывали от избытка солей 70% спиртом. На этапе промывания ДНК проводили объединение ДНК параллельных проб, затем обрабатывали РНКазой А в течение 30 мин при температуре 65 °С и только после этого подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле, используя буфер $0,5 \times \text{TBE}$. Фрагменты ДНК длиной 100 бп служили маркерами межнуклеосомной фрагментации ДНК.

Регистрация гибели клеток путем некроза по выходу ЛДГ в среду инкубации

Гибель клеток путем некроза оценивали по выходу лактатдегидрогеназы (ЛДГ) вследствие дезинтеграции мембран в среду инкубации [58]. Клетки K562 рассаживали на 96-луночный планшет в концентрации $1 \times 10^4/200$ мкл питательной среды, содержащей 1 % FCS, и инкубировали с DOX в диапазоне концентраций 1–10 мкмоль/л в присутствии модуляторов и без них (ТФ/FePPIX, 10 мкмоль/л) в течение 24 ч. После инкубации с препаратами клетки в планшетах центрифугировали (2000 об./мин, 5 мин). Аликвоты супернатанта смешивали с теплыми реагентами и определяли активность ЛДГ с помощью LDH assay kit (Cayman chemical) по формуле:

$$\text{Активность ЛДГ (\%)} = (S - N) / (P - N),$$

где S — поглощение супернатанта клеток, обработанных препаратами (490 нм), N — отрицательный контроль (супернатант клеток, обработанных 0,1 % ДМСО), P — положительный контроль (супернатант образцов клеток, обработанных 0,2 % Tween). Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение.

Исследование экспрессии гена *beclin1* в опухолевых клетках методом ОТ-ПЦР в реальном времени

Выделение РНК из клеток и синтез кДНК. Через 6 ч после культивирования с химиопрепаратами клетки лизировали реагентом TRIzol из расчета 1 мл на 1×10^6 клеток согласно стандартной методике. Концентрацию РНК определяли с помощью Quant-IT RNA Assay Kit согласно протоколу производителя

(Invitrogen, США). Для синтеза кДНК брали 250 нг РНК и проводили обратную транскрипцию в конечном объеме смеси 20 мкл с использованием iScript™ Select cDNA Synthesis Kit согласно инструкции (Bio Rad, США). Реакцию проводили при температуре 42 °С в течение 70 мин. Обратную транскриптазу (ревертазу) инактивировали нагреванием реакционной смеси до 85 °С в течение 5 мин. Контроль обратной транскрипции проводили при отсутствии обратной транскриптазы.

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Количественная ПЦР в реальном времени проводилась на Light Cycler 96 (Roche, США) и CFX96 Real-Time System (Bio Rad, США) с использованием коммерческой смеси iTaq® Universal SYBR® Green Supermix согласно протоколу производителя (Bio Rad, США). В качестве матрицы для ПЦР была использована кДНК образцов. Уровень экспрессии мРНК *beclin1* определяли путем нормализации образцов к референсным генам (β -actin и *GAPDH*). ПЦР-реакционная смесь содержала 2 мкл (50 нг) кДНК и 5 пкмоль праймеров, последовательности которых представлены в табл. 1.

Условия амплификации. Предварительная обработка при температуре 95 °С в течение 5 мин, с последующими 39 циклами: 95 °С — 5 с; 60 °С — 30 с; 72 °С — 30 с. Анализ кривых плавления проводили путем детекции флюоресценции при постепенном нагревании образцов до 95 °С с шагом 0,5 °С/с. Все образцы анализировались в повторах в 96-луночных низкопрофильных планшетах или стрипах. Результаты количественной ОТ-ПЦР представлены параметром $\Delta\Delta\text{Ct}$.

Исследование способности клеток накапливать антрациклины в присутствии модуляторов и без таковых с помощью радиометрического метода

Для оценки способности лейкозных клеток накапливать АА их рассеивали на 24-луночные планшеты в количестве 5×10^5 клеток в 800 мкл полной питательной среды на лунку, добавляли 50 мкл ^{14}C -DNR (0,04 мкКи, конечная концентрация DNR в лунке 4 мкмоль/л) в присутствии и без ТФ/FePPIX (10 мкмоль/л). После инкубации с препаратами при температуре 37 °С в течение 30 мин в атмосфере 5% CO_2 клетки переносили в центрифужные пробирки, трижды отмывали от свободной радиоактивной метки 3 мл холодного физиологического раствора, лизировали в 0,5 мл 0,5 N натрия гидроксида при температуре 37 °С в течение 2 ч. Лизаты, нейтрализованные 5 N соляной кислоты, переносили во фла-

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, использованных для анализа уровня экспрессии генов и размера продукта

Ген	Последовательность прямого (F) и обратного (R) праймеров	Размер продукта
<i>Beclin1</i>	F: 5'-GAGTTTCAAGATCCTGGACCGTGCA-3' R: 5'-CTGTTGGCACTTTCTGTGGACATCA-3'	282 п. н.
<i>GAPDH</i>	F: 5'-GGGGAGCCAAAAGGGTCACTATCT-3' R: 5'-GACGCCTGCTTACCACCTTCTTG-3'	212 п. н.
β -actin	F: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' R: 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTC-3'	201 п. н.

Таблица 2. Чувствительность клеток линии K562 к противоопухолевым препаратам (IC_{50}/IR) в присутствии модуляторов и без таковых

Препарат	IC_{50}/IR		
	Без М	С ТФ (10 мкмоль/л)	С FePPIX (10 мкмоль/л)
DOX	384 ± 52	1848 ± 37/4,1 ± 0,6	1000 ± 137/2,7 ± 0,4
DNR	306 ± 83	862 ± 31/2,8 ± 0,2	800 ± 43/2,2 ± 0,2
IDA	538 ± 168	807 ± 50/1,5 ± 0,4	1240 ± 54/2,5 ± 0,1
ACLA	383 ± 8	33,3 ± 7,0/1,1 ± 0,1	30 ± 2/1,1 ± 0,1
MiTOX	1500 ± 50	34 930 ± 1560/21,0 ± 7,7	11 490 ± 641/5,6 ± 2,5
VP-16	340	260/0,8	420/1,2

коны, добавляли 5 мл сцинтилляционной жидкости (диоксан + нафталин), метку считали с помощью β-счетчика (ЛКВ, Швеция). Данные выражены в виде количества импульсов/ч в расчете на 10^6 клеток и являются средними величинами, полученными из 2 независимых экспериментов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование влияния ТФ на цитотоксичность АА разной химической структуры в отношении опухолевых клеток

С целью выяснить зависимость защитного эффекта ТФ от химической структуры АА (см. рис. 1) мы исследовали чувствительность клеток линии K562 к DOX, DNR, IDA и ACLA в присутствии модулятора и без него.

По нашим данным, в присутствии ТФ (10 мкмоль/л) чувствительность клеток K562 снижается к стандартным АА (DOX, DNR, IDA) и не изменяется к ACLA (табл. 2). Среди АА эффективность защиты ТФ от токсичности препаратов выше для DOX по сравнению с DNR и IDA, о чем свидетельствуют показатели IR 4,1 ± 0,6, 2,8 ± 0,2, 1,5 ± 0,4 соответственно. Как и в случае с ТФ, в присутствии FePPIX (10 мкмоль/л) — известного модулятора токсичности АА [48–52] — величина IC_{50} увеличивается для DOX, DNR и IDA в среднем в 2,5 раза, а для ACLA не изменяется (IR = 2,7 ± 0,4, 2,2 ± 0,2, 2,5 ± 0,1, 1,1 ± 0,1 соответственно). Кроме того, по сравнению с FePPIX эффективность защиты ТФ от токсичности DOX выше и сопоставима с таковой для DNR и IDA. По нашим данным, в присутствии ТФ (10 мкмоль/л) чувствительность клеток линии K562 к другому препарату «антрахинонового» ряда, MiTOX, снижается в среднем в 20 раз. Таким образом, уровень защиты ТФ от токсичности MiTOX в 5 раз выше, чем от DOX (IR = 21,0 ± 7,7 и 4,1 ± 0,6 соответственно). В присутствии FePPIX токсичность MiTOX для клеток K562 снижается только в 5 раз (IR = 5,6 ± 2,5) (см. табл. 2), что свидетельствует о большей эффективности ТФ по сравнению с FePPIX.

Таким образом, по нашим данным, защитный эффект ТФ/FePPIX, снижающий токсичность АА по отношению к клеткам K562, зависит от химической структуры антибиотика. Отсутствие влияния ТФ/FePPIX на чувствительность клеток к ACLA наводит на мысль о том, что, по-видимому, для протекции от токсичности АА в присутствии модуляторов важна NH_2 -группа гликозидной части антибиотика, различия в которой

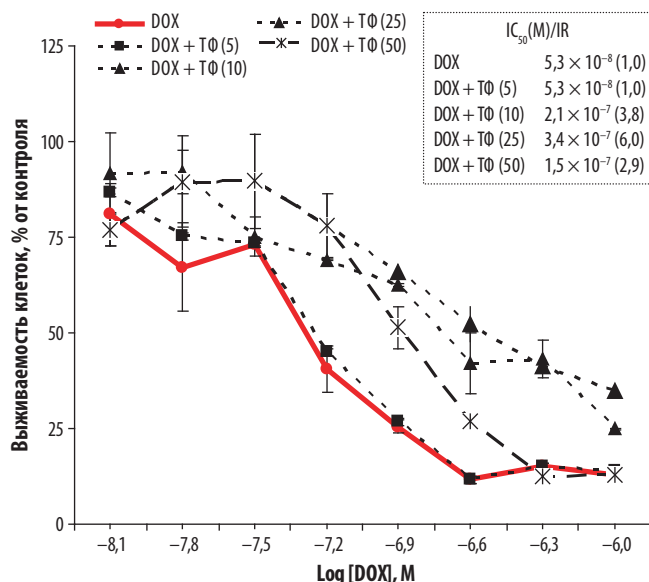


Рис. 3. Зависимость токсичности комбинации DOX + ТФ для клеток K562 от концентрации модулятора

DOX — доксорубин; IC_{50} — концентрация 50%-го ингибирования; IR — индекс резистентности; М — модулятор; ТФ — терафтал.

Fig. 3. Dependence of DOX + ТФ combination toxicity for the K562 cells on modulator concentration

DOX — doxorubicin; IC_{50} — 50 % inhibitory concentration; IR — index of resistance; M — modulator; ТФ — teraphthal.

имеются между ACLA и стандартными АА (DOX, DNR, IDA) (см. рис. 1). В качестве гипотезы мы выдвигаем предположение о роли $-NH_2$ в химической структуре препаратов в механизме защиты ТФ/FePPIX от их токсичности. В дальнейшем мы планируем выяснить роль NH_2 -группы в защитном эффекте модуляторов от токсичности MiTOX с помощью структурных аналогов препарата.

Поскольку как стандартные АА (DOX, DNR, IDA), так и MiTOX принадлежат к классу ингибиторов Торо II [59], представляло интерес выяснить влияние ТФ на токсичность другого представителя ингибиторов этого фермента — этопозида (VP-16) [59]. Оказалось, что в присутствии ТФ/FePPIX токсичность VP-16 не изменяется (IR = 0,8) (см. табл. 2). Вероятно, отсутствие NH_2 -группы в химической структуре VP-16 может служить причиной, по которой ТФ/FePPIX теряют способность влиять на токсичность этого препарата.

С целью определить эффективность ТФ как протектора, мы исследовали зависимость токсичности DOX для клеток K562 от концентрации модулятора (рис. 3). По нашим данным, зависимость снижения токсичности АА от концентрации ТФ имеет колоколообразный характер. Защитный эффект ТФ для клеток K562 отсутствует при концентрации модулятора в среде 5 мкмоль/л, регистрируется при 10 мкмоль/л (IR = 3,8), возрастает при 25 мкмоль/л (IR = 6,0) и снижается при нетоксической для клеток концентрации модулятора 50 мкмоль/л (IC_{50} ТФ > 3000 мкмоль/л) до начального уровня защиты (IR = 2,9). Такой колоколообразный характер защиты ТФ от токсичности АА наводит на мысль, что на белке, вовлеченном в механизм защитного эффекта модулятора, как и в случае растворимой гуанилатциклазы, которая, по нашим данным, оказалась белком-мишенью ТФ [60], имеется

два места связывания для ТФ с высоким и низким сродством, выполняющих, как предполагают, регуляторную функцию. В присутствии FePPIX защитный эффект также регистрируется при концентрации модулятора 10 мкмоль/л (см. рис. 3), но в отличие от ТФ дальнейшее повышение концентрации модулятора не приводит к увеличению его эффективности (данные не представлены).

По данным литературы, снижение токсичности АА в присутствии FePPIX зависит от вида клеток. Например, защитный эффект FePPIX не наблюдается относительно клеток аденокарциномы человека линии MCF-7 [48]. По нашим данным, в условиях комбинированного воздействия (DOX + ТФ) на клетки линии MCF-7 их выживаемость снижается по сравнению с влиянием DOX. При этом выявляется прямая зависимость защитного эффекта от концентрации модулятора в среде инкубации (рис. 4). Так, при концентрации ТФ 12,5, 25 и 50 мкмоль/л токсичность АА снижается в 1,9, 4,3 и 5,4 раза соответственно. В то же время в присутствии FePPIX для уменьшения токсичности DOX относительно клеток MCF-7 в 1,9 раза необходима концентрация модулятора 25 мкмоль/л. Дальнейшее увеличение концентрации FePPIX в среде до 50 мкмоль/л приводит к увеличению IC_{50} АА только в 2,6 раза. Эти данные свидетельствуют о том, что ТФ по сравнению с FePPIX является более эффективным протектором токсичности АА и для клеток MCF-7. С другой стороны, мы отмечаем «сдвиг вправо» в сторону большей концентрации ТФ/FePPIX, необходимой для уровня защиты этих клеток от токсичности DOX, соответствующего таковому для клеток K562. По-видимому, в опухолевых клетках человека двух типов — эритробластах линии K562 и аденокарциномы MCF-7 — существуют разные по количеству или сродству мишени, участвующие в механизме защитного эффекта обоих модуляторов.

Чтобы ответить на вопрос, лежит ли в основе защиты клеток от токсичности к АА в присутствии ТФ/FePPIX один и тот же механизм, мы исследовали чувствительность клеток K562 к DOX в присутствии комбинации модуляторов. По нашим данным, кривая выживаемости клеток в присутствии комбинации DOX + ТФ не отличается от таковой для комбинации DOX + ТФ + FePPIX (рис. 5). Таким образом, конечный эффект комбинации DOX + ТФ + FePPIX не является суммой вклада обоих модуляторов и свидетельствует о том, что ТФ и FePPIX конкурируют за одни и те же мишени, участвующие в механизме снижения токсичности АА.

Влияние ТФ на способность DOX индуцировать преждевременное старение опухолевых клеток

Стандартные АА (за исключением АСЛА), будучи интеркаляторами ДНК и ингибиторами Торо II, способны вызывать сшивки и разрывы в ДНК. Это приводит к нарушению митоза: остановке клеток в фазе S, накоплению их в фазе G2 митотического клеточного цикла, а в дальнейшем — к аресту пролиферации [61, 62]. Продолжительная остановка в фазе G2/M клеток, перегруженных генетическим материалом, в конечном итоге вызывает их преждевременное старение. Индукция фенотипа SLC является типичным механизмом гибели при воздействии АА (кроме АСЛА)

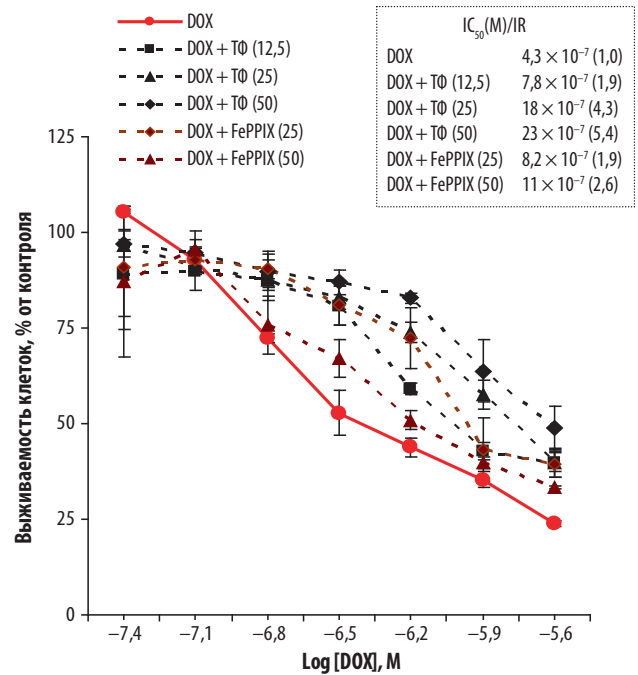


Рис. 4. Зависимость токсичности комбинации DOX + ТФ/FePPIX для клеток линии MCF-7 от концентрации модуляторов в среде инкубации

DOX — доксорубин; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; IC_{50} — концентрация 50%-го ингибирования; IR — индекс резистентности; М — модулятор; ТФ — терафтал.

Fig. 4. Dependence of DOX + ТФ/FePPIX combination toxicity for the MCF-7 cells on modulator concentration in incubation medium DOX — doxorubicin; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; IC_{50} — 50 % inhibitory concentration; IR — index of resistance; M — modulator; ТФ — teraphthal.

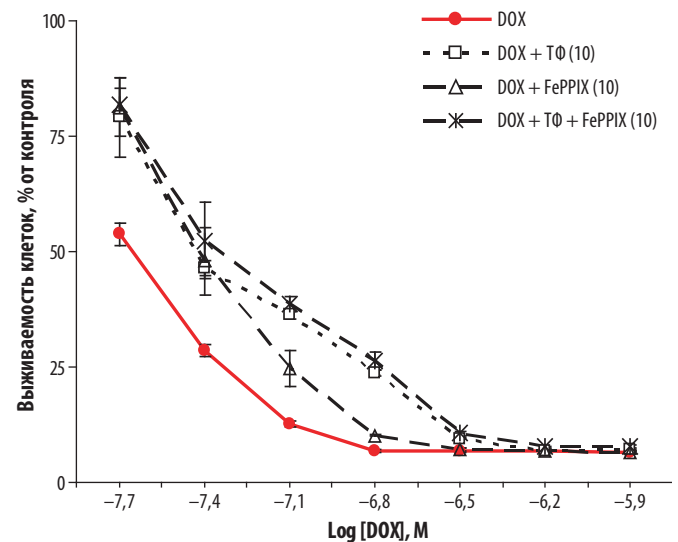


Рис. 5. Токсичность DOX для клеток линии K562 в условиях комбинации с ТФ + FePPIX

DOX — доксорубин; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; М — модулятор; ТФ — терафтал.

Fig. 5. DOX toxicity of ТФ + FePPIX combination for the K562 cells DOX — doxorubicin; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; M — modulator; ТФ — teraphthal.

на опухолевые клетки, включая линии гематологического происхождения: миеломы [40], В-клеточной лимфомы [41], лейкозных клеток линии K562 [31, 32]. Для клеток с фенотипом SLC характерны морфологиче-

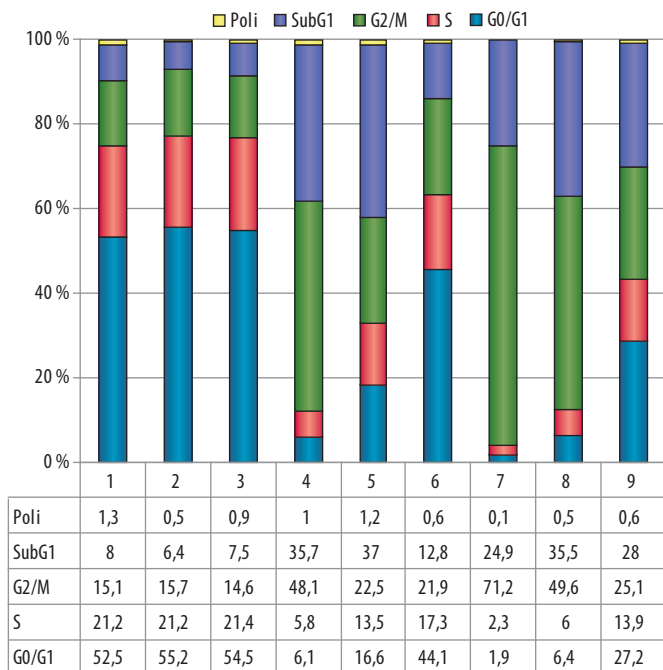


Рис. 6. Распределение эритробластов линии K562 в суспензии по фазам клеточного цикла (G, M, S) после воздействия на них DOX ± ТФ/FePPIX в течение 48 ч

1 — клетки в отсутствие препаратов; 2 — в присутствии FePPIX (20 мкмоль/л); 3 — в присутствии ТФ (20 мкмоль/л); 4 — клетки, обработанные DOX (25 мкмоль/л); 5 — клетки, обработанные DOX (25 мкмоль/л) + FePPIX (20 мкмоль/л); 6 — клетки, обработанные DOX (25 мкмоль/л) + ТФ (20 мкмоль/л); 7 — клетки, обработанные DOX (50 мкмоль/л); 8 — клетки, обработанные DOX (50 мкмоль/л) + FePPIX (20 мкмоль/л); 9 — клетки, обработанные DOX (50 мкмоль/л) + ТФ (20 мкмоль/л)

DOX — доxorубин; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; Poli — полиплоидные варианты; ТФ — терафтал.

Fig. 6. K562 line erythroblast distribution in suspension according to the cell cycle (G, M, S) following 48-h exposure to DOX ± ТФ/FePPIX
1 — cells without exposure; 2 — with FePPIX (20 μM); 3 — with ТФ (20 μM); 4 — DOX (25 μM) exposed cells; 5 — DOX (25 μM) + FePPIX (20 μM) exposed cells; 6 — DOX (25 μM) + ТФ (20 μM) exposed cells; 7 — DOX (50 μM) exposed cells; 8 — DOX (50 μM) + FePPIX (20 μM) exposed cells; 9 — DOX (50 μM) + ТФ (20 μM) exposed cells
DOX — doxorubicin; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; Poli — polyploid types; ТФ — teraphthal.

ские (увеличение размера, разбухание ядер, появление микроядер) и биохимические (увеличение активности β-галактозидазы лизосом) признаки [29, 56].

В нашем исследовании данные проточной цитометрии, представленные на рис. 6, свидетельствуют о том, что воздействие DOX (25 мкмоль/л) в течение 48 ч вызывает изменения клеточного цикла популяции: уменьшается доля клеток в фазе S (5%), почти половина (48%) линии клеток K562 останавливается в фазе G2/M по сравнению с контрольными образцами в этих же фазах цикла (21 и 14,6% соответственно). В присутствии обоих модуляторов — ТФ/FePPIX (20 мкмоль/л) — блок в фазе G2/M наблюдается в 22% клеток, что сопоставимо с контрольными образцами (без препаратов и при наличии одного из модуляторов ТФ/FePPIX — в 15%). Число клеток, заблокированных в фазе G2/M, возрастает при повышении концентрации DOX (50 мкмоль/л) и составляет уже 71%, а в условиях комбинирования с ТФ или с FePPIX — 25 и 50% соответственно. Таким образом, снижение в популяции доли клеток с блоком в G2/M-фазе в условиях комбинации DOX с ТФ/FePPIX свидетельствует о способности модуляторов защищать клетки от нарушений в период прохождения клеточного цикла, индуцированных DOX. При этом эффективность защиты в присутствии ТФ, по нашим данным, выше по сравнению с FePPIX.

Как свидетельствуют данные, представленные на рис. 7, клетки K562, обработанные DOX (0,5 мкмоль/л), через 48 ч приобретают характерные для фенотипа SLC морфологические признаки. По сравнению с контрольными образцами (рис. 7, А) они гораздо крупнее и имеют разбухшие ядра (рис. 7, Б). В этих же условиях клетки, обработанные DOX, в присутствии модуляторов ТФ/FePPIX (20 мкмоль/л) не отличались по морфологии от контрольного образца (данные не представлены).

По нашим данным, индукция фенотипа SLC в клетках K562 после воздействия DOX (0,5 мкмоль/л) сопровождается увеличением количества лизосом, о чем свидетельствуют «синие» клетки с высокой экспрессией

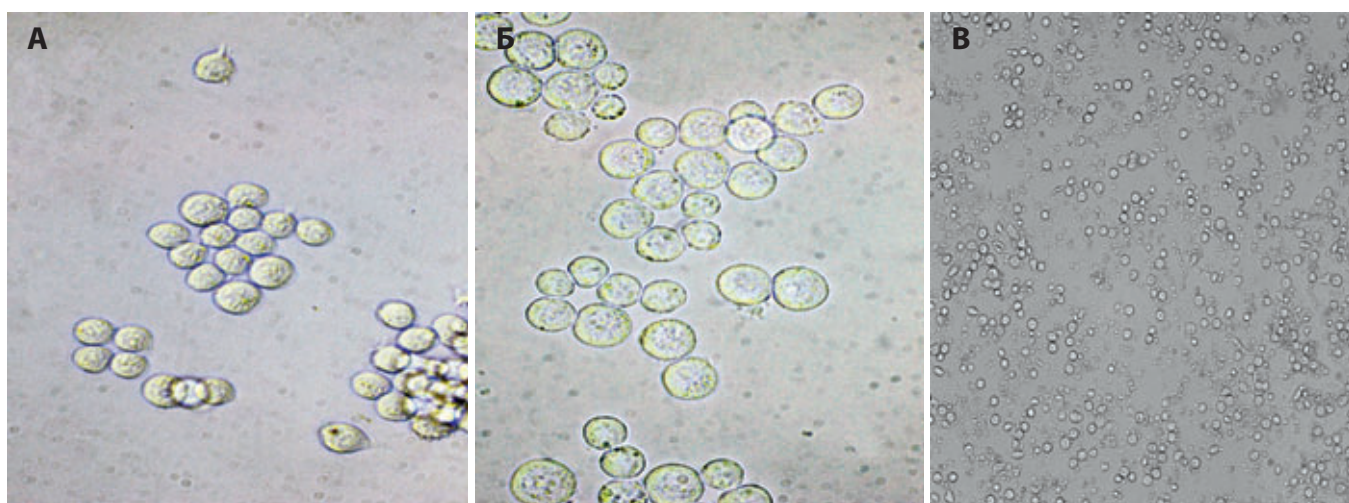


Рис. 7. Морфологический фенотип клеток линии K562 после воздействия на них антрациклиновых антибиотиков
А — контрольные клетки; Б — доxorубин (0,5 мкмоль/л, 48 ч); В — акларубин (0,05 мкмоль/л, 48 ч)

Fig. 7. Morphological phenotype of the K562 cells following exposure to anthracycline antibiotics
А — controls; Б — doxorubicin (0.5 μM, 48 h); В — aclarubicin (0.05 μM, 48 h)

β -галактозидазы, выявленные с помощью реагента X-GAL (рис. 8, Б). В популяции клеток, обработанных комбинацией DOX +ТФ/FePPIX (20 мкмоль/л), «синие» клетки отсутствуют, включая варианты с морфологическими признаками фенотипа SLC (увеличенные размеры) (рис. 8, В, Г). В этих же условиях единичные «синие» клетки присутствуют в контрольных образцах (рис. 8, А, стрелка).

Как правило, фенотип SLC является этапом необратимого ареста пролиферации и последующей гибели клеток по типу митотической катастрофы [38]. В то же время этот процесс обратим при низких кон-

центрациях АА [63], а некоторые типы клеток (MCF-7, НСТ 116) способны избегать SLC и возобновлять рост благодаря полиплоидизации [64].

Накапливается клинический материал, свидетельствующий о том, что опухолевые клетки с фенотипом SLC могут быть причиной рецидивов заболевания [65].

По нашим данным, представленным на рис. 9, через 6 дней после начала воздействия DOX (0,5 мкмоль/л) крупные клетки приобретают разнообразный деформированный фенотип. По-видимому, это происходит вследствие повреждения актинового цитоскелета (рис. 9, А) в попытках избавиться от

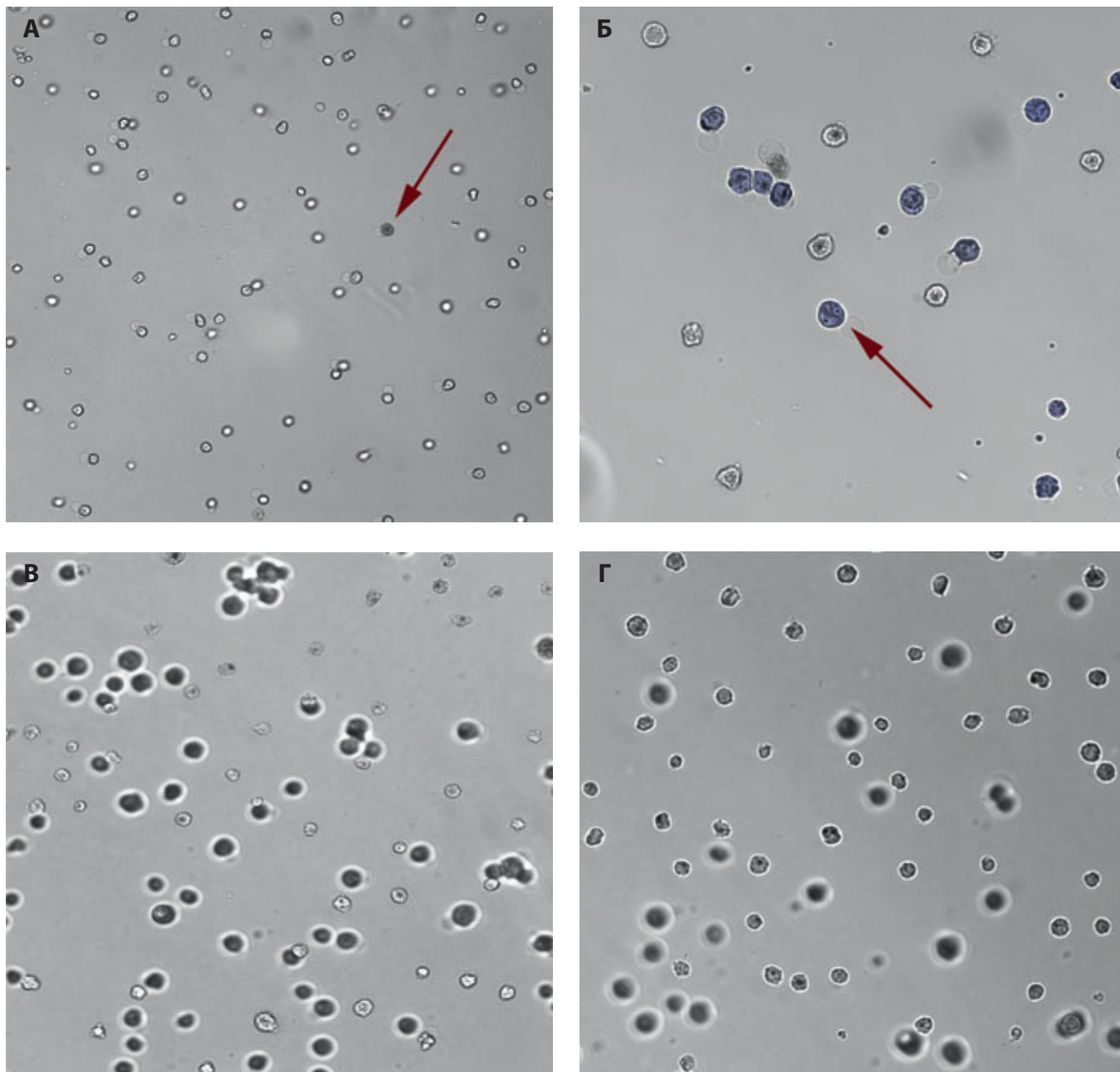


Рис. 8. Экспрессия β -галактозидазы в эритроблестах линии K562 после воздействия на них DOX \pm ТФ/FePPIX. Клетки, окрашенные на β -галактозидазу, указаны красной стрелкой

А — в отсутствие препаратов; Б — DOX (5 мкмоль/л, 48 ч); В — DOX + ТФ (20 мкмоль/л); Г — DOX + FePPIX (20 мкмоль/л)
DOX — доксорубин; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; ТФ — терафтал.

Fig. 8. β -galactosidase expression in the K562 line erythroblast following DOX \pm ТФ/FePPIX exposure. A red arrow indicates β -galactosidase stained cells

А — cells without exposure; Б — DOX (5 μ M, 48 hours); В — DOX + ТФ (20 μ M); Г — DOX + FePPIX (20 μ M)
DOX — doxorubicin; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; ТФ — teraphthal.

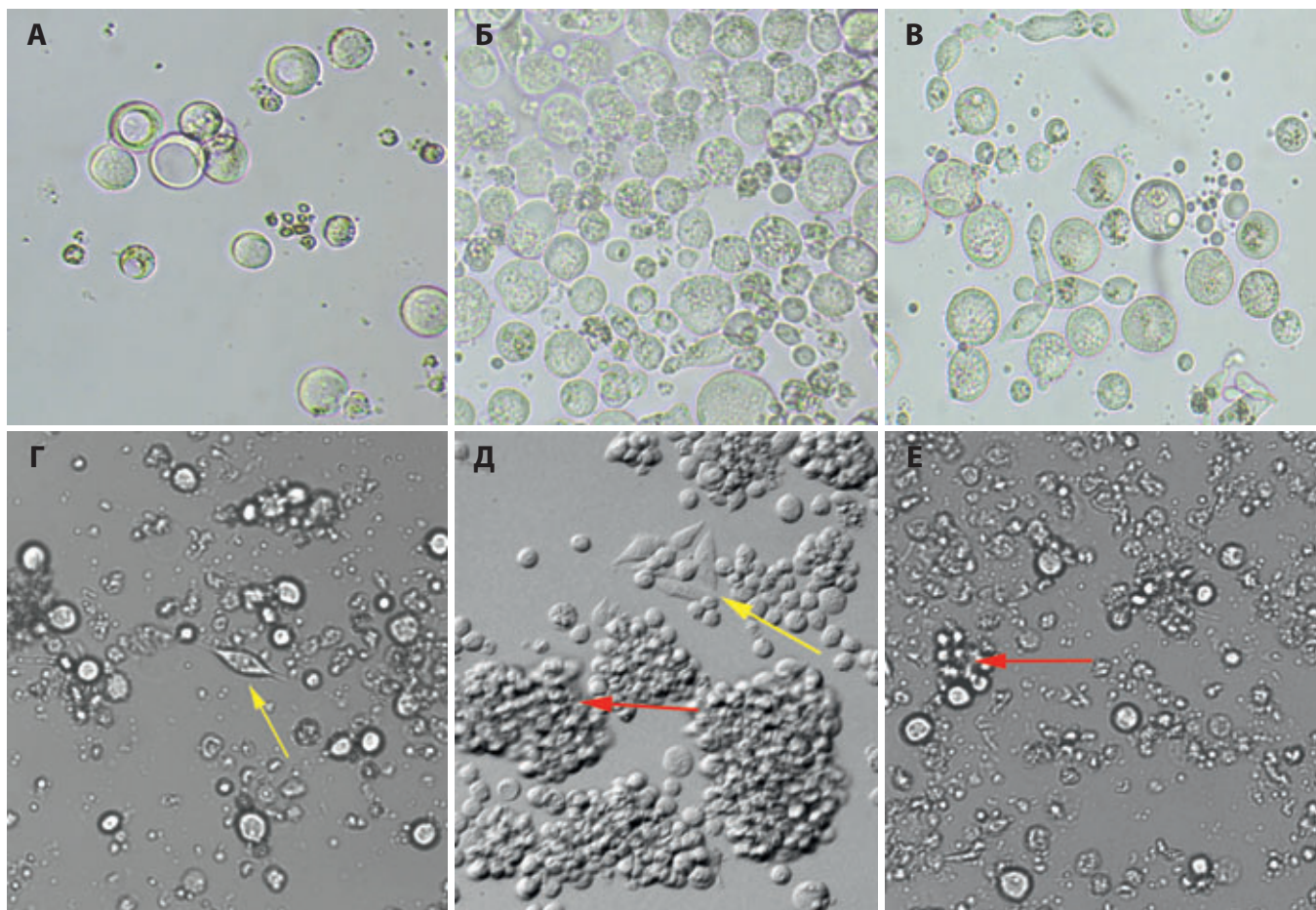


Рис. 9. Изменения клеток K562 с фенотипом SLC, индуцированные DOX ± ТФ/FePPIX. Клетки, подобные фибробластам, — желтая стрелка; колония суспензионных клеток — красная стрелка. 6 дней: (А) DOX (0,25 мкмоль/л), (Б) DOX (0,25 мкмоль/л) + ТФ (20 мкмоль/л), (В) DOX (0,25 мкмоль/л) + FePPIX (20 мкмоль/л); 14 дней: (Г) DOX (0,25 мкмоль/л), (Д) DOX (0,25 мкмоль/л) + ТФ (20 мкмоль/л), (Е) DOX (0,25 мкмоль/л) + FePPIX (20 мкмоль/л)
DOX — доксорубицин; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; ТФ — терафтал.

Fig. 9. DOX ± ТФ/FePPIX induced changes of the K562 cells with SLC phenotype. Yellow arrow — fibroblast-like cells; red arrow — suspension cell colony. 6 days of exposure: (A) DOX (0.25 μM), (B) DOX (0.25 μM) + ТФ (20 μM), (C) DOX (0.25 μM) + FePPIX (20 μM); 14 days: (G) DOX (0.25 μM), (D) DOX (0.25 μM) + ТФ (20 μM), (E) DOX (0.25 μM) + FePPIX (20 μM)
DOX — doxorubicin; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; ТФ — teraphthal.

лишнего генетического материала. Однако клетки погибают, а митотическая катастрофа завершается в пределах 12 дней (рис. 9, В). В условиях комбинированного воздействия DOX + ТФ/FePPIX (20 мкмоль/л) (рис. 9, В) гибель крупных клеток происходит по аналогичному сценарию. Однако на фоне разрушенных клеток выделяются колонии суспензионных мелких клеток и колония клеток, подобных фибробластам (рис. 9, Г).

Дальнейшие исследования требуются с целью выяснить: какие клетки являются источником возобновления роста клеток линии K562; существуют ли они в исходной популяции и отбираются при воздействии АА или появляются на каком-то этапе из клеток с SLC фенотипом? В нашем исследовании по данным проточной цитометрии полиплоидные клетки исходно присутствуют в суспензии K562 (1 %), но их доля не изменяется после воздействия на клетки DOX ± ТФ/FePPIX (см. рис. 6). Следовательно, полиплоидия не является механизмом защиты от токсичности АА лейкозных клеток человека линии K562 в отличие от клеток мышей [66] и поэтому не может быть источником колоний мелких клеток (см. рис. 9, Г).

Влияние ТФ на способность DOX индуцировать гибель клеток по механизмам апоптоза и некроза в опухолевых клетках

Принято считать, что клетки линии K562, имеющие мутантный ген *BCR/ABL*, устойчивы к индукции апоптоза противоопухолевыми препаратами, в т. ч. АА [67]. В то же время в этих клетках после воздействия АА регистрируют появление subG1-пика как одного из маркеров начального этапа индукции апоптоза по митохондриальному пути. Согласно нашим данным, представленным на рис. 6, в популяции клеток K562 исходно в subG1-пике находится 8 % клеток. Доля этой фракции возрастает после воздействия как DOX (25 мкмоль/л), так и комбинации DOX + FePPIX до 35 %, а на фоне ТФ составляет 12 %. Эти данные свидетельствуют о том, что ТФ в отличие от FePPIX обладает способностью защищать клетки K562 уже на ранних этапах индукции апоптоза в присутствии АА. Конечный этап апоптоза, вызываемого АА, а именно межнуклеосомная фрагментация ДНК, во многих клетках, включая лейкозные клетки линии K562, не регистрируется [68]. В связи с этим мы привлекли

другую модель — клетки линии HCT 116, чувствительность которых к DOX и DNR также снижается в присутствии ТФ/FePPIX (данные не представлены).

По нашим данным, большой пул коротких фрагментов ДНК (100 п. н.) выявляется методом гелелектрофореза в лизатах клеток аденокарциномы HCT 116 после воздействия на них DNR (5 мкмоль/л, 48 ч) (рис. 10, лунка 1). В присутствии комбинации DNR + FePPIX в клетках также наблюдается фрагментация ДНК (рис. 10, лунка 3), а в присутствии ТФ (рис. 10, лунка 2) ДНК остается интактной, как в контрольном образце (рис. 10, лунка 4).

Таким образом, ТФ обладает способностью защищать клетки K562 от гибели путем апоптоза, вызванного АА, и это свойство отсутствует у FePPIX.

По нашим данным, в присутствии АА (DNR) наблюдается гибель клеток K562 по типу некроза, о чем свидетельствует присутствие ЛДГ в питательной среде (выход фермента из клеток после нарушения целостности мембран) (рис. 11). Отмечается прямая зависимость количества клеток, погибших по этому механизму, от концентрации DNR. Доля таких клеток составляет 25 и 50 % при концентрации АА 5 и 10 мкмоль/л соответственно. В присутствии модуляторов (ТФ/FePPIX, 10 мкмоль/л) снижение числа клеток, погибших путем некроза, регистрируется при высокой концентрации АА (10 мкмоль/л) и для обоих модуляторов составляет 30 % от величины, соответствующей таковой в отсутствие их. Требуются дальнейшие эксперименты, чтобы выяснить, зависит ли эффективность защиты ТФ/FePPIX от гибели клеток путем некроза от концентрации модулятора.

Роль *beclin*-зависимой аутофагии в защитном эффекте ТФ от токсичности DOX для клеток эритролейкоза K562

Согласно нашим данным, воздействие АА на клетки K562 приводит к индукции в них преждевременного старения или SLC-фенотипа. Известно, что одновременно с индукцией SLC в клетках запускается программа аутофагии, процесс деградации и удаления из клетки поврежденных белков и компонентов с помощью лизосом [43]. Среди многочисленных участников аутофагии критическую роль играют белок Beclin-1 и его сигнальные пути [44].

Представляло интерес выяснить роль *beclin*-зависимой аутофагии с участием лизосом в механизме снижения цитотоксичности DOX в присутствии ТФ. Для этой цели мы, с одной стороны, исследовали влияние ТФ на способность DOX индуцировать белок Beclin-1 на уровне мРНК в клетках линии K562, а с другой — в условиях фармакологического ингибирования аутофагии CQ оценили эффективность комбинации DOX + ТФ относительно этих клеток.

По нашим данным, в клетках K562 регистрируется исходный уровень экспрессии мРНК гена *beclin1* (рис. 12). Уровень экспрессии этого гена увеличивается в 2 раза после воздействия на клетки DOX (5 мкмоль/л, 10 ч инкубации) и не изменяется в присутствии ТФ/FePPIX (25 мкмоль/л) по сравнению с соответствующими контрольными клетками. Таким образом, ТФ/FePPIX являются ингибиторами индукции АА экспрессии мРНК гена *beclin1* в эритробластах человека линии K562.

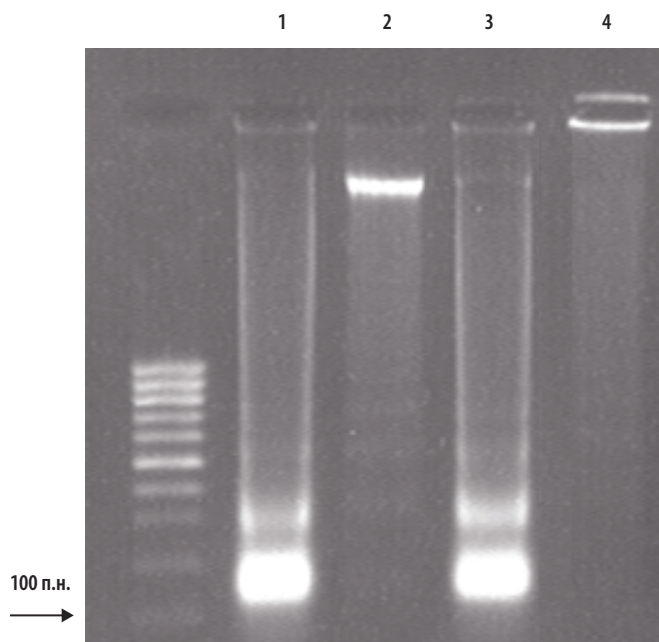


Рис. 10. Межнуклеосомная фрагментация ДНК в клетках линии HCT 116 после воздействия на них DNR в комбинации с ТФ/FePPIX и без модуляторов

1 — DNR (5 мкмоль/л, 48 ч); 2 — DNR + ТФ (10 мкмоль/л); 3 — DNR + FePPIX (10 мкмоль/л); 4 — клетки в отсутствие препаратов DNR — даунорубин; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; ТФ — терафтал.

Fig. 10. DNA internucleosomal fragmentation in the HCT 116 cells following DNR with TPh/FePPIX exposure without modulators

1 — DNR (5 μM, 48 h); 2 — DNR + TPh (10 μM); 3 — DNR + FePPIX (10 μM); 4 — cells in the absence of drugs DNR — daunorubicin; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; TPh — teraphthal.

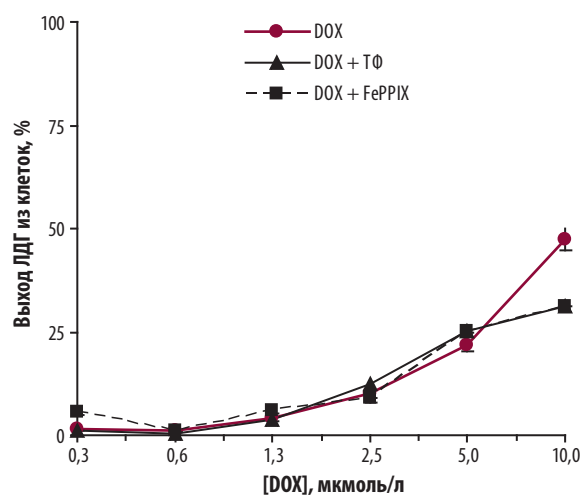


Рис. 11. Выход ЛДГ из клеток линии K562 после воздействия на них DOX (24 ч) в присутствии и без ТФ/FePPIX (10 мкмоль/л) DOX — доксорубин; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; ЛДГ — лактатдегидрогеназа; ТФ — терафтал.

Fig. 11. Release of LDH by the K562 cells following 24-h exposure to DOX with or without TPh/FePPIX (10 μM)

DOX — doxorubicin; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; ЛДГ — lactate dehydrogenase; ТФ — teraphthal.

По нашим данным, в условиях фармакологического ингибирования аутофагии CQ (20 мкмоль/л) цитотоксичность DOX для клеток K562 возрастает в 2 раза (рис. 13). Эти результаты в совокупности

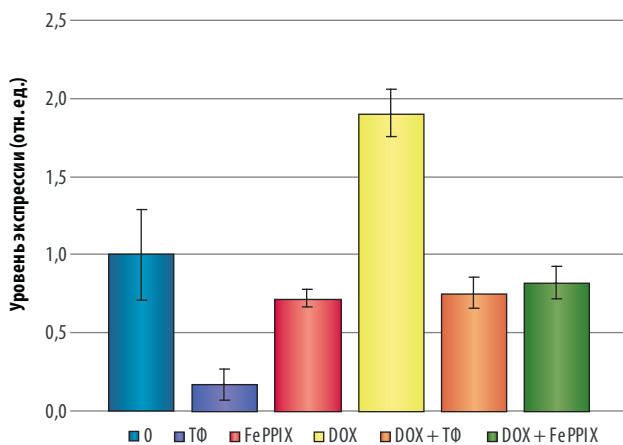


Рис. 12. Уровень экспрессии гена *beclin1* в клетках K562 (исходный и препарат-индуцированный)

DOX — доксорубицин; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; TФ — терафтал.

Fig. 12. *Beclin1* expression in the K562 cells (basal and drug induced)
DOX — doxorubicin; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; TФ — teraphthal.

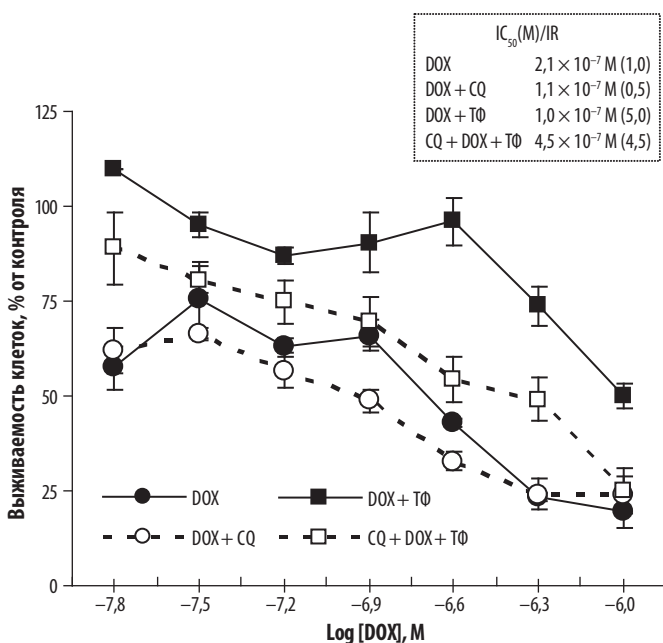


Рис. 13. Токсичность DOX для клеток K562 в условиях фармакологического угнетения аутофагии CQ в присутствии TФ и без него
CQ — хлорохин; DOX — доксорубицин; IC₅₀ — концентрация 50%-го ингибирования; IR — индекс резистентности; M — модулятор; TФ — терафтал.

Fig. 13. DOX toxicity of the K562 cells under pharmacological inhibition of CQ autophagy with or without TPh

CQ — chloroquine; DOX — doxorubicin; IC₅₀ — 50 % inhibitory concentration; IR — index of resistance; M — modulator; TФ — teraphthal.

с данными о способности DOX индуцировать экспрессию гена *beclin1* свидетельствуют о том, что *beclin*-зависимая аутофагия играет роль в защите клеток K562 от токсичности DOX. Однако фармакологическая блокада аутофагии CQ (20 мкмоль/л) не повлияла на выживаемость клеток K562 в условиях комбинированного воздействия на них DOX + TФ. Эти данные подтверждают, что *beclin*-лизосомальный путь аутофагии не участвует в механизме снижения

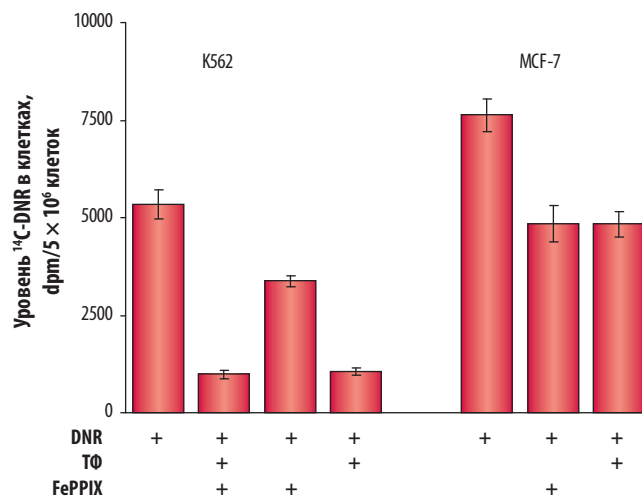


Рис. 14. Накопление ¹⁴C-DNR клетками линий K562 и MCF-7 в присутствии модуляторов TФ/FePPIX (10 мкмоль/л) и без таковых
DNR — даунорубицин; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; TФ — терафтал.

Fig. 14. ¹⁴C-DNR accumulation in the K562 and MCF-7 cells with or without TPh/FePPIX (10 μM) modulators

DNR — daunorubicin; FePPIX — ferri-protoporphyrin IX; TФ — teraphthal.

токсичности DOX для клеток лейкоза линии K562 в присутствии TФ.

Влияние TФ на способность опухолевых клеток накапливать AA

Согласно данным литературы, механизм защиты клеток от токсичности AA в присутствии FePPIX может быть связан со способностью модулятора снижать накопление препаратов опухолевыми клетками [48, 53]. Учитывая эти сведения, мы исследовали влияние TФ/FePPIX на накопление AA лейкозными клетками линии K562.

Согласно нашим данным, при кратковременной инкубации клеток с ¹⁴C-DNR величина накопления AA клетками K562 составляет 5340 ± 384 имп./ч, в присутствии TФ она снижается в 5 раз (982 ± 99 имп./ч), а в присутствии FePPIX — в 1,5 раза (3571 ± 140 имп./ч) (рис. 14). Таким образом, оба модулятора (TФ и FePPIX) являются ингибиторами накопления AA клетками K562, но эффективность TФ выше по сравнению с FePPIX. Это свидетельствует о том, что TФ конкурирует с AA и за другие внутриклеточные мишени. Уровень накопления AA в условиях комбинирования двух модуляторов соответствует величине, характерной для TФ (1061 ± 83 имп./ч), что говорит о конкурентном типе взаимодействия модуляторов с белками-мишенями AA. В этих же условиях уровень накопления ¹⁴C-DNR клетками аденокарциномы человека линии MCF-7 составляет 7626 ± 415 имп./ч. Он снижается в присутствии обоих модуляторов TФ/FePPIX (10 мкмоль/л) до величин 4835 ± 461 и 4451 ± 329 имп./ч соответственно (см. рис. 14). Согласно этим данным, исходный уровень накопления AA в клетках MCF-7 выше по сравнению с клетками K562. Можно предположить, что для защиты клеток линии MCF-7 от токсичности AA необходима концентрация модуляторов выше

10 мкмоль/л. Действительно, результаты цитотоксических экспериментов (см. рис. 4) подтверждают это предположение.

Таким образом, мы установили, что в присутствии ТФ снижается способность опухолевых клеток накапливать АА. В то же время ТФ не влияет на содержание АСЛА в клетках K562 (данные проточной цитометрии не представлены). Можно предположить, что ТФ включается в механизм действия стандартных АА уже на уровне их поступления в клетки. Известно, что АА могут проникать в клетки с помощью транспортеров нуклеозидов [69].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что ТФ обладает способностью защищать лейкозные клетки человека линии K562 от цитотоксического действия стандартных АА (DOX, DNR, IDA). Этот эффект отсутствует у АСЛА. Наряду с АА — «антрахинонами» ТФ оказался модулятором токсичности другого представителя этого класса, МiТOХ. Эффективность защиты ТФ от токсичности МiТOХ в 5 раз выше по сравнению с АА. Способность ТФ защищать опухолевые клетки человека зависит от их типа и определяется, по-видимому, количеством и/или сродством ТФ к белкам, участвующим в механизмах защиты. Эффективность защиты клеток от цитотоксичности АА и МiТOХ у ТФ выше по сравнению с FePPIX. ТФ, как и FePPIX, защищает лейкозные клетки человека линии K562 от гибели, индуцированной АА по механизмам апоптоза, некроза и преждевременного старения. В присутствии ТФ сценарий гибели по типу преждевременного старения, индуцированного АА, приводит к появлению колоний суспензионных мелких клеток и монослойных клеток, подобных фибробластам. *Beclin*-лизосомальный путь аутофагии не участвует в механизмах снижения цитотоксичности АА в присутствии ТФ. В защите клеток линии K562 от токсичности АА в присутствии ТФ/FePPIX участвует один и тот же механизм. Последний связан со снижением способности опухолевых клеток накапливать АА в присутствии модуляторов.

Свойство ТФ и FePPIX снижать токсичность АА в отношении опухолевых клеток человека в первую очередь следует учитывать при использовании фотосенсибилизаторов фталоцианиновой и гематопорфириновой природы в клинике в комбинации с химиотерапией, включающей АА [70]. Кроме того, в клинической онкологии некоторые заболевания (например, порфирия), а также сосудистые нарушения (кровоизлияния в пределах опухоли) могут быть источником эндогенного гемина и создавать условия, снижающие противоопухолевую эффективность АА. Следует отметить, что наши и литературные данные свидетельствуют о том, что существуют виды клеток, в частности аденокарциномы молочной железы линии MCF-7, по отношению к которым ТФ/FePPIX не являются модуляторами токсичности АА. В таких ситуациях ТФ/FePPIX способны выполнять функцию протекторов для нормальных клеток и снижать не-селективную токсичность АА.

КОНФЛИКТЫ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства Москвы.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция и дизайн: Т.А. Сидорова.

Сбор и обработка данных: Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, В.В. Татарский, Д.А. Хоченков, Е.С. Иванова.

Предоставление материалов исследования: Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, В.В. Татарский, Д.А. Хоченков.

Анализ и интерпретация данных: Т.А. Сидорова, О.О. Рябая, В.В. Татарский, Д.А. Хоченков.

Подготовка рукописи: Т.А. Сидорова.

Окончательное одобрение рукописи: все авторы.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А.А. Штилю за ценные замечания, касающиеся редактирования данной статьи.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Arcamone FM. Fifty years of chemical research at Farmitalia. *Chemistry*. 2009;15(32):7774–91. doi: 10.1002/chem.200900292.
2. Gewirtz DA. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1999;57(7):727–41. doi: 10.1016/S0006-2952(98)00307-4.
3. Doroshow JH. Anthracycline antibiotic-stimulated superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical production by NADH dehydrogenase. *Cancer Res*. 1983;43(10):4543–51.
4. Doroshow JH, Davies KJ. Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *J Biol Chem*. 1986;261(7):3068–74.
5. Demant EJ. Inactivation of cytochrome c oxidase activity in mitochondrial membranes during redox cycling of doxorubicin. *Biochem Pharmacol*. 1991;41(4):543–52. doi: 10.1016/0006-2952(91)90626-g.
6. Sinha BK, Mason RP. Is Metabolic Activation of Topoisomerase II Poisons Important In The Mechanism Of Cytotoxicity? *J Drug Metab Toxicol*. 2015;6(3):186. doi: 10.4172/2157-7609.1000186.
7. Robinson NC. Functional binding of cardiolipin to cytochrome c oxidase. *J Bioenerg Biomembr*. 1993;25(2):153–63. doi: 10.1007/bf00762857.
8. Nicolay K, de Kruijff B. Effects of adriamycin on respiratory chain activities in mitochondria from rat liver, rat heart and bovine heart. Evidence for a preferential inhibition of complex III and IV. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1987;892(3):320–30. doi: 10.1016/0005-2728(87)90236-2.
9. Claypool SM, Koehler CM. The complexity of cardiolipin in health and disease. *Trends Biochem Sci*. 2012;37(1):32–41. doi: 10.1016/j.tibs.2011.09.003.
10. Paradies G, Paradies V, De Benedictis V, et al. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 2014;1837(4):408–17. doi: 10.1016/j.bbabi.2013.10.006.
11. Kagan VE, Bayir HA, Belikova NA, et al. Cytochrome c/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(11):1439–53. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.03.004.
12. Petrosillo G, Casanova G, Matera M, et al. Interaction of peroxidized cardiolipin with rat-heart mitochondrial membranes: induction of permeability transition and cytochrome c release. *FEBS Lett*. 2006;580(27):6311–6. doi: 10.1016/j.febslet.2006.10.036.
13. Frost B-M, Eksborg S, Bjork O, et al. Pharmacokinetics of doxorubicin in children with acute lymphoblastic leukemia: multi-institutional collaborative study. *Med Pediatr Oncol*. 2002;38(5):329–37. doi: 10.1002/mpo.10052.

14. Toldo S, Goehle RW, Lotrionte M, et al. Comparative cardiac toxicity of anthracyclines in vitro and in vivo in the mouse. *PLoS One*. 2013;8(3):e58421. doi: 10.1371/journal.pone.0058421.
15. Wang Z, Wang J, Xie R, et al. Mitochondria-derived reactive oxygen species play an important role in doxorubicin-induced platelet apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2015;6(5):11087–100. doi: 10.3390/ijms160511087.
16. Heart EA, Karandrea S, Liang X, et al. Mechanisms of Doxorubicin Toxicity in Pancreatic β -Cells. *Toxicol Sci*. 2016;152(2):395–405. doi: 10.1093/toxsci/kfw096.
17. Wu X, Hasinoff BB. The antitumor anthracyclines doxorubicin and daunorubicin do not inhibit cell growth through the formation of iron-mediated reactive oxygen species. *Anticancer Drugs*. 2005;16(1):93–9. doi: 10.1097/00001813-200501000-00014.
18. Tarasiuk J, Frezard F, Garnier-Suillerot A, Gattegno L. Anthracycline incorporation in human lymphocytes. Kinetics of uptake and nuclear concentration. *Biochim Biophys Acta*. 1989;1013(2):109–17. doi: 10.1016/0167-4889(89)90038-4.
19. Swift LP, Rephaeli A, Nudelman A, et al. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. *Cancer Res*. 2006;66(9):4863–71. doi: 10.1158/0008-5472.can-05-3410.
20. Skladanowski A, Konopa J. Interstrand DNA crosslinking induced by anthracyclines in tumour cells. *Biochem Pharmacol*. 1994;47(12):2269–78. doi: 10.1016/0006-2952(94)90265-8.
21. Tewey KM, Rowe TC, Yang L, et al. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*. 1984;226(4673):466–8. doi: 10.1126/science.6093249.
22. Mordente A, Meucci E, Martorana GE, et al. Topoisomerases and Anthracyclines: Recent Advances and Perspectives in Anticancer Therapy and Prevention of Cardiotoxicity. *Curr Med Chem*. 2017;24(15):1607–26. doi: 10.2174/0929867323666161214120355.
23. Hajji N, Mateos S, Pastor N, et al. Induction of genotoxic and cytotoxic damage by aclarubicin, a dual topoisomerase inhibitor. *Mutat Res*. 2005;583(1):26–35. doi: 10.1016/j.mrgentox.2005.01.012.
24. Nitiss JL, Pourquier P, Pommier Y. Aclacinomycin A stabilizes topoisomerase I covalent complexes. *Cancer Res*. 1997;57(20):4564–9.
25. Bridewell DJ, Finlay GJ, Baguley BC. Differential actions of aclarubicin and doxorubicin: the role of topoisomerase I. *Oncol Res*. 1997;9(10):535–42.
26. Bogason A, Bhuiyan H, Masquelier M, et al. Uptake of anthracyclines in vitro and in vivo in acute myeloid leukemia cells in relation to apoptosis and clinical response. *Eur J Clin Pharmacol*. 2009;65(12):1179–86. doi: 10.1007/s00228-009-0734-4.
27. Dartsch DC, Schaefer A, Boldt S, et al. Comparison of anthracycline-induced death of human leukemia cells: programmed cell death versus necrosis. *Apoptosis*. 2002;7(6):537–48. doi: 10.1023/a:1020647211557.
28. Koceva-Chyla A, Jedrzejczak M, Skierski J, et al. Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation. *Apoptosis*. 2005;10(6):1497–514. doi: 10.1007/s10495-005-1540-9.
29. Chang BD, Broude EV, Dokmanovic M, et al. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer agents. *Cancer Res*. 1999;59(15):3761–7.
30. te Poele RH, Okorokov AL, Jardine L, et al. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 2002;62(6):1876–83.
31. Czyz M, Jakubowska J, Sztiller-Sikorska M. ST1571/doxorubicin concentration-dependent switch for diverse caspase actions in CML cell line K562. *Biochem Pharmacol*. 2008;75(9):1761–73. doi: 10.1016/j.bcp.2008.02.004.
32. Yang MY, Lin PM, Liu YC, et al. Induction of cellular senescence by doxorubicin is associated with upregulated miR-375 and induction of autophagy in K562 cells. *PLoS One*. 2012;7(5):e37205. doi: 10.1371/journal.pone.0037205.
33. Mayer P, Gorisse MC, Carpentier Y, Desoize B. Effects of aclarubicin on growth, differentiation and apoptosis of tumor cells in vitro. *Bull Cancer*. 1994;81(8):670–6.
34. Rogalska A, Koceva-Chyla A, Jozwiak Z. Aclarubicin-induced ROS generation and collapse of mitochondrial membrane potential in human cancer cell lines. *Chem Biol Interact*. 2008;176(1):58–70. doi: 10.1016/j.cbi.2008.07.002.
35. Maejima Y, Adachi S, Ito H, et al. Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage. *Aging Cell*. 2008;7(2):125–36. doi: 10.1111/j.1474-9726.2007.00358.x.
36. Sultana R, Di Domenico F, Tseng M, et al. Doxorubicin-induced thymus senescence. *J Proteome Res*. 2010;9(12):6232–41. doi: 10.1021/pr100465m.
37. Litwiniac A, Grzanka A, Helmin-Basa A, et al. Features of senescence and cell death induced by doxorubicin in A549 cells: organization and level of selected cytoskeletal proteins. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(5):717–36. doi: 10.1007/s00432-009-0711-4.
38. Eom YW, Kim MA, Park SS, et al. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. *Oncogene*. 2005;24(30):4765–77. doi: 10.1038/sj.onc.1208627.
39. Joyner DE, Bastar JD, Randall RL. Doxorubicin induces cell senescence preferentially over apoptosis in the FU-SY-1 synovial sarcoma cell line. *J Orthop Res*. 2006;24(6):1163–9. doi: 10.1002/jor.20169.
40. Zingoni A, Cecere F, Vulpis E, et al. Genotoxic Stress Induces Senescence-Associated ADAM10-Dependent Release of NKG2D MIC Ligands in Multiple Myeloma Cells. *J Immunol*. 2015;195(2):736–48. doi: 10.4049/jimmunol.1402643.
41. Dabritz JH, Yu Y, Milanovic M, et al. CD20-Targeting Immunotherapy Promotes Cellular Senescence in B-Cell Lymphoma. *Mol Cancer Ther*. 2016;15(5):1074–81. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-15-0627.
42. Gewirtz DA, Alotaibi M, Yakovlev VA, Povirk LF. Tumor Cell Recovery from Senescence Induced by Radiation with PARP Inhibition. *Radiat Res*. 2016;186(4):327–32. doi: 10.1667/rr144371.
43. Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J Pathol*. 2010;221(1):3–12. doi: 10.1002/path.2697.
44. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ*. 2011;18(4):571–80. doi: 10.1038/cdd.2010.191.
45. Gewirtz DA. Autophagy and senescence in cancer therapy. *J Cell Physiol*. 2014;229(1):6–9. doi: 10.1002/jcp.24420.
46. Svensson SP, Lindgren S, Powell W, Green H. Melanin inhibits cytotoxic effects of doxorubicin and daunorubicin in MOLT 4 cells. *Pigment Cell Res*. 2003;16(4):351–4. doi: 10.1034/j.1600-0749.2003.00030.x.
47. Heaney ML, Gardner JR, Karasavvas N, et al. Vitamin C antagonizes the cytotoxic effects of antineoplastic drugs. *Cancer Res*. 2008;68(19):8031–8. doi: 10.1158/0008-5472.can-08-1490.
48. Tsiftoglou AS, Wong W, Wheeler C, et al. Prevention of anthracycline-induced cytotoxicity in hemopoietic cells by hemin. *Cancer Res*. 1986;46(7):3436–40.
49. Tsiftoglou AS, Wong W, Robinson SH. Analysis of hemin-induced protection of human hemopoietic cells from the cytotoxic effects of anthracyclines. *Cancer Res*. 1988;48(13):3566–70.
50. Papadopoulou LC, Tsiftoglou AS. Mitochondrial cytochrome c oxidase as a target site for daunomycin in K-562 cells and heart tissue. *Cancer Res*. 1993;53(5):1072–8.
51. Papadopoulou LC, Tsiftoglou AS. Effects of hemin on apoptosis, suppression of cytochrome c oxidase gene expression, and bone-marrow toxicity induced by doxorubicin (adriamycin). *Biochem Pharmacol*. 1996;52(5):713–22. doi: 10.1016/0006-2952(96)00349-8.
52. Nagai T, Kikuchi S, Ohmine K, et al. Hemin reduces cellular sensitivity to imatinib and anthracyclins via Nrf2. *J Cell Biochem*. 2008;104(2):680–91. doi: 10.1002/jcb.21659.
53. Bohmer RM, Hoffmann K, Morstyn G. Hematoporphyrin derivative and anthracyclines mutually inhibit cellular uptake and toxicity. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1987;20(1):16–20. doi: 10.1007/bf00252953.
54. Сидорова Т.А., Какпакова Е.С., Власенкова Н.К. и др. Различная реакция на терафтал культивируемых in vitro клеток, экспрессирующих Р-гликопротеин, и клеток, не экспрессирующих этот белок. *Цитология*. 2001;43:889–90.
- [Sidorova TA, Kakpakova ES, Vlasenkova NK, et al. Differences in teraphthal response of in vitro cultured cells expressing P-glycoprotein and those without this expression. *Tsitologiya*. 2001;43:889–90. (In Russ)]
55. Сидорова Т.А., Вагида М.С., Каляя О.Л., Герасимова Г.К. Роль каталазы в защите опухолевых клеток от окислительного стресса, индуцированного бинарной каталитической системой «терафтал + аскорбиновая кислота». *Клиническая онкогематология*. 2014;7(3):282–9.
- [Sidorova TA, Vagida MS, Kaliya OL, Gerasimova GK. Role of catalase in protection of cancer cells from oxidative stress induced by binary catalytic system "teraphthal + ascorbic acid". *Klinicheskaya onkogematologiya*. 2014;7(3):282–9. (In Russ)]
56. Dimri GP, Lee X, Basile G, et al. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92(20):9363–7. doi: 10.1073/pnas.92.20.9363.
57. Ling YH, Priebe W, Perez-Soler R. Apoptosis induced by anthracycline antibiotics in P388 parent and multidrug-resistant cells. *Cancer Res*. 1993;53(8):1845–52.
58. Cummings BS, Schnellmann RG. Measurement of cell death in mammalian cells. *Curr Protoc Pharmacol*. 2004;25(12.8):12.8.1–22. doi: 10.1002/0471141755.ph1208s25.
59. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. *Chem Biol*. 2010;17(5):421–33. doi: 10.1016/j.chembiol.2010.04.012.
60. Сидорова Т.А., Пятакова Н.В., Северина И.С. и др. Растворимая гуанилатциклаза (pГЦ) в реализации гипотензивного и антиагрегантного эффектов терафтала (ТФ, натриевая соль 4,5-октакарбокситфалоцианина кобальта). *Клиническая онкогематология*. 2016;9(2):138–47. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-138-147.
- [Sidorova TA, Pyatakova NV, Severina IS, et al. Soluble Guanylyl Cyclase (sGC) in Mechanisms of Hypotensive and Antiaggregatory Effects Induced by Teraphthal (TP, sodium salt 4,5-cardoxyphtalocyanin-cobalt). *Clinical oncology*. 2016;9(2):138–47. doi: 10.21320/2500-2139-2016-9-2-138-147. (In Russ)]
61. Forrest RA, Swift LP, Rephaeli A, et al. Activation of DNA damage response pathways as a consequence of anthracycline-DNA adduct formation. *Biochem Pharmacol*. 2012;83(12):1602–12. doi: 10.1016/j.bcp.2012.02.026.
62. Konopa J. G2 block induced by DNA crosslinking agents and its possible consequences. *Biochem Pharmacol*. 1988;37(12):2303–9. doi: 10.1016/0006-2952(88)90355-3.
63. Barlogie B, Drewinko B, Johnston DA, Freireich EJ. The effect of adriamycin on the cell cycle traverse of a human lymphoid cell line. *Cancer Res*. 1976;36(6):1975–9.

64. Mosieniak G, Sliwinska MA, Alster O, et al. Polyploidy Formation in Doxorubicin-Treated Cancer Cells Can Favor Escape from Senescence. *Neoplasia*. 2015;17(12):882–93. doi: 10.1016/j.neo.2015.11.008.

65. Wu PC, Wang Q, Grobman L, et al. Accelerated cellular senescence in solid tumor therapy. *Exp Oncol*. 2012;34(3):298–305.

66. Zucker RM, Adams DJ, Bair KW, Elstein KH. Polyploidy induction as a consequence of topoisomerase inhibition. A flow cytometric assessment. *Biochem Pharmacol*. 1991;42(11):2199–208. doi: 10.1016/0006-2952(91)90357-b.

67. McGahon AJ, Brown DG, Martin SJ, et al. Downregulation of Bcr-Abl in K562 cells restores susceptibility to apoptosis: characterization of the apoptotic death. *Cell Death Differ*. 1997;4(2):95–104. doi: 10.1038/sj.cdd.4400213.

68. Masquelier M, Zhou QF, Gruber A, Vitols S. Relationship between daunorubicin concentration and apoptosis induction in leukemic cells. *Biochem Pharmacol*. 2004;67(6):1047–56. doi: 10.1016/j.bcp.2003.10.025.

69. Nagai K, Nagasawa K, Koma M, et al. Contribution of an unidentified sodium-dependent nucleoside transport system to the uptake and cytotoxicity of anthracycline in mouse M5076 ovarian sarcoma cells. *Biochem Pharmacol*. 2006;71(5):565–73. doi: 10.1016/j.bcp.2005.11.017.

70. Aniogo EC, George BPA, Abrahamse H. Phthalocyanine induced phototherapy coupled with doxorubicin; a promising novel treatment for breast cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2017;17(8):693–702. doi: 10.1080/14737140.2017.1347505.

