

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Фролова Анастасия Сергеевна

**Исследование экспрессии и некоторых функций цистеиновых катепсинов
в раковых клетках в ответ на действие терапевтических агентов**

Специальность 1.5.3. Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Диссертация подготовлена на факультете биоинженерии и биоинформатики МГУ имени М.В. Ломоносова

- Научный руководитель** – *Замятнин Андрей Александрович* – доктор биологических наук, доцент
- Официальные оппоненты** – *Митькевич Владимир Александрович* – член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, лаборатория конформационного полиморфизма белков в норме и патологии, главный научный сотрудник
- Каменский Петр Андреевич* – доктор биологических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра молекулярной биологии, профессор
- Черняк Борис Викторович* – доктор биологических наук, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, лаборатория биоэнергетики клетки, заведующий лабораторией

Защита диссертации состоится «12» ноября 2026 г. в 15 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: msu.015.4.dissovet@org.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/4050>

Автореферат разослан «__» октября 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Злокачественные новообразования остаются одной из ведущих причин смертности, а эффективность терапии ограничена развитием лекарственной резистентности и недостатком надёжных предиктивных маркеров (Fujii, Asadi, and Mehla 2025). В этой связи изучение молекулярных детерминант ответа опухоли на терапевтические агенты и поиск новых биомаркеров представляют собой приоритетные задачи.

Одними из ключевых регуляторов злокачественного роста служат цистеиновые катепсины — лизосомальные протеиназы, дерегуляция экспрессии, локализации и активности которых коррелирует с неблагоприятным прогнозом при многих типах рака. При почечно-клеточном раке (ПКР) гиперэкспрессия катепсинов ассоциирована с инвазией, метастазированием и низкой выживаемостью, что определяет их как перспективные мишени и биомаркеры (Yan et al. 2025). Катепсины вовлечены в ангиогенез, иммуносупрессию и формирование лекарственной устойчивости. При этом специфичность участия отдельных представителей семейства в реализации ответа на химиопрепараты остаётся практически не изученной.

Ограниченная эффективность традиционных цитостатиков во многом обусловлена их низким уровнем накопления в опухолевых клетках. Решить данную проблему позволяют биологические наносистемы, доставляющие инкапсулированный агент непосредственно в клетки-мишени и высвобождающие его под действием протеиназ (Liu et al. 2025). Поскольку после интернализации такие носители первично транспортируются в лизосомы — компартмент локализации и функционирования цистеиновых катепсинов — именно активность этих протеиназ и кислая среда органелл должны определять кинетику разрушения носителя и, как следствие, терапевтический исход. Однако влияние самих нановезикул на лизосомальный компартмент и роль конкретных катепсинов в стабильности носителей до настоящего времени систематически не исследованы.

Таким образом, несмотря на очевидную вовлечённость цистеиновых катепсинов в патогенез ПКР, их роль в реализации ответа на терапевтические воздействия и во внутриклеточной судьбе наноразмерных систем доставки остаётся практически не систематизированной.

Степень разработанности темы исследования. Цистеиновые катепсины признаны ключевыми эффекторами протеолиза в опухолевом микроокружении (Ercegovic Rot and Turk 2024). Для катепсинов B, L и S при ПКР показана связь гиперэкспрессии с агрессивным фенотипом, инвазией и ангиогенезом (Liang et al. 2024). Катепсины K, F, H, C, V, Z

рассматриваются как потенциальные биомаркеры ПКР (Wei et al. 2022). Вместе с тем систематических данных о полном репертуаре цистеиновых катепсинов и их субклеточном распределении в единой клеточной модели ПКР до настоящего времени не представлено.

Данные литературы указывают на двойственную роль цистеиновых катепсинов в ответе опухолевых клеток на химио- и радиотерапию. Показано, что цитостатики и ионизирующее излучение способны индуцировать экспрессию катепсинов В, S и L через АФК- и NF-κВ-зависимые механизмы (Malla et al. 2012) и вызывать их транслокацию в ядро, где они активируют апоптотические каскады и деградируют проапоптотические факторы (Goulet et al. 2004). Фармакологическое ингибирование отдельных катепсинов сенсibiliзирует клетки к противоопухолевым соединениям (Grotsky et al. 2013), однако компенсаторная активация других протеиназ ограничивает эффективность этого подхода. Камптотедин (СРТ), рассматриваемый как перспективный агент для терапии ПКР, подвергается лизосомальной секвестрации и индуцирует цитопротективную аутофагию с участием катепсинов В и L (J. Zhang et al. 2015), а их ингибирование усиливает цитотоксический эффект препарата (Lamparska-Przybysz, Gajkowska, and Motyl 2005). Вместе с тем, для ПКР систематический анализ вклада цистеиновых катепсинов в реализацию ответа на СРТ и, в особенности, вопрос о возможной взаимной компенсации их функций с каспазами, остаётся неизученным.

Лизосомальный компартмент служит конечным пунктом транспорта большинства интернализованных наночастиц (Rathore et al. 2019), где под действием кислой среды и цистеиновых катепсинов происходит деградация носителя и высвобождение лекарства (Yoon et al. 2023). На этом принципе основана разработка протеолиз-чувствительных линкеров и носителей, селективно разрушаемых в опухолевых клетках (Egorova et al. 2023). Однако систематического исследования роли конкретных катепсинов в деградации биологических нановезикул и влияния самих наночастиц на лизосомальный компартмент опухолевых клеток не проводилось.

Цели и задачи исследования: провести комплексное исследование экспрессии и функциональной роли цистеиновых катепсинов в условно нормальных и опухолевых клетках в условиях химиотерапевтического воздействия, а также оценить эффективность наноразмерных терапевтических агентов, чувствительных к протеолитической активности.

Для достижения цели необходимо решить следующие задачи:

1) Провести сравнительный анализ экспрессии, изоформного состава и внутриклеточной локализации цистеиновых катепсинов в эмбриональной культуре клеток почки человека НЕК293 и культурах клеток почечно-клеточного рака 769-Р и А-498.

2) Определить вклад цистеиновых катепсинов в реализацию СРТ-индуцированной клеточной гибели и исследовать динамику их экспрессии в эмбриональной культуре клеток почки человека НЕК293 и культурах клеток почечно-клеточного рака 769-P и A-498.

3) Исследовать влияние протеолитического воздействия и pH, моделирующих лизосомальную среду, на стабильность альбуминовых наночастиц и мембранных нановезикул и эффективность высвобождения инкапсулированного в них препарата.

4) Исследовать влияние лизосомальных цистеиновых катепсинов на стабильность мембранных нановезикул в опухолевых клетках.

5) Провести анализ экспрессии катепсинов при интернализации альбуминовых наночастиц в опухолевых клетках.

6) Оценить цитотоксическое действие альбуминовых наночастиц, загруженных противоопухолевым препаратом, на опухолевых клетках.

Объект и предмет исследования. Объектом исследования являлись цистеиновые катепсины и наноразмерные системы доставки на основе альбуминовых наночастиц и мембранных нановезикул. Предметом исследования являлись определение роли цистеиновых катепсинов в реализации СРТ-индуцированной клеточной гибели и их вклад во внутриклеточную стабильность протеолиз-чувствительных наноносителей.

Научная новизна исследования. В ходе диссертационной работы впервые установлено, что цистеиновые катепсины локализуются в ядрах клеток почки, их ядерно-цитоплазматическое распределение различается в норме и при опухолевой трансформации; показано интенсивное созревание катепсинов О, К, С, Н в ядрах опухолевых клеток.

Впервые охарактеризована динамика изменений экспрессии катепсинов в клетках ПКР в ответ на СРТ. Обнаружен аддитивный эффект при одновременном ингибировании каспаз и катепсинов.

Впервые показано, что степень сшивки альбуминовых наночастиц определяет их устойчивость к протеиназам и кинетику высвобождения, а интернализация индуцирует экспрессию катепсинов. Цистеиновые катепсины выступают ключевыми эффекторами деградации биоподобных нановезикул. Включение синтетических липидов повышает pH-чувствительность и деградацию биоподобных нановезикул в лизосомах. Альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки обеспечивают более быстрое высвобождение сунитиниба и обладают более высокой цитотоксичностью в клетках с гиперактивностью катепсинов.

Теоретическая и практическая значимость исследования. Полученные данные расширяют представления о роли протеолиза в онкогенезе, выявляя неканонические изменения катепсинов — ядерную локализацию, изоформные перестройки и различия

процессинга в ядерной и цитоплазматической фракциях опухолевых клеток. Динамика созревания катепсинов К, L и Н при СРТ-индуцированной гибели указывает на их участие в эффекторной стадии гибели, тогда как гиперактивность лизосомальных катепсинов при ПКР может лежать в основе устойчивости к ней.

Выявленные изменения экспрессии цистеиновых катепсинов создают основу для разработки диагностических маркеров ПКР, а аддитивный эффект совместного ингибирования каспаз и катепсинов открывает пути преодоления резистентности. Различия в стабильности мембранных нановезикул к pH и протеолизу обосновывают их применение в качестве долгоциркулирующих носителей, так и pH-чувствительных систем. Степень сшивки альбуминовых наночастиц определяет их цитотоксичность в отношении клеток с гиперактивированными катепсинами, что позволяет рекомендовать частицы с низкой степенью сшивки для терапии опухолей, характеризующихся высоким уровнем лизосомальных протеиназ.

Методология исследования.

Методологическая основа работы построена на комплексном применении молекулярно-биологических, биохимических и нанобиотехнологических методов, адекватных поставленным задачам. Исследование выполнено на сопоставимых клеточных моделях ПКР. Для характеристики протеолитического фенотипа использована панель специфических антител ко всем цистеиновым катепсинам; для функционального анализа — селективные ингибиторы E-64, Ac-PLVE-FMK и Z-VAD-FMK, используемые отдельно и в комбинации. Оценка роли катепсинов во внутриклеточной судьбе наноносителей проведена на моделях альбуминовых наночастиц с контролируемой степенью сшивки и мембранных нановезикулах.

Положения, выносимые на защиту.

- 1) Клетки ПКР характеризуются гиперэкспрессией катепсинов V, Z, S, L и B, изменённым профилем процессинга катепсинов C, O, K и H, а также перераспределением внутриклеточной локализации катепсинов (снижение ядерной фракции катепсинов V и W). В ядрах опухолевых клеток созревание катепсинов происходит более интенсивно, чем в ядрах эмбриональных клеток.
- 2) При индукции клеточной гибели камптотецином в клетках ПКР происходит активация процессинга катепсинов K, L и H на фоне супрессии созревания катепсинов B, O и V. В данных условиях каспазы и цистеиновые катепсины выступают в роли частично функционально взаимозаменяемых протеиназ.
- 3) Структурные параметры наночастиц (степень сшивки для альбуминовых носителей и липидный состав мембран для биологических нановезикул) являются ключевыми

детерминантами их устойчивости к протеолизу и кинетики внутриклеточного высвобождения препарата.

- 4) Внутриклеточная деградация биоподобных нановезикул опосредована цистеиновыми катепсинами, которые служат их основными эффекторами. Напротив, при интернализации альбуминовых наночастиц наблюдается индукция компенсаторного повышения экспрессии данных протеиназ, в первую очередь катепсина В.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность результатов обеспечена применением валидированных молекулярно-биологических и физико-химических методов, адекватных клеточных моделей, сертифицированного оборудования и реактивов, а также статистической обработкой с использованием общепринятых критериев. Выводы строго обоснованы и опираются на воспроизводимые экспериментальные данные.

По теме диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Основные результаты работы были представлены и обсуждены на всероссийских и международных конференциях: III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2022), Международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2023) и конференция «Физико-химическая биология в год 270-летия МГУ» (Москва, 2025).

Личный вклад автора. Диссертационная работа написана на основе собственных данных, полученных автором и соавторами с 2020 по 2026 год. Автор провёл критический анализ литературы, спланировал экспериментальную работу и выполнил основной объём экспериментов; лично осуществил статистическую обработку, анализ и интерпретацию данных. Автор непосредственно участвовал в подготовке публикаций и представлении результатов на конференциях. Вклад соавторов указан в соответствующих публикациях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 143 страницах машинописного текста, включает 28 рисунков и 2 таблицы, и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты, обсуждение, заключение, список сокращений, список литературы из 258 наименований.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследование проводили на эмбриональных клетках почки человека линии HEK293 и линиях ПКР 769-Р и А-498, клетках рака молочной железы SKBR3 и линии клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2. Экспрессию и изоформный состав цистеиновых катепсинов анализировали методом вестерн-блоттинга с использованием панели специфических антител. Субклеточное распределение исследовали путём разделения клеток на цитоплазматическую и ядерную фракции с последующим вестерн-блоттингом и методами иммунофлуоресцентного окрашивания и конфокальной микроскопии.

Запрограммированную клеточную гибель, индуцированную СРТ, оценивали окрашиванием аннексин V-FITC/пропидия иодид методом проточной цитометрии. Функциональную роль цистеиновых катепсинов устанавливали с помощью селективных ингибиторов E-64 и Ac-PLVE-FMK, а вклад каспаз — с помощью пан-каспазного ингибитора Z-VAD-FMK.

Альбуминовые наночастицы с контролируемой степенью сшивки получали методом десольватации, а биологические и биоподобные нановезикулы — путём последовательной экструзии клеток HEK293T либо слиянием с липосомами, нагруженными FAM-PHK. Протеолитическую устойчивость частиц и кинетику высвобождения загруженных агентов оценивали гравиметрически и спектрофотометрически, а внутриклеточную судьбу носителей — методом конфокальной микроскопии живых клеток. Жизнеспособность клеток подтверждали МТТ-тестом.

Результаты и их обсуждение

1. Экспрессия, локализация и созревание цистеиновых катепсинов различаются в эмбриональных и опухолевых клетках почки

Выяснение роли цистеиновых катепсинов в ответе опухолевых клеток на терапевтические агенты предварительно был проведён сравнительный анализ экспрессии всех цистеиновых катепсинов в лизатах HEK293, 769-Р и А-498 (рис. 1). Каждый из 11 ферментов детектирован во всех исследованных линиях.

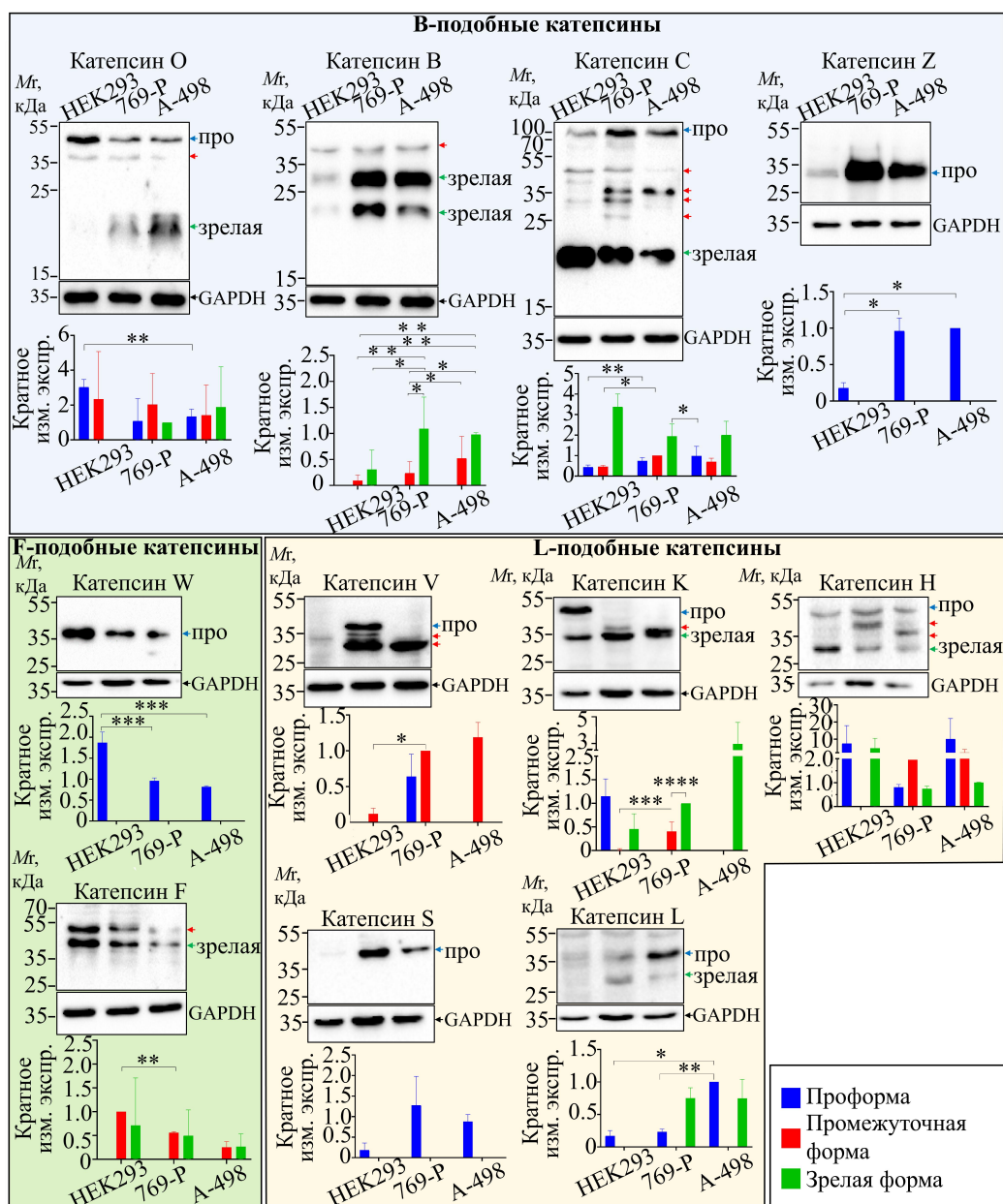


Рисунок 1 – Экспрессия цистеиновых катепсинов повышена в опухолевых клетках почки. Вестерн-блоттинг клеточных лизатов с антителами против катепсинов, нормализацией по GAPDH; денситометрия: среднее $\pm$ SD. Однофакторный ANOVA с пост-хок тестом Даннетта. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Полуколичественный анализ выявил гиперэкспрессию катепсинов V (в 9,34 раза), Z (в 5,5 раза), S (в 9,2 раза), L и B (в 3,34 раза) в опухолевых линиях, накопление зрелых форм L и B. Обнаружены особенности процессинга: для катепсина С — увеличение доли про- и промежуточных форм при снижении содержания зрелой формы; для катепсина О — снижение про- и промежуточных форм и появление зрелой формы исключительно в опухолевых клетках; для катепсина К — преобладание зрелой формы; для катепсина Н — снижение уровня зрелой формы и заметные межформенные различия. Экспрессия катепсинов F и W была выше в эмбриональных клетках; в опухолях обнаружены дополнительные промежуточные изоформы V, K, C, H. Таким образом, злокачественная

трансформация сопровождается гиперэкспрессией катепсинов V, Z, L, S, B и изменением соотношения изоформ для C, O, K, H.

Внутриклеточную локализацию катепсинов исследовали методом конфокальной микроскопии (рис. 2). Все катепсины выявлены как в цитоплазме, так и в ядрах всех трёх линий, однако характер распределения различается. Около 90% сигнала катепсина F сосредоточено в ядре независимо от типа клеток.

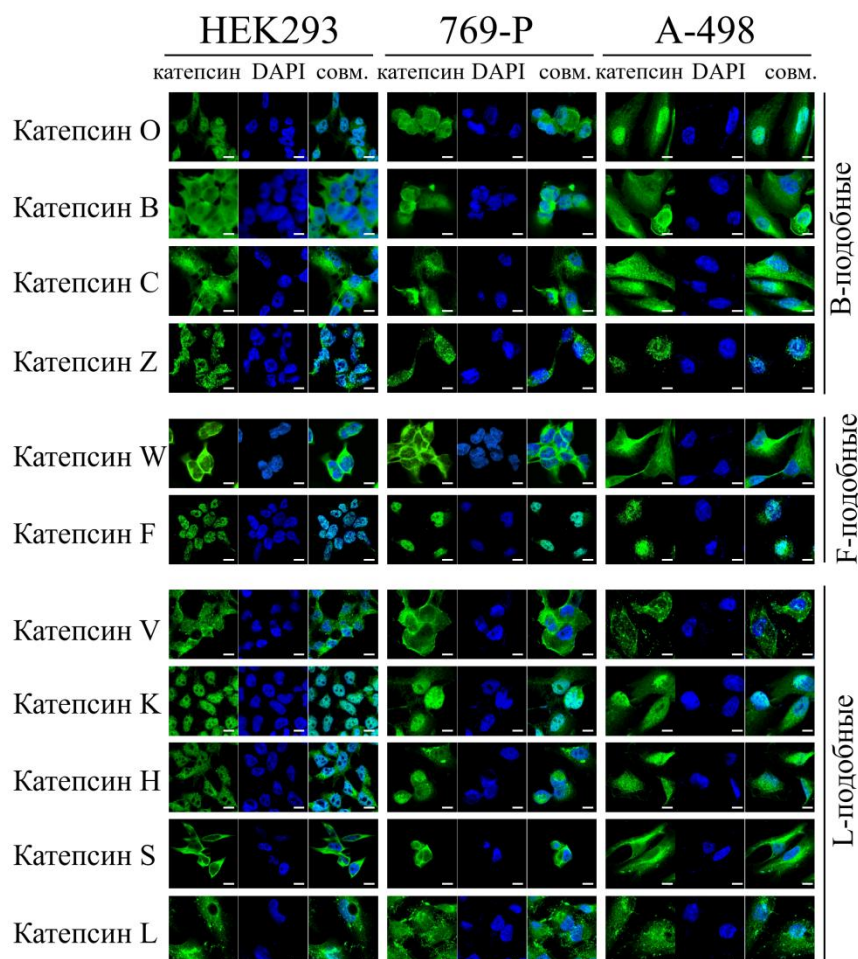


Рисунок 2 – Цистеиновые катепсины присутствуют в ядрах и в цитоплазме эмбриональных и опухолевых клеток почки, но в разных соотношениях. Локализацию анализировали конфокальной микроскопией после окрашивания антителами к цистеиновым катепсином и DAPI. Масштабная шкала – 10 мкм. Совм. – совмещённое изображение.

В 769-P более половины сигнала Z, B, O, K и H приходилось на ядерную фракцию, тогда как в A-498 значительное ядерное накопление отмечено только для Z и K. Доля ядерной локализации V и W в опухолевых клетках значимо снижена. Для B, O и Z статистически значимые различия зафиксированы лишь в одной из линий, для S, H, K, L и C достоверных межлинейных изменений не обнаружено.

Фракционирование с последующим вестерн-блоттингом подтвердило присутствие всех изоформ катепсинов — от про- до зрелых — в ядерной фракции (рис. 3). Катепсины Z,

W, V и L детектировались в виде проформ в цитоплазме и ядрах; K, C, F и H — в про- и зрелой формах в ядрах; катепсин S выявлен исключительно как проформа в ядрах эмбриональных клеток. Зрелая форма O (~20 кДа) обнаружена только в ядерной фракции опухолей. Про- и зрелая формы катепсина В локализованы преимущественно в цитоплазме. Полученные данные свидетельствуют о более интенсивном созревании катепсинов в опухолевых клетках, особенно в ядерном компартменте.

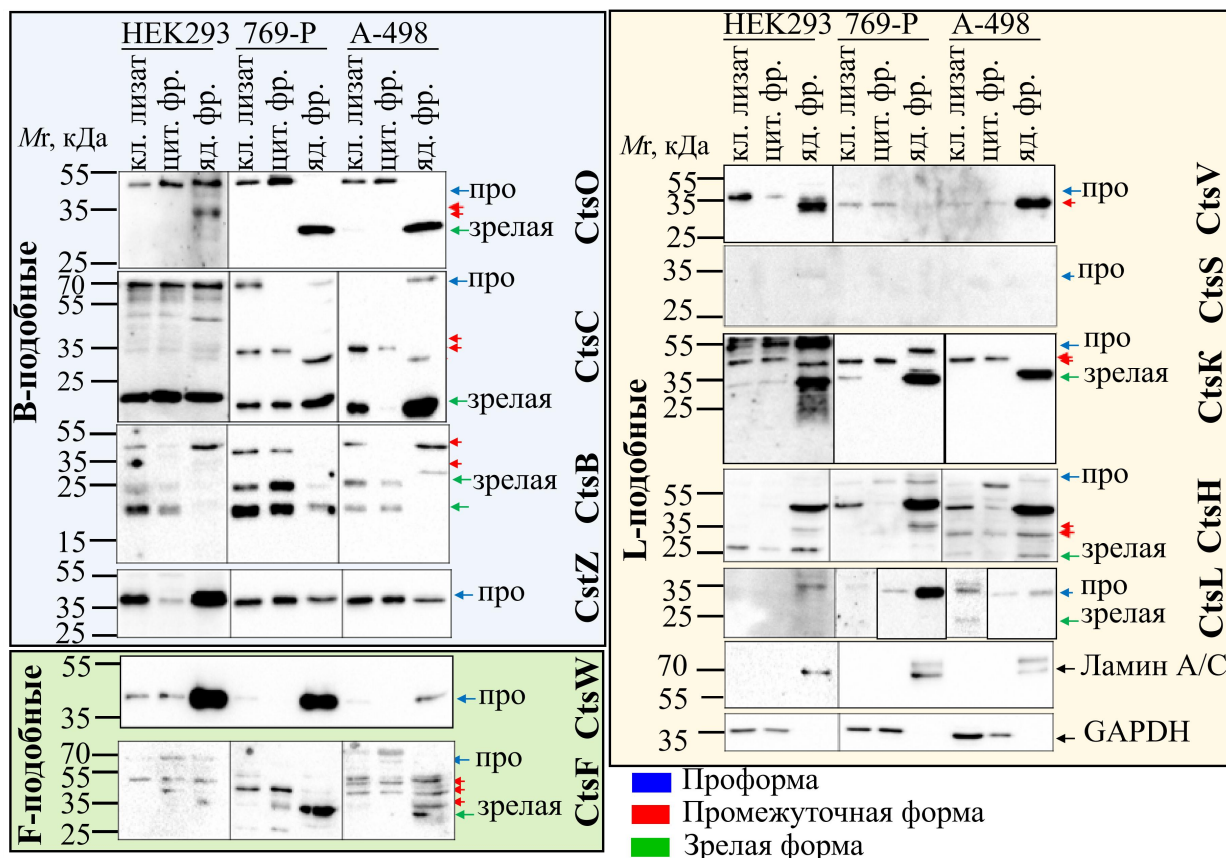


Рисунок 3 – Цистеиновые катепсины эффективнее созревают в опухолевых клетках почки, чем в эмбриональных. Вестерн-блоттинг клеточных лизатов и фракций; чистота фракций подтверждена антителами к GAPDH (цитоплазма) и ламинам A/C (ядро). Cts – катепсин.

Чтобы оценить функциональную значимость выявленных изменений протеолитического профиля, в следующем разделе с помощью селективных ингибиторов исследована роль цистеиновых катепсинов в клеточном ответе.

2. Ингибирование цистеиновых катепсинов снижает клеточную гибель в эмбриональных и опухолевых клетках почки

В работе использовали два ингибитора цистеиновых катепсинов — E-64 (широкого спектра) и селективный пептидный ингибитор Ac-PLVE-FMK (Rudzińska et al. 2020). Роль катепсинов в ответе на цитостатический стресс оценивали с применением камптотецина

(СРТ, 2 мкМ) — ингибитора топоизомеразы I (Prokhorova et al. 2018). Долю клеток на ранней стадии гибели (аннексин V⁺/PI⁻) определяли проточной цитометрией (рис. 4).

В клетках НЕК293 ингибиторы катепсинов на фоне СРТ снижали долю ранней гибели с ~37% до ~1%, что сопоставимо с эффектом пан-каспазного ингибитора Z-VAD-FMK. В линии 769-Р Z-VAD-FMK уменьшал показатель с 42,13% до 33,46%; среди ингибиторов катепсинов достоверный протекторный эффект зарегистрирован лишь при 50 мкМ E-64 (до 33,36%). В клетках А-498 ни Z-VAD-FMK, ни ингибиторы катепсинов не влияли на данный показатель.

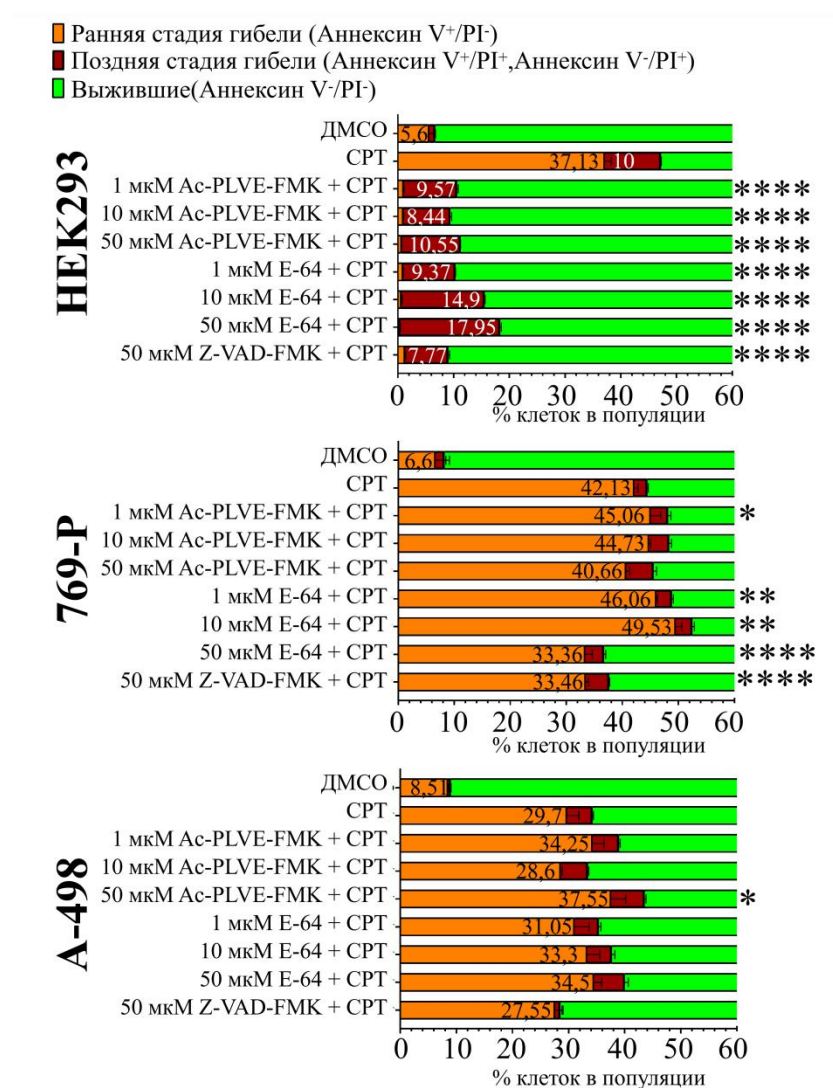


Рисунок 4 – Ингибирование цистеиновых катепсинов снижает количество клеток на ранней стадии гибели, индуцированной СРТ, в линиях НЕК293, 769-Р и А-498. Клетки обрабатывали СРТ и ингибиторами катепсинов в течение 48 часов, окрашивали аннексином V-FITC и PI и анализировали проточной цитометрией. Данные: среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистическую значимость отличий от группы СРТ оценивали однофакторным ANOVA с пост-хок тестом Даннетта. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Совместное применение Z-VAD-FMK с ингибиторами катепсинов в опухолевых линиях дало аддитивный эффект (рис. 5). В 769-Р комбинация Z-VAD-FMK с 50 мкМ Ас-PLVE-FMK снижала долю аннексин V⁺/PI⁻-клеток до 22,3%, а с 10 мкМ E-64 — до 29%. В А-498 сочетание Z-VAD-FMK с Ас-PLVE-FMK уменьшало показатель до 9,87%, а с E-64 — до 14,15%, 9,97% и 19,65%. Полученные данные указывают на взаимную компенсацию каспаз и цистеиновых катепсинов в опухолевых клетках СРТ-индуцированной клеточной гибели.

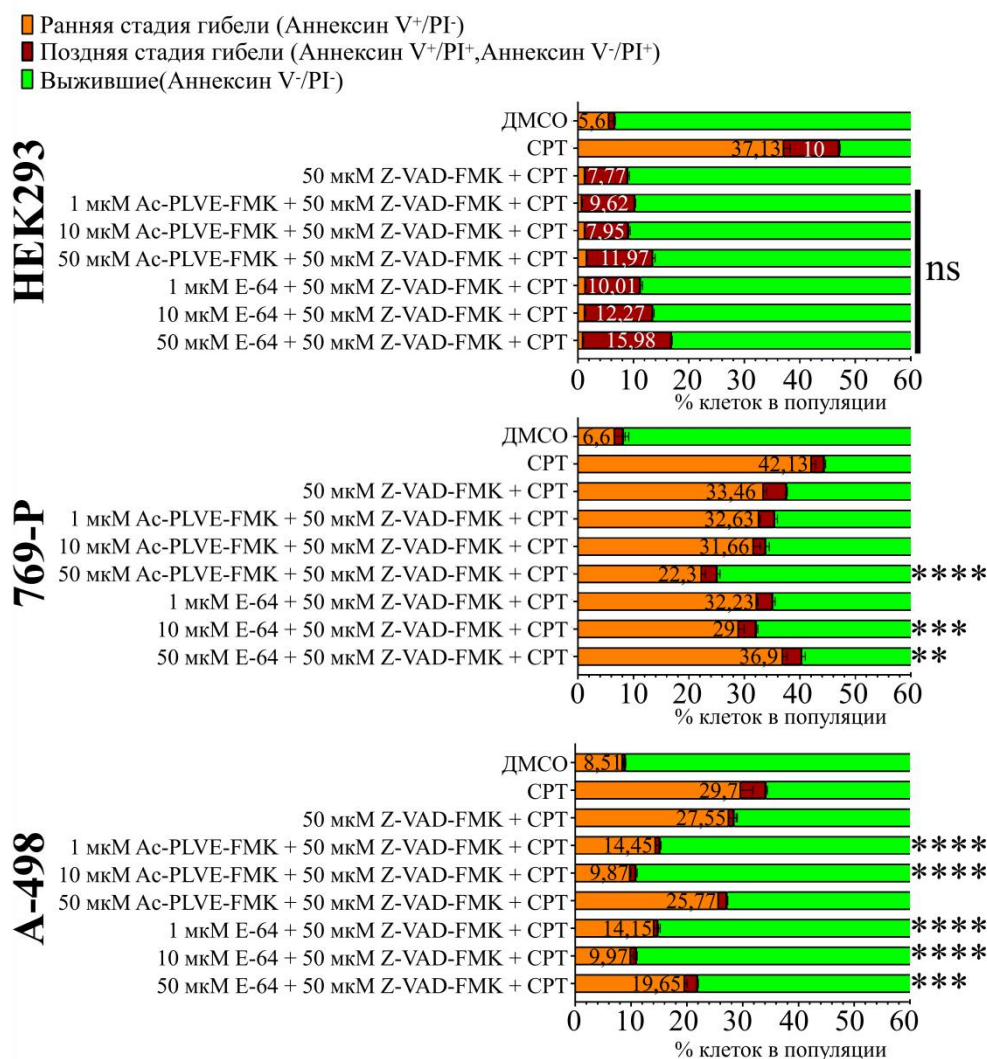


Рисунок 5 – Совместное ингибирование цистеиновых катепсинов и каспаз эффективнее подавляет гибель, индуцированную СРТ, в опухолевых клетках почки человека 769-Р и А-498. Клетки обрабатывали СРТ и ингибиторами катепсинов в течение 48 часов, анализировали проточной цитометрией. Данные: среднее $\pm$ SD; статистическую значимость отличий от группы 50 мкМ Z-VAD-FMK оценивали однофакторным ANOVA с пост-хок тестом Даннетта. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns — незначимо.

Цистеиновые катепсины вовлечены в СРТ-индуцированную запрограммированную гибель, причём их вклад более выражен в эмбриональных клетках; аддитивный эффект совместного ингибирования каспаз и катепсинов предполагает взаимную компенсацию.

Исследование изоформного состава всех 11 катепсинов в динамике СРТ-индуцированной гибели показало, что в опухолевых линиях для катепсинов О, В и V отмечено снижение промежуточных и зрелых форм в обеих линиях (рис. 6). Для К, L и Н зарегистрирована активация процессинга. В клетках НЕК293 экспрессия катепсинов О, В, W и F остаётся стабильной, а изменения С, L и Н носят обратимый характер без устойчивой активации.

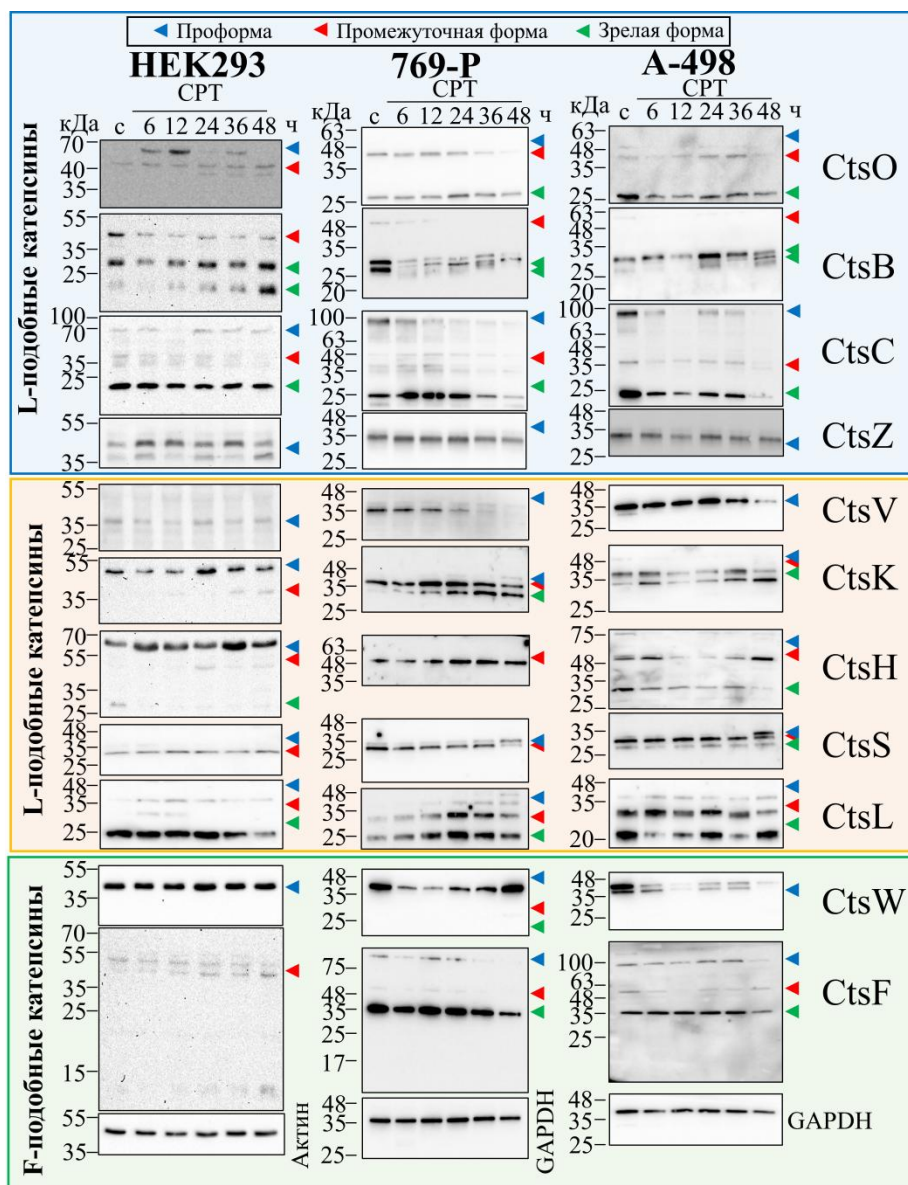


Рисунок 6 - Цистеиновые катепсины процессируются при запрограммированной клеточной гибели, вызванной СРТ. Вестерн-блоттинг клеточных лизатов через 6–48 часов с антителами к 11 катепсинам; контроль нанесения — GAPDH и β -актин. Cts — катепсин. ч - часы.

3. Состав структуры частиц влияет на скорость высвобождения загруженных препаратов в условиях, моделирующих лизосомальное микроокружение

Роль протеолиза и низкого pH как факторов стабильности наноносителей исследовали *in vitro* на двух модельных системах: альбуминовых наночастицах, разрушаемых преимущественно протеиназами, и мембранных нановезикулах, чья стабильность липидного бислоя зависит от pH.

Альбуминовые наночастицы с низкой (0,009 % глутарового альдегида, НСШ-АНЧ) и высокой (0,09 %, ВСШ-АНЧ) степенью сшивки получали десольватацией и загружали сунитинибом или родамином 123. НСШ-АНЧ даже в физиологических условиях (pH 7,4, 37 °C) высвобождали содержимое медленнее из-за плотной белковой матрицы (рис. 7 А,Б).

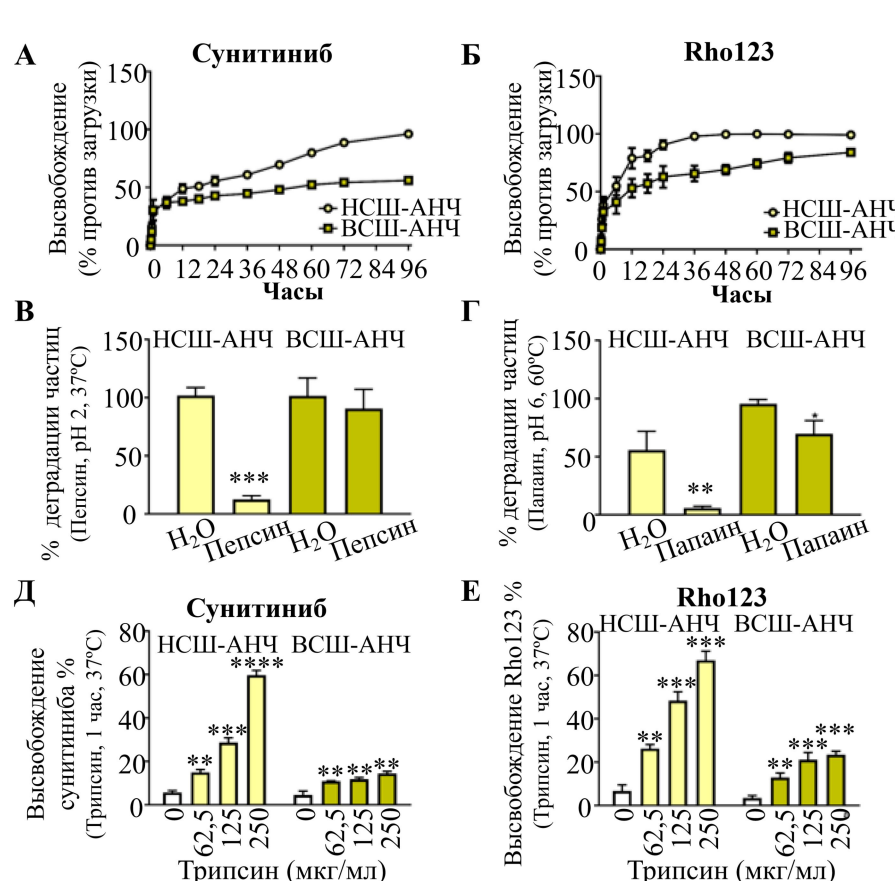


Рисунок 7 - Степень сшивки альбуминовых наночастиц влияет на высвобождения препарата. (А–Б) Кинетика высвобождения сунитиниба и родамина 123. (В–Г) Деградация после инкубации с пепсином и папаином. (Д–Е) Высвобождение сунитиниба и родамина 123 под действием трипсина. Данные: среднее $\pm$ SD ($n \geq 3$). Для (А–Б) использован t-критерий Стьюдента, для (Д–Е) — однофакторный ANOVA с пост-хок тестом Даннетта. * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,0001$.

Протеолиз моделировали папаином (цистеиновая протеиназа, родственная катепсинам), пепсином и трипсином: во всех случаях НСШ-АНЧ деградировали значительно

сильнее, тогда как ВСШ-АНЧ были устойчивы не только к протеиназам, но и к щелочному рН и повышенной температуре (рис. 7 В,Г). Высвобождение сунитиниба и родамина 123 под действием трипсина также шло быстрее из НСШ-АНЧ, подтверждая, что доступность матрицы для протеиназ лимитирует кинетику выхода агента (рис. 7 Д,Е).

Мембранные нановезикулы — биологические нановезикулы (БНВ) и биоподобные нановезикулы (БПНВ), полученные слиянием биологических нановезикул с синтетическими липосомами, — использовали для оценки вклада кислого рН в высвобождение содержимого (рис. 8). В носители загружали FAM-меченую РНК. При инкубации в буферах, моделирующих этапы эндолизосомального пути, БНВ набухали и разрушались при рН 4,5, тогда как БПНВ демонстрировали более высокую рН-чувствительность.

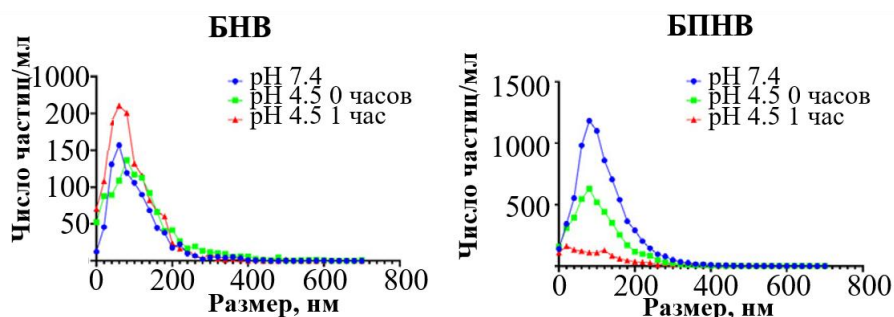


Рисунок 8 - Состав мембраны нановезикул определяет их устойчивость в условиях низкого рН. Динамика изменения размера и количества частиц БНВ и БПНВ в условиях кислого рН. Нановезикулы инкубировали 1 час в буферах с разным рН и после измеряли размер и количество частиц. Данные: среднее $\pm$ SD.

С помощью гель-электрофореза зафиксировано высвобождение FAM-РНК из БПНВ при рН 4,5 (рис. 9).

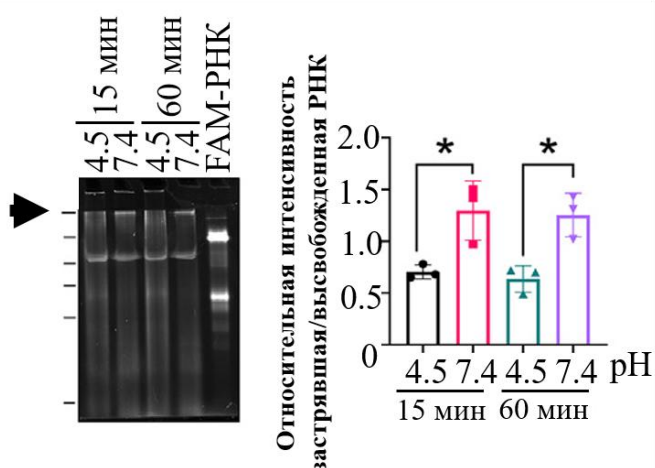


Рисунок 9 - БПНВ легче разрушаются в условиях низкого рН с высвобождением содержимого. Высвобождение FAM-РНК из БПНВ и полуколичественный анализ эффективности высвобождения. Черной стрелкой указано застревание FAM-РНК. Среднее $\pm$ SD; ANOVA. * $p < 0,05$.

Таким образом, *in vitro* стабильность наноносителей в лизосомоподобных условиях диктуется их химической природой: для белковых матриц ключевую роль играет протеолиз, контролируемый степенью сшивки, а для липидных — рН-зависимая дестабилизация бислоя.

4. Биоподобные нановезикулы подвергаются деградации под действием цистеиновых катепсинов

Ингибирование цистеиновых катепсинов с помощью E-64 и Ac-PLVE-FMK в сочетании с динамической микроскопией выявило накопление внутриклеточного DiR-сигнала БПНВ, тогда как для БНВ аналогичного эффекта не зарегистрировано (рис. 10 А); сигнал FAM-RНК при этом не изменялся (рис. 10 Б).

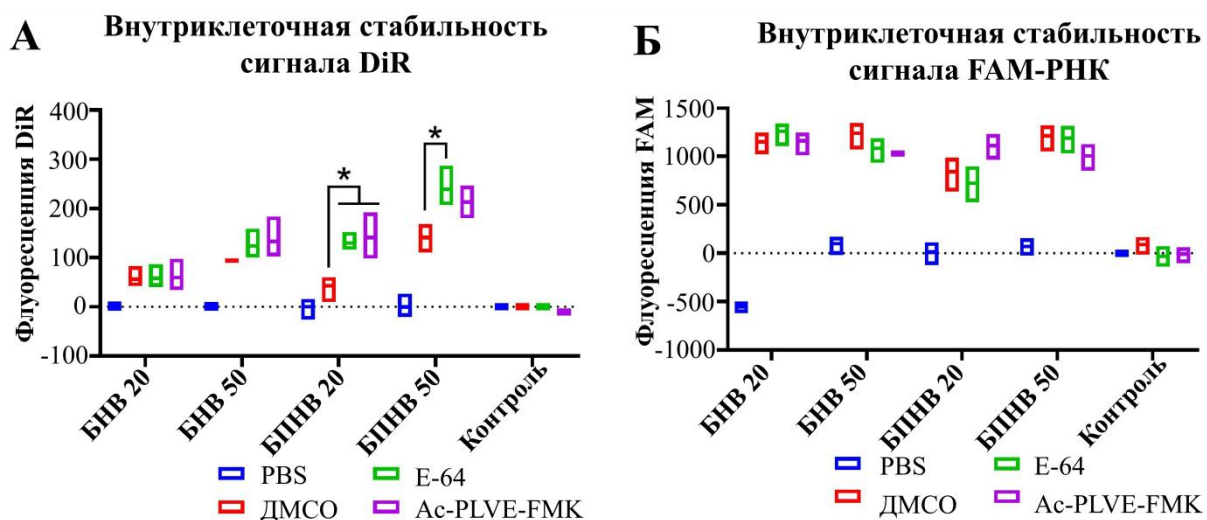


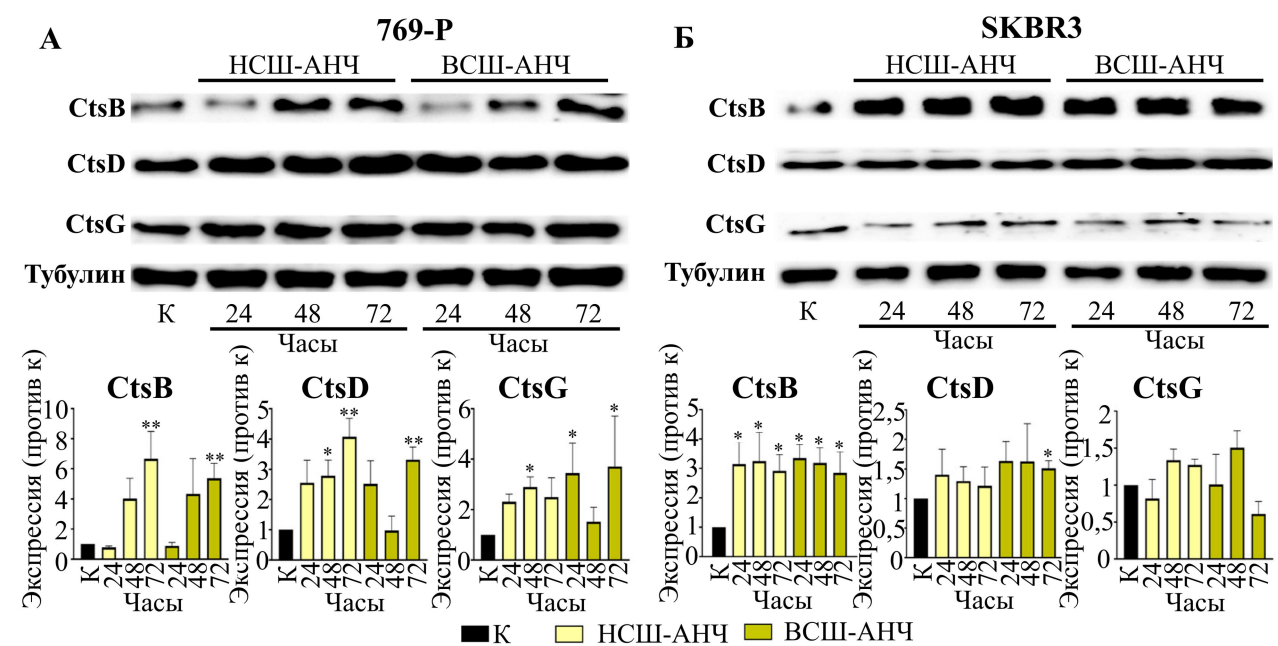
Рисунок 10 - Ингибирование цистеиновых катепсинов увеличивает стабильность БПНВ в клетках. (А) Стабильность DiR-меченых БНВ и БПНВ. (Б) Стабильность FAM-RНК в БНВ и БПНВ в клетках HerG2. Представлены усреднённые сигналы (4–44 часов) для двух концентраций частиц в присутствии PBS или ингибиторов (E-64, Ac-PLVE-FMK); контроль — клетки без частиц. Среднее $\pm$ SD; ANOVA. * $p < 0,05$.

Полученные данные прямо указывают на избирательную деградацию БПНВ цистеиновыми катепсинами, тогда как нативные БНВ в существенно меньшей степени подвержены лизосомальному протеолизу.

5. Альбуминовые наночастицы влияют на экспрессию катепсинов

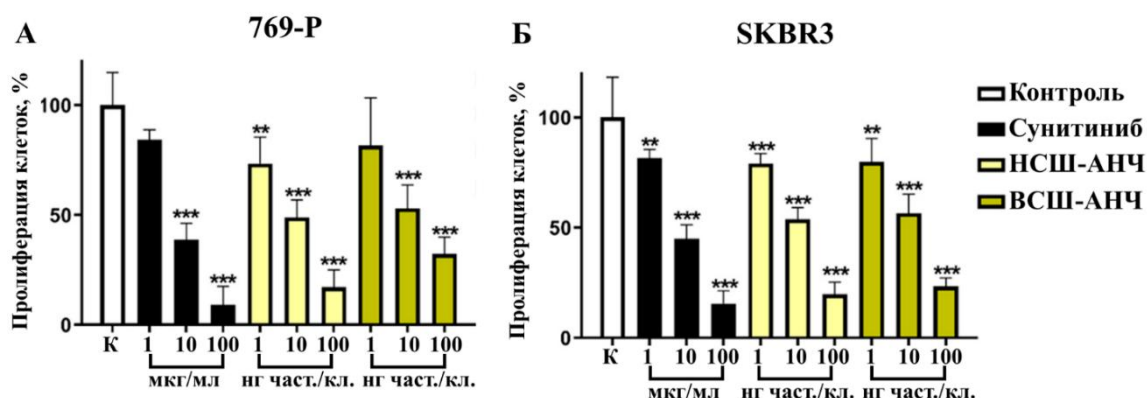
Изменение экспрессии катепсинов В, D и G после 6-часовой обработки клеток 769-Р и SKBR3 альбуминовыми наночастицами с разной степенью сшивки оценивали методом вестерн-блоттинга через 24-72 часов. Обработка обоими типами частиц повышала содержание протеиназ в обеих линиях (рис. 11 А,Б). Наиболее выраженные изменения зарегистрированы для цистеинового катепсина В — в линии 769-Р его экспрессия прогрессивно нарастала, а в SKBR3 оставалась стабильно повышенной на протяжении всего периода наблюдения. Уровень катепсина D увеличивался слабее, а катепсина G менялся

минимально. Следовательно, интернализация альбуминовых наночастиц избирательно активирует лизосомальный компартмент, затрагивая в первую очередь катепсин В.



6. Альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки с загруженным сунитинибом эффективнее индуцируют гибель клеток

Сравнительную цитотоксичность нагруженных сунитинибом альбуминовых наночастиц с разной степенью сшивки оценивали на линиях 769-Р и SKBR3: после 16-часовой инкубации и смены среды жизнеспособность регистрировали через 48 часов (рис. 12 А,Б).



ночи со свободным сунитинибом, альбуминовыми наночастицами, загруженными сунитинибом, затем оценивали жизнеспособность. Данные: среднее $\pm$ SD; однофакторный ANOVA с пост-хок тестом Даннетта. $**p < 0,005$, $***p < 0,0005$.

Свободный сунитиниб и обе формы частиц вызывали дозозависимое снижение выживаемости. Несмотря на более низкую загрузку, НСШ-АНЧ достоверно сильнее подавляли жизнеспособность, причём различие было более выражено в 769-Р.

Таким образом, в клетках НСШ-АНЧ обеспечивает быстрое высвобождение сунитиниба и повышенную цитотоксичность, тогда как высокая стабильность ВСШ-АНЧ замедляет высвобождение и ослабляет эффект.

III. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведён сравнительный анализ экспрессии, субклеточного распределения и процессинга всех 11 цистеиновых катепсинов в эмбриональных клетках почки и двух линиях ПКР. Неопластическая трансформация сопровождается гиперэкспрессией катепсинов V, Z, S, L, B, накоплением зрелых и промежуточных форм. Впервые показана ядерная локализация этих ферментов, изменение ядерно-цитоплазматического распределения и усиленное созревание катепсинов O, K, C, H в ядерной фракции опухолей.

Функциональный анализ с использованием СРТ выявил принципиальную роль цистеиновых катепсинов в реализации запрограммированной клеточной гибели: их селективное ингибирование достоверно снижало долю клеток на ранних стадиях гибели, причём в эмбриональных клетках протективный эффект был выражен значительно сильнее. Совместное подавление активности каспаз и катепсинов в ПКР приводило к аддитивному цитопротекторному эффекту, что прямо указывает на способность двух протеолитических систем к взаимной компенсации.

Принципиально новым результатом стало раскрытие роли цистеиновых катепсинов во внутриклеточной судьбе наноразмерных систем доставки. На модели альбуминовых наночастиц показано, что степень сшивки белковой матрицы выступает регулятором их протеолитической устойчивости: НСШ-АНЧ быстро деградируют протеиназами, обеспечивая ускоренное высвобождение агента и более высокую цитотоксичность. Сама интернализация наночастиц индуцирует экспрессию катепсина B, формируя положительную обратную связь, усиливающую разрушение носителя. На модели мембранных нановезикул установлено, что включение синтетических липидов в БНВ придаёт им pH-чувствительность.

Избирательное ингибирование катепсинов повышает внутриклеточную стабильность БПНВ, но не биологических, подтверждая специфичность протеолитического механизма.

Таким образом, цистеиновые катепсины выполняют в опухолевых клетках двоякую функцию: участвуют в запрограммированной гибели и определяют кинетику деградации наноносителей. Это обосновывает персонализированные протеолиз-чувствительные системы доставки с учётом активности катепсинов в конкретной опухоли и открывает перспективы для направленной модуляции лизосомальных протеиназ и рационального дизайна наноносителей в терапии ПКР.

ВЫВОДЫ

- 1) Экспрессия, внутриклеточная локализация и созревание цистеиновых катепсинов различаются в эмбриональной и опухолевых культурах клеток почки.
- 2) Цистеиновые катепсины вовлечены в СРТ-индуцированную запрограммированную клеточную гибель, при этом характер их вовлеченности существенно различается в эмбриональной и опухолевых культурах клеток почки.
- 3) Цистеиновые катепсины принимают участие в деградации альбуминовых и мембранных наноносителей, причем эффективность и специфичность этой деградации определяются структурными параметрами самих наноносителей.
- 4) Интернализация альбуминовых наночастиц инициирует повышение экспрессии катепсинов в опухолевых культурах. При этом включение сирамезина в состав наночастиц приводит к проявлению цитотоксического эффекта.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология (биологические науки)

1) Soond S.M., Kozhevnikova M.V., **Frolova A.S.**, Savvateeva L.V., Plotnikov E.Y., Townsend P.A., Han Y.P., Zamyatnin A.A. Jr. Lost or Forgotten: The nuclear cathepsin protein isoforms in cancer // *Cancer Letters*. – 2019. – vol. 462, pp. 43-50. EDN: FZXEHS. Импакт-фактор (JIF) – 11,8. Доля участия 20%, 0,13 п.л.

2) Rudzinska-Radecka M., **Frolova A.S.**, Balakireva A.V., Gorokhovets N.V., Pokrovsky V.S., Sokolova D.V., Korolev D.O., Potoldykova N.V., Vinarov A.Z., Parodi A., Zamyatnin A.A. Jr. In Silico, In Vitro, and Clinical Investigations of Cathepsin B and Stefin A mRNA Expression and a Correlation Analysis in Kidney Cancer // *Cells*. – 2022. – vol. 11, № 9. – P. 1455. EDN: PCCOTX. Импакт-фактор (JIF) – 6,0. Доля участия 25%, 0,41 п.л.

3) **Frolova A.S.**, Chepikova O.E., Deviatkina A.S., Solonkina A.D., Zamyatnin A.A. Jr. New Perspectives on the Role of Nuclear Proteases in Cell Death Pathways // *Biology (Basel)*. – 2023. – vol. 12, № 6. – P. 797. EDN: MOWPBV. Импакт-фактор (JIF) – 4,3. Доля участия 80%, 1,0 п.л.

4) Kolesova E.P., Egorova V.S., Syrocheva A.O., **Frolova A.S.**, Kostyushev D., Kostyusheva A., Brezgin S., Trushina D.B., Fatkhutdinova L., Zyuzin M., Demina P.A., Khaydukov E.V., Zamyatnin A.A. Jr., Parodi A. Proteolytic Resistance Determines Albumin Nanoparticle Drug Delivery Properties and Increases Cathepsin B, D, and G Expression // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – vol. 24, № 12. – P. 10245. EDN: SGQTJA. Импакт-фактор (JIF) – 5,6. Доля участия 20%, 0,3 п.л.

5) **Фролова А.С.**, Тихомирова Н.К., Киреев И.И., Зерний Е.Ю., Пароди А., Иванов К.И., Замятнин А.А. мл. Экспрессия, внутриклеточная локализация и созревание цистеиновых катепсинов в эмбриональной и опухолевых культурах клеток почки // *Биохимия*. – 2023. – Т. 88, № 7. – С. 1268-1280. EDN: FYLWMO. Импакт-фактор – 1,941 (РИНЦ). Доля участия 80%, 0,8 п.л.

[**Frolova A.S.**, Tikhomirova N.K., Kireev I.I., Zernii E.Y., Parodi A., Ivanov K.I., Zamyatnin A.A. Jr. Expression, Intracellular Localization, and Maturation of Cysteine Cathepsins in Renal Embryonic and Cancer Cell Lines // *Biochemistry*. – 2023. – vol. 88, № 7. – pp. 1034-1044. EDN: OAKAYV. Импакт-фактор (JIF) – 2,1. Доля участия 80%, 0,8 п.л.]

6) Voronina M.V., **Frolova A.S.**, Kolesova E.P., Kuldyushev N.A., Parodi A., Zamyatnin A.A. Jr. The Intricate Balance between Life and Death: ROS, Cathepsins, and Their Interplay in Cell Death and Autophagy // International Journal of Molecular Sciences. – 2024. – vol. 25, № 7. – P. 4087. EDN: EXBHGM. Импакт-фактор (JIF) – 5,6. Доля участия 35%, 0,06 п.л.

7) Kostyusheva A., Brezgin S., Ponomareva N., **Frolova A.**, Lunin A., Bayurova E., Tikhonov A., Slatinskaya O., Demina P., Kachanov A., Babayeva G., Khan I., Khochenkov D., Khochenkova Y., Sokolova D., Silachev D., Maksimov G., Khaydukov E., Pokrovsky V.S., Zamyatnin A.A. Jr., Parodi A., Gordeychuk I., Chulanov V., Kostyushev D. Biologics-based technologies for highly efficient and targeted RNA delivery // Molecular Therapy. – 2025. – vol. 33, № 1. – pp. 168-183. EDN: WRSUEB. Импакт-фактор (JIF) – 11,4. Доля участия 15%, 0,2625 п.л.