

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ФАКУЛЬТЕТ БИОИНЖЕНЕРИИ И БИОИНФОРМАТИКИ

на правах рукописи

Фролова Анастасия Сергеевна

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

1.5.3 Молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент
Замятнин Андрей Александрович

Москва – 2026

Оглавление

Оглавление	2
Введение	5
1. Обзор литературы	11
1.1 Цистеиновые катепсины: структура, регуляция, внутриклеточная локализация	11
1.1.1 Общая роль протеолиза в прогрессии рака	11
1.1.2 Семейство цистеиновых катепсинов: классификация, структура профермента и механизмы активации	12
1.1.3 Синтез и активация проферментов	14
1.1.4 Регуляция активности: рН-зависимость и эндогенные ингибиторы	16
1.1.5 Внутриклеточная локализация цистеиновых катепсинов	17
1.2 Роль цистеиновых катепсинов в онкогенезе	18
1.2.1 Дисрегуляция экспрессии при раке почки и других типах опухолей	18
1.2.2 Участие цистеиновых катепсинов в ключевых процессах канцерогенеза	20
1.2.3 Роль катепсинов в ответе на химио- и радиотерапию	21
1.3 Роль цистеиновых катепсинов в регуляции типов клеточной гибели	26
1.3.1 Лизосом-зависимая клеточная гибель	26
1.3.2 Апоптоз	29
1.3.3 Аутофагия	32
1.3.4 Другие типы регулируемой клеточной гибели	34
1.4 «Умные» системы доставки лекарственных средств	42
1.4.1 Основные механизмы контроля высвобождения	44
1.4.2 Контроль высвобождения с помощью эндогенных стимулов	44
1.4.3 Факторы, определяющие кинетику высвобождения	46
1.4.4 Методы изучения и оценки высвобождения	47
1.4.5 Практическое применение и перспективы	48
2 Материалы и методы	51

2.1	Химические вещества и реактивы	51
2.2	Антитела	51
2.3	Биологические наночастицы	52
2.3.1	Синтез альбуминовых наночастиц	52
2.3.2	Загрузка и высвобождение веществ в альбуминовых наночастицах	53
2.3.3	Определение деградации альбуминовых наночастиц и высвобождения в протеолитических условиях	53
2.3.4	Изготовление биологических нановезикул	54
2.3.5	Изготовление биоподобных нановезикул на основе слияние биологических нановезикул и липосом	54
2.3.6	Флуоресцентное мечение биологических и биоподобных нановезикул	55
2.3.7	Загрузка FAM-РНК в биологические нановезикулы методом электропорации	55
2.3.8	Анализ траекторий наночастиц (NTA)	56
2.3.9	Криогенная просвечивающая электронная микроскопия (крио-ПЭМ)	56
2.4	Культивирование клеточных линий	57
2.5	Фракционирование клеточных структур	57
2.6	Выделение ДНК из эукариотических клеток	58
2.7	Клеточные тесты	58
2.7.1	Определение пула апоптотических клеток методом проточной цитометрии	58
2.7.2	Оценка жизнеспособности клеток в присутствии камптотецина методом МТТ	59
2.7.3	Оценка жизнеспособности клеток в присутствии альбуминовых наночастиц	59
2.7.4	Определение количества живых клеток методом окрашивания трипановым синим	60
2.8	Оценка насыщения аминокрупп на поверхности альбуминовых наночастиц методом проточной цитометрии	60
2.9	Оценка активности цистеиновых катепсинов	60
2.10	Окрашивание лизосом	61
2.11	Оценка экспрессии цистеиновых катепсинов методом вестерн блоттинга	62

2.12 Нативный ПААГ-электрофорез	63
2.13 Оценка локализации частиц с лизосоми методом флуоресцентной микроскопии	63
2.14 Анализ внутриклеточной стабильности нановезикул в присутствии ингибиторов цистеиновых катепсинов	64
2.15 Статистический анализ результатов	64
3. Результаты работы	65
3.1 Экспрессия, локализация и созревание цистеиновых катепсинов различаются в эмбриональных и опухолевых клетках почки.	65
3.2 Ингибирование цистеиновых катепсинов снижает клеточную гибель в эмбриональных и опухолевых клетках почки	72
3.3 При СРТ-индуцированной клеточной гибели в клетках наблюдаются изменения целостности лизосом и активности цистеиновых катепсинов	83
3.4 Состав структуры частиц влияет на скорость высвобождения загруженных препаратов в условиях, моделирующих лизосомальное микроокружение	94
3.5 Биоподобные нановезикулы подвергаются деградации под действием цистеиновых катепсинов	104
3.6 Альбуминовые наночастицы влияют на экспрессию катепсинов	106
3.7 Альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки с загруженным сунитинибом эффективнее индуцируют гибель клеток	108
4. Обсуждение результатов	112
5. Заключение	121
6. Список сокращений	123
7. Список литературы	125

Введение

Актуальность темы исследования

Злокачественные новообразования остаются одной из ведущих причин смертности, а эффективность терапии ограничена развитием лекарственной резистентности и недостатком надёжных предиктивных маркеров [1,2]. 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 [3]. 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 [4]. 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 [5]. Для катепсинов В, L и S при ПКР показана связь гиперэкспрессии с агрессивным фенотипом, инвазией и ангиогенезом [6]. Катепсины К, F, H,

C, V, Z рассматриваются как потенциальные биомаркеры ПКР [7]. 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 B, S и L через АФК- и NF-κB-зависимые механизмы [8] и вызывать их транслокацию в ядро, где они активируют апоптотические каскады и деградируют проапоптотические факторы [9]. Фармакологическое ингибирование отдельных катепсинов сенсibiliзирует клетки к противоопухолевым соединениям [10], однако компенсаторная активация других протеиназ ограничивает эффективность этого подхода. Камптотецин (СРТ), рассматриваемый как перспективный агент для терапии ПКР, подвергается лизосомальной секвестрации и индуцирует цитопротективную аутофагию с участием катепсинов B и L [11], а их ингибирование усиливает цитотоксический эффект препарата [12]. 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 интернализированных наночастиц [13], где под действием кислой среды и цистеиновых катепсинов происходит деградация носителя и высвобождение лекарства [14]. На этом принципе основана разработка протеолиз-чувствительных линкеров и носителей, селективно разрушаемых в опухолевых клетках [15–20]. Однако систематического исследования роли конкретных катепсинов в деградации биологических нановезикул и влияния самих наночастиц на лизосомальный компартмент опухолевых клеток не проводилось.

Цель работы - 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.

Задачи работы

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-P и A-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-Р и А-498.

3. Исследовать влияние протеолитического воздействия и рН, 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 рН-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 рН и протеолизу обосновывают их применение в качестве долгоциркулирующих носителей, так и рН-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 и методы исследования

Работа выполнена с использованием комплекса современных молекулярно-биологических, биохимических и клеточно-биологических методов. Исследование проводилось на эмбриональных клетках почки человека линии НЕК293 и линиях почечно-клеточного рака человека 769-Р и А-498. Для анализа экспрессии и изоформного состава белков использовали метод вестерн-блоттинга с панелью специфических антител ко всем цистеиновым катепсинам. Внутриклеточную локализацию исследовали методами конфокальной микроскопии с иммунофлуоресцентным окрашиванием и вестерн-блоттингом фракционированных клеточных компонентов.

Запрограммированную клеточную гибель, индуцированную камптотецином, оценивали методами проточной цитометрии (окрашивание аннексином V-FITC и пропидия йодидом), анализа фрагментации ДНК и вестерн-блоттинга маркеров апоптоза (Bcl-2, прокаспазы-3). Для функциональных исследований использовали ингибиторы цистеиновых катепсинов (Е-64, Ас-PLVE-FMK) и пан-каспазный ингибитор Z-VAD-FMK. Динамику лизосомальной пермеабиллизации анализировали с помощью лизосомотропных красителей LysoTracker и измерения активности катепсинов по расщеплению флуорогенного субстрата.

Эффективность загрузки и высвобождения модельных веществ (сунитиниб, родамин 123, FAM-РНК) из альбуминовых наночастиц с разной степенью сшивки, а также мембранных нановезикул оценивали в протеолитических условиях и на клеточных культурах

с применением проточной цитометрии и флуоресцентной микроскопии. Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.4.3.

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 B.

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.

1. Обзор литературы

1.1 Цистеиновые катепсины: структура, регуляция, внутриклеточная локализация

1.1.1 Общая роль протеолиза в прогрессии рака

Прогрессирование злокачественных новообразований представляет собой сложный многостадийный процесс, зависящий как от внутренних свойств опухолевых клеток, так и от их динамического взаимодействия с опухолевым микроокружением (ОМО) [21]. Ключевым механизмом модификации ОМО служит протеолитическая активность, осуществляемая широким спектром протеиназ. Данные ферменты разрушают физические барьеры внеклеточного матрикса (ВКМ), активируют и инактивируют сигнальные молекулы, а также высвобождают биологически активные фрагменты из компонентов ВКМ, модулируя тем самым рост, инвазию и метастазирование опухоли [22].

Среди протеиназ, вовлечённых в опухолевую прогрессию, выделяют несколько основных классов. Матриксные металлопротеиназы (ММП), в частности мембранная ММП-14 (MT1-MMP), расщепляют фибриллярные коллагены и компоненты базальной мембраны, облегчая миграцию опухолевых клеток [23]. Сериновые протеиназы, такие как активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) и плазмин, активируют каскады протеолиза и напрямую деградируют ВКМ [24]. Цистеиновые катепсины, секретируемые опухолевыми клетками или клетками микроокружения, также вносят существенный вклад в ремоделирование ВКМ, ангиогенез и ускользание от иммунного надзора [25]. Кроме того, протеиназы семейств ADAM и ADAMTS участвуют в шеддинге мембранных белков и высвобождении факторов роста [26].

Несмотря на разнообразие протеолитических ферментов в ОМО, особое место занимают цистеиновые катепсины. В отличие от многих ММП, действующих преимущественно внеклеточно, катепсины локализуются не только в лизосомах, но и в цитоплазме, ядре и на клеточной поверхности, что наделяет их уникальными регуляторными функциями [27,28]. Их экспрессия и активность специфически повышены при многих типах рака, включая почечно-клеточный рак, и коррелируют с неблагоприятным прогнозом и устойчивостью к терапии [29].

1.1.2 Семейство цистеиновых катепсинов: классификация, структура профермента и механизмы активации

Цистеиновые катепсины представляют собой семейство лизосомальных протеиназ, относящихся к клану СА семейства С1 папаин-подобных цистеиновых протеиназ. Как известно, более 70 лет назад лизосома была идентифицирована как основной компартмент внутриклеточного переваривания [30]. С тех пор гидролитический аппарат лизосом, включая цистеиновые катепсины, был всесторонне охарактеризован. Исторически их роль сводилась к неспецифическому протеолизу в кислой среде лизосом, однако сегодня накоплены убедительные доказательства их участия в ключевых физиологических и патологических процессах, таких как антиген-презентация, ремоделирование костной ткани и дифференцировка кератиноцитов [31–33]. Особый интерес представляет их роль в онкологии. Экспрессия цистеиновых катепсинов нарушена при множестве типов опухолей, и многочисленные данные подтверждают их вовлечённость в прогрессирование рака, ангиогенез, метастазирование и развитие устойчивости к противоопухолевым препаратам [29].

Название «катепсин» происходит от греческого «katharsein» (переваривать) и было предложено для протеиназ, активных в слабокислой среде. Согласно данным биоинформатического анализа генома, у человека идентифицировано 11 представителей цистеиновых катепсинов: В, С, F, Н, К, L, О, S, V, Z и W (таблица 1) [34]. По типу протеолитической активности катепсины делят на: эндопептидазы (катепсины F, L, К, S, V, О, W), осуществляющие расщепление пептидных связей внутри полипептидной цепи; экзопептидазы (аминодипептидаза (катепсин С), карбоксидипептидаза (катепсин В), карбоксимонопептидаза (катепсин Z)). При этом катепсин Н проявляет как эндопептидазную, так и аминопептидазную активность.

Таблица 1. Функциональные последовательности цистеиновых катепсинов.
Схематическое представление катепсинов с указанием количества аминокислот, протяжённости доменов (сигнальный пептид, пропептид (продомен) и зрелый домен), а также типа протеолитической активности [35].

Цистеиновые катепсины (Cts)	Число аминокислот	Сигнальный пептид/ Продомен/Зрелый домен	-пептидаза
CtsB	339	...17... ..62.....260.....	ЭКЗО-/ЭНДО-
CtsC	463	...24... ..206.....233.....	ЭКЗО-
CtsF	484	...19.. ..251.....214.....	ЭНДО-
CtsH	335	...22... ..75.....220.....	ЭКЗО-/ЭНДО-
CtsK	329	..15.. ..99.....215.....	ЭКЗО-
CtsL	333	...17... ..96.....220.....	ЭНДО-
CtsO	321	...23... ..84.....214.....	НЕИЗВЕСТНО
CtsS	331	...16.. ..98.....217.....	ЭНДО-
CtsV	334	...17... ..96.....231.....	ЭНДО-
CtsW	376	...21.. ..106.....249.....	НЕИЗВЕСТНО
CtsX	303	...23... ..38.....242.....	ЭКЗО-

Большинство катепсинов (В, Н, L, С, Х, F, О) экспрессируются повсеместно и участвуют в общем клеточном обороте белков. Однако некоторые демонстрируют ограниченную тканеспецифичную экспрессию, указывающую на специализированные функции. Например, катепсин К высоко экспрессируется в остеокластах и играет критическую роль в резорбции кости [36]. Катепсин S экспрессируется преимущественно в профессиональных антиген-презентирующих клетках (дендритных клетках и В-лимфоцитах) [37]. Катепсин V высокоомологичен катепсину L, но его экспрессия ограничена тимусом и яичками [38,39]. Катепсин W экспрессируется в CD8⁺ Т-лимфоцитах и NK-клетках [40]. Первоначально считавшиеся исключительно лизосомальными ферментами, катепсины были обнаружены и в других клеточных компартментах: цитоплазме, ядре и на плазматической мембране [27,28]. Например, ядерные формы катепсинов L и F участвуют в процессинге гистона H3 и регуляции клеточного цикла [41,42], что существенно расширяет представление об их функциях.

Все цистеиновые катепсины, за исключением тетрамерного катепсина С [43], обладают консервативной трёхмерной структурой, известной как «папаин-подобная структура». Данная структура образована двумя структурными доменами, условно обозначаемыми как L-домен (левый) и R-домен (правый). L-домен сложен преимущественно из α -спиралей, включая центральную спираль длиной более 30 аминокислотных остатков. R-домен имеет форму β -листа, замкнутого в нижней части α -спиралью. Активный сайт

фермента расположен в щели между этими двумя доменами. Каталитическая триада, состоящая из цистеина, гистидина и аспарагина (Cys25, His163 и Asn300 по нумерации катепсина L), является строго консервативной. Согласно классической номенклатуре Шехтера и Бергера, остатки субстрата обозначаются как P1, P2, P3 и т.д., а соответствующие им сайты связывания на поверхности протеиназы — как S1, S2, S3 [44]. Исследования структуры комплексов катепсинов с ингибиторами позволили пересмотреть и уточнить эту модель. Было показано, что только три сайта связывания — S2, S1 и S1' — являются чётко определёнными и образуют стабильные взаимодействия. Среди них S2-сайт формирует настоящий карман, в значительной степени определяющий субстратную специфичность фермента. Например, уникальное предпочтение катепсина K к пролину в позиции P2 обусловлено строением его S2 кармана [45].

1.1.3 Синтез и активация проферментов

Цистеиновые катепсины, будучи ключевыми эффекторами лизосомального протеолиза, проходят сложный многоэтапный путь от синтеза до становления функционально активными ферментами. Данный процесс находится под строгим контролем и складывается из нескольких этапов: биосинтеза неактивных предшественников, их посттрансляционного созревания, направленного внутриклеточного транспорта и, наконец, активации в специализированных компартментах. Разлад на любом из этих этапов способен дезорганизовать протеолитическую активность и тем самым внести вклад в патогенез заболеваний.

Биогенез цистеиновых катепсинов инициируется на рибосомах шероховатого эндоплазматического ретикулума (ЭПР), где полипептидные цепи образуются сразу в виде пре-про-ферментов (рис. 1). Присутствующий на N-конце сигнальный пептид обеспечивает котрансляционное втягивание растущей цепи в люмен ЭПР; там он отщепляется сигнальными пептидазами с образованием про-катепсина. В структуре последнего выделяют два главных домена: ингибиторный про-пептид и каталитический домен. Про-пептид выполняет ключевую функцию – действуя как высокоаффинный ингибитор, он стерически перекрывает активный центр и предотвращает несанкционированную протеолитическую активность [46]. Помимо ингибиторной функции, про-пептид действует как внутримолекулярный шаперон, обеспечивая правильное сворачивание каталитического домена и формирование активного центра. Сразу после трансляции в ЭПР про-катепсины

подвергаются N-гликозилированию — присоединению олигосахаридов высокой маннозы к определённым аспарагиновым остаткам [47].

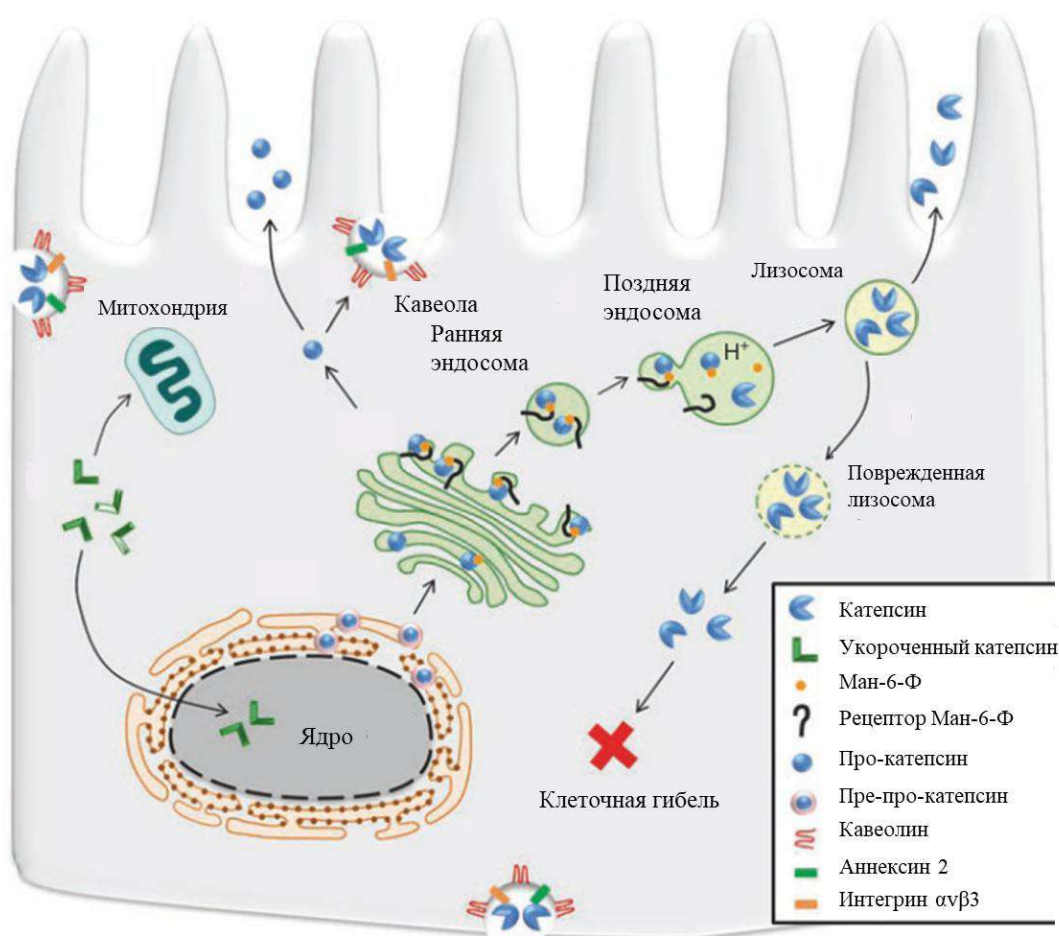


Рисунок 1. Синтез, сортировка и внутриклеточная локализация катепсинов.

Цистеиновые катепсины синтезируются в виде неактивных пре-про-ферментов, содержащих N-концевой сигнальный пептид, который направляет полипептидную цепь в эндоплазматический ретикулум (ЭПР). В просвете ЭПР сигнальный пептид отщепляется, и с помощью про-пептида молекула приобретает правильную трёхмерную структуру. Затем про-катепсин подвергается формированию дисульфидных связей и гликозилированию с присоединением высокоманнозных олигосахаридов, после чего транспортируется в сеть транс-Гольджи (ТГС). В ТГС про-катепсины метятся маннозо-6-фосфатом (Ман-6-Ф), что обеспечивает их целевой транспорт в эндосомально-лизосомальные компартменты через рецептор M6P (M6PR). Активация катепсинов происходит в лизосомах под действием низкого pH или в результате протеолитического процессинга другими протеиназами, что приводит к образованию зрелой формы фермента, состоящей из тяжёлой и лёгкой цепей, связанных дисульфидной связью [48].

После правильного фолдинга и гликозилирования в ЭПР про-катепсины транспортируются в цис-Гольджи, а затем в транс-Гольджи сеть (ТГС), которая служит главной сортировочной станцией. Именно в ТГС происходит ключевое событие, определяющее их лизосомальную судьбу: ферментативное присоединение фосфатной группы к маннозным остаткам олигосахаридов с образованием маннозо-6-фосфата (Ман-6-Ф). Этот уникальный углеводный остаток распознаётся специфическими маннозо-6-

фосфатными рецепторами (M6PR), расположенными на мембране ТГС. Образовавшийся комплекс «про-катепсин–M6PR» упаковывается в клатрин-покрытые везикулы, которые отшнуровываются от ТГС и направляются к ранним эндосомам. Кислая среда эндосом ($\text{pH} \sim 5,5$) вызывает конформационные изменения в рецепторе, что приводит к диссоциации комплекса. Освободившийся про-катепсин попадает в лизосомы, а M6PR рециклирует обратно в ТГС. Следует отметить, что не весь пул про-катепсинов следует по этому пути. Однако описанный M6P-зависимый путь сортировки характерен не для всех катепсинов: для некоторых из них существуют альтернативные механизмы лизосомального таргетинга, включая взаимодействие с рецептором сортилин или LRP1, а также прямой секреторный путь.

1.1.4 Регуляция активности: pH-зависимость и эндогенные ингибиторы

Попадание в кислую среду эндолизосом ($\text{pH} 4,0\text{--}5,5$) служит триггером для активации про-катепсинов. Низкий pH вызывает протонирование ключевых аминокислотных остатков, что ослабляет электростатические и водородные связи, удерживающие про-пептид в активной щели фермента. Это приводит к конформационным изменениям, которые делают про-пептид доступным для протеолитического расщепления. Для большинства эндопептидаз (катепсины L, S, K, V) характерна аутокаталитическая активация. В отличие от них, экзопептидазы, такие как катепсины C и X, не способны к эффективному аутокатализу и требуют активации другими эндопептидазами, например, катепсинами L или S [49]. Важным модулятором активации являются гликозаминогликаны (GAG). Связываясь с про-катепсинами, GAG индуцируют конформационные изменения, облегчая удаление про-пептида и позволяя некоторым катепсинам (в частности, катепсину S) активироваться даже при нейтральном pH [50].

Уровень pH является одним из главных факторов, определяющих не только активацию, но и стабильность ферментов. Лизосомальная среда ($\text{pH} \sim 4,5$) является оптимумом для их функционирования. При выходе в цитозоль ($\text{pH} \sim 7,2$) или во внеклеточное пространство большинство катепсинов, таких как L, H и K, быстро денатурируют и теряют активность [51]. Однако существуют и исключения. Катепсин S сохраняет значительную активность в широком диапазоне pH (от 4,5 до 8,0), что позволяет ему функционировать в эндосомах, участвуя в процессинге антигенов. Катепсин B также демонстрирует относительную стабильность при нейтральном pH, с периодом полураспада около 15 минут, что объясняет его патологическую роль на клеточной поверхности опухолевых клеток и во

внеклеточном матриксе [52]. Помимо pH, активность катепсинов регулируется эндогенными ингибиторами, главным образом цистатинами, которые обратимо блокируют активный центр фермента. Дисбаланс между катепсинами и цистатинами часто наблюдается в опухолях и способствует инвазивному фенотипу.

1.1.5 Внутриклеточная локализация цистеиновых катепсинов

Долгое время протеолитические ферменты рассматривались исключительно в контексте их внеклеточных или цитоплазматических функций, связанных с деградацией внеклеточного матрикса и внутриклеточных белков. Вместе с тем за последние десятилетия получен значительный массив данных, указывающих на то, что многие протеиназы, в том числе цистеиновые катепсины, способны перемещаться в ядро и выполнять там регуляторные роли. Присутствие этих ферментов зарегистрировано в ядрах как нормальных [53], так и опухолевых клеток [27,54–58]. Подобные наблюдения заставляют пересмотреть традиционные взгляды на клеточную регуляцию и рассматривать ядерные протеиназы как самостоятельную группу внутриклеточных регуляторов. Их активность в ядре вовлечена в управление ключевыми процессами: генной транскрипцией, апоптозом, ответом на повреждения ДНК, а нарушения этой активности связывают с онкогенезом [59,60] и развитием устойчивости к терапии.

После попадания в ядерный компартмент катепсины получают возможность непосредственно взаимодействовать с хроматином, компонентами транскрипционной машины и элементами ядерного матрикса. Установлено, что катепсин L процессирует транскрипционный фактор CUX1, ускоряя тем самым вход клетки в S-фазу и стимулируя пролиферацию [9]. Вместе с катепсином D он расщепляет гистон H3, что сказывается на эпигенетической регуляции [61]. В звёздчатых клетках печени ядерный катепсин H разрушает гистондеацетилазу HDAC4, усиливая экспрессию матриксных металлопротеиназ и способствуя ремоделированию внеклеточного матрикса [62,63]. Катепсин B может проникать в ядро и деградировать белок репарации ДНК BRCA1, вызывая накопление повреждений ДНК и клеточную гибель [64]. Катепсин L в ядре участвует также в созревании транскрипционного фактора p53, модулируя апоптотический ответ [65].

Механизмы транслокации катепсинов в ядро многообразны и регулируются клеткой. Ведущий путь — классический импортин-зависимый транспорт: белок, содержащий сигнал ядерной локализации (NLS), распознаётся импортинами и активно переносится через ядерную пору. Наряду с этим функционируют шаперон-зависимые варианты доставки; так,

белки Snail (для катепсина L) и BAT3 (для катепсина D) [66], играют роль молекулярных переходников, предоставляя собственные NLS. Доказана и возможность ядерного импорта катепсинов как следствие лизосомальной мембранной пермеабилзации, при которой фермент сначала выходит в цитоплазму, а затем диффундирует в ядро [66].

Особый интерес представляет участие ядерных катепсинов в опухолевом процессе. Их накопление в ядрах раковых клеток нередко сопровождается более агрессивным течением заболевания. В клетках глиобластомы присутствует ядерный катепсин L, активность которого коррелирует с прогрессией опухоли и индукцией эпителиально-мезенхимального перехода через процессинг CUX1 [65]. Подавление активности ядерного катепсина L повышает чувствительность глиобластомных клеток к химио- и лучевой терапии [67].

Суммируя, цистеиновые катепсины не ограничиваются функционированием в лизосомах — в ядре они вовлечены в контроль транскрипции, клеточного цикла и программированной клеточной гибели. Изменённая ядерная локализация и аномальный процессинг катепсинов в опухолевых клетках могут выступать одним из механизмов, обуславливающих злокачественный потенциал новообразования и его ответ на терапевтические воздействия.

1.2 Роль цистеиновых катепсинов в онкогенезе

Роль цистеиновых катепсинов в патогенезе злокачественных новообразований прослеживается на всех ключевых этапах — от первичной клеточной трансформации до образования отдалённых метастатических очагов и формирования устойчивости к терапевтическим воздействиям. В данной главе рассмотрены две ключевые грани их участия в онкологическом процессе: (1) изменение экспрессии и процессинга при раке почки и других солидных опухолях и (2) функциональная роль в инвазии, метастазировании, ангиогенезе и формировании химиорезистентности.

1.2.1 Дисрегуляция экспрессии при раке почки и других типах опухолей

Почечно-клеточный рак (ПКР) характеризуется значительными изменениями в экспрессии и активности ряда протеолитических ферментов, среди которых цистеиновые катепсины занимают одно из центральных мест [68,69]. Анализ транскриптомных данных

Атласа ракового генома (TCGA), а также иммуногистохимические и ПЦР-исследования выявили, что при светлоклеточном ПКР (наиболее распространённом гистологическом подтипе) наблюдается гиперэкспрессия нескольких представителей семейства [70–73].

Катепсин S демонстрирует значительное повышение экспрессии на уровне мРНК и белка в тканях светлоклеточного ПКР, причём его высокий уровень обратно коррелирует с общей выживаемостью пациентов [72]. Уникальной особенностью катепсина S является сохранение протеолитической активности при нейтральном pH, что позволяет ему функционировать во внеклеточном пространстве и модулировать опухолевое микроокружение. Показано, что экспрессия катепсина S положительно коррелирует с инфильтрацией опухоли иммунными клетками и уровнями хемокинов, участвующих в рекрутинге лейкоцитов, что указывает на его роль в формировании иммуносупрессивного ландшафта ПКР.

Катепсин В также характеризуется достоверным повышением экспрессии в опухолевой ткани почки по сравнению с нормальной паренхимой, причём уровень его мРНК выше в злокачественных новообразованиях, чем в доброкачественных [73]. Установлена положительная корреляция между экспрессией катепсина В и его эндогенного ингибитора стафина А, что свидетельствует о координированной регуляции протеолитического баланса в опухоли.

В отличие от перечисленных выше, катепсин F при светлоклеточном ПКР демонстрирует значительное снижение экспрессии, что коррелирует с плохой выживаемостью пациентов [74]. Функциональные исследования показали, что сверхэкспрессия катепсина F в клеточных линиях ПКР подавляет пролиферацию и миграцию, что позволяет рассматривать его как потенциальный опухолевый супрессор.

Катепсин К, напротив, практически не экспрессируется в большинстве типов ПКР (светлоклеточном, папиллярном, хромофобном), за исключением редких случаев транслокационного рака почки семейства MTF/TFE, где он служит важным диагностическим маркером [75,76].

Данные об экспрессии катепсина D при ПКР рисуют неоднозначную картину. В опухолевой ткани его содержание повышено по сравнению с нормальной почечной паренхимой [77]. Вопреки ожиданиям, высокая тканевая экспрессия этого фермента коррелировала с более благоприятным прогнозом, что позволяет обсуждать её как маркер степени дифференцировки. Противоположная ситуация прослеживается при анализе мочи больных ПКР: возрастание концентрации зрелой формы катепсина D выступает предиктором неблагоприятного течения, сопряжённым со снижением показателей общей и безрецидивной выживаемости [78]. Уровень катепсина D в моче коррелировал с саркоматоидной

дифференцировкой, метастатическим поражением лимфатических узлов и наличием отдалённых метастазов. Противоречие результатов, полученных на тканевом и мочевом материале, может отражать различия в биологических функциях внутриклеточной и секретируемой форм белка, а также особенности гликоформирования и регуляции, что лишний раз указывает на сложный, контекстно-зависимый характер вовлечения катепсина D в патогенез ПКР.

Таким образом, при раке почки отмечаются разнонаправленные сдвиги экспрессии нескольких представителей семейства катепсинов: растёт уровень катепсинов S, B и D и снижается экспрессия катепсина F. Подобные наблюдения свидетельствуют о том, что катепсины могут служить не только прогностическими маркёрами, но и перспективными терапевтическими мишенями.

1.2.2 Участие цистеиновых катепсинов в ключевых процессах канцерогенеза

Дисрегуляция активности катепсинов, обусловленная их гиперэкспрессией, изменением внутриклеточной локализации или снижением уровня эндогенных ингибиторов (цистатинов), вносит вклад в реализацию ключевых этапов опухолевой прогрессии: инвазию, метастазирование, ангиогенез и эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП).

Основным механизмом, посредством которого катепсины способствуют инвазии, является деградация компонентов внеклеточного матрикса (ВКМ). Катепсины B, L, K и S эффективно гидролизуют фибронектин, ламинины, протеогликаны и несколько типов коллагена, разрушая физические барьеры и облегчая миграцию опухолевых клеток [25,79]. Помимо прямой деградации ВКМ, катепсины регулируют клеточную адгезию: катепсины B, L и S способны расщеплять E-кадгерин, что ослабляет межклеточные контакты и способствует приобретению инвазивного фенотипа [80].

Важную роль играет субклеточная локализация катепсинов. Катепсин B обнаруживается на поверхности инвазивных опухолевых клеток в составе инвадоподий, где он ассоциирован с аннексином A2 и кавеолином-1 и участвует в активации каскада плазминоген-плазмин, усиливая протеолиз [81,82]. Катепсин L также вносит значительный вклад в инвазивный потенциал, а его уровень обратно коррелирует с выживаемостью пациентов с меланомой [83].

Особого внимания заслуживает роль катепсинов, экспрессируемых клетками микроокружения опухоли. Опухоль-ассоциированные макрофаги (TAMs) и эндотелиальные

клетки являются значительными источниками катепсина S, который, как было показано, критически важен для ангиогенеза — процесса формирования новых кровеносных сосудов, снабжающих опухоль питательными веществами [84]. Недавние исследования выявили специфическую функцию катепсина S в метастазировании рака молочной железы в головной мозг. Было продемонстрировано, что катепсин S, продуцируемый как опухолевыми, так и стромальными клетками, облегчает прохождение через гемато-энцефалический барьер путем протеолитического расщепления молекулы JAM-B [85]. Уникальный механизм действия характерен для катепсина X, который проявляет строгую карбоксипептидазную активность. Показано, что его вклад в опухолевую прогрессию может быть в значительной степени независим от каталитической активности. Вместо этого, RGD-мотив в его пропептиде позволяет прокатепсину X взаимодействовать с интегрином $\alpha\beta 3$, стимулируя интегриновые сигнальные пути и усиливая миграцию Т-лимфоцитов и опухолевых клеток [86].

1.2.3 Роль катепсинов в ответе на химио- и радиотерапию

Исследования последних десятилетий решительно отводят лизосоме роль не просто терминальной станции внутриклеточной деградации, но активного регуляторного центра, интегрирующего сигналы генотоксического и протеотоксического стресса, индуцируемого цитостатиками. Цистеиновые катепсины, будучи наиболее многочисленной группой лизосомальных гидролаз, в этой парадигме занимают положение ключевых модуляторов, определяющих, пойдёт ли клеточная судьба по пути адаптивного выживания или запрограммированной гибели. Их дуалистическая природа проявляется особенно отчётливо при анализе ответа опухолевой клетки на терапевтические воздействия: умеренная, контролируемая активация протеиназ поддерживает аутофагический клиренс повреждённых органелл и репаративные процессы, тогда как массивный выброс катепсинов в цитозоль вследствие пермеабилзации лизосомальной мембраны (lysosomal membrane permeabilization, ПЛМ) инициирует апоптоз, а также лизосом-зависимую клеточную гибель (lysosome-dependent cell death, ЛЗКГ). Таким образом, химиотерапевтические агенты, вне зависимости от их первичной молекулярной мишени, неизбежно вовлекают лизосомально-катепсиновую систему в орбиту своего действия, и именно соотношение между протеолитической нагрузкой и буферной ёмкостью эндогенных ингибиторов (цистатинов, стефинов) определяет конечный вектор клеточного ответа.

Цитостатики различных классов закономерно вызывают глубокую перестройку транскриптома опухолевой клетки, и гены цистеиновых катепсинов неизменно оказываются

в числе наиболее отзывчивых на это воздействие. Механизмы, лежащие в основе такой индукции, многогранны и, как правило, опосредованы классическими стресс-киназными каскадами и окислительным стрессом. Цитостатики так же способны индуцировать экспрессию катепсинов В, S и L [87–89]. Показательно, что облучение γ -лучами индуцирует дозозависимое увеличение экспрессии катепсина S на уровне мРНК и белка в клетках рака молочной железы человека. Этот процесс опосредован реактивными формами кислорода (АФК) и интерфероном- γ , которые активируют интерферон-регуляторный фактор-1 (IRF-1), непосредственно связывающийся с промотором гена CTSS [88]. Высокая экспрессия катепсина S ассоциирована с повышенной клоногенной выживаемостью клеток после облучения, в то время как его нокдаун значимо сенсibiliзирует опухоль к радиации. Сходная логика прослеживается и в клетках глиобластомы человека, где радиационно-индуцированный подъём уровня катепсина В обеспечивает протективный эффект, а siRNA-опосредованное подавление этого фермента усиливает апоптоз [8].

Не менее выраженная транскрипционная активация наблюдается и при действии классических химиопрепаратов. Доксорубицин способен стимулировать экспрессию катепсина В в широком спектре карцином через NF- κ B-зависимые механизмы [89]. Эта транскрипционная активация, по-видимому, отражает не только попытку клетки справиться с накоплением повреждённых макромолекул, но и инициацию про-выживательной аутофагии, в которой катепсины играют незаменимую роль эффекторов терминальной деградации.

Помимо количественного увеличения пула ферментов, цитостатики вызывают качественные изменения в жизни катепсинов — их посттрансляционную модификацию и, что принципиально важно, перераспределение из лизосомального компартмента в цитозоль и ядро. Подъём уровня АФК, сопровождающий действие большинства генотоксических агентов, способствует окислению липидов лизосомальной мембраны и индукции частичной, сублетальной ПЛМ, достаточной для выхода небольшого количества протеиназ. Оказавшись в цитозоле, катепсины способны протеолитически активировать про-апоптотический белок Bid, запуская митохондриальный путь апоптоза, либо, напротив, деградировать ключевые репарационные факторы [90]. Ещё более утончённым механизмом следует признать ядерную транслокацию катепсина L, где он осуществляет ограниченный протеолиз гистонов и транскрипционных факторов, влияя на экспрессию генов, контролирующих клеточный цикл и дифференцировку [9]. Подобная мультилокусная активность делает катепсины не просто исполнителями деградации, но прямыми модуляторами сигнальных путей, определяющих чувствительность к терапии.

Концепция фармакологического подавления протеолитической активности катепсинов как способа хемосенсибилизации прошла значительную эволюцию — от природных ингибиторов (цистатинов, стефинов) до низкомолекулярных синтетических соединений. Ранние ингибиторы широкого спектра, такие как E-64, позволили установить принципиальную возможность снижения инвазивного потенциала и усиления апоптоза, однако их клиническое применение было ограничено отсутствием селективности. Более избирательные агенты, например, одалисиб (MIV-701), нацеленный на катепсин K, или селективные ингибиторы катепсина S, продемонстрировали обнадеживающие результаты в доклинических моделях [91,92]. Однако ключевая проблема, выявившаяся в ходе этих исследований, заключается в поразительной пластичности протеолитической сети опухолевой клетки: компенсаторная активация других гидролаз (катепсина D, калпаинов, протеасомы) быстро нивелирует эффект монотерапии ингибиторами.

Тем не менее, стратегия комбинирования ингибиторов катепсинов с цитостатиками сохраняет свою актуальность. Весьма показательна работа, в которой комбинация доксорубицина с ингибитором катепсина L индуцировала преждевременное старение в лекарственно-устойчивых линиях раковых клеток [87]. В последующих исследованиях было продемонстрировано, что селективное ингибирование катепсина L стабилизирует и повышает внутриклеточную доступность широкого круга мишеней цитостатиков — от рецептора эстрогена- α и Bcr-Abl до топоизомеразы-II α и гистондеацетилазы 1, что позволило преодолеть резистентность к тамоксифену, этопозиду и иматинибу [67]. Генетическая потеря опухолевого супрессора BRCA1 в клетках рака молочной железы приводит к тому, что катепсин L-опосредованная деградация белка 53BP1, ключевого фактора репарации ДНК, приобретает критическое значение. Стабилизация 53BP1 путём ингибирования катепсина L (E64 или витамин D) усиливает геномную нестабильность и чувствительность клеток к генотоксичным агентам [10]. Эти данные отчётливо иллюстрируют, что хемосенсибилизирующий потенциал ингибиторов катепсинов реализуется не только на уровне самой опухолевой клетки, но и через воздействие на её микроокружение: опухоле-ассоциированные макрофаги, поставляя катепсины во внеклеточное пространство, создают хемопротективную нишу, и ингибирование этих протеиназ нивелирует данный паракринный эффект.

Альтернативная стратегия исходит из представления о лизосоме как о критически уязвимом компартменте опухолевой клетки, особенно в условиях повышенного базального уровня АФК и изменённого липидного метаболизма. Лизосомотропные агенты, накапливающиеся в кислой среде органелл, способны напрямую индуцировать ПЛМ и последующую катепсин-опосредованную гибель, минуя классические апоптотические

каскады. К таким соединениям относятся сирамезин, производные хлорохина, а также фотосенсибилизаторы, применяемые в фотодинамической терапии [93]. Показательно, что лизосомотропные агенты часто проявляют синергизм с цитостатиками, в частности с доксорубицином и цисплатином, поскольку последние дополнительно повышают проницаемость лизосомальных мембран, тем самым снижая порог индукции ЛЗКГ.

Феномен лизосомальной секвестрации лекарственных препаратов представляет собой один из наиболее изящных и одновременно трудно преодолимых механизмов химиорезистентности. Многие противоопухолевые агенты, являясь слабыми основаниями (доксорубицин, митоксантрон, ингибиторы тирозинкиназ), пассивно накапливаются в кислой среде лизосом, где протонируются и теряют способность достигать своих молекулярных мишеней. В этих компартментах они могут подвергаться прямой протеолитической деградации катепсинами или прочно связываться с мембранными структурами, что ведёт к многократному снижению эффективной концентрации препарата в цитозоле и ядре [94,95]. Парадокс заключается в том, что для преодоления этого типа резистентности необходимо одновременно ингибировать катепсины (чтобы предотвратить деградацию препарата) и, напротив, активировать их (чтобы индуцировать ЛЗКГ). Разрешение этой диалектической коллизии видится в использовании «умных» систем доставки, высвобождающих активное вещество непосредственно в цитозоле после захвата в лизосомы, либо в применении пролекарств, активируемых исключительно опухоль-специфичными катепсинами.

Камптотецин (СРТ) и его полусинтетические аналоги (топотекан, иринотекан) занимают особое место в арсенале ингибиторов топоизомеразы I. Их уникальный механизм действия — стабилизация ковалентного комплекса «фермент-ДНК» и генерация двунитевых разрывов при столкновении с репликативной вилкой [96] — делает их принципиально отличными от большинства цитостатиков, часто неэффективных при ПКР. Известно, что светлоклеточная карцинома почки характеризуется высокой конститутивной экспрессией белков множественной лекарственной устойчивости (Р-гликопротеина и MRP), что лежит в основе её фенотипической химиорезистентности. Камптотецины же, будучи субстратами ABC-транспортёров лишь отчасти, в ряде случаев способны преодолевать этот барьер, что позволяет рассматривать их как перспективный класс соединений для терапии ПКР [97,98]. Более того, почка является органом с высоким фоновым уровнем экспрессии как цистеиновых катепсинов, так и их эндогенных ингибиторов — цистатинов, и этот тонкий баланс, нарушаемый при малигнизации, создаёт уникальный молекулярный контекст для взаимодействия «опухоль–препарат».

Роль цистеиновых катепсинов в определении чувствительности клеток ПКР к СРТ многослойна и неоднозначна [94,99]. Во-первых, СРТ является слабым основанием и

подвержен лизосомальной секвестрации: в резистентных клеточных линиях наблюдается увеличение объёма и ацидификация лизосомального компартмента, что ведёт к накоплению препарата в этих органеллах и снижению его ядерной доступности [94,100–102]. Во-вторых, камптотецин индуцирует цитопротективную аутофагию, которая позволяет клеткам временно выживать в условиях репликативного стресса, и катепсины В и L, как ключевые участники терминальных стадий аутофагического потока, обеспечивают деградацию повреждённых митохондрий и поддержание энергетического гомеостаза [99,103]. Показательно, что ингибирование катепсинов с помощью E-64d в обработанных камптотецином клетках MCF-7 усиливает накопление аутолизосом и сдвигает баланс в сторону апоптотической гибели [12]. В-третьих, повышенная цитозольная активность катепсинов в резистентных к СРТ клетках может приводить к преждевременной протеолитической деградации про-апоптотических факторов, таких как Bid и каспазы, до того как они будут полностью активированы сигналами от повреждённой ДНК [104,105].

Эти обстоятельства диктуют необходимость комбинированного воздействия. Фармакологическое ингибирование цистеиновых катепсинов (CA-074Me, E-64d) действительно усиливает цитотоксический эффект камптотецина в различных клеточных моделях [12,99]. Более радикальный подход — использование лизосомотропных агентов (сирамезин, гидроксихлорохин), которые вызывают управляемую ПЛМ и переводят клетки от цитопротективной аутофагии к лизосомально-опосредованной гибели, тем самым потенцируя действие СРТ [106,107]. Однако для ПКР, с его гетерогенностью и мощной системой антиоксидантной защиты, ключевое значение приобретает не просто ингибирование катепсинов, а контекстно-зависимая модуляция их активности. Идеальным инструментом здесь могут стать «умные» наносистемы, чувствительные к протеолитическому расщеплению катепсинами. Конъюгация камптотецина с полимерным носителем через катепсин-расщепляемый линкер позволит, с одной стороны, защитить препарат от гидролиза и секвестрации, а с другой — обеспечить его целенаправленное высвобождение именно в том внутриклеточном компартменте, где избыточно экспрессированы протеиназы, т.е. в лизосомах и цитозоле опухолевой клетки. Таким образом, уникальный профиль экспрессии катепсинов при светлоклеточном раке почки из проблемы резистентности превращается в терапевтическую возможность для направленной доставки и активации камптотецина.

Представленные результаты указывают на то, что цистеиновые катепсины активно вовлечены в ответ опухолевых клеток на химио- и радиотерапию, а не просто сопровождают индуцированную клеточную гибель. Их вклад в терапевтический исход двойствен: катепсины участвуют в репарации, аутофагии и формировании резистентности, но

одновременно способны запускать ЛЗКГ и апоптоз. Отсюда вытекает практическая задача — научиться различать состояния, при которых эти протеиназы поддерживают выживание клеток или, напротив, способствуют их элиминации, и целенаправленно смещать равновесие в сторону запрограммированной гибели. В случае рака почки эта задача стоит особенно остро из-за невысокой эффективности стандартных терапевтических подходов и своеобразного протеолитического профиля опухолевой ткани. Камптотецин представляет собой подходящий объект для проверки гипотезы о перенаправлении активности катепсинов с про-резистентного на цитотоксический сценарий: его биологическое действие тесно сопряжено с состоянием лизосомально-катепсиновой системы, а структура молекулы удобна для направленных химических модификаций.

1.3 Роль цистеиновых катепсинов в регуляции типов клеточной гибели

1.3.1 Лизосом-зависимая клеточная гибель

Лизосомы — мембранные органеллы, выполняющие центральную роль в деградации макромолекул, регуляции внутриклеточного кальция и сигнальных путях, контролирующих клеточный метаболизм и стрессовые ответы. Одним из ключевых механизмов, посредством которого лизосомы участвуют в реализации клеточной гибели, является ПЛМ — процесс частичного или полного нарушения целостности лизосомальной мембраны [108,109]. ПЛМ приводит к высвобождению растворимого содержимого лизосом в цитозоль, в первую очередь — гидролитических ферментов семейства катепсинов. Это запускает ряд внутриклеточных каскадов, направленных на реализацию ЛЗКГ. В настоящее время ЛЗКГ признана самостоятельной, регулируемой формой клеточной гибели, имеющей существенное терапевтическое значение, особенно в контексте злокачественных новообразований [110].

Несмотря на выделение ЛЗКГ в отдельную категорию запрограммированной клеточной гибели, в литературе существует дискуссия относительно её самостоятельности. ПЛМ и высвобождение катепсинов обнаруживаются при большинстве регулируемых форм клеточной гибели, включая апоптоз, некроптоз, пироптоз, ферроптоз и другие. В связи с этим некоторые авторы рассматривают ЛЗКГ не как независимый путь, а как универсальный терминальный механизм, «рекрутируемый» различными программами гибели для окончательного разрушения клетки.

Инициация ЛЗКГ начинается с развития ПЛМ — события, которое может быть вызвано широким спектром стрессовых воздействий. Выделяют три основные категории индукторов ПЛМ: прямые лизосомотропные агенты [93], химиотерапевтические препараты, повреждающие ДНК и индуцирующие окислительный стресс [111–114], а также физико-химические воздействия.

Прямые лизосомотропные агенты накапливаются в лизосомах и нарушают их целостность за счёт осмотического дисбаланса, изменения pH или прямого повреждения мембраны. Наиболее часто используемым модельным индуктором ПЛМ является дипептидный эфир L-лейцил-L-лейцина метиловый эфир (LLOMe), который конденсируется в лизосомах, вызывая их осмотический разрыв [93]. Другим представителем этой группы является сирамезин — лизосомотропный препарат, нарушающий pH и стабильность лизосомальной мембраны независимо от каспазной активности [93]. Лизосомотропные слабые основания, такие как хлорохин и гидроксихлорохин, в высоких концентрациях также способны индуцировать ПЛМ и последующую гибель клеток [115].

Химиотерапевтические препараты индуцируют ПЛМ косвенно — через генерацию активных форм кислорода (АФК), повреждение ДНК и развитие стресса эндоплазматического ретикула. Антрациклины (доксорубин), платиновые производные (цисплатин) и ингибиторы топоизомеразы I (камптотецин) как было показано, вызывают ПЛМ в различных клеточных линиях [116,117]. Ингибиторы протеасом (бортезомиб) индуцируют ПЛМ через накопление убиквитинированных белков и агрегацию белков в лизосомах, что приводит к их повреждению [118].

Физико-химические подходы к индукции ПЛМ активно разрабатываются как перспективные терапевтические стратегии. Наночастицы с pH-чувствительным высвобождением, магнитные наночастицы и фотосенсибилизаторы позволяют контролируемо индуцировать ПЛМ в опухолевых клетках [119]. Использование магнитных полей для модуляции лизосом открывает возможности для пространственно-временного контроля ПЛМ и ЛЗКГ при лечении злокачественных новообразований.

В основе ПЛМ лежат сложные молекулярные механизмы, включающие окислительный стресс, активацию лизосомальных сфингомиелиназ, нарушение ионного гомеостаза и прямое повреждение липидного бислоя АФК. Злокачественная трансформация снижает стабильность лизосомальных мембран, что делает раковые клетки более чувствительными к ЛЗКГ по сравнению с нормальными клетками [120]. Эта особенность создаёт основу для избирательного терапевтического воздействия для применения индукторов ПЛМ в онкологии.

После выхода в цитозоль цистеиновые катепсины, в первую очередь катепсины В, L и S, запускают ряд протеолитических событий, которые делают клеточные повреждения необратимыми. Ключевые этапы этого каскада ЛЗКГ можно описать следующим образом.

В цитозоле мишенями катепсинов становятся многие белки: проапоптотический Bid превращается в активную усечённую форму tBid [118–120], разрушаются антиапоптотические представители семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1) [119], ингибиторы апоптоза семейства IAP, в частности XIAP [119], а также элементы цитоскелета. Расщепление Bid выступает главным узлом, связывающим ЛЗКГ с митохондриальной ветвью апоптоза: tBid перемещается на митохондрии, где активирует BAX и BAK, вызывая выход цитохрома c и последующую активацию каспазного каскада.

Катепсины способны повреждать митохондриальную мембрану и напрямую, расщепляя белки мембраны и способствуя высвобождению проапоптотических факторов (цитохром c, AIF, эндонуклеаза G). Такое повреждение реализуется как через описанный выше Bid-опосредованный механизм активации BAX/BAK, так и путём прямого протеолиза митохондриальных белков [121].

В зависимости от контекста (активность каспаз, редокс-статус, наличие специфических субстратов) ЛЗКГ может реализовываться через апоптоз, некроптоз, пироптоз или аутофагическую гибель. При сохранённой активности каспаз доминирует апоптоз; при блокаде каспаз происходит переключение на некроптоз; при наличии газдерминов D или E может развиваться пироптоз. Таким образом, ЛЗКГ представляет собой гибкую, контекст-зависимую систему, адаптирующуюся к внутриклеточным условиям.

Цистеиновые катепсины являются ключевыми эффекторами ЛЗКГ. Доказательства их центральной роли получены с использованием фармакологических ингибиторов и генетических моделей. Фармакологическая блокада активности катепсинов (например, пан-цистеиновым ингибитором E64d или селективным ингибитором катепсина В CA-074-Me) подавляет ЛЗКГ, а стабилизация лизосомальной мембраны предотвращает высвобождение катепсинов и блокирует гибель [122]. Генетический нокаут генов, кодирующих катепсины, также снижает чувствительность клеток к ПЛМ-индуцирующим агентам.

Катепсин В является основным эффектором ЛЗКГ в большинстве клеточных моделей. Он обладает высокой стабильностью при физиологических значениях pH и способен эффективно расщеплять Bid — ключевой субстрат, связывающий лизосомальный и митохондриальный пути гибели [123,124]. Ингибирование катепсина В с помощью CA-074-Me эффективно блокирует ЛЗКГ, индуцированную различными стимулами, включая LLOMe и некоторые химиотерапевтические препараты [125]. Более того, катепсин В способен непосредственно расщеплять и инактивировать антиапоптотические белки (Bcl-2, Bcl-xL),

усиливая проапоптотический сигнал [104]. Катепсин L играет компенсаторную или контекст-зависимую роль. В клетках с дефицитом катепсина В может наблюдаться компенсаторная активация катепсина L [126], который также способен расщеплять Bid, хотя и с меньшей эффективностью [105]. Катепсин L особенно важен в условиях, когда требуется расщепление белков семейства IAP (XIAP) или деградация компонентов аутофагического аппарата [104].

Накопленные экспериментальные данные свидетельствуют, что лизосомальный апоптоз реализуется и при нефункциональном p53 — обстоятельство, важное для лечения опухолей с мутациями этого гена (свыше 50% злокачественных новообразований) [127]. Индукция ЛЗКГ также привлекает внимание как инструмент преодоления множественной лекарственной устойчивости: опухолевые клетки с дефектными путями апоптоза — гиперэкспрессией Bcl-2 или мутациями каспаз — не утрачивают чувствительности к агентам, вызывающим пермеабиллизацию лизосомальных мембран [106].

1.3.2 Апоптоз

Апоптоз — генетически запрограммированная форма клеточной гибели, играющая ключевую роль в поддержании тканевого гомеостаза и элиминации повреждённых клеток. В современной литературе принято выделять два основных сигнальных пути, ведущих к апоптозу: внешний (рецепторный) и внутренний (митохондриальный). Оба пути сходятся на активации каспаз — цистеиновых протеиназ, осуществляющих протеолитическую деградацию клеточных структур [128,129].

Морфологически апоптоз распознается по сморщиванию клетки, уплотнению хроматина (пикноз) с его последующей фрагментацией (кариорексис), инвагинации ядерной оболочки и образованию апоптотических телец; плазматическая мембрана на ранних этапах остаётся целой. В основе биохимических событий лежит каскад активации каспаз — семейства цистеиновых протеиназ, узнающих и разрезающих субстраты по остаткам аспарагиновой кислоты [110]. В ответ на сигнал к смерти инициаторные каспазы (каспаза-8, каспаза-9) переходят в активное состояние и, в свою очередь, процессируют эффекторные каспазы (каспаза-3, -6, -7). Именно эффекторные каспазы расщепляют множество клеточных мишеней: белки цитоскелета, ферменты репарации ДНК (PARP-1), ингибитор ДНКазы ICAD, — что в итоге приводит к характерным морфологическим сдвигам и олигонуклеосомной фрагментации ДНК.

Внешний путь запускается при взаимодействии внеклеточных лигандов (FasL, TNF- α , TRAIL) с рецепторами смерти на плазмалемме. Это ведёт к формированию DISC (death-inducing signaling complex; сигнальный комплекс, индуцирующий гибель) и последующей активации каспазы-8. Внутренний путь инициируется внутриклеточными стрессовыми стимулами — повреждением ДНК, окислительным стрессом, нарушениями кальциевого гомеостаза, — которые вызывают пермеабиллизацию внешней мембраны митохондрий (ПВММ). Вышедший в цитозоль цитохром с запускает сборку апоптосомы и активацию каспазы-9. Центральными регуляторами ПВММ выступают белки семейства Bcl-2, включая проапоптотические (Bax, Bak, Bid) и антиапоптотические (Bcl-2, Bcl-xL) члены [110].

В физиологических условиях протеолитическая активность цистеиновых катепсинов ограничена кислой средой лизосом (pH 4,5–5,0), где они выполняют функцию деградации макромолекул. Однако при воздействии различных стрессовых стимулов (окислительный стресс, повреждение ДНК, ряд химиопрепаратов) происходит нарушение целостности лизосомальной мембраны [108,109]. ПЛМ рассматривается как функциональный аналог ПВММ и является ключевым событием, запускающим участие катепсинов в апоптозе. Среди индукторов ПЛМ выделяют АФК [111,112]; сфинголипиды (церамид, сфингозин), накапливающиеся при стрессе [113,114]; а также некоторые лизосомотропные агенты (сирамезин, гидроксихлорохин, LLOMe) [93].

В результате ПЛМ содержимое лизосом, включая зрелые активные цистеиновые катепсины (главным образом В, L, Н), высвобождается в цитозоль. В отличие от каспаз, которые находятся в цитозоле в неактивной форме и требуют протеолитической активации, катепсины уже активны в момент высвобождения [123]. Хотя нейтральный pH цитозоля (~7,2) является субоптимальным для большинства катепсинов (за исключением катепсина S, сохраняющего активность в широком диапазоне pH), локальное подкисление вблизи места пермеабиллизации может временно поддерживать их активность.

Высвободившиеся катепсины могут участвовать в запуске апоптотических каскадов через несколько механизмов. Основным путём является расщепление про-апоптотического белка Bid с образованием его активной усечённой формы tBid [104,105,130]. tBid транслоцируется к митохондриям, где индуцирует ПВММ, высвобождение цитохрома с, формирование апоптосомы и активацию каспазы-9, которая затем активирует эффекторные каспазы-3 и -7. Помимо Bid, катепсины способны расщеплять антиапоптотические белки семейства Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1), приводя к их активации [104]. Кроме того, катепсины могут напрямую деградировать ингибитор апоптоза XIAP, способствуя каспазной активности [104]. В некоторых клеточных линиях описана так же прямая активация каспазы-

8 под действием катепсинов, в результате которой образуется активный фрагмент, способный в дальнейшем активировать каспазу-3 [131–133].

Частичная, селективная пермеабиллизация лизосомальной мембраны ведёт к высвобождению ограниченного количества катепсинов и запуску апоптоза, тогда как массивное и полное разрушение лизосом приводит к некрозу или некроптозу [134]. Эта дифференциальная чувствительность к ПЛМ в значительной степени определяет, будет ли клетка подвергаться апоптотической гибели или перейдет на альтернативные пути.

Каспазы и катепсины не являются изолированными участниками апоптоза; между ними существует сложная взаимная регуляция, которая может как усиливать апоптотический сигнал (за счёт положительных обратных связей), так и обеспечивать компенсаторные механизмы при фармакологической блокаде одного из путей. Особый интерес представляет феномен замещения действия каспаз катепсинами — когда при подавлении каспазной активности лизосомальные протеиназы могут самостоятельно запускать и реализовывать программу гибели, морфологически напоминающую апоптоз.

Активированные каспазы, в свою очередь, способны индуцировать ПЛМ. Показано, что каспаза-8, активированная в составе DISC, может вызывать лизосомальную пермеабиллизацию как напрямую, так и через образование tBid, который взаимодействует не только с митохондриями, но и с лизосомальными мембранами [135–137]. Данный механизм объясняет, почему ингибирование только одного компонента (каспаз или катепсинов) часто не способно полностью блокировать апоптоз: существует положительная обратная связь, где каспазы усиливают ПЛМ, а катепсины — дополнительно активируют каспазы (через Bid и XIAP).

Существование каспаз-независимых механизмов гибели, в которых эффекторную функцию каспаз берут на себя катепсины, подтверждается экспериментами с пан-каспазным ингибитором Z-VAD-FMK. Следует, однако, иметь в виду, что Z-VAD-FMK подавляет активность не только каспаз, но и ряда катепсинов (особенно катепсинов В и L), что осложняет интерпретацию получаемых результатов [138]. Несмотря на это, в присутствии данного ингибитора клеточная гибель во многих случаях переключается на альтернативные пути, реализуемые именно катепсинами, которые могут демонстрировать частичную устойчивость к Z-VAD-FMK [139,140]. Показано, что в ряде моделей только одновременное ингибирование каспаз и катепсинов — например, комбинацией Z-VAD-FMK с ингибитором катепсина В CA-074Me — полностью блокирует апоптотическую гибель [104,105]. Это прямо указывает на способность катепсинов в отсутствие функциональных каспаз самостоятельно инициировать и доводить до конца процесс, завершающийся клеточной гибелью с признаками апоптоза.

Полученные данные важны для разработки стратегий преодоления резистентности опухолевых клеток к апоптозу. Поскольку для опухолевых клеток нередко характерны повышенная экспрессия катепсинов и нарушенная регуляция апоптотических путей, комбинированное ингибирование каспаз и катепсинов может служить инструментом для количественной оценки вклада каждого из этих путей в реализацию апоптоза, индуцированного конкретным химиопрепаратом. Кроме того, резистентность опухолевых клеток к классическим индукторам апоптоза может быть связана с тем, что они сохраняют способность к каспаз-независимой гибели, опосредованной лизосомальными катепсинами; этот момент необходимо учитывать при интерпретации экспериментов, в которых используется Z-VAD-FMK.

1.3.3 Аутофагия

Аутофагия представляет собой катаболический путь, сохранённый в эволюции, который направляет на лизосомальную деградацию повреждённые макромолекулы, белковые агрегаты и вышедшие из строя органеллы, обеспечивая тем самым рециклинг внутриклеточного материала. В норме этот процесс выполняет защитную функцию, помогая клетке перенести неблагоприятные условия — нехватку питательных веществ, гипоксию, окислительный стресс. Вместе с тем при определённых обстоятельствах избыточная или выходящая из-под контроля аутофагия способна приводить к гибели клетки, обозначаемой как аутофагическая клеточная смерть (autophagy-dependent cell death, ADCD). Ключевая роль в аутофагическом пути принадлежит лизосомам, так как именно они обеспечивают финальный этап расщепления содержимого аутофагосом. Взаимосвязь между АФК и катепсинами в этих сигнальных каскадах не сводится к простой цепочке «причина–следствие»: оба участника прямо и косвенно модулируют активность друг друга, формируя разветвлённую регуляторную сеть. [141].

Ключевым морфологическим событием аутофагии выступает образование двухмембранных везикул — аутофагосом, которые секвестрируют внутриклеточный груз: белки, липиды, целые органеллы. После слияния аутофагосом с лизосомами формируются аутофаголизосомы, и внутри них захваченный материал расщепляется гидролазами [142]. На электронно-микроскопическом уровне аутофагию идентифицируют именно по присутствию аутофагосом и аутофаголизосом. В биохимическом плане процесс характеризуют по нескольким показателям: липидированная форма LC3-II (её оценивают через отношение LC3-II/LC3-I либо по накоплению LC3-позитивных везикул), адаптерный белок p62/SQSTM1

(снижение его содержания отражает усиление аутофагического потока), а также компоненты молекулярной машинерии — Beclin-1 (ATG6) и белки ATG5, ATG7, ATG12, которые необходимы для элонгации и замыкания аутофагосомальной мембраны.

Механизм аутофагии разворачивается в несколько стадий. Начало процессу даёт диссоциация комплекса mTORC1 (при голодании или иных стрессовых воздействиях); следствием этого становится активация ULK1-комплекса (ULK1-ATG13-FIP200-ATG101). Далее комплекс Beclin-1/Vps34 (PI3K-III) синтезирует на мембране фагофора фосфатидилинозитол-3-фосфат (PI3P), который привлекает эффекторные белки. Удлинение и замыкание двухмембранной аутофагосомы обеспечиваются убиквитин-подобными системами конъюгации ATG12-ATG5-ATG16L1 и липидированием LC3-II. Завершающее событие — слияние аутофагосомы с лизосомой и образование аутофаголизосомы; внутри неё лизосомальные гидролазы, включая катепсины, осуществляют деградацию захваченного материала [143].

Лизосомы служат конечным компартментом аутофагического пути: при нарушении их работы аутофагический поток останавливается, в клетке накапливаются неразрушенные аутофагосомы и возникают вторичные функциональные расстройства. Непосредственное участие в деградации материала, попавшего в аутофаголизосомы, принимают лизосомальные катепсины, прежде всего B, D и L. Известно, что эти протеиназы расщепляют широкий круг белковых субстратов, поступающих в лизосомы по аутофагическому пути [144]. Подавление катепсинов B и L ведёт к накоплению неразрушенного материала в лизосомах и индуцирует гибель клеток нейробластомы [145]. Эксперименты на *Drosophila* показали, что отсутствие катепсина L сопровождается накоплением аномальных аутофагических везикул, вызванным блоком аутофагического потока; это подчёркивает значимость катепсинов для поддержания базального уровня аутофагии [146].

При выраженном стрессе, прежде всего окислительном, избыточная аутофагия может из протективного процесса превратиться в летальный: деградация критически важных клеточных компонентов достигает масштаба, несовместимого с жизнью. Такую гибель обозначают как ADCD; для неё характерны независимость от каспаз и активное участие лизосомальных катепсинов. По существу, ADCD — это запрограммированная клеточная смерть, вызванная гиперактивацией аутофагии, при которой разрушение материала в аутофаголизосомах переходит порог выживаемости клетки [143]. Возможность индуцировать ADCD как альтернативный путь гибели привлекает особое внимание в контексте апоптоз-резистентных форм рака и рассматривается как перспективное терапевтическое направление.

Аутофагия и апоптоз находятся в сложном взаимодействии. Аутофагия может действовать как защитный механизм, отсрочивая апоптоз: удаление повреждённых митохондрий (митофагия) ограничивает накопление проапоптотических сигналов. В то же время глубокое истощение клеточных ресурсов из-за чрезмерной аутофагии способно сенсibilизировать клетку к апоптозу. В ряде ситуаций индуцированная стрессом ПЛМ высвобождает катепсины, которые не только запускают апоптотический каскад, но и нарушают аутофагический поток, формируя петлю положительной обратной связи, ведущую к гибели клетки [141].

1.3.4 Другие типы регулируемой клеточной гибели

Помимо лизосом-зависимой клеточной гибели, апоптоза и аутофагии, в последние десятилетия был идентифицирован ряд альтернативных форм регулируемой клеточной гибели, которые играют важную роль в патогенезе различных заболеваний и представляют собой перспективные терапевтические мишени. Ниже рассматриваются некроптоз, пироптоз и ферроптоз — три формы регулируемого некроза, каждая из которых имеет отличительные молекулярные механизмы и морфологические признаки. Общей чертой этих процессов является активное участие лизосом и лизосомальных катепсинов в качестве эффекторных или регуляторных молекул.

Некроптоз представляет собой регулируемую форму некротической гибели клеток, которая активируется при блокировании апоптотического пути (например, при ингибировании каспаз) и играет важную роль в противовирусном иммунитете, воспалительных заболеваниях и патогенезе рака. Некроптоз опосредован белками RIPK1, RIPK3 и MLKL [147]. В отличие от апоптоза, некроптоз протекает с разрывом плазматической мембраны и высвобождением внутриклеточного содержимого, что вызывает воспалительную реакцию. Морфологически некроптоз характеризуется набуханием клетки (oncosis), просветлением цитоплазмы, разрывом плазматической мембраны и выходом внутриклеточного содержимого в межклеточное пространство; при этом отсутствует характерная для апоптоза конденсация хроматина или формирование апоптотических телец. Ключевыми биохимическими маркерами служат фосфорилирование RIPK1, RIPK3 и MLKL, олигомеризация и транслокация MLKL к плазматической мембране, высвобождение LDH, а также ингибирование процесса специфическими ингибиторами Nec-1 или Nec-1s.

Некроптоз инициируется связыванием лигандов с рецепторами смерти (например, TNF- α с TNFR1) в условиях, когда каспаза-8 инактивирована (фармакологически или в

результате вирусной инфекции). В отсутствие активной каспазы-8 RIPK1 рекрутирует и активирует RIPK3, формируя некрсому (комплекс IIb). RIPK3 фосфорилирует MLKL, вызывая его олигомеризацию и транслокацию к плазматической мембране, где олигомеры MLKL формируют поры, что приводит к осмотическому набуханию и лизису клетки [110].

Лизосомальный компартмент играет многоуровневую роль в некроптозе, участвуя как в регуляции активности белков некроптоза, так и в эффекторной фазе процесса [148]. Ключевым открытием последних лет является то, что активированный MLKL транслоцируется к лизосомальной мембране, где его полимеризация индуцирует ПЛМ. Это приводит к быстрому высвобождению катепсинов (главным образом катепсина В и D) в цитозоль. Высвободившиеся катепсины проявляют гидролитическую активность, взаимодействуют с цитозольными сигнальными белками, постепенно деградируют определённые клеточные компоненты, усиливают ПЛМ, индуцируют пермеабиллизацию митохондриальной и плазматической мембран и, в конечном счёте, вызывают гибель клеток [148,149]. Химическое ингибирование или нокдаун катепсина В защищает клетки от некроптоза. Кроме того, активация MLKL приводит к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} , что активирует Ca^{2+} -зависимые ферменты (включая кальпаины и фосфолипазы), которые, в свою очередь, вызывают ПЛМ с последующим высвобождением катепсинов [150]. Помимо эффекторной роли в ПЛМ, лизосомы участвуют в регуляции уровня белков некроптоза: убиквитинированные RIPK1/RIPK3 колокализуются с лизосомами совместно с SNIP и деградируют в лизосом-зависимом пути, что служит значимым механизмом, ограничивающим некроптотический сигнал [151]. Поскольку некроптоз активируется при блокировании апоптоза, а лизосомальные катепсины являются его ключевыми эффекторами, индукция некроптоза представляет собой перспективную стратегию для элиминации опухолевых клеток, которые приобрели устойчивость к апоптозу.

Пироптоз — это провоспалительная форма регулируемой клеточной гибели, опосредованная формированием пор газдерминами (прежде всего газдермином D, GSDMD) [152]. Пироптоз играет ключевую роль в иммунном ответе на внутриклеточные патогены и ассоциирован с широким спектром воспалительных заболеваний, включая системные воспалительные синдромы, сепсис и аутоиммунные заболевания. Морфологически пироптоз характеризуется набуханием клетки, образованием пузырей на плазматической мембране, выходом провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-18 и последующим лизисом клетки. В отличие от апоптоза, при пироптозе ядро остаётся интактным (кариопикноз нехарактерен), но формирование пор GSDMD приводит к потере мембранного потенциала и осмотическому набуханию. Пироптоз протекает значительно быстрее апоптоза и сопровождается выраженной воспалительной реакцией. Ключевыми биохимическими маркерами служат

активация каспазы-1 (в классическом пути) или каспаз-4/5/11 (в неклассическом пути), расщепление GSDMD с образованием N-концевого фрагмента GSDMD-N, секреция IL-1 β и IL-18, а также активация NLRP3 инфламмасы.

Пироптоз инициируется распознаванием патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs) или опасность-ассоциированных молекулярных паттернов (DAMPs) цитозольными сенсорами, такими как NLRP3. Активация NLRP3 приводит к сборке инфламмасы — мультипротеинового комплекса, включающего NLRP3, адаптерный белок ASC и прокаспазу-1. В составе инфламмасы прокаспаса-1 активируется путём протеолитического расщепления. Активная каспаза-1 затем расщепляет два ключевых субстрата: GSDMD, генерируя его N-концевой фрагмент GSDMD-N, который олигомеризуется и формирует поры в плазматической мембране, а также про-IL-1 β и про-IL-18, превращая их в зрелые провоспалительные цитокины, которые высвобождаются через поры GSDMD [153].

Ключевым звеном, связывающим лизосомальный стресс с пироптозом, является катепсин В. Общими путями активации NLRP3 инфламмасы являются выброс калия, генерация митохондриальных АФК и лизосомальная дестабилизация с выходом катепсина В. Высвобождаемый из лизосом катепсин В рассматривается как один из ключевых активаторов NLRP3 инфламмасы, что служит связующим звеном между лизосомальным повреждением и провоспалительной гибелью клеток. На модели вирусного миокардита показано, что катепсин В значительно активируется в сердце; генетическое удаление катепсина В улучшало выживаемость, уменьшало воспаление и снижало уровень сердечного тропонина I, тогда как дефицит цистатина С (эндогенного ингибитора катепсина В) усиливал тяжесть заболевания. Механистически катепсин В влияет на вирусный миокардит через активацию NLRP3 инфламмасы и каспаза-1-опосредованный пироптоз [154]. Описана ось катепсин В/NLRP3/GSDMD, опосредующая пироптоз макрофагов и способствующая воспалению и фиброзу при системной склеродермии. В отличие от некроза, индуцированного полным разрушением лизосом, активация инфламмасы связана с более контролируемым механизмом, включающим частичную ПЛМ. Различие между этими путями определяется степенью лизосомального повреждения: массивное разрушение лизосом ведёт к некрозу, тогда как частичная пермеабилзация ассоциирована с инфламмасомной активацией [155]

Ферроптоз — это железо-зависимая форма регулируемого некроза, характеризующаяся накоплением продуктов перекисного окисления (липидной пероксидацией) и инактивацией глутатион-зависимой антиоксидантной защиты [156]. Ферроптоз вовлечён в патогенез нейродегенеративных расстройств (болезнь Паркинсона,

болезнь Альцгеймера), ишемически-реперфузионных повреждений, острых почечных повреждений и рака. Морфологически ферроптоз характеризуется уменьшением объёма митохондрий, конденсацией митохондриальной мембраны, потерей митохондриальных крист и разрывом внешней митохондриальной мембраны; при этом отсутствует конденсация хроматина, а ядро остаётся интактным. Ключевыми биохимическими маркерами служат инактивация GPX4, накопление Fe^{2+} , снижение уровня SLC7A11 (xCT), повышение уровня ACSL4, накопление продуктов липидной пероксидации (MDA, 4-HNE), а также защитный эффект ингибиторов ферроптоза (ферростатина-1, липрокстатина-1).

Ферроптоз инициируется при нарушении системы глутатион-зависимой антиоксидантной защиты, прежде всего при инактивации GPX4. GPX4 является единственным ферментом, способным восстанавливать липидные гидропероксиды до соответствующих спиртов, используя глутатион (GSH) в качестве кофактора. Синтез GSH зависит от системы Xc^- (цистин-глутаматный антипортер), состоящей из субъединиц SLC7A11 и SLC3A2. При ингибировании системы Xc^- (например, эрастином) или GPX4 (например, RSL3) происходит накопление липидных пероксидов, которые в присутствии ионов Fe^{2+} генерируют реактивные альдегиды, вызывающие необратимое повреждение мембран и гибель клеток [110].

В работе Nagakannan et al. (2021) с использованием фармакологических и генетических моделей ферроптоза было впервые продемонстрировано, что при ферроптозе происходит ПЛМ и цитоплазматический выход катепсина В, что приводит к структурным и функциональным изменениям митохондрий, а также ранее не описанному расщеплению гистона H3 [157]. Ингибирование катепсина В (фармакологическое или с помощью нокдауна) устойчиво восстанавливало целостность клеточной мембраны и предотвращало деградацию хроматина, причём эти защитные эффекты были независимы от GPX4. Первичные фибробласты с нокаутом катепсина В оставались нечувствительными к различным индукторам ферроптоза [157]. Помимо эффекторной роли катепсина В, лизосомы участвуют в регуляции внутриклеточного гомеостаза железа: лизосомы имеют наиболее высокую концентрацию активного каталитического Fe^{2+} среди всех органелл и способны высвобождать активное железо из ферритина в аутофагическом пути, называемом ферритинофагия, что может усугублять ферроптотический сигнал [158]. Важным открытием является транслокация катепсина В в ядро в процессе ферроптоза, где он расщепляет гистон H3, способствуя деградации хроматина [157]. В некоторых контекстах ферроптоз может опосредоваться через аутофагию (например, ферритинофагия), что создаёт дополнительные точки взаимной регуляции между лизосомами, катепсинами и железо-зависимой гибелью клеток.

Помимо апоптоза, аутофагии и некроза, в современной научной литературе накапливаются данные, свидетельствующие о вовлечении лизосомально-катепсинового аппарата в механизмы таких альтернативных форм регулируемой клеточной гибели (таблица 2).

При митотической катастрофе роль лизосом, как ни парадоксально, носит не патологический, а физиологический характер. Исследования, в частности работа Namalisto et al., 2020, демонстрируют, что в прометафазе происходит запрограммированная, строго контролируемая ПЛМ хроматин-ассоциированных лизосом, в результате которой активный катепсин В высвобождается в непосредственной близости от конденсирующихся хромосом [159]. Этот процесс необходим для расщепления небольшой фракции гистона H3, что, в свою очередь, обеспечивает точное расхождение хромосом в анафазе. Стабилизация лизосомальной мембраны или ингибирование катепсина В приводило к значительному увеличению дефектов сегрегации и появлению микроядер, в то время как клетки и ткани с нокаутом катепсина В и клетки, экспрессирующие устойчивую к катепсину В форму гистона H3, накапливали микронуклеацию и другие ядерные дефекты. Таким образом, в контексте митотической катастрофы временная ПЛМ, инициирующая высвобождение катепсинов, является не триггером смерти, а, напротив, важнейшим внутриклеточным механизмом, опосредующим корректную сегрегацию хроматина и поддержание геномной стабильности.

Нетоз — это уникальная форма запрограммированной гибели нейтрофилов, приводящая к выбросу в экстрацеллюлярное пространство деконденсированного хроматина, образующего ловушки для патогенов (NETs) [160]. В отличие от других типов гибели, при нетозе классической ПЛМ и тотального цитолиза не происходит. Вместо этого, специфический катепсин G, изначально локализованный в азурофильных гранулах, в процессе нетоза секретируется и ассоциируется с формирующимися NETs. В работе Clancy et al., 2017 было показано, что ассоциированный с NETs катепсин G, наряду с эластазой, сохраняет протеолитическую активность и играет роль в процессинге и активации провоспалительных цитокинов семейства интерлейкина-1, в частности IL-1 α и IL-36, выступая таким образом в качестве внеклеточного сигнального комплекса [161].

Энтоз представляет собой каспаз-независимый тип клеточной гибели, при котором одна живая клетка активно проникает внутрь другой, формируя внутриклеточную вакуоль. В статье Krishna et al., 2016 показано, что энтоз — это процесс, запускаемый сигналами соседних клеток, экспрессирующих E-кадгерин или α -катенин [162]. Внутренняя клетка затем подвергается фагоцитозу, и образующаяся фagosома сливается с лизосомой, что приводит к лизосомальной деградации интернализованной клетки. Ключевую роль здесь играет лизосомальная деградация, а не активация каспаз, что подтверждается окрашиванием

активного катепсина В, который высвобождается из лизосом и диффундирует по всей внутренней клетке. Это подчеркивает центральную роль лизосомального пути в гибели при энтозе.

Таблица 2. Взаимосвязь лизосом и катепсинов в клеточной гибели. ПЛМ – пермеабиллизация лизосомальной мембраны.

Тип клеточной гибели	Ключевые маркеры	Лизосомы	Участие лизосом или катепсинов	Ссылки
Апоптоз	Конденсация хроматина; формирование апоптотических телец; активация каспаз 3, 8, 9; расщепление PARP; фрагментация ДНК (TUNEL); окрашивание аннексином V/PI	ПЛМ	Расщепление Bid до tBid. Деграция антиапоптотических Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, XIAP. Прямая активация прокаспазы-8.	[90,104,124, 131–134,163]
Аутофагия	Накопление аутофагосом (LC3-II); изменение уровня p62; формирование двухмембранных везикул (TEM); гиперактивация аутофагического потока.	Сливаются с аутофагосомами	Катепсины (B, D, L) расщепляют содержимого аутофаголизосом. Расщепление GABARAP-II and LC3-II.	[142,144,164]
Некроптоз	Фосфорилирование RIPK1, RIPK3, MLKL; олигомеризация и транслокация MLKL к плазматической мембране; высвобождение LDH	ПЛМ	Расщепление RIPK1 и RIPK3.	[149,150]
Пироптоз	Активация каспазы-1/4/5/11; расщепление GSDMD (образование GSDMD-N); секреция IL-1 β и IL-18;	ПЛМ	Катепсин В активирует NLRP3.	[154]

	активация NLRP3 инфламмасомы			
Ферроптоз	Накопление Fe ²⁺ ; инактивация GPX4; снижение SLC7A11 (хСТ); повышение ACSL4; накопление MDA/4- HNE; митохондриальная конденсация	ПЛИМ	В цитоплазме катепсин В вызывает структурные изменения митохондрий. Катепсин В расщепляет гистон H3 в ядре.	[157]
Лизосом- зависимая клеточная гибель	ПЛИМ; высвобождение катепсинов в цитозоль; вакуолизация;	ПЛИМ	ПЛИМ приводит к высвобождению катепсинов (прежде всего В, L, D). Неконтролируемое расщепление множества внутриклеточных белков.	[134]
Нетоз	Высвобождение нейтрофильных внеклеточных ловушек (NETs); экспрессия нейтрофильной эластазы, миелопероксидазы, катепсина G.	Не вовлечена	Катепсин G является одним из ключевых компонентов NETs и участвует в их формировании. Процессинг цитокинов (IL- 1α, IL-36).	[161,165]

Представленный анализ литературных данных позволяет сформулировать ряд обобщений относительно универсальной роли лизосом и катепсинов в клеточной гибели. Традиционная концепция, рассматривавшая лизосомы лишь как деградирующие органеллы, ответственные за пассивный некроз, на сегодняшний день является устаревшей. Согласно накопленным сведениям, лизосомы представляют собой динамические и многофункциональные компартменты, активное участие которых прослеживается в ключевых этапах различных форм запрограммированной гибели, от точной регуляции апоптоза до эффекторной функции в альтернативных путях, таких как пироптоз и ферроптоз.

В эволюционном и функциональном контексте лизосомально-катепсиновый модуль выступает как своего рода универсальный эффекторный механизм. В зависимости от порога и характера стимула, реакция лизосом может быть градуированной и физиологической (в

митотической катастрофе), амплифицирующей (апоптоз, партанотоз) или терминальной (некроз). Это подтверждается обширными данными о том, что катепсины, в частности катепсин В, имеют более сотни потенциальных белковых субстратов, многие из которых являются ключевыми регуляторами жизнеспособности клеток. Протеолиз этих субстратов, например, активирующего апоптотический белок Bid или инактивирующего антиапоптотический белок Bcl-2, лежит в основе механизма, с помощью которого ПЛМ передает сигналы гибели из цитоплазмы в ядро.

Несмотря на значительный прогресс в понимании этих процессов, современная классификация клеточной гибели все еще имеет определенные пробелы. Остается не до конца ясным, являются ли некоторые недавно описанные типы гибели, такие как алкалиптоз, вызванный внутриклеточным защелачиванием, или дисульфидоз, связанный с накоплением дисульфидных связей в цитоскелете, независимыми путями или лишь фенотипическими вариантами уже известных механизмов. Для окончательного разрешения этих вопросов необходима разработка новых специфических фармакологических ингибиторов и более точных методов визуализации, позволяющих *in vivo* проследить судьбу отдельных катепсинов. Кроме того, не для всех катепсинов до сих пор идентифицированы их физиологические и патологические субстраты, что существенно затрудняет понимание всего спектра их биологических функций.

Тем не менее, терапевтический потенциал модуляции лизосомально-катепсиновой оси значителен. Парадоксальная, на первый взгляд, ситуация складывается в сфере противоопухолевой терапии: клетки, резистентные к классическому апоптозу вследствие дисфункции его эффекторных каскадов, нередко демонстрируют сохранную чувствительность к неканоническим механизмам гибели – ЛЗКГ, некроптозу либо пироптозу. Именно эта уязвимость формирует концептуальный базис для разработки агентов, направленно воздействующих на лизосомальную мембрану (например, лизосомотропных соединений), причем ингибирование каспаз в подобных комбинациях позволяет элиминировать провыживательные сигналы, которые в противном случае могли бы нивелировать терапевтический эффект.

Однако в ином патогенетическом контексте – при воспалительных и нейродегенеративных процессах, где доминирует гиперпродукция апоптотических или пироптотических стимулов – акцент смещается в сторону супрессии конкретных эффекторных протеиназ. В этом ряду катепсин В заслуживает особого внимания как мишень, чья клиническая значимость подтверждается данными о его ключевой роли в запуске каскадов, усугубляющих тканевую деструкцию.

Таким образом, углубленное изучение регуляторных взаимодействий в лизосомально-катепсиновой сети выходит за рамки сугубо фундаментальной проблемы – оно приобретает отчетливо выраженное прикладное измерение. Детальная расшифровка этих сигнальных перекрестков не только обогатит существующие теоретические модели клеточной смерти, но и предоставит рациональные ориентиры для конструирования принципиально новых терапевтических подходов, адресованных широкому кругу социально значимых заболеваний – от злокачественных новообразований до нейродегенеративных расстройств.

1.4 «Умные» системы доставки лекарственных средств

В предыдущих главах было показано, что цистеиновые катепсины выступают в качестве значимых модуляторов клеточного ответа на воздействие стандартных химиотерапевтических агентов, участвуя в регуляции сигнальных каскадов гибели опухолевых клеток. Вместе с тем, сколь бы эффективной ни признавалась классическая цитостатическая терапия в клинической онкологии, её применение наталкивается на ряд принципиальных, трудно преодолимых барьеров. К их числу относятся, во-первых, недостаточная избирательность действия, во-вторых, системная токсичность, нередко лимитирующая длительность курсов, в-третьих, низкая биодоступность, обусловленная плохой растворимостью многих препаратов, и, наконец, стремительное формирование вторичной резистентности. Совокупность перечисленных факторов не только препятствует адекватной эскалации доз, но и закономерно ухудшает качество жизни пациентов, что подтверждено данными [166]. Данное обстоятельство стимулирует поиск принципиально иных терапевтических платформ, и одной из наиболее перспективных стала концепция наномедицины — использование наноразмерных носителей для адресной доставки противоопухолевых агентов.

Среди них особое место занимает наномедицина, а именно разработка наноразмерных транспортных систем, позволяющих осуществлять направленную доставку цитотоксических соединений непосредственно в опухолевый окружение. В противоположность свободным формам лекарств, которые после введения распределяются относительно равномерно по всем тканям и органам, наноносители – будь то липидные, полимерные, мембранные, белковые либо неорганические частицы – обеспечивают принципиально иной фармакокинетический сценарий. Они способны аккумулироваться в патологическом очаге, существенно повышая локальную концентрацию инкапсулированного агента и тем самым видоизменяя как терапевтический индекс, так и профиль побочных эффектов [167].

Преимущества таких систем включают повышение растворимости гидрофобных препаратов, защиту лекарства от преждевременной деградации, увеличение времени циркуляции в кровотоке и возможность реализации контролируемого высвобождения [168]. Ключевую роль в пассивном накоплении наночастиц в опухоли традиционно отводят эффекту повышенной проницаемости и удержания (enhanced permeability and retention — EPR), обусловленному высокой проницаемостью опухолевых сосудов и ослабленным лимфатическим оттоком [169]. Однако, универсальность EPR-эффекта в последние годы подвергается критике из-за значительной гетерогенности сосудистой архитектуры у разных пациентов и типов новообразований [170]. Для дополнительного увеличения времени циркуляции и снижения захвата частиц клетками моноклеарной фагоцитарной системы поверхность носителей часто модифицируют полиэтиленгликолем (ПЭГ) [171].

Однако пассивное накопление в опухоли — лишь первый этап. Чтобы реализовать свой терапевтический потенциал, наночастица должна проникнуть внутрь клетки-мишени и доставить груз в нужный внутриклеточный компартмент. Именно на этом этапе судьба нанопрепарата тесно переплетается с эндоцитозным аппаратом клетки и, как будет показано далее, с цистеиновыми катепсинами.

В отличие от низкомолекулярных химиопрепаратов, которые часто проникают в клетку путем пассивной диффузии через плазматическую мембрану, наноразмерные объекты размером от десятков до сотен нанометров преимущественно интернализуются посредством эндоцитоза. Среди множества эндоцитарных путей (клатрин-опосредованный эндоцитоз, кавеолин-зависимый эндоцитоз, макропиноцитоз, CLIC/GEEC-пути) для большинства типов наночастиц доминирующим является клатрин-опосредованный механизм [172]. После связывания с поверхностью клетки и образования клатриновой ямки частица оказывается в ранней эндосоме, где pH постепенно снижается до ~6.0–6.5. По мере созревания эндосом в поздние эндосомы и последующего слияния с лизосомами pH падает до 4.5–5.0, и содержимое везикулы подвергается действию набора лизосомальных гидролаз [173].

Именно здесь, в лизосомальном компартменте, начинают действовать цистеиновые катепсины. Поскольку цистеиновые катепсины (особенно катепсины В и L) гиперэкспрессированы и гиперактивны в опухолевых клетках, их протеолитическая активность может быть использована как триггер для селективного разрушения носителя и высвобождения лекарства. Таким образом, протеолитический профиль опухолевой клетки, и в особенности активность цистеиновых катепсинов, выступает не просто одним из многих параметров микроокружения, а решающим фактором, определяющим внутриклеточное поведение и эффективность высвобождения терапевтического груза. В отличие от диффузионно-контролируемых или pH-зависимых систем, где высвобождение часто

начинается уже во внеклеточном пространстве или ранних эндосомах, фермент-зависимые платформы обеспечивают максимальную селективность, срабатывая преимущественно после доставки в лизосомальный компартмент с его специфическим набором гидролаз. Именно поэтому понимание регуляции экспрессии и активности катепсинов в ответ на саму нанотерапию приобретает важное значение.

1.4.1 Основные механизмы контроля высвобождения

Контроль высвобождения лекарственного вещества из наночастиц является фундаментальным аспектом их свойств, напрямую влияющим на биодоступность, фармакокинетику, терапевтическую эффективность и профиль безопасности. Существующие механизмы можно классифицировать на три основные группы: диффузионно-контролируемое высвобождение, высвобождение за счёт деградации носителя и стимул-контролируемое высвобождение.

Диффузионно-контролируемое высвобождение — наиболее простой механизм, при котором лекарство постепенно мигрирует через полимерную матрицу или мембрану по градиенту концентрации; его скорость определяется коэффициентом диффузии вещества в материале носителя [174]. Контроль за счёт деградации носителя особенно актуален для биodeградируемых полимеров (PLGA, полимолочная кислота), где кинетика высвобождения коррелирует со скоростью поверхностной эрозии или объёмной деградации матрицы [175].

Наибольшее значение для онкологии представляют стимул-контролируемые системы, способные высвобождать груз в ответ на специфические триггеры. Стимулы подразделяются на экзогенные (температура, ультразвук, магнитное поле, свет) и эндогенные (присущие опухолевому микроокружению: пониженный pH, окислительно-восстановительный градиент, гиперэкспрессия определённых ферментов, в первую очередь протеиназ) [167,176].

1.4.2 Контроль высвобождения с помощью эндогенных стимулов

Эндогенные стимулы позволяют реализовать пространственно-временной контроль высвобождения с высокой степенью селективности [177]. В основе данного подхода лежит

хорошо известный эффект Варбурга — аэробный гликолиз, характерный для большинства злокачественных новообразований, который приводит к накоплению лактата и ионов водорода (H^+) в интерстициальном пространстве опухоли и формированию кислого микроокружения (pH 6.5–6.8). Дополнительный градиент pH создаётся и на субклеточном уровне: в процессе эндоцитоза наночастицы попадают в ранние эндосомы (pH 6.0–6.5), затем в поздние эндосомы и, наконец, в лизосомы, где pH достигает значений 4.5–5.0 [173,178]. Эта разница в кислотности используется для конструирования pH-чувствительных наноносителей, которые остаются стабильными при физиологическом pH (7.4) в кровотоке, но подвергаются конформационным изменениям, дестабилизации или гидролизу в кислой среде опухоли или внутриклеточных компартментов [179].

Ещё одним важным классом эндогенных стимулов является окислительно-восстановительный градиент, существующий между внеклеточным пространством и внутриклеточной средой опухолевых клеток. Ключевую роль в данном механизме играет глутатион (GSH) — основной внутриклеточный антиоксидант, концентрация которого в цитозоле опухолевых клеток (2–10 mM) в 100–1000 раз превышает его концентрацию во внеклеточной жидкости (2–20 мкM) [180]. Включение в структуру носителя дисульфидных или диселенидных связей, расщепляемых GSH, ведёт к быстрой внутриклеточной дезинтеграции частицы [181]. Более того, такие системы могут активно истощать запасы GSH, способствуя ферроптозу и купроптозу опухолевых клеток [182].

Особое место занимают фермент-чувствительные системы, в которых триггером высвобождения служат протеиназы, гиперэкспрессированные в опухоли [177]. Цистеиновые катепсины, в особенности катепсин В, являются ключевыми мишенями для таких платформ благодаря гиперэкспрессии при раке, участию в обновлении белков, аутофагии и презентации антигенов [20,183]. Помимо катепсина В, катепсин L расщепляет пептидные линкеры на основе Phe-Arg и используется в конъюгатах антитело-лекарственное средство [172]; катепсин S, задействованный в процессинге МНС II, предоставляет возможности для иммуномодуляции при комбинированной терапии [18]; катепсин К, маркер остеокластов, перспективен для остеотропных нанопрепаратов [17]. В совокупности гиперэкспрессированные в опухоли катепсины формируют специфический протеолитический профиль новообразования, который может быть положен в основу персонализированного выбора фермент-чувствительного носителя.

Цистеиновые катепсины играют ключевую роль в прогрессии и росте опухолей, что делает их перспективными мишенями для наноразмерной доставки [184]. В отличие от других протеиназ, катепсины обладают отличительной способностью сохранять протеолитическую активность в кислой среде лизосом (pH 4.5–5.0), а некоторые из них (в

частности, катепсин В) могут функционировать и во внеклеточном пространстве при pH опухолевого микроокружения (6.5–6.8) [14,178].

Центральным элементом фермент-чувствительных систем доставки является расщепляемый линкер, соединяющий лекарственное вещество с носителем или формирующий сшивку внутри наночастицы. Для создания катепсин-чувствительных систем разработан широкий спектр пептидных линкеров, распознаваемых и расщепляемых катепсинами. Среди наиболее распространённых конструкций выделяются линкеры на основе последовательностей Val-Cit (VCit), Val-Ala (VA) и Gly-Phe-Leu-Gly (GFLG), которые используются в конъюгатах антитело-лекарственное средство, системах пролекарств и наночастицах [19]. Структурные усовершенствования линкеров, от простых дипептидных конструкций до модифицированных пептидных последовательностей, коррелируют с улучшением распознавания субстрата, стабильности и эффективности расщепления.

Кремниевые наноносители и липосомы, функционализированные катепсин В-расщепляемыми пептидными линкерами, представляют собой эффективные системы для прецизионной доставки противоопухолевых препаратов. Конструирование таких систем требует тщательного выбора пептидного линкера, оптимизации параметров наночастиц (размер, заряд, поверхностная модификация) и, при необходимости, включения в состав конъюгатов антитело-лекарственное средство. Параллельная оценка трёх основных платформ биоконъюгатов (ADC, системы пролекарств и конъюгаты наночастиц) показывает, что ADC достигли наиболее зрелых клинических результатов, несмотря на продолжающиеся усовершенствования, обещающие расширить терапевтический индекс платформ пролекарств и наночастиц [183].

Ключевой задачей остаётся достижение баланса между стабильностью линкера при циркуляции и эффективным расщеплением в целевом участке, минимизация внецелевой активации и учёт вариабельности экспрессии катепсинов среди пациентов. Сохраняются проблемы при трансляции катепсин-чувствительных наноплатформ в клиническую практику, включая необходимость повышения эффективности доставки, обеспечения биосовместимости, долгосрочной безопасности, а также преодоления вариабельности протеиназ у разных видов и масштабируемого нанопроизводства.

1.4.3 Факторы, определяющие кинетику высвобождения

Кинетика высвобождения лекарственного вещества из наночастиц определяется комплексом физико-химических и биологических факторов. Ключевыми параметрами,

влияющими на профиль высвобождения, являются размер, форма, поверхностный заряд (дзета-потенциал) и состав поверхности наночастиц [185]. Установлено, что наночастицы меньшего размера обладают большей удельной площадью поверхности, что может приводить к более быстрому высвобождению лекарства, в то время как более крупные частицы обеспечивают более медленное и продолжительное высвобождение [186].

Поверхностный заряд наночастиц оказывает существенное влияние на их взаимодействие с биологическими мембранами и белками плазмы крови. Положительно заряженные наночастицы проявляют более высокий уровень клеточной интернализации по сравнению с отрицательно заряженными или нейтральными частицами, что может влиять на скорость внутриклеточного высвобождения препарата [185]. Заряд-обратимые наноносители (charge-reversible nanocarriers, CRN) привлекли значительное внимание благодаря их способности преодолевать физиологические и патологические барьеры в опухолевом микроокружении путём изменения поверхностного заряда в ответ на специфические стимулы, что улучшает нацеливание лекарств при одновременном снижении нецелевых эффектов [187].

Формирование белковой короны при попадании наночастиц в биологические жидкости является важным фактором, модифицирующим их биораспределение и кинетику высвобождения [188]. Адсорбция белков плазмы на поверхности наночастиц может маскировать нацеливающие лиганды, снижая селективность доставки, и способствовать преждевременному клиренсу частиц.

Среди биологических факторов, влияющих на высвобождение *in vivo*, следует отметить связывание с белками, ферментативную деградацию, абсорбцию липидов и углеводов, а также прикрепление к нуклеиновым кислотам. Особое значение имеет протеолитическая деградация носителя внутри клеток-мишеней. После эндоцитоза наночастицы попадают в эндосомы, которые созревают в лизосомы, где подвергаются действию лизосомальных гидролаз.

1.4.4 Методы изучения и оценки высвобождения

Оценка профиля высвобождения лекарственного вещества из наночастиц является одним из важных этапов разработки нанопрепаратов, поскольку от неё зависят эффективность, безопасность и дозировка конечного продукта. Методы изучения высвобождения подразделяются на *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*.

Методы *in vitro* включают использование модельных сред, имитирующих физиологические условия [189]. Наиболее распространёнными техниками являются метод раздельного потока, метод непрерывного потока и диализные методы. Выбор метода зависит от типа наночастиц и целей исследования. Дополнительно применяют модифицированные фармакопейные тесты, например, аппарат с лопастной мешалкой. Обязательным условием признаётся тестирование при разных pH, соответствующих внеклеточному микроокружению опухоли (6.5–6.8), эндосомам (5.5–6.0) и лизосомам (4.5–5.0) [190].

Методы *in vivo* исследования, в свою очередь, ориентированы на фармакокинетику и биораспределение в целом организме: анализируют тканевое распределение, гематологию, клиренс, гистопатологию и биохимию сыворотки. Для визуализации в реальном времени задействуют флуоресцентную корреляционную спектроскопию, конфокальную микроскопию, ПЭМ и интравитальную микроскопию [191].

Корреляция *in vitro–in vivo* (IVIVC) предполагает установление математических зависимостей между высвобождением в *in vitro* условиях и *in vivo* показателями в организме [3]. Однако для нанопрепаратов эта задача нетривиальна: мешают гетерогенность формуляций, недостаток регуляторных руководств и множество влияющих факторов – физико-химические свойства носителя, физиологические особенности субъекта и биофармацевтические характеристики активного вещества.

1.4.5 Практическое применение и перспективы

Наибольшие клинические достижения наномедицины фиксируются именно в онкологии: инкапсуляция цитостатиков в наночастицы позволила смягчить системные побочные эффекты и одновременно повысить терапевтическую результативность. Платформы, реагирующие на pH, окислительно-восстановительный статус либо ферментативную активность, показывают устойчивый противоопухолевый ответ. За пределами онкологии аналогичные системы контролируемой доставки разрабатываются для нейродегенеративных патологий, инфекционных процессов и атеросклероза. Отдельное направление — преодоление гематоэнцефалического барьера посредством функционализированных носителей. Среди них особо выделяются белковые конструкции на основе сывороточного альбумина человека: их высокая биосовместимость и полная биоразлагаемость обуславливают интерес как к тераностическому инструменту [192].

Влияние интернализации наночастиц на экспрессию лизосомальных протеиназ является важным аспектом, часто упускаемым из виду при разработке нанотерапевтиков.

Интернализация наночастиц не является нейтральным событием для клетки: как сложный терапевтический агент, наночастица способна индуцировать клеточный стресс и компенсаторные изменения протеолитического профиля.

В работе Ren и соавторов (2024) с помощью разработанной технологии фермент-индуцированного мечения по близости (nano-EPL) было показано, что внутриклеточная доставка PLGA-наночастиц в макрофагах сопровождается динамическим изменением профиля взаимодействующих белков, среди которых значительную долю составляют протеиназы и гидролазы [15]. Аналогичные данные получены для экзосом-миметических систем: в работе Zhang и соавторов (2021) показано, что интернализация наночастиц, несущих катепсин В-чувствительный линкер, индуцирует повышение экспрессии мРНК катепсина В в клетках рака молочной железы [16]. Данное явление имеет двойственные последствия: с одной стороны, повышенная экспрессия катепсина В может усиливать высвобождение груза из носителей, содержащих катепсин-чувствительные линкеры; с другой — избыточная протеолитическая активность может способствовать деградации внеклеточного матрикса, инвазии и метастазированию.

Гетерогенность опухолей по экспрессии протеиназ, включая катепсины, диктует необходимость персонализированного подхода к выбору наноносителя. Катепсин В сверхэкспрессирован при различных онкологических заболеваниях: раке молочной железы, кожи, колоректальном раке, раке яичников, желудка и почек [29,193–195]. Однако уровень экспрессии и активность катепсина В существенно варьируют не только между разными типами опухолей, но и между пациентами с одной нозологией [35]. В работе Rudzinska-Radecka и соавторов (2022) была показана корреляция между уровнем мРНК катепсина В и стадией рака почки, что позволяет рассматривать CTSB как прогностический маркер [73,196]. Катепсин L можно рассматривать как предиктивный маркер трижды негативного рака груди и рака поджелудочной железы [197,198]. Исследования также демонстрируют, что катепсин S может служить прогностическим биомаркером и новой потенциальной терапевтической мишенью для светлоклеточного почечно-клеточного рака (ccRCC) [72]. Сниженная экспрессия катепсина F коррелирует с плохим прогнозом у пациентов с ccRCC [74]. Изменение экспрессии катепсина H в сыворотке рассматривается в качестве потенциального маркера у пациентов с колоректальным раком [199].

Будущие направления развития нанотехнологий для доставки лекарств включают создание мультифункциональных платформ, сочетающих диагностические и терапевтические функции (тераностика), разработку нанороботов для таргетной терапии рака, а также совершенствование методов крупномасштабного производства и стандартизации нанолекарств [200]. Безопасность и эффективность наноразмерных систем

доставки должны тщательно исследоваться в доклинических и клинических испытаниях, особенно с учётом биораспределения, нацеливания на специфические области и потенциальной иммунологической токсичности.

Таким образом, цистеиновые катепсины являются ключевыми регуляторами ответа опухолевых клеток на нанотерапевтические воздействия. При этом остаётся недостаточно изученным фундаментальный вопрос: как именно протеолитическая система клетки реагирует на терапевтические агенты принципиально разной природы — классические химиопрепараты и наноразмерные системы доставки? Настоящая диссертационная работа направлена на решение этого вопроса путём сравнительного анализа экспрессии, процессинга и функциональной активности цистеиновых катепсинов в клетках почечно-клеточного рака в ответ на действие химиопрепарата и наночастиц с различными структурными параметрами.

2 Материалы и методы

2.1 Химические вещества и реактивы

Бычий сывороточный альбумин (Sigma-Aldrich, США), этанол (Sigma-Aldrich, США), пепсин (Sigma-Aldrich, США), коммерческая протеиназа (Sigma-Aldrich, США), камптотecin (Sigma-Aldrich, США), E-64 (Sigma-Aldrich, США), Z-VAD-FMK (R&D Systems, США), сунитиниба малат (Sigma-Aldrich, США), родамин 123 (Sigma-Aldrich, США), глутаральдегид (PanReas AppliChem, Испания), поликарбонатные трековые мембраны (GVS, Италия), Sepharose CL-4B (Cytiva, США), липосомы на основе DOPE и катионных липидов (Avanti Polar Lipids, США), диметилсульфоксид (Sigma-Aldrich, США), компоненты натрий-ацетатного буфера NaCl и ЭДТА (Sigma-Aldrich, США), коктейль ингибиторов протеиназ (Sigma-Aldrich, США), МТТ (Sigma-Aldrich, США), трипановый синий (Sigma-Aldrich, США); трипсин клеточной степени очистки, среда DMEM, RPMI-1640, эмбриональная телячья сыворотка, смесь пенициллин-стрептомицин, фосфатно-солевой буфер (PBS) и реагент Lipofectamine 3000 — у Gibco (Thermo Fisher Scientific, США); папаин очищен в лаборатории; все реагенты для вестерн-блоттинга — у Bio-Rad (Геркулес, Калифорния, США); LysoTracker™ Red DND-99 и LysoTracker™ Blue DND-22, FAM-PHK, флуоресцентный зонд DiR, pH-чувствительный краситель pHrodo™, аннексин V-FITC — у Thermo Fisher Scientific (Уолтем, Массачусетс, США); пропидия йодид, DAPI, а также набор для ВСА-анализа (бицинхолиновая кислота) — у Thermo Scientific (США); ингибитор цистеиновых катепсинов Ac-PLVE-FMK и флуорогенные субстраты Ac-QLLR-AMC — у Permpic (Сучжоу, Цзянсу, Китай); E-64 также у Serva (Германия); Z-VAD-FMK — у R&D Systems (США); LumiTrace DiR, сульфо-цианин 7 (Cy7) карбоновая кислота — у Lumiprobe (Россия); набор для очистки Amicon Ultra-4 и PVDF-мембрана — у Merck Millipore (США); концентратор VivaSpin 500 — у Sartorius (Германия).

2.2 Антитела

Таблица 3. Используемые в работе антитела для вестерн-блоттинга и флуоресцентной микроскопии.

Название антител	Каталожный номер
Катепсин В	ab190027

Катепсин К	ab19027
Катепсин О	ab200735
Катепсин С	ab119109
Катепсин Z	ab190580
Катепсин W	ab191083
Катепсин F	PA5-27840
Катепсин V	ab166894
Катепсин L	PAA306Hu01
Катепсин S	PAB933Hu01
Катепсин H	ab185935
Bcl-2	A0208
β -актин	A5441
Тубулин	ab52866
GAPDH	39-8600
Про-каспаза-3	PAA-626Hu01
LAMP-1	ab24170

2.3 Биологические наночастицы

2.3.1 Синтез альбуминовых наночастиц

Альбуминовые наночастицы синтезировали методом десольватации с последующей сшивкой [201]. Денатурацию белка и формирование наночастиц осуществляли путем капельного добавления этанола при комнатной температуре к водному раствору бычьего сывороточного альбумина (20 мг/мл) в соотношении этанол/вода 4:1. Добавление этанола проводили при постоянном перемешивании и фиксированной скорости потока (2 мл/мин) с использованием цифровой помповой системы (Masterflex L/S). Затем по каплям добавляли глутаровый альдегид (25% раствор), предварительно растворенный в 1 мл этанола. Раствор перемешивали в течение ночи при комнатной температуре. Для оценки минимального количества глутаральдегида, необходимого для стабилизации частиц, вносили различные количества сшивающего агента.

На следующий день частицы из каждой партии разделяли на равные аликвоты и центрифугировали при 13 000 g, супернатант удаляли, а частицы ресуспендировали в этаноле или воде и оставляли при комнатной температуре на 24 часа. Все пробирки объемом 1,5 мл, используемые в этом эксперименте, были предварительно взвешены. Затем пробирки центрифугировали при 13 000 g, супернатант удаляли, и пробирки высушивали при 65 °C в течение ночи. На следующий день пробирки повторно взвешивали и рассчитывали

коллоидную стабильность как функцию потери массы между наночастицами, ресуспендированными в этаноле и в воде, как показано на графике.

Для дальнейших экспериментов глутаральдегид использовали в конечной концентрации 0,009% для получения альбуминовых наночастиц с меньшим количеством сшивки и 0,09% для получения альбуминовых наночастиц с большим количеством сшивки. Полученные частицы многократно отмывали центрифугированием и ресуспендировали в воде перед определением их конечной концентрации.

2.3.2 Загрузка и высвобождение веществ в альбуминовых наночастицах

Загрузку терапевтического агента проводили путем инкубации 5 мг частиц в растворе Сунитиниба или Родамина 123, растворенных в ДМСО в концентрации 10 мг/мл или 5 мг/мл соответственно. Эффективность загрузки рассчитывали прямым методом, ресуспендируя частицы в 10 мл ДМСО, и после выдерживания раствора в течение ночи при перемешивании при 37 °C подтверждали непрямым методом по формуле: $\%ЭЗ = [(Добавленное\ лекарство - Свободное\ "незахваченное\ лекарство") / Добавленное\ лекарство] \times 100$. Концентрацию образцов определяли с помощью анализа абсорбции при длине волны 420 нм для Сунитиниба или флуоресцентного анализа (Возбуждение = 500 нм; Испускание = 530 нм) для Родамина 123, используя калибровочную кривую, построенную по известным концентрациям этих молекул. Высвобождение изучали в PBS с использованием того же аналитического подхода.

2.3.3 Определение деградации альбуминовых наночастиц и высвобождения в протеолитических условиях

Альбуминовые наночастицы (2 мг) ресуспендировали в течение ночи в 1 мл различных буферных растворов (Tris-HCl 0,05 M) при разных температурах и значениях pH, в присутствии или в отсутствии протеолитического фермента (1 мг/мл). Все пробирки объемом 1,5 мл взвешивали до начала эксперимента. На следующий день образцы центрифугировали, супернатант удаляли, а пробирки высушивали в течение ночи. На следующий день все образцы взвешивали, и деградацию частиц рассчитывали как разницу в массе между частицами, ресуспендированными в растворе без протеолитического фермента и с ним. Аналогично, известное количество частиц, нагруженных Сунитинибом или

Родамином 123, инкубировали в растворе трипсина в течение 1 часа при 37 °С. Пробирки центрифугировали и собирали супернатант. Концентрацию Сунитиниба и Родамина 123 определяли с помощью абсорбционного или флуоресцентного анализа, соответственно.

2.3.4 Изготовление биологических нановезикул

Клетки НЕК-293Т (2×10^7 клеток на один процесс изготовления), ресуспендированные в PBS, подвергали экструзии с использованием мини-экструдера (Avanti Polar Lipids, США) при 37 °С с набором гидрофильных поликарбонатных трековых мембран (GVS, Италия), предварительно замоченных в растворе PBS-НАТ (PBS, дополненный человеческим альбумином и трегалозой) [202]. Мембраны имели следующие диаметры пор: 10 мкм (9 экструзий), 5 мкм (9 экструзий) и 1 мкм (9 экструзий). Полученную суспензию центрифугировали при 4 °С и 2000 g в течение 5 минут для удаления клеточного дебриса. Супернатант подвергали экструзии 15 раз через поликарбонатную мембрану с диаметром пор 0,1 мкм при 37 °С. Биологические наночастицы очищали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке размером $1,6 \times 10$ см с сшитой агарозой Sepharose CL-4B (Cytiva), используя PBS в качестве подвижной фазы. Было собрано сорок фракций конечным объемом 500 мкл. Фракции 11–16, содержащие биологические наночастицы, объединяли и, при необходимости, концентрировали с использованием Amicon Ultra-4 (отсечение по молекулярной массе 10 кДа; Merck Millipore). Изоляты биологических наночастиц смешивали в 10-кратном буфере PBS-НАТ для хранения ⁵¹ до концентрации $1 \times$. Для получения DiR-меченых биологических нановезикул клетки снимали с поверхности пластика и смешивали с DMEM, дополненным 5 мкМ LumiTrace DiR (Lumiprobe, Россия), и инкубировали при перемешивании (37 °С, 350 об/мин) в течение 30 минут с последующим отмыванием PBS и последующим процессом экструзии.

2.3.5 Изготовление биоподобных нановезикул на основе слияние биологических нановезикул и липосом

Суспензии клеток НЕК-293Т (2×10^7 клеток на один процесс изготовления) подвергали экструзии, как описано для биологических нановезикул. Суспензии, полученные после удаления клеточного дебриса, и смесь 15,6 мкг *in vitro* транскрибированной РНК (FAM-РНК) и 20 мкл реагента Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США),

предварительно инкубированную в течение 10 мин, инкубировали в течение 20 минут при 37 °С для слияния.

Для анализа загрузки РНК в биоподобные наночастицы с помощью ПЦР в реальном времени и гель-электрофоретического анализа FAM-РНК была синтезирована искусственная РНК длиной 160 п.н. После слияния суспензию подвергали экструзии 15 раз через поликарбонатную мембрану с порами 0,1 мкм при 37 °С. Полученные биоподобные наночастицы выделяли и хранили, как описано для биологических нановезикул. Для получения DiR-меченых биоподобных наночастиц клетки снимали с поверхности пластика и смешивали с DMEM, дополненным 5 мкМ LumiTrace DiR (Lumiprobe, Россия), и инкубировали при перемешивании (37 °С, 350 об/мин) в течение 30 минут с последующим отмыванием PBS и последующим процессом экструзии.

2.3.6 Флуоресцентное мечение биологических и биоподобных нановезикул

Биологические нановезикулы (5×10^{11}) смешивали с ближним инфракрасным красителем сульфо-цианином 7 (Cy7) карбоновой кислотой (Lumiprobe, Россия) в концентрации 500 мг/мл и подвергали двум циклам замораживания-оттаивания. После второго оттаивания полученную суспензию экструдировали через гидрофильную поликарбонатную трековую мембрану с порами 0,1 мкм (GVS, Италия) с помощью мини-экструдера (Avanti Polar Lipids; 11 повторений). Свободный краситель удаляли путём трёхкратной промывки суспензии в PBS с использованием концентратора белков VivaSpin 500 (отсечение 300 кДа; Sartorius, Германия). Альтернативно, нановезикулы метили липофильным красителем DiR (Lumiprobe, Россия).

2.3.7 Загрузка FAM-РНК в биологические нановезикулы методом электропорации

Клетки линии HEK293T (2×10^7 клеток на один цикл получения) ресуспендировали в PBS и подвергали экструзии с использованием мини-экструдера («Avanti Polar Lipids», США) при 37 °С. Применяли набор гидрофильных трековых поликарбонатных мембран («GVS», Италия), предварительно уравновешенных в растворе PBS-НАТ. Экструзию проводили последовательно через мембраны с диаметром пор 10 мкм (7 проходов), 5 мкм (7 проходов) и 1 мкм (7 проходов). Полученную суспензию центрифугировали при 4 °С и 2000 g в течение 5

минут для удаления клеточного дебриса. К супернатанту, содержащему биологические нановезикулы, добавляли 30 мкг FAM-РНК и осторожно перемешивали. Смесь переносили в кювету для электропорации и подвергали воздействию электрических импульсов с использованием электропоратора MicroPulser («Bio-Rad», США) по программе, оптимизированной для клеток НЕК293Т. После электропорации образец инкубировали при 37 °С в течение 10 минут, затем проводили 11 циклов экструзии через поликарбонатную мембрану с диаметром пор 0,1 мкм при 37 °С. Очистку загруженных FAM-РНК биологических нановезикул осуществляли методом гель-фильтрационной хроматографии на колонке размером 1,6 × 10 см, заполненной агарозой Sepharose CL-4B («Cytiva», США); в качестве подвижной фазы использовали PBS. Очищенные препараты FAM-меченых биологических наночастиц смешивали с 10-кратным буфером PBS-НАТ до конечной концентрации 1 × для последующего хранения.

2.3.8 Анализ траекторий наночастиц (NTA)

Анализ и количественную характеристику препаратов наночастиц проводили на приборе LM10HS («NanoSight», Эймсбери, Великобритания) с лазерным источником 405 нм. Регистрацию траекторий движения частиц выполняли при пассивном температурном контроле со следующими установками камеры: экспозиция 1500, усиление 500; пороги детекции – нижний 195, верхний 1885. Обработку полученных видеозаписей осуществляли в аналитической среде версии 2.3 (того же производителя) при пороговом значении 8, установленном в режиме multi.

2.3.9 Криогенная просвечивающая электронная микроскопия (крио-ПЭМ)

Медные сетки (200 меш) с углеродной плёнкой-подложкой предварительно обрабатывали в воздушной плазме для увеличения гидрофильности, после чего наносили образцы наночастиц. Избыток материала удаляли промоканием в течение 1 с, затем сетку незамедлительно погружали в жидкий этан посредством автоматизированной системы витрификации Vitrobot™ («FEI Company», США). Полученные препараты, фиксированные в аморфном льду, в среде жидкого азота транспортировали в просвечивающий электронный микроскоп Tecnai™ G2 12 SPIRIT («FEI Company», США) для проведения визуализации.

2.4 Культивирование клеточных линий

Клеточные линии карциномы почки человека 769-P, A-498, человеческие эмбриональные клетки почки HEK293, клетки рака молочной железы SKBR3 и линия клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 были получены из американской коллекции типовых культур. Клетки 769-P и A-498 выращивали на флаконах в среде RPMI-1640, дополненной 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой (v/v) и 1%-ной смесью антибиотиков пенициллин-стрептомицин (v/v) («Gibco», США) при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. Клетки HEK293, SKBR3 и HepG2 выращивали на среде DMEM с теми же добавками и в тех же условиях.

2.5 Фракционирование клеточных структур

Фракционирование клеточных линий на цитоплазматическую и ядерную фракции проводили по основной методике [38] с некоторыми модификациями. Клетки отмывали от среды охлаждённым PBS. К клеткам добавляли сахарозный буфер (0,32 М сахароза, 3 мМ CaCl₂, 2 мМ ацетат магния, 0,1 мМ ЭДТА, 10 мМ Tris-HCl, 1 мМ ДТТ, 0,5%-ный NP-40 (v/v), коктейль ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich», США)), собирали скребком с клеточного пластика и переносили в пробирку во льду. Через 30 минут инкубации во льду с периодическим пипетированием образцы центрифугировали в течение 15 минут при 3000 g, +4 °C. После центрифугирования отбирали супернатант, содержащий цитоплазматическую фракцию, и ресуспендировали ядерный осадок в сахарозном буфере без добавления NP-40. После центрифугирования при 3000 g, +4 °C в течение 5 минут ядра ресуспендировали сначала в низкосолеваем буфере (20 мМ HEPES, pH 7,9, 20%-ный глицерин (v/v), 1,5 мМ MgCl₂, 0,02 М KCl, 0,2 мМ ЭДТА, 0,5 мМ ДТТ, коктейль ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich»)), потом в высокосолеваем буфере (20 мМ HEPES, pH 7,9, 20%-ный глицерин (v/v), 1,5 мМ MgCl₂, 0,8 М KCl, 0,2 мМ ЭДТА, 1%-ный NP-40 (v/v), 0,5 мМ ДТТ, коктейль ингибиторов протеиназ («Sigma-Aldrich»)). Ядра инкубировали в течение 30 минут во льду и центрифугировали на 16 000 g в течение 15 минут при +4 °C. Отобранный супернатант содержал ядерную фракцию. Цитоплазматическую и ядерную фракции хранили при –80 °C. Фракции смешивали с 2× буфером для нанесения образцов (125 мМ Tris-HCl, pH 6,8, 20%-ный глицерин (v/v), 4%-ный SDS (w/v), 0,004%-ный бромфеноловый синий (w/v), 10%-ный 2-меркаптоэтанол (v/v)) и прогревали в течение 5 минут при 96 °C. На ПААГ

(полиакриламидный гель) наносили по 6 мкг цитоплазматической фракции и 60 мкг ядерной фракции.

2.6 Выделение ДНК из эукариотических клеток

Эукариотические клетки были предварительно рассажены в 12-луночный планшет в плотности $1 \cdot 10^5$ клеток на лунку. На следующий день проводили обработку индуктором апоптоза или ингибиторами цистеиновых катепсинов. После завершения инкубации клеточную среду собрали в эффендорфы, а прикрепленные клетки промыли PBS раствором. К клеткам было добавили 0.48 mM EDTA на 5 минут, после чего открепленные клетки были объединены с ранее собранной средой. Затем клетки центрифугировали в течение 5 минут при 700 g при комнатной температуре. К клеточному осадку прибавили ДНК лизирующий буфер (100 mM Tris HCl, pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl, 200 мкг/мл протеиназа К) и инкубировали на протяжении ночи при 37°C. На следующий день к образцу добавили равное количество изопропанола и тщательно перемешали. Образец центрифугировали в течение 5 минут при 2000 g при 4°C. Нуклеиновый осадок ресуспендировали в РНК лизирующем буфере (10 mM Tris HCl, pH 7.5, содержащего 1 mM EDTA и 200 ug/ml RNase A) и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Образец был разведен в буфере для нанесения и проанализирован в 1.8% агарозном геле.

2.7 Клеточные тесты

2.7.1 Определение пула апоптотических клеток методом проточной цитометрии

Культуральную среду из-под клеток собирали в пробирку, а эукариотические клетки снимали раствором Версена в течение 10 минут. После этого собранные клетки объединяли с культуральной средой и центрифугировали в течение 5 минут при 3000 g при комнатной температуре. Клеточный осадок промывали раствором PBS и повторно центрифугировали при тех же условиях. Затем к клеточному осадку добавляли раствор Аннексина-FITC (Abcam, ab14082) на 10 минут при комнатной температуре, а после этого добавляли раствор пропидия йодида и производили измерение флуоресценции в клетках на проточном цитометре PanaCyte A8.

2.7.2 Оценка жизнеспособности клеток в присутствии камптотецина методом МТТ

Клеточные линии были посеяны в 96-луночные планшеты на ночь, после чего обработаны индуктором апоптоза или другими ингибиторами. Клетки затем выращивались в течение указанного времени до того, как в каждую лунку был добавлен МТТ. После инкубации в течение двух часов при 37°C с раствором МТТ, среда была удалена и заменена растворителем МТТ (4 mM HCl в изопропанол), который затем помещался на орбитальный шейкер на 15 минут. Оптическая плотность (ОП) в каждой лунке затем измерялась при длине волны 490 нм с помощью планшетного ридера ClarioStar. Исследования проводились в пяти репликах и повторялись не менее трех раз.

2.7.3 Оценка жизнеспособности клеток в присутствии альбуминовых наночастиц

Для оценки влияния наночастиц на жизнеспособность клеток клетки высевали в 96-луночные микропланшеты (Costar, Corning Inc., Корнинг, Нью-Йорк, США) в плотности 10×10^3 . Через 24 часа после прикрепления клеток планшеты промывали PBS, и клетки обрабатывали возрастающими концентрациями (от 0,1 до 10 нг на клетку) альбуминовых наночастиц в течение 72 часов. Для каждого контроля и каждой тестируемой концентрации использовали по шесть повторных лунок. Ту же процедуру применяли для оценки токсичности сунитиниба и частиц, нагруженных этим препаратом. В этом случае обработку проводили в течение ночи, затем клетки отмывали и МТТ-анализ выполняли через 48 часов. Соль тетразолия (МТТ [3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид]) растворяли в PBS (5 мг/мл) и добавляли к клеткам 769-P и SKBR3 (100 мкл на мл DMEM без сыворотки или фенолового красного) в соответствии с методом Мосманна [48]. После инкубации в течение 3 часов при 37 °C в каждую лунку вносили раствор 1 N хлористоводородной кислоты в изопропанол (1:24, об./об.) и перемешивали для растворения образовавшихся темно-синих кристаллов формазана. Через несколько минут при комнатной температуре оптическую плотность планшетов считывали при 570 нм с помощью планшетного ридера BioTek (Вайнуски, Вермонт, США).

2.7.4 Определение количества живых клеток методом окрашивания трипановым синим

Клетки были посеяны на 24-луночные планшеты. На следующий день клетки были промыты в PBS и затем выращивались в среде, содержащей индуктор апоптоза или ингибиторы цистеиновых катепсинов в течение 0-72 часов. Количество жизнеспособных клеток в каждый момент времени определяли путем окрашивания 0.4% трипановым синим и измерением на клеточном счетчике Countess 3 FL Automated Cell Counter (Thermo FS).

2.8 Оценка насыщения аминогрупп на поверхности альбуминовых наночастиц методом проточной цитометрии

Проточную цитометрию использовали для оценки насыщения аминогрупп на поверхности частиц. В этом случае альбуминовые наночастицы метили NHS-эфиром AlexaFluor 488 в соответствии с инструкцией производителя, а затем анализировали с помощью FACS (флуоресцентная сортировка клеток). С другой стороны, FACS также использовали для оценки снижения флуоресценции красителя, загруженного в частицы, после их интернализации. В этом случае оба типа частиц загружали родамином 123, а клетки SKBR3 и 769-P обрабатывали альбуминовыми наночастицами в концентрации 1 нг на клетку в течение ночи. Затем клетки отмывали и культивировали, как описано ранее, фиксировали в 4% параформальдегиде и ресуспендировали в PBS при 4 °C. Эту процедуру повторяли в разные дни после обработки в течение 2 недель. Анализ флуоресценции клеток проводили на цитометре BD FACSCanto II (BD Biosciences, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси, США) с программным обеспечением NovoExpress 1.4.1 (Agilent Technologies, Санта-Клара, Калифорния, США) в канале FITC-A; сигналы отображали в линейном режиме. Процент GFP-положительных клеток рассчитывали по сравнению с необработанными контрольными клетками.

2.9 Оценка активности цистеиновых катепсинов

Протеолитическую активность цистеиновых катепсинов в клетках линий HEK293, 769-P и A-498 оценивали по интенсивности гидролиза флуорогенного субстрата Ac-Gln-Leu-Leu-Arg-7-амино-4-метилкумарин (Ac-QLLR-AMC) («Permpic», Китай). Клетки

высеивали в 96-луночные планшеты в количестве 1×10^4 клеток на лунку и культивировали в течение 24 ч до достижения 50–80 % конфлюэнтности. Для оценки вклада цистеиновых катепсинов в суммарную протеолитическую активность клетки предварительно инкубировали в течение 10 минут в присутствии ингибиторов Ас-PLVE-FMK (1, 25 и 50 мкМ) либо E-64 (1, 25 и 50 мкМ). Контрольные образцы инкубировали с эквивалентным объёмом растворителя (диметилсульфоксид). По окончании предынкубации в каждую лунку вносили субстрат Ас-QLLR-АМС до конечной концентрации 50 мкМ в 0,1 М натрий-ацетатном буфере (100 мМ NaCl, 0,5 % ДМСО, 0,6 мМ ЭДТА, pH 4,6). Кинетику накопления продукта гидролиза регистрировали непрерывно в течение 10–12 минут с использованием планшетного ридера CLARIOstar® Plus (BMG Labtech, Ортенберг, Баден-Вюртемберг, Германия) при длинах волн возбуждения и эмиссии 353 и 442 нм соответственно. При исследовании влияния камптотецина на активность цистеиновых катепсинов измерения проводили в заданные временные точки по аналогичной схеме.

2.10 Окрашивание лизосом

Лизосомальный компартмент визуализировали с использованием лизосомотропных флуоресцентных красителей LysoTracker™ Red DND-99 и LysoTracker™ Blue DND-22 («Thermo Fisher Scientific», США). Клетки инкубировали с красителем в конечной концентрации 75 нМ в течение 30 мин при 37 °С в стандартных условиях культивирования. По окончании инкубации клетки дважды отмывали от несвязавшегося красителя PBS. Флуоресценцию лизосом регистрировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе ExFluor («LCI», Южная Корея) с использованием фильтра Texas Red (для LysoTracker™ Red) при увеличении $\times 20$. Количественную оценку интенсивности флуоресценции проводили путём усреднения сигнала от всех клеток, детектируемых в поле зрения. Для анализа лизосомальной флуоресценции методом проточной цитометрии клетки после окрашивания снимали с подложки раствором трипсина-ЭДТА, ресуспендировали в PBS и анализировали на проточном цитометре в каналах ECD (для LysoTracker™ Red) и BP450 (для LysoTracker™ Blue).

2.11 Оценка экспрессии цистеиновых катепсинов методом вестерн блоттинга

Клетки аккуратно промывали охлаждённым PBS и лизировали в RIPA-буфере (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1%-ный NP-40 (v/v), 0,5%-ный дезоксихолат натрия (w/v), 0,1%-ный SDS (w/v)) с добавлением коктейля ингибитора протеиназ («Sigma-Aldrich») в течение 30 минут во льду. Лизированные клетки центрифугировали на 16 000 g при температуре +4 °C в течение 15 минут и далее отбирали клеточный лизат (супернатант). Концентрацию белков в клеточном лизате оценивали набором Pierce BCA protein assay kit (ThermoScientific). Образцы клеточных лизатов с известной концентрацией смешивали с 2× буфером для нанесения образцов (125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 20%-ный глицерин (v/v), 4%-ный SDS (w/v), 0,004%-ный бромфеноловый синий (w/v), 10%-ный 2-меркаптоэтанол (v/v)) до одинаковой концентрации белка в образцах и прогревали в течение 5 минут при 96 °C. На ПААГ наносили по 30 мкг клеточного лизата. Готовые для нанесения белковые образцы разделяли в 14%-ном ПААГ и переносили на PVDF-мембрану («Merck Millipore», США). Мембрану инкубировали с первичными антителами в течение ночи. Используемые в работе антитела описаны в разделе «антитела». На следующий день мембрану отмывали раствором PBST (PBS с добавлением Tween-20, 0.1%) и инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, 1 час. Белки на мембране проявляли набором Clarity Western ECL Substrate («Bio-Rad», США). Денситометрический анализ проводили в программе GelAnalyzer 19.1. Полученные данные нормировали к контролю нагрузки GAPDH, б-актину или тубулину, и представляли в относительных единицах. Проверку чистоты цитоплазматической и ядерной фракций проводили по цитоплазматическому белку GAPDH и ядерным белкам ламинам A/C.

Для оценки экспрессии катепсинов в присутствии альбуминовых наночастиц клетки SKBR3 и 769-P высевали в плотности 1×10^5 клеток/см². Через 6 часов обработки частицами культуральную среду, содержащую НЧ, удаляли. Через 24, 48 и 72 часа после обработки клетки дважды промывали ледяным PBS, снимали мягким скребком и центрифугировали при 250× g в течение 10 минут при 4 °C. Осадки клеток лизировали с использованием RIPA-буфера (Thermo Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) с добавлением 1 мкл коктейля ингибиторов протеиназ Halt (Thermo Scientific) на 100 мкл буфера. Всего 30 мкг клеточного лизата белков наносили на SDS-PAGE и затем переносили на PVDF-мембрану для вестерн-блоттинга, как описано ранее.

2.12 Нативный ПААГ-электрофорез

Биологические и биоподобные нановезикулы, несущие FAM-меченую РНК, в объёме 20 мкл инкубировали при комнатной температуре с 1,62 мл 2 М ацетата натрия (pH 4,6) либо с фосфатным буфером (pH 7,4) в течение 15 или 60 минут. По окончании инкубации в пробы вносили 4-кратный буфер для нанесения (125 мМ Tris-HCl pH 6,8, 20% глицерина, 0,004% бромфенолового синего) и разделяли в 14% нативном полиакриламидном геле. Визуализацию выполняли с помощью системы гель-документации Bio-Rad ChemiDoc MP Imaging, снабжённой фильтром Alexa 488, а интенсивность полос, соответствующих FAM-РНК, оценивали количественно в программном пакете GelAnalyzer 19.1.

2.13 Оценка локализации частиц с лизосоми методом флуоресцентной микроскопии

Клетки линии HepG2 высевали в культуральные планшеты со стеклянным дном и культивировали в стандартных условиях до достижения 60–70 % конфлюэнтности. Лизосомы окрашивали лизосомотропным красителем LysoTracker™ Red DND-99 («Thermo Fisher Scientific», США) в конечной концентрации 75 нМ в течение 30 минут при 37 °С. После двукратной отмывки от несвязавшегося красителя к клеткам добавляли биологические и биоподобные нановезикулы, нагруженные FAM-меченой РНК и DiR-меткой, и инкубировали в течение заданного времени. Визуализацию и количественный анализ интенсивности флуоресценции LysoTracker™ Red и FAM-РНК проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе FV3000 («Olympus Corporation», Япония); кинетику накопления и распределения сигналов регистрировали с использованием автоматизированной системы визуализации живых клеток Image ExFluorer («Live Cell Instrument», Сеул, Южная Корея). Анализ степени колокализации сигналов выполняли в программном обеспечении Image ExFluorer путём расчёта коэффициента пространственного совпадения флуоресцентных меток в пределах области интереса (ROI).

2.14 Анализ внутриклеточной стабильности нановезикул в присутствии ингибиторов цистеиновых катепсинов

Клетки линии HepG2 высевали в культуральные планшеты со стеклянным дном и культивировали в стандартных условиях до достижения 50 % конфлюэнтности. К клеткам HepG2 добавляли DiR-меченные и FAM-PHK-нагруженные биологические и биоподобные нановезикулы в двух дозах (для каждого типа частиц – своя доза) совместно с ингибиторами цистеиновых катепсинов: 20 мМ PLVE-FMK и 50 мМ E64; в качестве контроля использовали DMSO. В качестве контроля использовали клетки HepG2 без обработки наночастицами и с добавлением PBS. Через 4 ч инкубации кондиционную среду удаляли, клетки дважды промывали фосфатно-солевым буфером и заливали полной питательной средой. Для оценки стабильности нановезикул внутри клеток в динамике проводили флуоресцентную микроскопию с использованием микроскопа LCI Ex-Fluor (LCI, Южная Корея), регистрируя сигналы DiR и FAM-PHK в интервале времени от 4 до 44 ч после добавления ингибиторов. Динамическое наблюдение позволяло отслеживать сохранность меток и, соответственно, целостность нановезикул на протяжении всего периода культивирования.

2.15 Статистический анализ результатов

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, США). Все эксперименты выполняли не менее чем в трёх независимых биологических повторностях; количественные данные представлены в виде среднего значения $\pm$ стандартное отклонение (SD) или $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM). Сравнение двух групп осуществляли с помощью двустороннего непарного t-критерия Стьюдента, сравнение трёх и более групп — методом однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с апостериорным тестом Даннетта, а при наличии двух независимых переменных применяли двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA). Денситометрию вестерн-блотов выполняли в программе ImageJ с нормализацией сигнала относительно белка «домашнего хозяйства». Различия считали статистически значимыми при ** $p < 0,05$, при этом уровни значимости на рисунках обозначены как * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ и ns — различия недостоверны ($p > 0,05$).

3. Результаты работы

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

Для исследования функциональной роли цистеиновых катепсинов в опухолевых клетках в ответ на действие терапевтических препаратов необходимо получить детальное представление о состоянии протеолитической системы в норме и при злокачественной трансформации. Известно, что отдельные представители семейства цистеиновых катепсинов демонстрируют изменённую экспрессию по сравнению с нормой при различных типах рака. Однако в литературе практически отсутствуют работы, в которых проводился бы одновременный системный анализ всех 11 членов данного семейства в пределах одной клеточной модели. Такой комплексный подход позволяет выявить скоординированные изменения в протеолитическом профиле, которые обуславливают способность опухолевых клеток поддерживать злокачественный фенотип.

В рамках настоящей работы проведено сравнительное исследование экспрессии цистеиновых катепсинов в клеточных лизатах эмбриональных почек человека HEK293 и двух линий опухолевых клеток почки: 769-P и A-498 (рис. 2). Установлено, что все 11 цистеиновых катепсинов обнаруживаются как в эмбриональных, так и в опухолевых клеточных линиях. При этом между эмбриональными и опухолевыми линиями выявлены различия в уровне экспрессии, а также в спектре присутствующих форм, отражающих стадии созревания ферментов.

Полуколичественный анализ выявил статистически значимое увеличение уровня экспрессии в опухолевых клетках по сравнению с эмбриональными для катепсинов V (в 9,34 раза), Z (в 5,5 раза), S (в 9,2 раза), L (в 3,34 раза) и B (в 3,34 раза). Для катепсинов L и B в опухолевых линиях помимо повышенного общего уровня экспрессии зарегистрировано увеличение относительного содержания их зрелых форм.

Анализ изоформного состава выявил специфические особенности процессинга для отдельных катепсинов. В опухолевых клетках уровень про- и промежуточной форм катепсина C был выше, чем в эмбриональных, тогда как содержание зрелой формы катепсина C было снижено. Количество про- и промежуточной форм катепсина O, напротив, было снижено в опухолевых клетках, а зрелая форма катепсина O с молекулярной массой ~20 кДа обнаруживалась исключительно в опухолевых клетках. Катепсин K в опухолевых клетках был представлен преимущественно зрелой формой, тогда как в эмбриональных

клетках преобладала его проформа. Количественное содержание про- и промежуточной форм катепсина Н различалось во всех трёх клеточных линиях, при этом зрелая форма катепсина Н в опухолевых клетках была представлена в меньшем количестве, чем в эмбриональных.

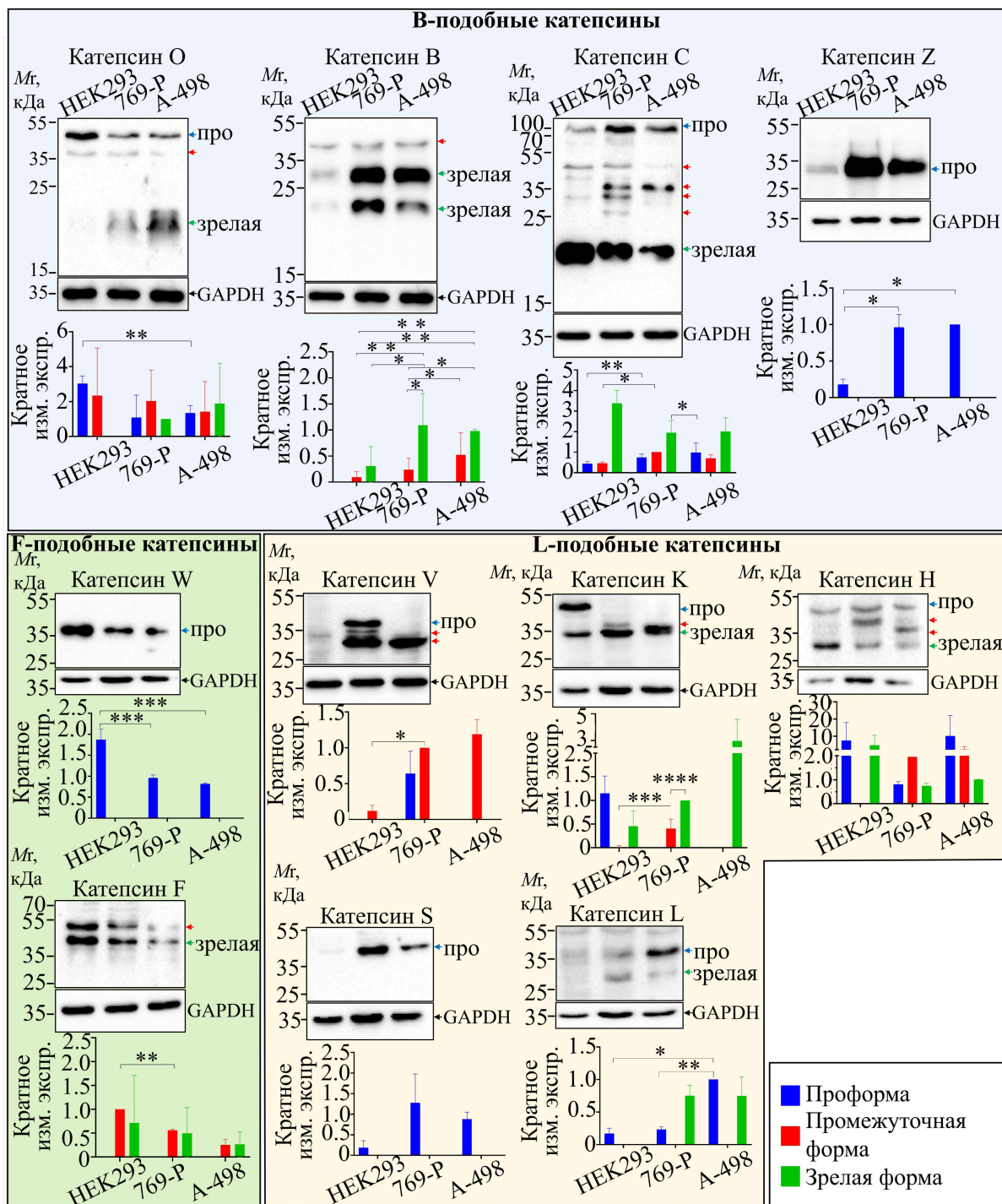


Рисунок 2. Экспрессия цистеиновых катепсинов повышена в опухолевых клетках почки 769-P и A-498. Экспрессию цистеиновых катепсинов анализировали с помощью вестерн-блоттинга в клеточных лизатах. Мембраны окрашивали антителами против 11 цистеиновых катепсинов, а также против GAPDH для количественного контроля нанесения образцов. Про – проформа катепсина, зрелая – зрелая форма катепсина, стрелки без подписей – промежуточные формы катепсинов. Гистограммы представляют результаты

анализа вестерн-блотов (среднее значение и среднеквадратичное отклонение). Все значения интенсивностей сигналов полос белков нормализованы по GAPDH. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Экспрессия катепсинов F-подтипа (F и W) была статистически значимо выше в эмбриональных клетках почки по сравнению с опухолевыми. В опухолевых клетках обнаружены дополнительные промежуточные формы катепсинов V, K, C и H, которые отсутствовали в контрольной линии HEK293.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что, несмотря на конститутивную экспрессию всех 11 цистеиновых катепсинов в исследованных клеточных линиях, уровень их экспрессии и изоформный состав (отражающий этапы созревания) различаются в норме и при опухолевой трансформации. Для опухолевых клеток почки характерна гиперэкспрессия катепсинов V, Z, L, S и B, а также изменение протеолитического процессинга для катепсинов C, O, K и H, что проявляется в изменении соотношения их форм и появлении дополнительных промежуточных изоформ.

На последующем этапе работы проведено исследование внутриклеточной локализации цистеиновых катепсинов в эмбриональных и опухолевых клетках почки методом конфокальной микроскопии (рис. 3). Визуализацию осуществляли с использованием специфических антител, конъюгированных с флуоресцентными красителями; ядра клеток окрашивали красителем DAPI. Установлено, что все цистеиновые катепсины обнаруживаются как в цитоплазме, так и в ядрах эмбриональных и опухолевых клеток. Однако распределение отдельных катепсинов между цитоплазмой и ядром различается. Например, около 90% сигнала катепсина F локализовано в ядре в обоих типах клеток (рис. 4). На основании анализа распределения флуоресцентных сигналов установлено, что преимущественная часть сигнала катепсинов Z, B, O, K и H (более 50% общего сигнала) локализована в ядрах клеток линии 769-P, тогда как в ядрах клеток A-498 преобладают катепсины Z и K.

Распределение сигналов от некоторых цистеиновых катепсинов между цитоплазмой и ядром различалось в эмбриональных и опухолевых клетках. В эмбриональных клетках 49% сигнала катепсина V и 65,15% сигнала катепсина W обнаруживались в ядрах, тогда как в опухолевых клетках доля ядерной локализации катепсина V снижалась до 22,94% в линии 769-P и до 24,76% в линии A-498, а катепсина W — до 16% и 16,46% соответственно.

Анализ распределения катепсинов B, O и Z выявил статистически значимые различия только в одной из опухолевых линий по сравнению с клетками HEK293. В ядрах клеток 769-P уровень катепсина Z снижался с 73,35% до 50,1%, а в клетках A-498 статистически

значимо уменьшалась ядерная локализация катепсина В (с 55,68% до 21,65%) и катепсина О (с 66,92% до 39,88%). При этом распределение сигналов катепсинов S, H, K, L и С между цитоплазмой и ядром в эмбриональных и опухолевых клетках статистически значимо не различалось.

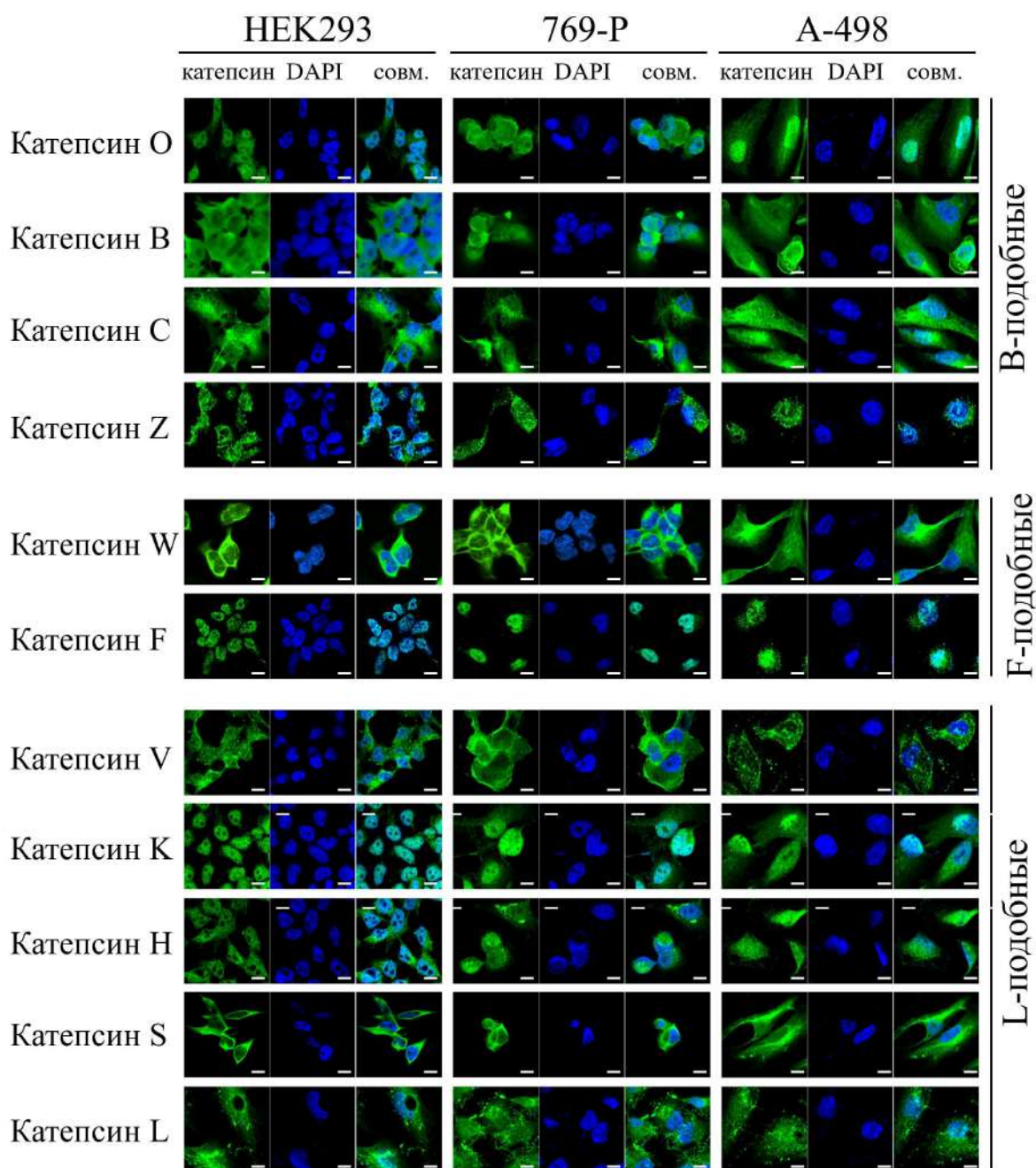


Рисунок 3. Цистеиновые катепсины присутствуют в ядрах и в цитоплазме эмбриональных и опухолевых клеток почки, но в разных соотношениях. Локализацию цистеиновых катепсинов анализировали методом флуоресцентной микроскопии; микрофотографии получены с помощью конфокальной микроскопии. Окрашивание проводили с использованием антител к цистеиновым катепсинам, ядра окрашивали красителем DAPI. Размер масштабной шкалы – 10 мкм. Совм. – совмещённая фотография.

Полученные результаты демонстрируют, что локализация цистеиновых катепсинов не ограничивается цитоплазматическим компартментом. Цистеиновые катепсины присутствуют

в ядрах и цитоплазме как эмбриональных, так и опухолевых клеток почки, однако соотношение их ядерной и цитоплазматической локализации может различаться в зависимости от типа клеток.

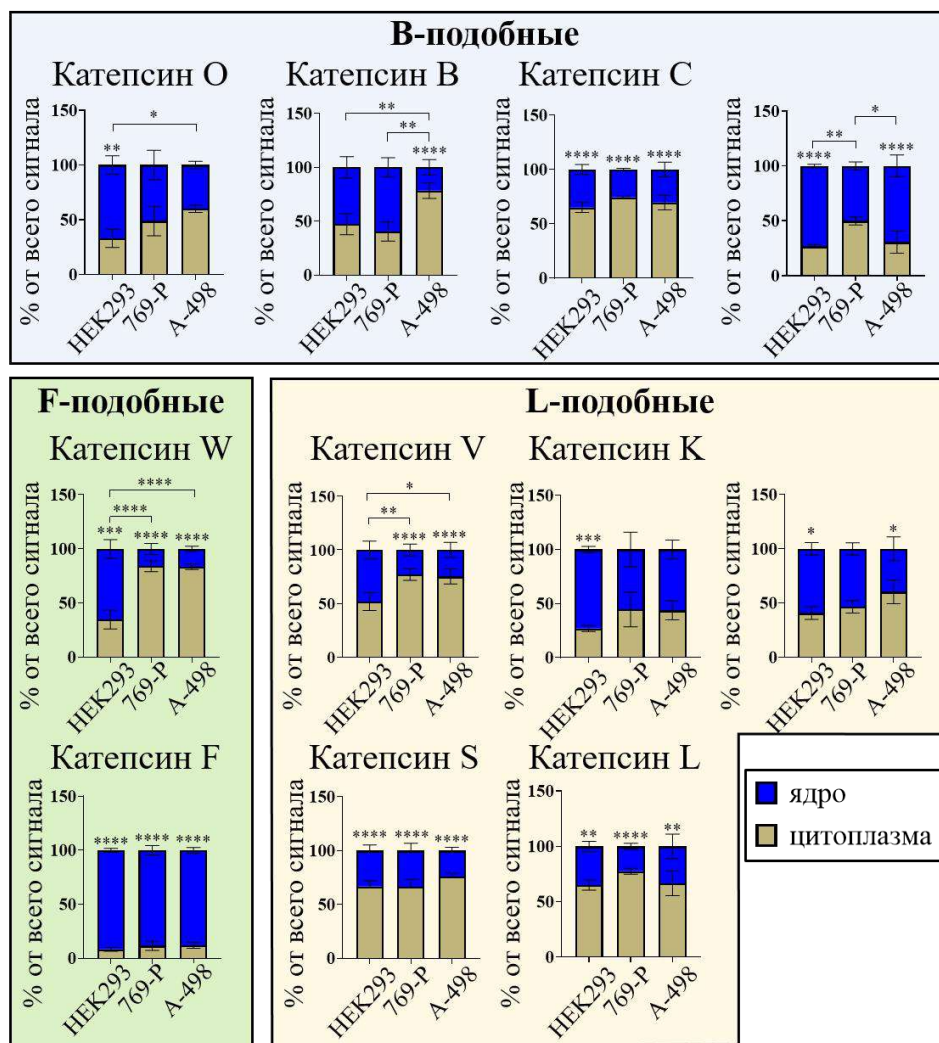


Рисунок 4. Локализация некоторых цистеиновых катепсинов различается между эмбриональными клетками почки HEK293 и опухолевыми клетками почки 769-P и A-498. Результаты обсчёта внутриклеточной локализации В-, F- и L-подобных цистеиновых катепсинов в эмбриональных клетках почки HEK293 и опухолевых клетках почки 769-P и A-498. Представлены соотношения флуоресцентных сигналов от конъюгированных антител, детектируемых в цитоплазме или в ядре (среднее значение и среднеквадратичное отклонение). Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

На последующем этапе исследования методом фракционирования клеточных компонентов и вестерн-блоттинга проведён анализ форм катепсинов, присутствующих в цитоплазматической и ядерной фракциях эмбриональных и опухолевых клеток почки (рис. 5

А,Б). Показано, что катепсины Z, W, V и L обнаруживаются в виде проформ как в цитоплазме, так и в ядрах клеток. Про- и зрелые формы катепсинов K, C, F и H обнаруживались в ядерных фракциях всех трёх клеточных линий. При анализе наличия катепсина S в ядерной фракции эмбриональных клеток выявлялась только его проформа. Катепсин O в зрелой активной форме обнаруживался только в ядерной фракции опухолевых клеток, тогда как в эмбриональных клетках в ядрах присутствовали лишь про- и промежуточная формы. Катепсин B выявлялся в цитоплазматической фракции в виде промежуточной и зрелой форм, тогда как в ядерной фракции присутствовало незначительное количество его промежуточной формы.

Таким образом, в ядрах клеток цистеиновые катепсины представлены всеми формами — от проформ до зрелых ферментов. Состав форм катепсинов O и B в ядерной фракции различается в эмбриональных и опухолевых клетках почки. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что процессы созревания катепсинов в ядерной и цитоплазматической фракциях опухолевых клеток протекают более интенсивно, чем в эмбриональных.

Цистеиновые катепсины характеризуются не только различиями в уровне экспрессии между эмбриональными и опухолевыми клетками почки, но и особенностями внутриклеточной локализации, а также разным характером процессинга в ядерном и цитоплазматическом компартментах. Выявленная в опухолевых клетках гиперэкспрессия катепсинов V, Z, S, L, B, появление дополнительных промежуточных форм и смещение баланса в сторону зрелых активных ферментов, особенно в ядерной фракции, указывают на участие этих протеиназ в поддержании опухолевого фенотипа и регуляции клеточного гомеостаза. При этом остаётся невыясненным, проявляются ли обнаруженные различия в протеолитическом профиле на функциональном уровне, в частности, влияют ли они на чувствительность клеток к противоопухолевым агентам. Для проверки данного предположения в последующем разделе работы оценивали роль цистеиновых катепсинов в ответе клеток на действие противоопухолевых препаратов с использованием специфических ингибиторов данной группы протеиназ.

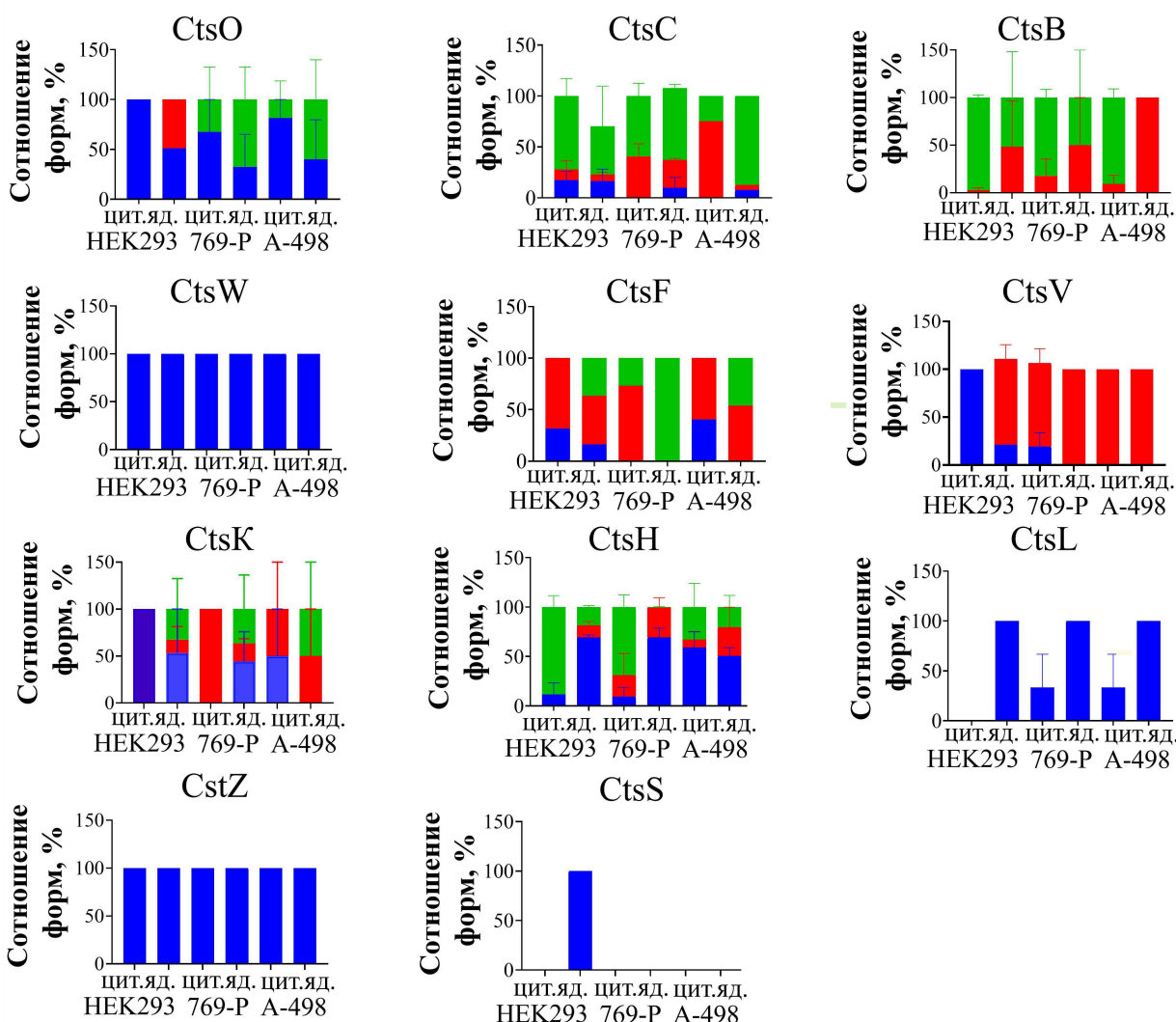
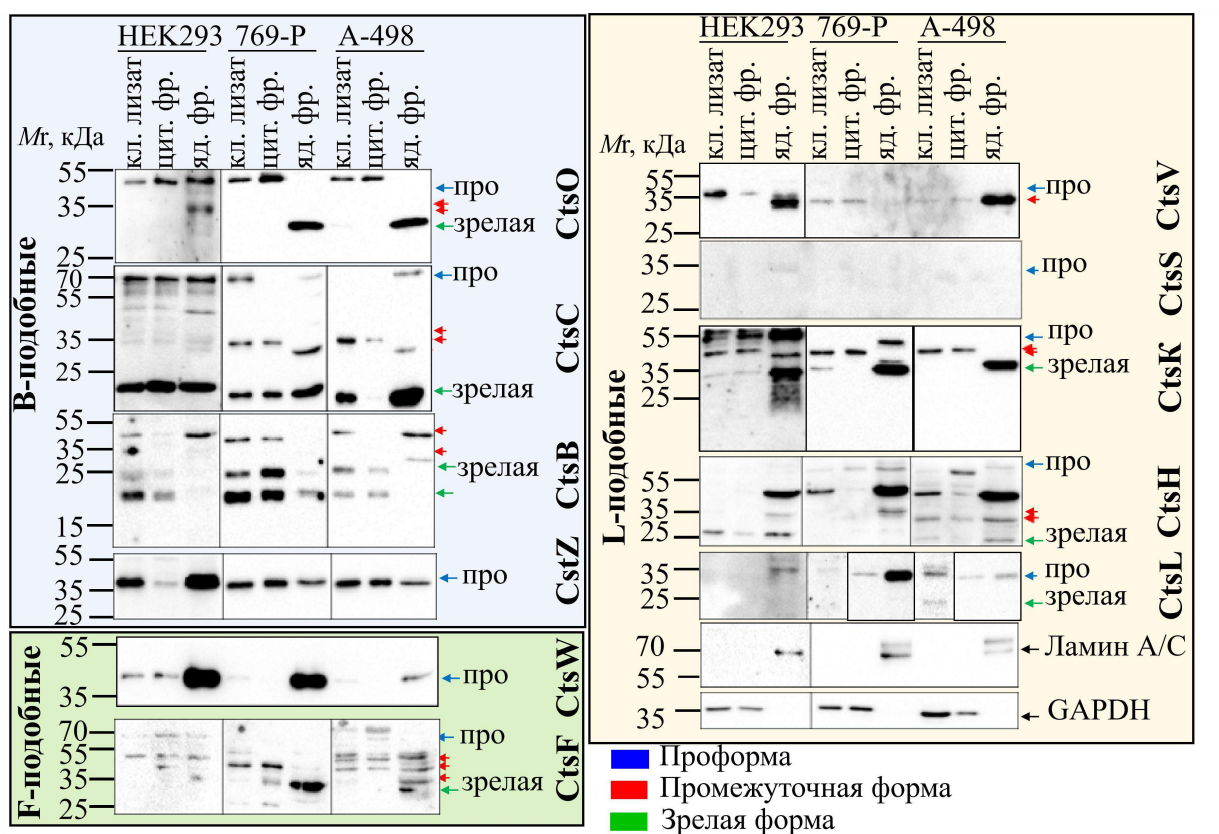


Рисунок 5. Цистеиновые катепсины созревают в опухолевых клетках почки эффективнее, чем в эмбриональных. (А) Анализ клеточных лизатов и клеточных фракций проводили с помощью вестерн-блоттинга. Мембраны окрашивали антителами против 11 цистеиновых катепсинов. Антитела к GAPDH и ламинам А/С использовали для проверки чистоты цитоплазматической и ядерной фракций. Про – проформа катепсина, зрелая – зрелая форма катепсина, стрелки без подписей – промежуточные формы катепсина, кл.лизат – клеточный лизат, цит. – цитоплазматическая фракция, яд. – ядерная фракция. Cts – катепсин. (Б) Гистограммы представляют результаты анализа вестерн-блотов (среднее значение и стандартная ошибка среднего).

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

В работе были использованы два специфических ингибитора цистеиновых катепсинов: ингибитор широкого спектра действия E-64 и новый синтетический пептидный ингибитор Ac-PLVE-FMK, обладающий повышенной селективностью [205]. Поскольку в литературе представлено мало данных об эффективности действия Ac-PLVE-FMK в отношении исследуемых клеточных линий, а активность E-64 может варьировать в зависимости от клеточного контекста, на первом этапе требовалось подобрать рабочие концентрации ингибиторов и подтвердить их способность подавлять протеолитическую активность катепсинов.

Оценку ингибирующей способности указанных соединений проводили на трёх клеточных линиях. Клетки инкубировали с ингибиторами Ac-PLVE-FMK и E-64 в трёх концентрациях (1, 25 и 50 мкМ) в течение 1 часа, после чего добавляли флуорогенный субстрат Ac-QLLR-AMC. Интенсивность флуоресценции, возникающей в результате расщепления субстрата, регистрировали через 10 минут. В качестве контроля использовали диметилсульфоксид (ДМСО) в том же разведении, что и ингибиторы.

Специфический ингибитор цистеиновых катепсинов Ac-PLVE-FMK подавлял активность целевых ферментов уже при концентрации 1 мкМ, при этом эффективность ингибирования возрастала дозозависимым образом (рис. 6). Ингибитор широкого спектра действия E-64 также вызывал снижение активности цистеиновых катепсинов на всех клеточных линиях, начиная с концентрации 1 мкМ. Исключение составили опухолевые клетки почки линии A-498, для которых при низкой концентрации ингибитора E-64 (1 мкМ) не было выявлено статистически значимых различий по сравнению с контролем (ДМСО).

Оба соединения проявили способность дозозависимо подавлять активность цистеиновых катепсинов в живых клетках, что дало основание перейти к анализу их

функциональных эффектов. Гибель клеток определяли методом проточной цитометрии после двойного окрашивания аннексином V, меченным FITC, и пропидия йодидом (PI). Жизнеспособные клетки идентифицировали как аннексин V⁻/PI⁻, клетки на ранней стадии гибели — как аннексин V⁺/PI⁻, на поздней стадии гибели — как аннексин V⁺/PI⁺ и аннексин V⁻/PI⁺. Для оценки влияния ингибиторов на уровень клеточной гибели были выбраны концентрации 1, 10 и 50 мкМ, охватывающие диапазон от минимальной до высокой дозы. Концентрация 25 мкМ, использованная в тесте на активность, была заменена на 10 мкМ для анализа эффектов в области частичного ингибирования.

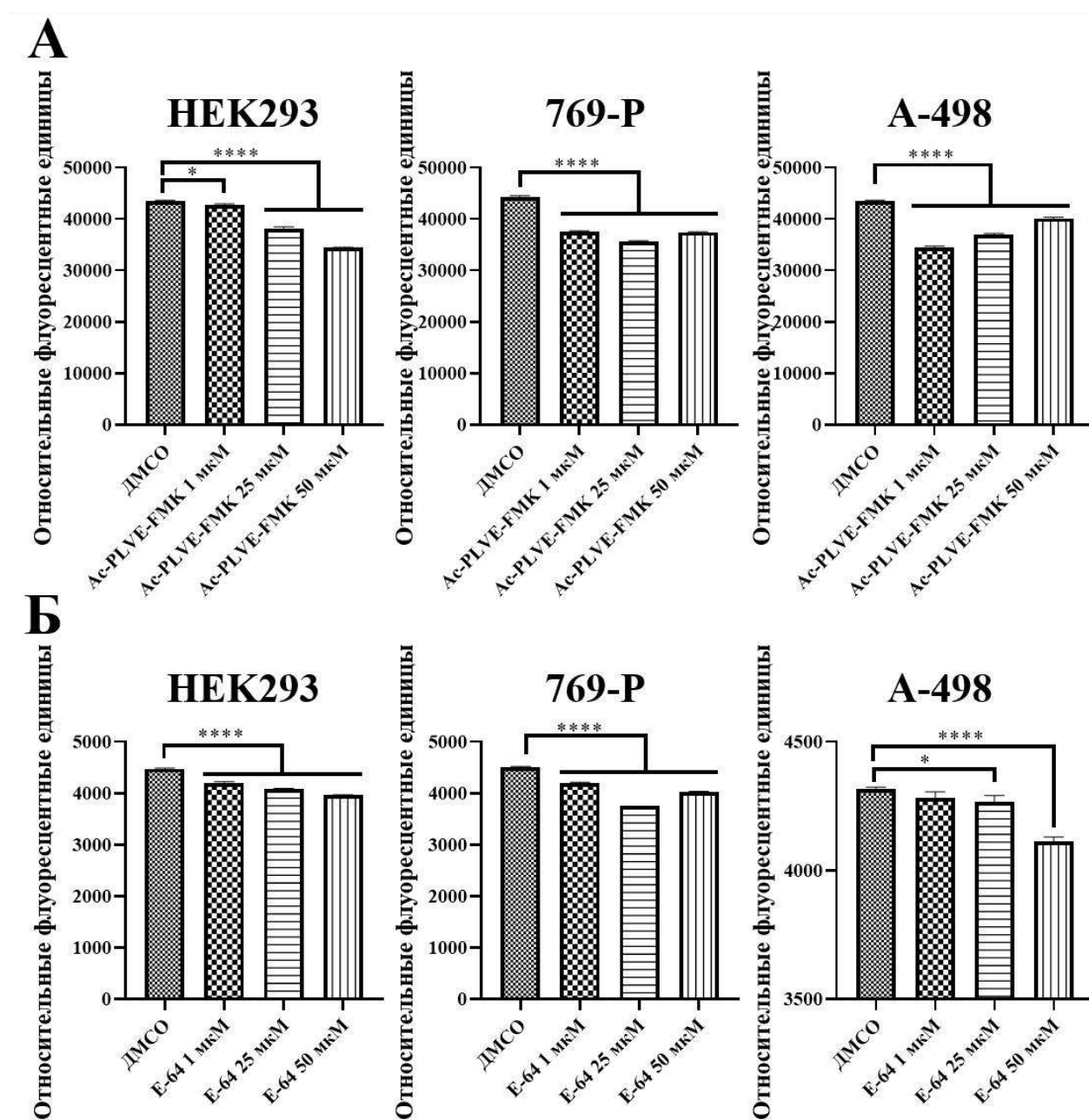


Рисунок 6. Ингибиторы цистеиновых катепсинов Ac-PLVE-FMK и E-64 подавляют протеолитическую активность цистеиновых катепсинов в эмбриональных клетках НЕК293 и опухолевых клетках почки 769-Р и А-498. Оценку протеолитической

активности клеток НЕК293, 769-Р и А-498 проводили с использованием флуорогенного субстрата Ас-QLLR-АМС в отсутствие или в присутствии Ас-PLVE-FMK (А) и Е-64 (Б). Клетки высевали в 96-луночный планшет, инкубировали с ингибиторами в течение 1 часа, затем добавляли флуорогенный субстрат Ас-QLLR-АМС на 10 минут. Интенсивность флуоресценции оценивали на планшетном ридере. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

В эмбриональных клетках линии НЕК293 обработка ингибитором Ас-PLVE-FMK приводила к дозозависимому снижению популяции аннексин V^+/PI^- клеток к 48-му часу инкубации (рис. 7). Доля аннексин V^+/PI^- клеток снижалась с 5,64% в контрольной группе (ДМСО) до 1,66%, 1,41% и 0,63% при концентрациях ингибитора 1, 10 и 50 мкМ соответственно. Ингибитор широкого спектра действия Е-64 также проявлял протекторный эффект, уменьшая долю клеток на ранней стадии гибели до 0,088%, 0,033% и 0,069% при аналогичных концентрациях. Таким образом, в клетках линии НЕК293 оба ингибитора цистеиновых катепсинов предотвращали раннюю стадию клеточной гибели.

В опухолевой клеточной линии почки 769-Р зарегистрированы разнонаправленные эффекты исследуемых соединений. Ингибитор Ас-PLVE-FMK не вызывал снижения популяции аннексин V^+/PI^- клеток по сравнению с контролем. При действии ингибитора Е-64 в концентрации 1 мкМ наблюдалось снижение популяции аннексин V^+/PI^- клеток с 6,67% (контроль ДМСО) до 1,78%. Однако при увеличении концентрации Е-64 до 50 мкМ регистрировалось повышение уровня ранней клеточной гибели до 17,73%.

В другой опухолевой клеточной линии почки А-498 ингибитор Ас-PLVE-FMK подавлял раннюю клеточную гибель во всем диапазоне использованных концентраций: доля аннексин V^+/PI^- клеток снижалась с 8,51% в контроле (ДМСО) до 3,61%, 5,44% и 4,61% при концентрациях 1, 10 и 50 мкМ соответственно. Ингибитор Е-64 вызывал снижение уровня аннексин V^+/PI^- клеток только при минимальной концентрации (1 мкМ) — до 6,66%, тогда как при более высоких концентрациях протекторный эффект отсутствовал. В целом полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень ранней стадии клеточной гибели в эмбриональных клетках НЕК293 в значительной степени зависит от активности цистеиновых катепсинов, тогда как в опухолевых линиях вклад этих протеиназ менее выражен и варьирует в зависимости от типа клеток и природы ингибитора.

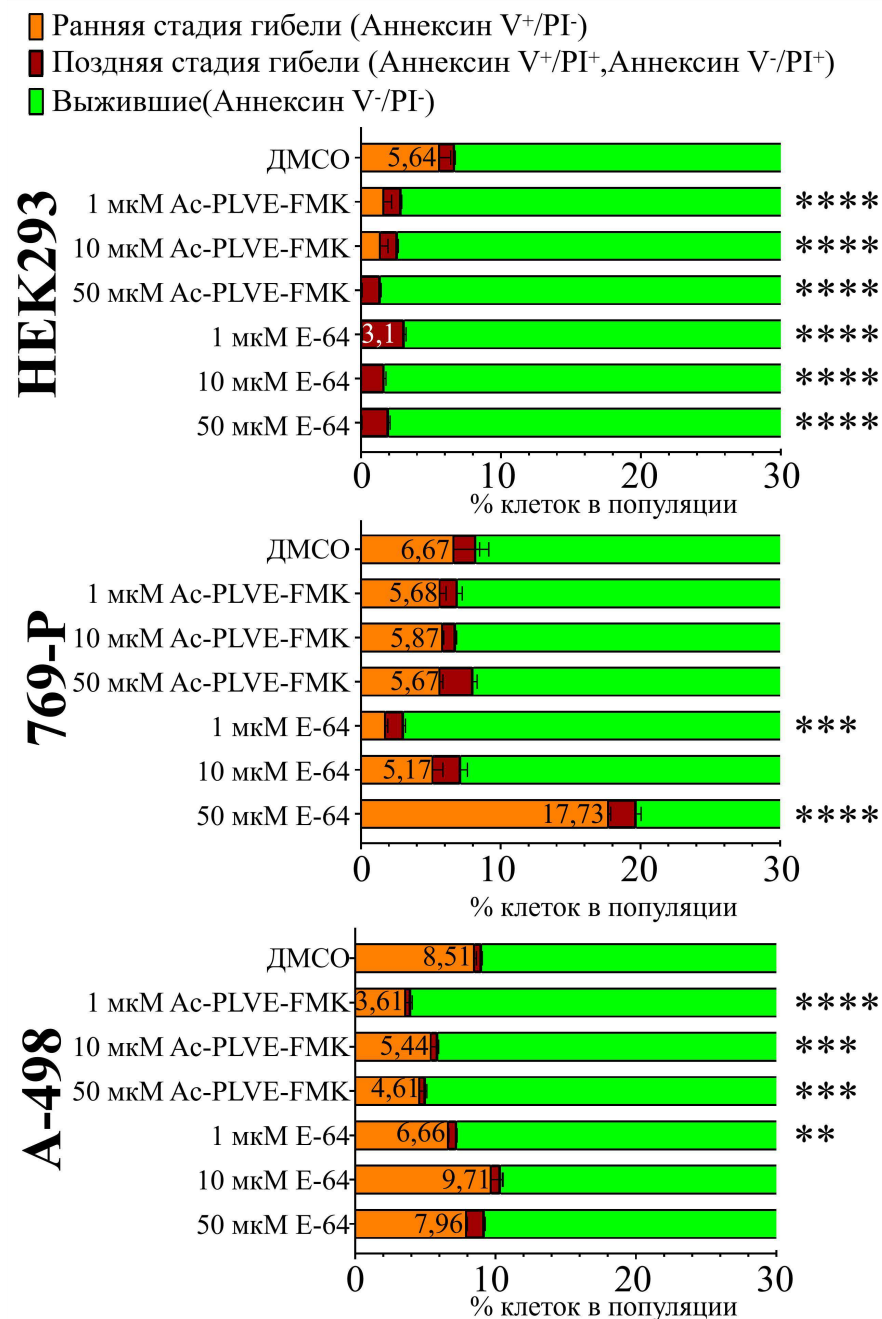


Рисунок 7. Ингибиторы цистеиновых катепсинов подавляют раннюю стадию гибели клеток в эмбриональных клетках почки НЕК293 и в опухолевых клетках почки 769-Р и А-498. Клетки линий НЕК293, 769-Р и А-498 обрабатывали ингибиторами цистеиновых катепсинов Ac-PLVE-FMK и E-64 в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ в течение 48 часов. После инкубации культуральную среду объединяли с клетками, полученную суспензию окрашивали аннексином V, меченным FITC, и пропидия йодидом (PI), после чего анализировали методом проточной цитометрии. На основании распределения флуоресцентных меток выделяли три популяции клеток: выжившие (аннексин V–FITC–/PI–), ранняя стадия клеточной гибели (аннексин V–FITC+/PI–), поздняя стадия клеточной гибели (аннексин V–FITC+/PI+ и аннексин V–FITC–/PI+). Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение; статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

После установления факта, что вклад цистеиновых катепсинов в клеточную гибель различается между эмбриональными и опухолевыми клетками почки, был поставлен вопрос

о степени необходимости активности этих протеиназ для реализации клеточной гибели, запускаемой классическими цитостатиками. Известно, что опухолевые клетки нередко приобретают устойчивость к химиопрепаратам за счёт перестройки внутриклеточных сигнальных путей, в том числе модуляции каскадов клеточной гибели. Для проверки гипотезы об участии катепсинов в ответе на терапевтический стресс использовали камптотецин (СРТ) — ингибитор топоизомеразы I, вызывающий повреждение ДНК и последующую гибель клеток [206]. На первом этапе была проведена оптимизация условий индукции клеточной гибели на клеточных линиях НЕК293, 769-Р и А-498. Клетки обрабатывали СРТ в концентрациях 0,1; 2; 5; 10 и 20 мкМ в течение 24 и 48 часов

После 24 часов инкубации количество жизнеспособных клеток НЕК293 снижалось до 60% при концентрации СРТ 5 мкМ и выше (рис. 8А). При этом жизнеспособность опухолевых клеток 769-Р и А-498 при аналогичных концентрациях не снижалась ниже 70%. Через 48 часов обработки снижение количества живых клеток зависело от концентрации и при высоких дозах препарата составляло не более 40% от контроля. Таким образом, линии почечно-клеточного рака (769-Р и А-498) проявляли более высокую устойчивость к действию СРТ по сравнению с линией НЕК293.

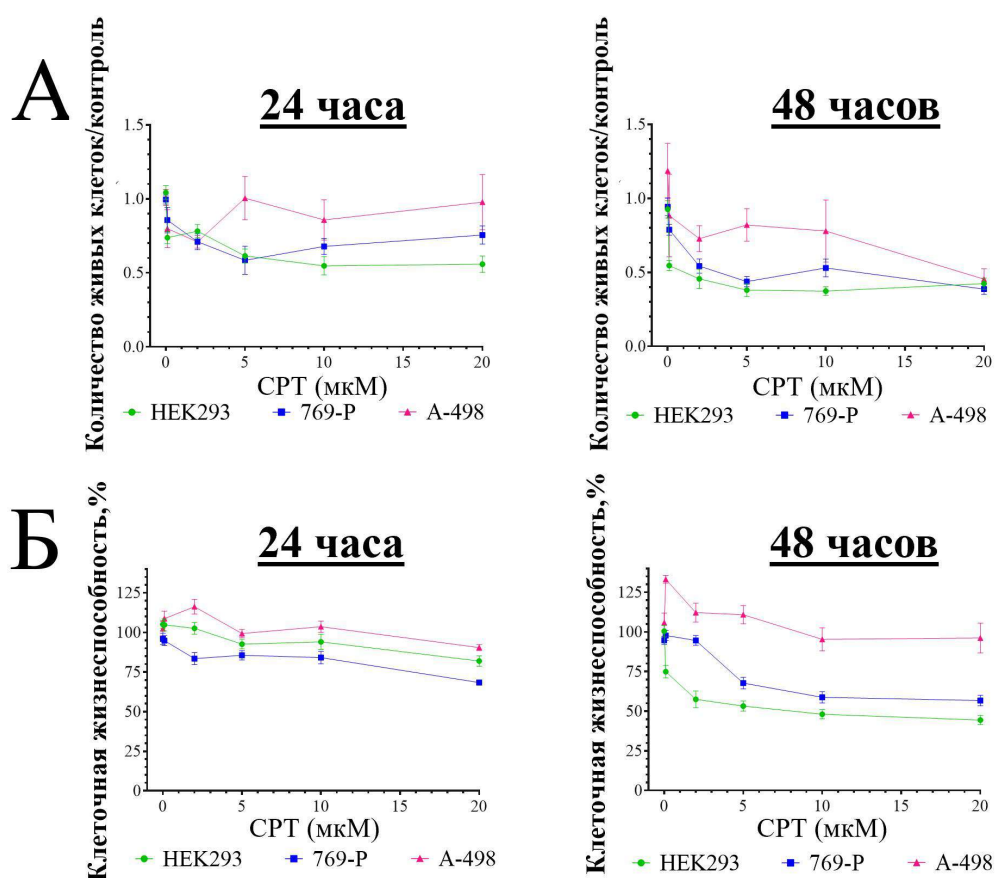


Рисунок 8. Камптотецин (СРТ) вызывает гибель эмбриональных клеток почки НЕК293 и опухолевых клеток почки 769-Р и А-498. Клетки НЕК293, 769-Р и А-498 инкубировали с разными концентрациями камптотецина (от 0,1 до 20 мкМ) в течение 24 и 48

часов. Количество жизнеспособных клеток определяли с помощью окрашивания трипановым синим (А), а жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста (Б) через 24 и 48 часов. Зелёная линия – НЕК293, синяя линия – 769-Р, розовая линия – А-498.

С помощью МТТ-теста установлено, что обработка СРТ приводила к снижению жизнеспособности клеток НЕК293 на 25% через 24 часа и свыше 50% при высоких концентрациях через 48 часов (рис. 8Б). Снижения жизнеспособности не зарегистрировано в клетках А-498, тогда как в клетках 769-Р и НЕК293 зафиксировано уменьшение данного показателя.

Известно, что различные концентрации СРТ способны индуцировать разные типы клеточной гибели. В настоящей работе исследование было направлено на запрограммированную клеточную гибель. Согласно литературным данным, для индукции запрограммированной клеточной гибели с использованием СРТ применяется диапазон концентраций от 0,1 до 50 мкМ.

Для выбора концентрации СРТ проведена оценка доли клеток на ранней и поздней стадиях гибели методом проточной цитометрии с окрашиванием аннексином V-FITC и PI. Установлено, что в диапазоне концентраций СРТ от 0,1 до 10 мкМ доля аннексин V⁺/PI⁻ клеток составляет приблизительно 30% к 48-му часу. Дальнейшее повышение концентрации приводит к снижению количества аннексин V⁺/PI⁻ клеток и увеличению доли клеток на поздней стадии гибели. На основании полученных результатов для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация СРТ 2 мкМ (рис. 9). Анализ клеточных лизатов линий НЕК293, 769-Р и А-498 через 48 часов инкубации с СРТ выявил расщепление антиапоптотического белка Bcl-2 и прокаспазы-3, что является признаком апоптотической клеточной гибели во всех трёх исследованных линиях (рис. 10А). Электрофоретический анализ ДНК также продемонстрировал фрагментацию, характерную для запрограммированной клеточной гибели (рис. 10Б). Полученные данные подтверждаются результатами проточной цитометрии с использованием аннексина V-FITC и PI (рис. 10В). В клетках НЕК293 действие СРТ приводило к появлению 37,13% клеток, находящихся на ранней стадии гибели. В опухолевых клетках почечно-клеточного рака линий 769-Р и А-498 доля аннексин V⁺/PI⁻ клеток составила 42,13% и 29,7% соответственно.

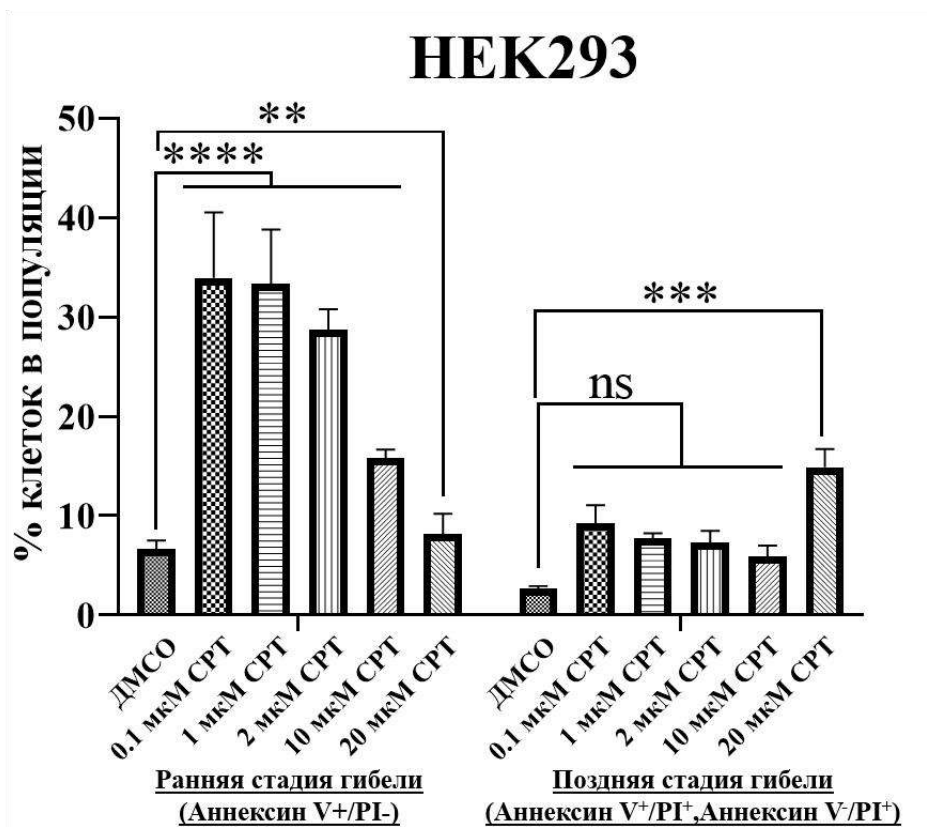


Рисунок 9. Камптотecin (CPT) вызывает запрограммированную клеточную гибель клеток НЕК293 при низких концентрациях. Клетки линии НЕК293 инкубировали с CPT в концентрациях от 0,1 до 20 мкМ в течение 48 часов. После инкубации культуральную среду объединяли с клетками, полученную суспензию окрашивали аннексином V, меченным FITC, и пропидия йодидом, после чего анализировали методом проточной цитометрии. Клетки на ранней стадии гибели идентифицировали как аннексин V–FITC⁺/PI⁻, на поздней стадии гибели – как аннексин V–FITC⁺/PI⁺ и аннексин V–FITC⁻/PI⁺. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение; статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта. * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001, ns – недостоверно.

Для оценки роли цистеиновых катепсинов в CPT-индуцированной клеточной гибели клетки линий НЕК293, 769-P и A-498 предварительно инкубировали с ингибиторами цистеиновых катепсинов Ac-PLVE-FMK и E-64 в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ в течение 3 часов. В качестве контроля классического пути апоптоза во всех экспериментах использовали пан-каспазный ингибитор Z-VAD-FMK в концентрации 50 мкМ.

В клетках НЕК293 на фоне действия CPT количество аннексин V⁺/PI⁻ клеток составляло около 37%. Пан-каспазный ингибитор снижал долю аннексин V⁺/PI⁻ клеток до 1,28% (рис. 11). Оба ингибитора цистеиновых катепсинов во всех использованных концентрациях уменьшали долю аннексин V⁺/PI⁻ клеток приблизительно до 1%.

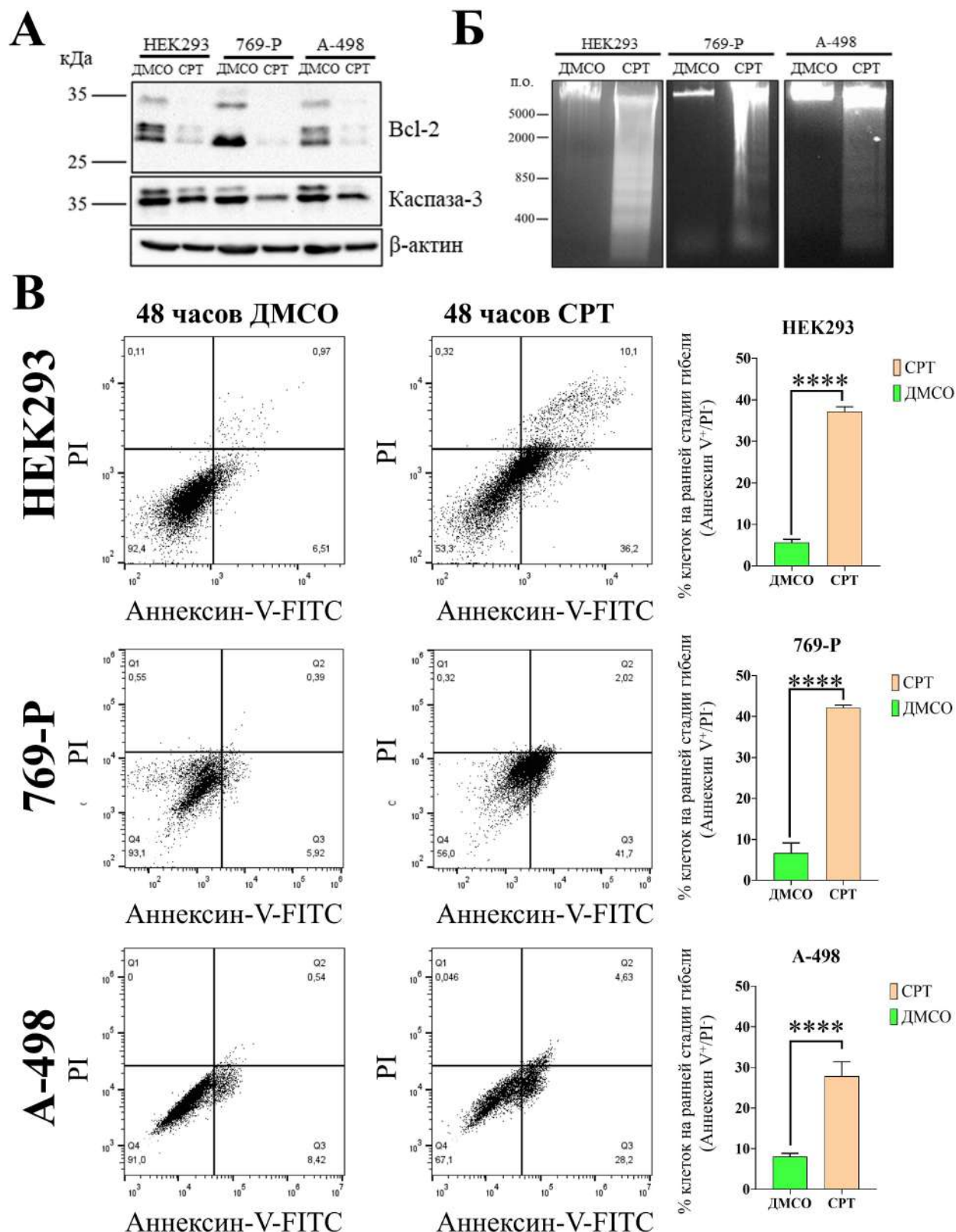


Рисунок 10. Камптотecin (СРТ) вызывает запрограммированную гибель эмбриональных клеток почки НЕК293 и опухолевых клеток почки 769-Р и А-498. Клетки линий НЕК293, 769-Р и А-498 обрабатывали СРТ в концентрации 2 мкМ в течение 48 часов, после чего анализировали маркеры запрограммированной клеточной гибели. (А) Вестерн-блоттинг клеточных лизатов с использованием антител к Bcl-2 и прокаспазе-3. (Б) Агарозный электрофорез ДНК, выделенной из клеток, выявляющий специфическую фрагментацию ДНК. (В) Количественная оценка клеточной гибели методом проточной цитометрии после двойного окрашивания аннексином V, меченным FITC, и PI. Клетки на ранней стадии клеточной гибели идентифицированы как аннексин V–FITC⁺/PI⁻. Данные

представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns – не достоверно.

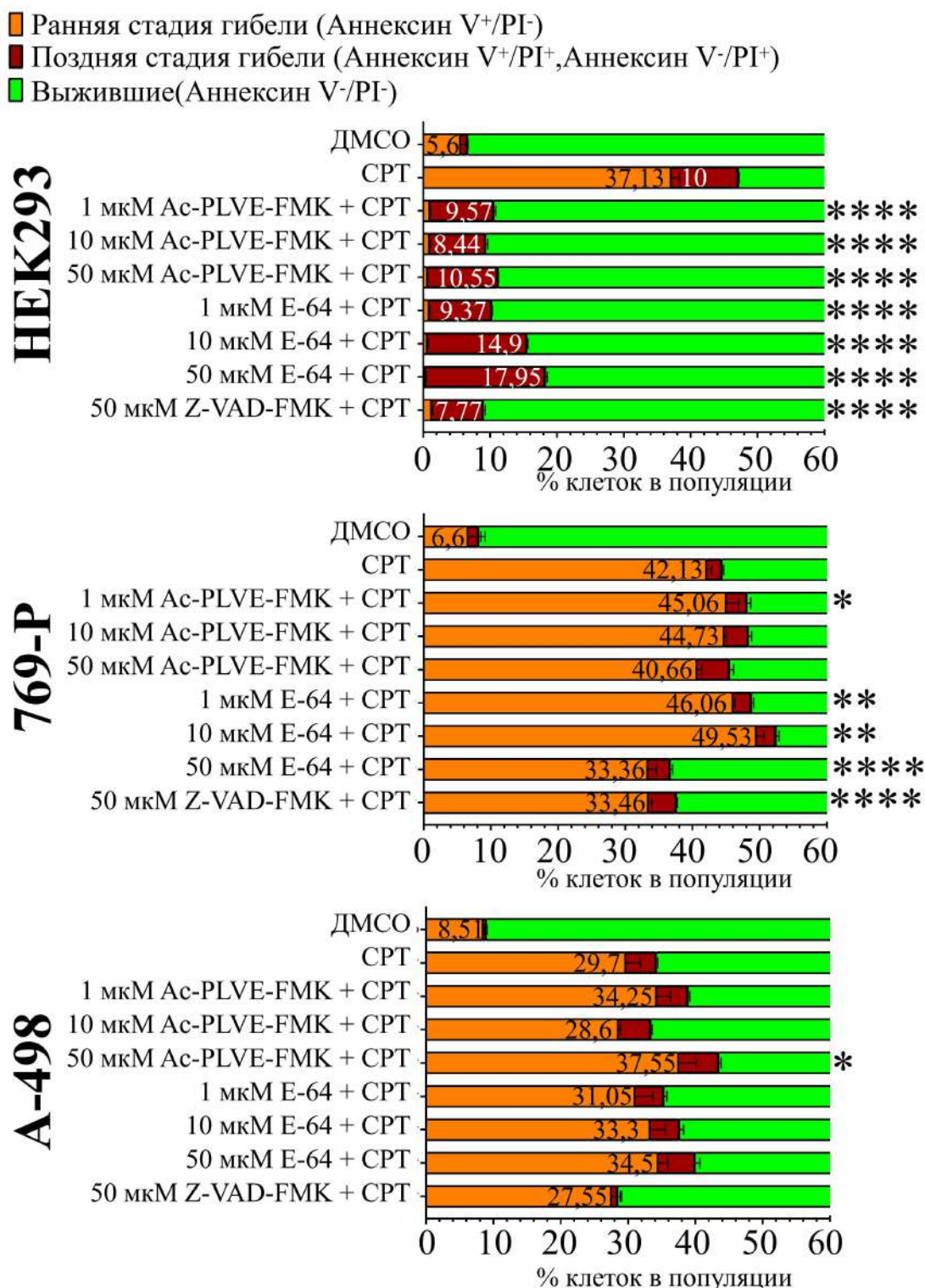


Рисунок 11. Ингибирование цистеиновых катепсинов снижает количество клеток на ранней стадии клеточной гибели, вызванной действием камптотецина (СРТ), в эмбриональных клетках почки HEK293 и опухолевых клетках почки 769-P и A-498. Клетки линий HEK293, 769-P и A-498 обрабатывали 2 мкМ СРТ и ингибиторами цистеиновых катепсинов Ас-PLVE-FMK и E-64 в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ в течение 48 часов. После инкубации культуральную среду объединяли с клетками, полученную

суспензию окрашивали аннексином V, меченным FITC, и PI, после чего анализировали методом проточной цитометрии. На основании распределения флуоресцентных меток выделяли три популяции клеток: выжившие (аннексин V–FITC–, PI–), ранняя стадия гибели (аннексин V–FITC+, PI–), поздняя стадия гибели (аннексин V–FITC+/PI+ и аннексин V–FITC–/PI+). Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта между группой CPT и остальными группами. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns – недостоверно.

В линиях карциномы почки обнаружена устойчивость к ингибированию апоптоза. В клетках 769-P действие пан-каспазного ингибитора приводило к снижению доли аннексин V⁺/PI[–] клеток с 42,13% до 33,46%. В линии 769-P CPT-индуцированная ранняя стадия клеточной гибели характеризовалась ограниченной чувствительностью к ингибированию катепсинов. Статистически значимый протекторный эффект наблюдался только при максимальной концентрации E-64 (50 мкМ), при которой доля аннексин V⁺/PI[–] клеток снижалась до 33,36%. При более низких концентрациях этого ингибитора наблюдалось увеличение доли аннексин V⁺/PI[–] клеток до 49,53%.

В линии A-498 зарегистрирован сходный эффект. Пан-каспазный ингибитор не приводил к снижению доли аннексин V⁺/PI[–] клеток. Ингибиторы цистеиновых катепсинов не влияли на долю аннексин V⁺/PI[–] клеток, которая сохранялась на уровне контроля (около 30%).

Для анализа взаимного влияния между каспазами и цистеиновыми катепсинами использовали комбинированную обработку клеток Z-VAD-FMK и ингибиторами катепсинов. В клетках HEK293 аддитивный эффект отсутствовал, поскольку Z-VAD-FMK полностью подавлял раннюю стадию клеточной гибели (рис. 12).

В опухолевых клетках 769-P комбинация Z-VAD-FMK с высокой концентрацией Ac-PLVE-FMK (50 мкМ) приводила к снижению количества аннексин V⁺/PI[–] клеток до 22,3% по сравнению с действием Z-VAD-FMK (33,46%) или Ac-PLVE-FMK (40,66%) по отдельности. Для ингибитора E-64 аналогичный эффект наблюдался при концентрации 10 мкМ: доля клеток на ранней стадии клеточной гибели снижалась до 29% против 49,53% при действии одного E-64.

В клетках A-498 совместное ингибирование пан-каспазы и цистеиновых катепсинов также приводило к уменьшению доли клеток на ранней стадии клеточной гибели. При комбинации Z-VAD-FMK с Ac-PLVE-FMK в концентрациях 1 и 10 мкМ количество аннексин V⁺/PI[–] клеток снижалось до 14,45% и 9,87% соответственно, тогда как при раздельном применении Z-VAD-FMK этот показатель составлял 27,55%, а Ac-PLVE-FMK — 34,25% (1 мкМ) и 28,6% (10 мкМ). Комбинированное применение Z-VAD-FMK с

ингибитором E-64 приводило к снижению доли клеток на ранней стадии клеточной гибели до 14,15%, 9,97% и 19,65% при увеличении концентрации ингибитора на фоне действия Z-VAD-FMK, в то время как при раздельном применении Z-VAD-FMK количество аннексин V⁺/PI⁻ клеток составляло 27,55%, а E-64 — около 30% во всех концентрациях.

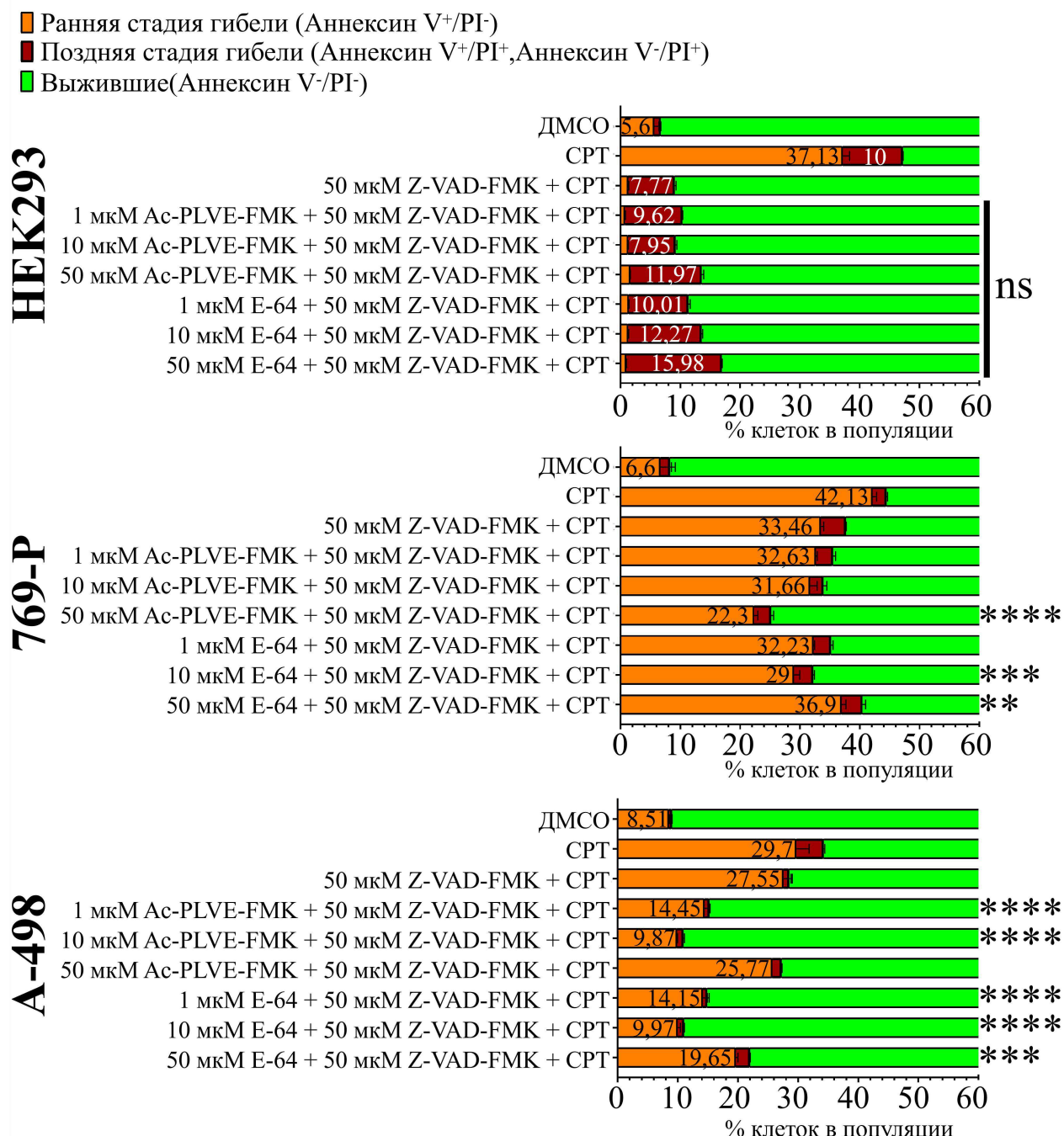


Рисунок 12. Одновременное ингибирование цистеиновых катепсинов и каспаз эффективнее подавляет запрограммированную клеточную гибель, вызванную камптотечином (СРТ), в опухолевых клетках почки человека 769-Р и А-498. Клетки линий НЕК293, 769-Р и А-498 обрабатывали 2 мкМ СРТ, 50 мкМ Z-VAD-FMK и ингибиторами цистеиновых катепсинов Ас-PLVE-FMK и E-64 в концентрациях 1, 10 и 50 мкМ в течение 48 часов. После инкубации культуральную среду объединяли с клетками, полученную суспензию окрашивали аннексином V, меченным FITC, и пропидия йодидом, после чего анализировали методом проточной цитометрии. На основании распределения флуоресцентных меток выделяли три популяции клеток: выжившие (аннексин V–FITC–, PI–),

ранняя стадия гибели (аннексин V-FITC+, PI-), поздняя стадия гибели (аннексин V-FITC+/PI+ и аннексин V-FITC-/PI+). Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта между группой 50 мкМ Z-VAD-FMK и остальными группами. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns – недостоверно.

Таким образом, совокупность полученных данных свидетельствует о том, что цистеиновые катепсины вносят вклад в реализацию запрограммированной клеточной гибели, запускаемой СРТ, причём их роль более выражена в эмбриональных клетках НЕК293 и в меньшей степени — в опухолевых линиях 769-Р и А-498. Наблюдаемый аддитивный эффект при совместном ингибировании каспаз и катепсинов в опухолевых клетках указывает на возможность взаимной компенсации этих двух протеолитических систем в реализации запрограммированной клеточной гибели. Механизм участия катепсинов, являющихся преимущественно лизосомальными ферментами, в эти процессы может быть связан с пермеабиллизацией лизосомальной мембраны (ПЛМ), приводящей к высвобождению активных катепсинов в цитоплазму. Для проверки данного предположения в последующем разделе работы проведён анализ целостности лизосом, динамики протеолитической активности и изменений внутриклеточного рН в ходе камптотецин-индуцированной клеточной гибели.

3.3 При СРТ-индуцированной клеточной гибели в клетках наблюдаются изменения целостности лизосом и активности цистеиновых катепсинов

Для проверки гипотезы о том, что участие цистеиновых катепсинов в СРТ-индуцированной клеточной гибели опосредовано нарушением целостности лизосомальной мембраны, проведена серия экспериментов с использованием лизосомотропного красителя LysoTracker Red, позволяющего детектировать интактные кислые компартменты. Целостность лизосом оценивали в различные временные точки (12, 24, 36 и 48 часов после добавления СРТ). В ходе СРТ-индуцированной клеточной гибели наблюдались изменения локализации и количества лизосом (рис. 13А). В эмбриональных клетках почки НЕК293 уже через 12 часов наблюдалась агрегация лизосом с образованием более крупных структур. В дальнейшем, начиная с 24 часов и достигая максимума к 48 часам, зарегистрировано снижение количества и интенсивности сигнала лизосом.

В опухолевых клетках линий 769-Р и А-498 наблюдалась сходная последовательность событий. Агрегация лизосом в этих клетках регистрировалась позднее (около 24 часов) и в меньшей степени по сравнению с линией НЕК293. После 36 часов инкубации с СРТ также отмечалось снижение интенсивности сигнала лизосом. Снижение интенсивности окрашивания лизосом было более выраженным в клетках А-498.

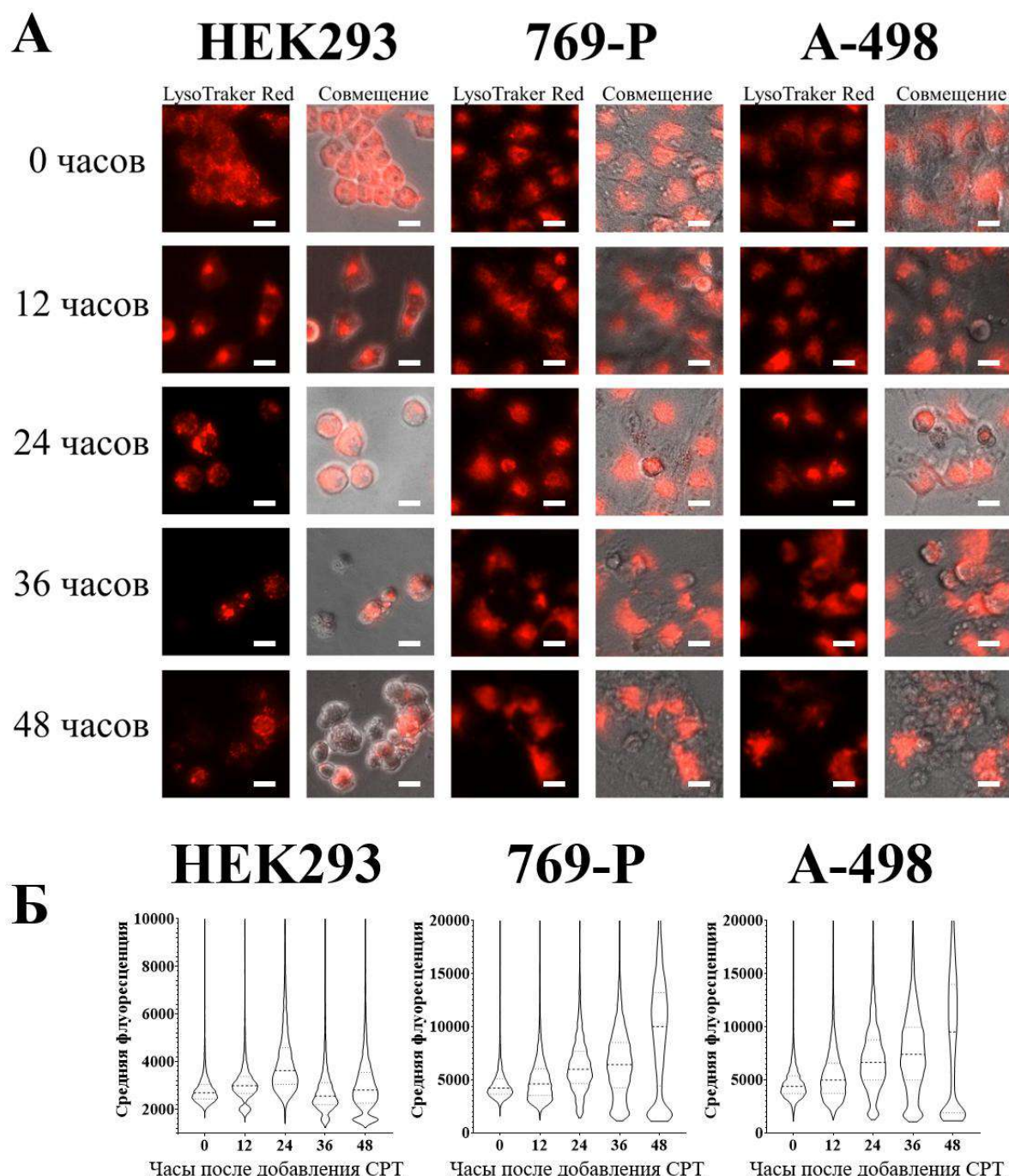


Рисунок 13. Целостность лизосом нарушается при камптотecin (СРТ)-индуцированной клеточной гибели. Клетки линий НЕК293, 769-Р и А-498 инкубировали с СРТ (2 мкМ) в течение 12, 24, 36 и 48 часов, после чего окрашивали LysoTracker Red (30 минут) и анализировали методом флуоресцентной микроскопии. (А) Репрезентативные микрофотографии клеток. Размер масштабной шкалы – 10 мкм. (Б) Графики, отражающие среднюю интенсивность флуоресценции LysoTracker Red.

Анализ средней интенсивности флуоресценции лизосом выявил её увеличение к 24-му часу, что, вероятно, обусловлено накоплением красителя внутри агрегированных структур (рис. 13Б). Однако к 48-му часу во всех клеточных линиях появлялась популяция клеток с низкой интенсивностью сигнала. Более выраженное снижение зарегистрировано в опухолевых клетках почечно-клеточного рака линий 769-Р и А-498.

На следующем этапе проведена оценка изменений интенсивности сигнала лизосом в клетках, находящихся на СРТ-индуцированной ранней стадии клеточной гибели. Через 48 часов инкубации с СРТ лизосомы окрашивали красителем LysoTracker Blue, после чего клетки метили аннексином V-FITC и PI для идентификации клеток на ранней стадии гибели.

В общей популяции жизнеспособных клеток и клеток на ранней стадии гибели линии НЕК293 на 48-й час инкубации с СРТ наблюдалось снижение пика интенсивности сигнала лизосом (рис. 14А). Доля клеток в субпопуляции с низким уровнем флуоресценции лизосом LysoBlue^{min} увеличивалась с 1,5% до 26,5% (рис. 14Б). В субпопуляции с высоким уровнем флуоресценции LysoBlue^{max} происходило снижение средней интенсивности флуоресценции до ~3200.

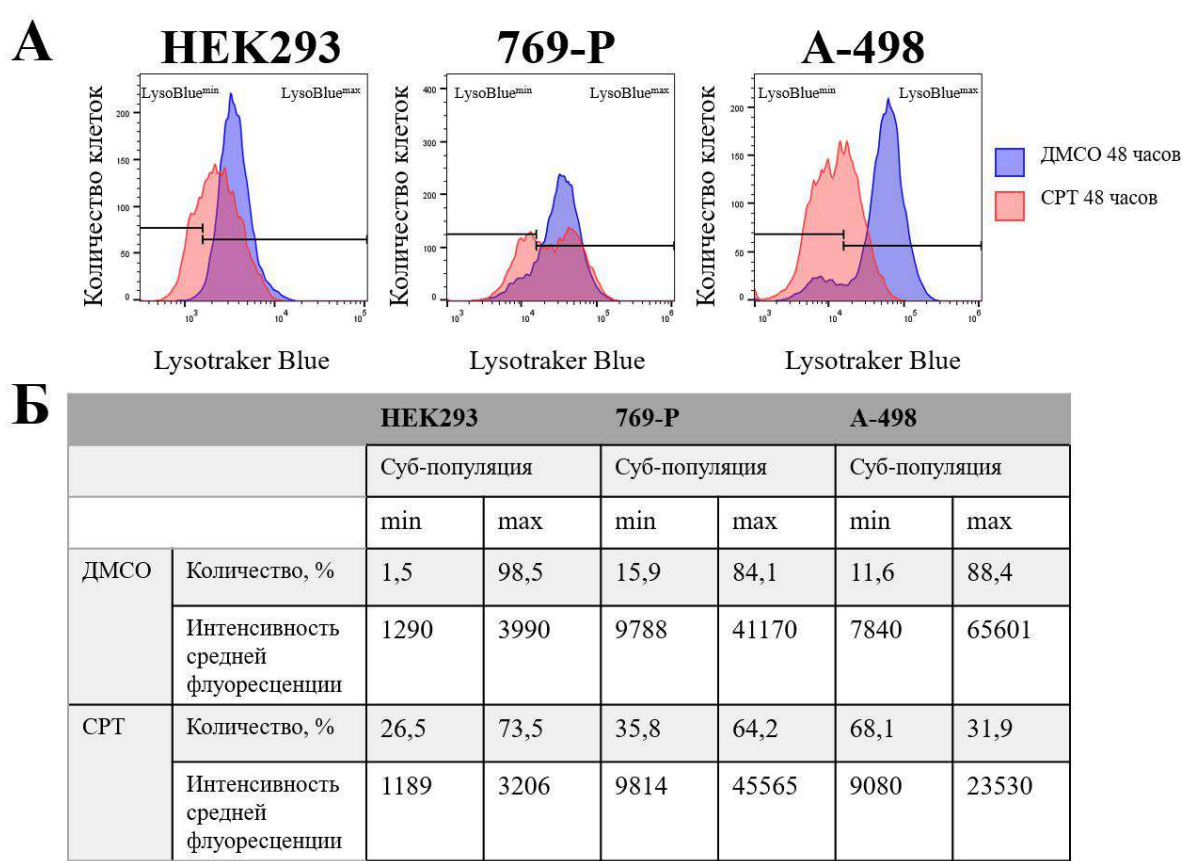


Рисунок 14. Целостность лизосом снижается при запрограммированной клеточной гибели, вызванной действием камптотецина (СРТ). Клетки линий НЕК293, 769-Р и А-498 инкубировали с СРТ (2 мкМ) в течение 48 часов. Контрольные клетки обрабатывали ДМСО. После инкубации клетки окрашивали LysoTracker Blue в течение 30 мин, затем собирали клетки вместе с культуральной средой и проводили двойное

окрашивание аннексином V–FITC и PI. Интенсивность флуоресценции лизосом анализировали методом проточной цитометрии в популяции клеток на ранней стадии клеточной гибели (аннексин V–FITC⁺/PI⁻). (А) Гистограммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции LysoTracker Blue в фракции клеток на ранней стадии клеточной гибели после обработки ДМСО (контроль) и СРТ. (Б) Количественная оценка популяций клеток с низкой (LysoBlue^{min}) и высокой (LysoBlue^{max}) интенсивностью лизосомальной флуоресценции, а также значения средней интенсивности флуоресценции в каждой популяции клеток.

В опухолевых клетках 769-Р при действии СРТ доля клеток в субпопуляции LysoBlue^{min} увеличивалась до 35%, однако в субпопуляции LysoBlue^{max} наблюдалось увеличение средней интенсивности флуоресценции с ~41000 до ~45000. В опухолевых клетках А-498 пик интенсивности сигнала в клетках, обработанных СРТ, снижался: доля клеток в субпопуляции LysoBlue^{min} возрастала до 68,1%, а средняя интенсивность флуоресценции в субпопуляции LysoBlue^{max} снижалась с ~65000 до ~23000.

Для прямого подтверждения изменений целостности лизосом проведено иммунофлуоресцентное окрашивание клеток через 48 часов инкубации с СРТ на белок мембраны лизосом LAMP-1 и цистеиновый катепсин В (рис. 15). Установлено, что распределение сигнала LAMP-1 изменяется при СРТ-индуцированной клеточной гибели: лизосомы распределены в клетке более диффузно, а их количество снижено по сравнению с контролем (ДМСО). Локализация катепсина В также претерпевает изменения: его распределение становится более диффузным, наблюдается сокращение областей интенсивной колокализации с лизосомами. Наиболее выраженный эффект зарегистрирован в клетках А-498, что согласуется с ранее полученными данными проточной цитометрии.

Полученные данные свидетельствуют о том, что при СРТ-индуцированной клеточной гибели в эмбриональных и опухолевых клетках почки происходит нарушение целостности лизосом и высвобождение цистеиновых катепсинов (на примере катепсина В) в цитоплазму клеток.

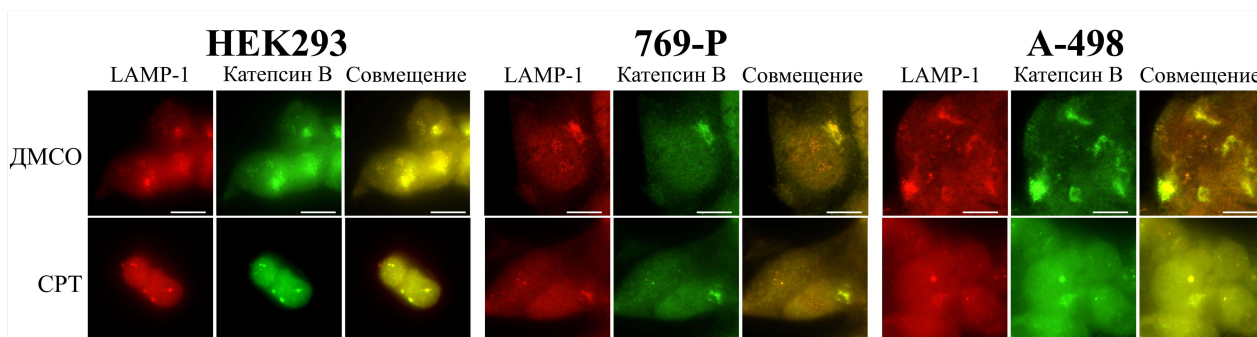


Рисунок 15. При запрограммированной клеточной гибели, вызванной действием камптотецина (СРТ), мембрана лизосом повреждается и цистеиновый катепсин В выходит в цитоплазму клеток. Клетки линий HEK293, 769-Р и А-498 инкубировали с СРТ (2 мкМ) в течение 48 часов. Контрольные клетки обрабатывали ДМСО. Целостность лизосом и выход цистеиновых катепсинов определяли методом иммуноцитохимии. Клетки

окрашивали антителами к лизосомальному белку LAMP-1 и цистеиновому катепсину В. Масштабная линейка – 5 мкм.

Функциональную активность катепсинов в ходе СРТ-индуцированной ранней стадии клеточной гибели оценивали по гидролизу флуорогенного субстрата Ас-QLLR-АМС, специфичного для цистеиновых катепсинов.

В эмбриональных клетках НЕК293 зарегистрировано снижение протеолитической активности в период с 24 до 36 часов, достигавшее 30% от контрольного уровня (рис. 16). К 48 часам активность возвращалась к исходному уровню. В опухолевых клетках 769-Р и А-498 снижение активности цистеиновых катепсинов также наблюдалось через 24 часа после обработки СРТ. В последующие часы в клетках 769-Р активность возвращалась к исходному уровню, тогда как в клетках А-498 к 48-му часу регистрировалось увеличение активности цистеиновых катепсинов.

Поскольку изменение активности цистеиновых катепсинов может зависеть от внутриклеточного рН, был проведён анализ рН с использованием рН-чувствительного красителя рНRodo. В клетках НЕК293 на раннем этапе (12 часов) наблюдалось снижение внутриклеточного рН. К 36-му часу происходило повышение рН, а к 48 часам рН снова снижался. В опухолевых клетках 769-Р и А-498 выявлены иные изменения: к 12-му часу в клетках происходило повышение внутриклеточного рН, а затем, начиная с 36 часов, отмечалось его снижение. Динамика изменения внутриклеточного рН была более значительной в клетках А-498.

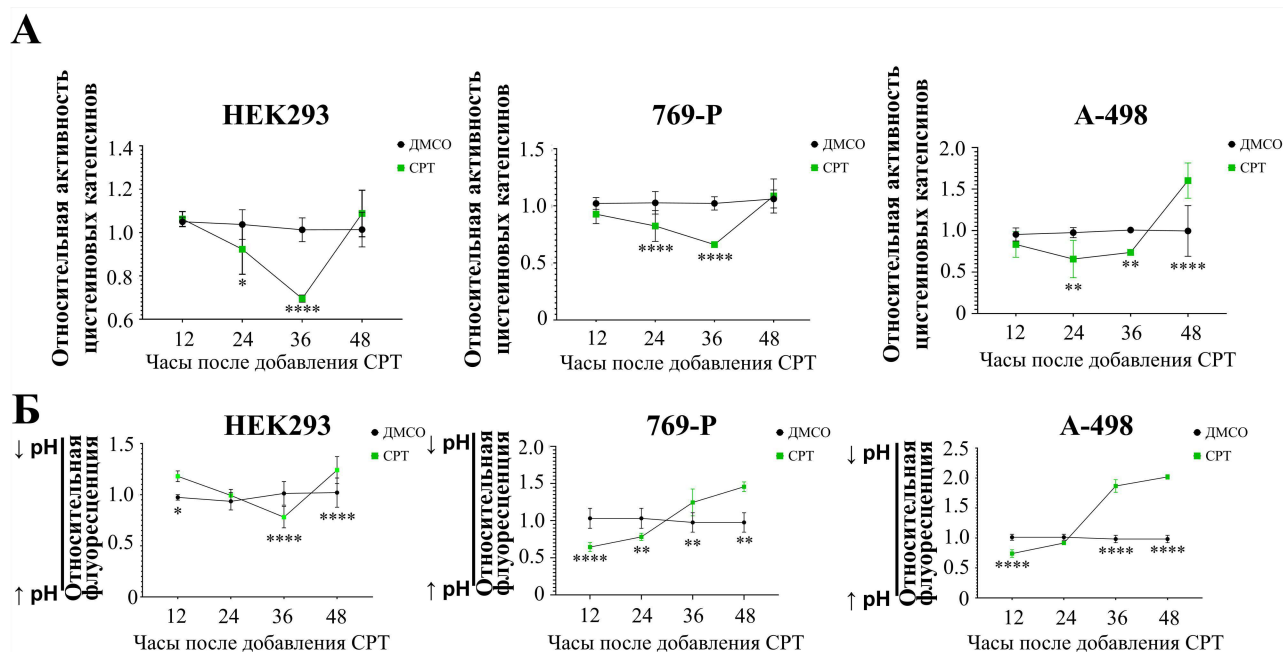


Рисунок 16. Активность цистеиновых катепсинов изменяется вместе с внутриклеточным рН в клетках при запрограммированной клеточной гибели, вызванной действием камптотецина (СРТ). Клетки инкубировали с СРТ (2 мкМ) в течение 12, 24, 36 и 48 часов. (А) Протеолитическую активность оценивали по расщеплению

флуорогенного субстрата Ac-QLLR-AMC, который добавляли к клеткам на 10 минут в каждый указанный временной интервал. (Б) Цитоплазматический pH определяли с использованием pH-чувствительного красителя pHRodo, добавляемого к клеткам на 10 минут в соответствующие временные точки. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Полученные данные демонстрируют, что СРТ вызывает нарушение целостности лизосом и высвобождение катепсинов в цитоплазму, однако эти наблюдения не позволяют ответить на вопрос о том, происходит ли протеолитическая активация представителей данного семейства в ходе запрограммированной клеточной гибели. Известно, что превращение проформы катепсина в зрелую активную форму является ключевым этапом, определяющим его функциональную состоятельность. Кроме того, ранее было показано, что опухолевые клетки характеризуются изменённым профилем созревания ряда катепсинов по сравнению с эмбриональными. В связи с этим на последующем этапе проведено детальное исследование изменений экспрессии и изоформного состава всех 11 цистеиновых катепсинов в динамике СРТ-индуцированной клеточной гибели.

В эмбриональных клетках НЕК293 большинство исследованных цистеиновых катепсинов характеризуются стабильностью экспрессии и отсутствием устойчивой активации (рис. 17, 18). Для катепсинов О, В, W и F значимых изменений содержания проформ, промежуточных и зрелых форм не зафиксировано. Для катепсинов С, L и Н зарегистрированы временные изменения, носящие обратимый характер: уровень зрелой формы катепсина С снижается в ранние сроки, однако впоследствии возвращается к исходным значениям; для катепсина L характерно разнонаправленное изменение промежуточной и зрелой форм. В целом в эмбриональных клетках не происходит накопления активных форм ферментов, что может свидетельствовать о контроле протеолитического каскада и ограниченном участии цистеиновых катепсинов в раннюю стадию клеточной гибели нормальных клеток.

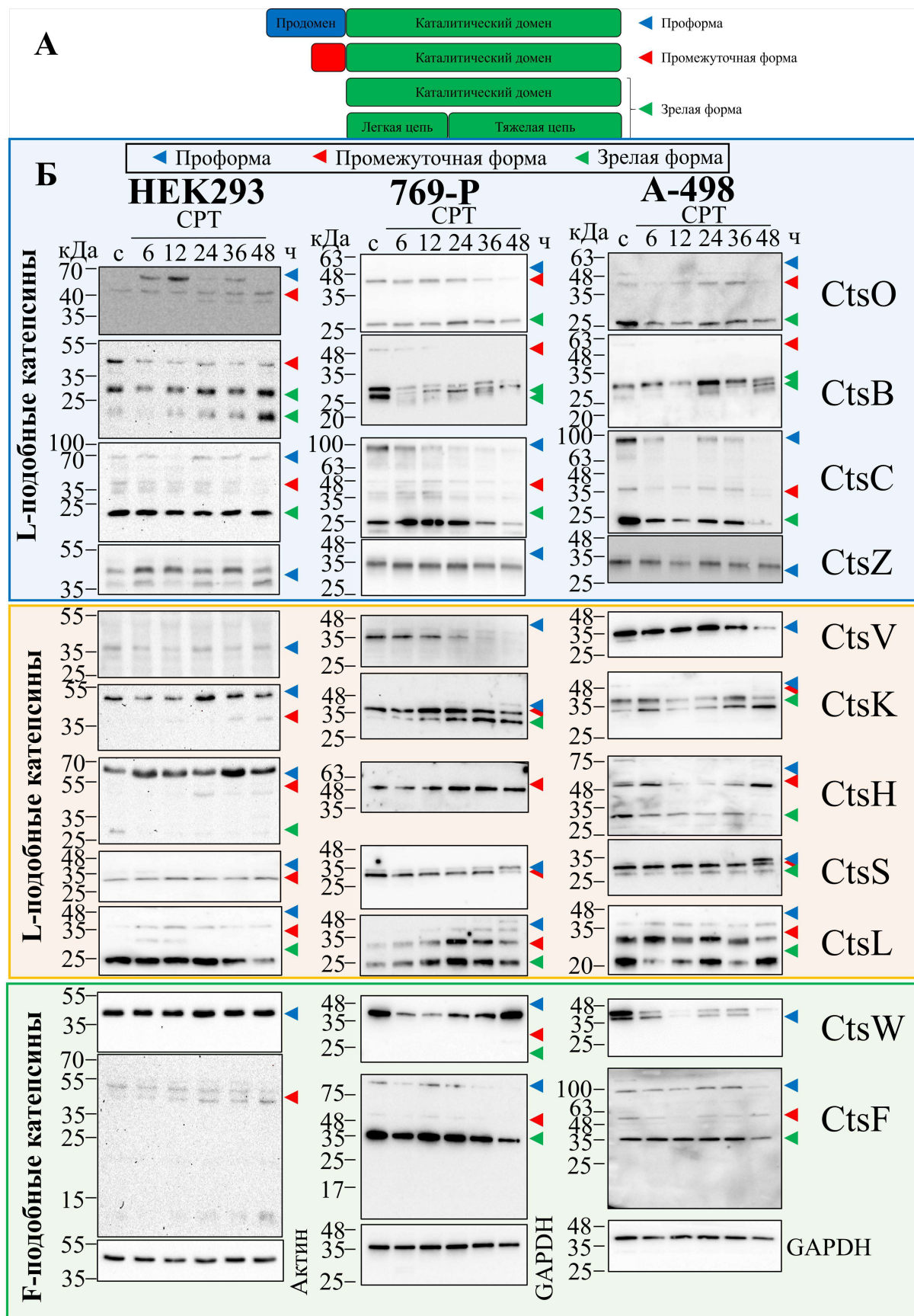


Рисунок 17. Цистеиновые катепсины процессируются при запрограммированной клеточной гибели, вызванной камптотецином (CPT). (А) Схематическое изображение структуры цистеиновых катепсинов. Белок синтезируется в неактивной проформе вместе с продоме́ном (синяя стрелка). При активации происходит отщепление продоме́на. При частичном отщеплении продоме́на образуются промежуточные формы (красная стрелка).

Полное отщепление продомена приводит к образованию зрелой формы катепсина (зелёная стрелка). (Б) Вестерн-блоттинг цистеиновых катепсинов при запрограммированной клеточной гибели, индуцированной СРТ. Экспрессию цистеиновых катепсинов анализировали через 6, 12, 24, 36 и 48 часов с помощью вестерн-блоттинга в клеточных лизатах. Мембраны окрашивали антителами против 11 цистеиновых катепсинов, а также против GAPDH и β -актина для количественного контроля нанесения образцов. Cts – катепсин.

В опухолевых клетках выявлены изменения процессинга катепсинов, причём характер изменений различается между линиями 769-Р и А-498. По направленности изменений можно выделить несколько групп ферментов. Первую группу составляют катепсины В и О, для которых в обеих опухолевых линиях характерно снижение содержания промежуточных и зрелых форм без компенсаторного накопления активного белка. Это может указывать на ингибирование их созревания или усиленную деградацию в условиях ранней стадии клеточной гибели.

Ко второй группе относятся катепсины, процессинг которых активируется в опухолевых клетках. К ним относятся катепсины К, L и Н. В линии 769-Р увеличение проформы катепсина К сопровождается ростом всех форм, тогда как в клетках А-498 снижение уровня про- и промежуточной формы сочетается с увеличением зрелой формы. Для катепсина L в обеих линиях характерно возрастание количества промежуточной и зрелой форм в поздние сроки (36–48 часов), а для катепсина Н – накопление промежуточной формы в линии 769-Р и процессинг на протяжении всего эксперимента в линии А-498. Подобная активация позволяет предположить участие цистеиновых катепсинов в процессах СРТ-индуцированной гибели в опухолевых клетках.

Отдельную группу составляют катепсины с разнонаправленной динамикой в двух линиях почечно-клеточного рака. Для катепсина W проформа в клетках 769-Р сначала снижается, а затем возрастает к 48 часам, тогда как в А-498 наблюдается её динамическое снижение. Катепсин С в линии 769-Р характеризуется снижением про- и промежуточной форм, в то время как в А-498 уменьшаются все три формы белка. Катепсин F подвергается изменениям преимущественно в клетках А-498, где его промежуточная форма снижается в ранние часы с последующим восстановлением к 48 часам. Подобная гетерогенность может отражать индивидуальные молекулярные особенности опухолевых линий, которые способны влиять на чувствительность к химиотерапевтическому воздействию.

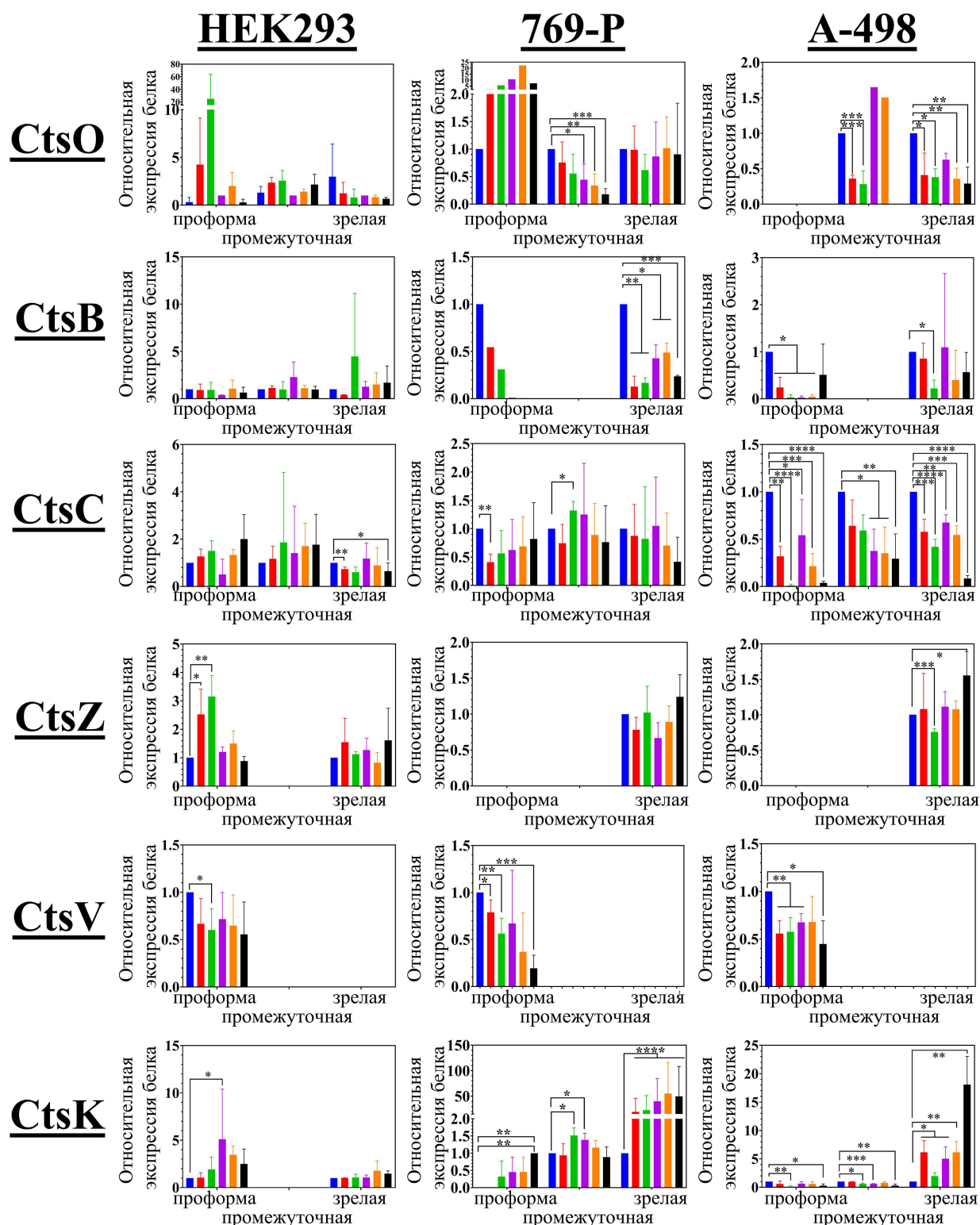
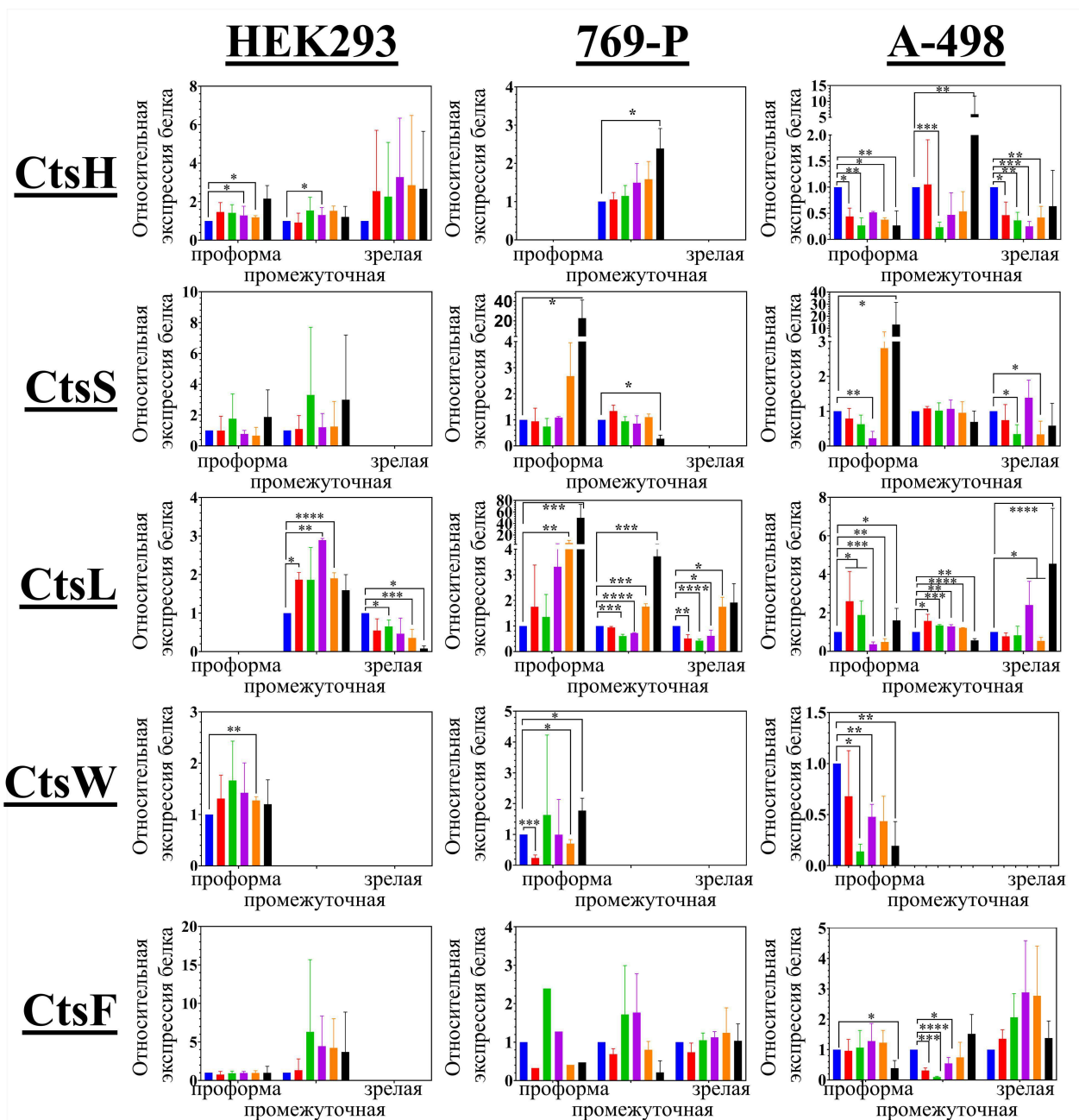


Рисунок 18. В опухолевых клетках наблюдается повышенный уровень процессинга цистеиновых катепсинов при запрограммированной клеточной гибели, индуцированной камптотецином (CPT). Гистограммы представляют результаты анализа вестерн-блотов (среднее значение и средноквадратичное отклонение). Все значения интенсивностей сигналов полос белков нормализованы по GAPDH или β -актину. Cts – катепсин. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение; статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.**



Продолжение рисунка 18.

Помимо различий, выявлены и сходные для обеих опухолевых линий тенденции. В клетках 769-P и A-498 зафиксировано снижение экспрессии катепсина V, а также отсутствие накопления зрелой формы катепсина В при одновременном уменьшении его предшественников. Эти данные позволяют рассматривать указанные ферменты в качестве потенциальных мишеней для опухоль-ассоциированных механизмов регуляции протеолиза.

Анализ временной динамики продемонстрировал, что изменения процессинга в опухолевых клетках часто носят двухфазный характер. На ранних этапах (6–12 часов) преимущественно наблюдается снижение проформ и промежуточных форм, что может быть связано с быстрой активацией протеиназ или их временным ингибированием. В поздние сроки (24–48 часов) происходит восстановление или накопление зрелых форм, что

согласуется с представлениями о роли лизосомальных ферментов на поздних стадиях ранней клеточной гибели. В эмбриональных клетках временная динамика выражена слабее, и большинство показателей возвращаются к исходному уровню к 48 часам, что отражает более эффективное поддержание протеолитического гомеостаза.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о различиях в регуляции процессинга цистеиновых катепсинов при СРТ-индуцированной клеточной гибели в нормальных и опухолевых клетках. В эмбриональных клетках НЕК293 процессы созревания катепсинов контролируются и не приводят к устойчивой активации ферментов. В опухолевых линиях 769-Р и А-498, напротив, выявлены изменения процессинга, среди которых особого внимания заслуживают катепсины К, L, Н как кандидаты, ассоциированные с активацией протеолиза при клеточной гибели, вызываемой СРТ, а также катепсины В, О и V, подавление которых может отражать адаптивные механизмы, способствующие выживанию трансформированных клеток в условиях стресса.

Несмотря на то, что низкомолекулярные соединения остаются стандартом терапии онкологических заболеваний, в современной онкотерапии всё более широкое применение находят иные формы химиопрепаратов — не свободные молекулы, а наноразмерные частицы, в которых цитостатический препарат заключён внутри белковой или мембранной оболочки. Такие конструкции представляют собой новый вид терапевтических агентов, обеспечивающих направленную доставку вещества в клетку и его пролонгированное высвобождение. В отличие от свободного вещества, которое немедленно взаимодействует с клеточными мишенями, инкапсулированный препарат остаётся инертным до момента разрушения частицы внутри клетки. В связи с этим возникает вопрос о роли цистеиновых катепсинов в случае поступления в клетку наноинкапсулированной формы лекарства. Известно, что наночастицы проникают в клетку преимущественно путём эндоцитоза и далее следуют по эндосомальному пути в лизосомы — компартмент, где локализованы и проявляют максимальную активность цистеиновые катепсины. Можно предположить, что именно эти ферменты, а также кислая среда лизосом, определяют скорость разрушения носителя и, следовательно, кинетику высвобождения активного агента.

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

Для проверки предположения о том, что протеолитические ферменты и низкий pH в лизосомах определяют стабильность наноразмерных носителей, были созданы соответствующие условия *in vitro*. Поскольку в живой клетке оба фактора действуют одновременно, для их дифференцированной оценки использовали две модельные системы, в каждой из которых доминирует чувствительность к одному из компонентов лизосомальной среды. Альбуминовые наночастицы, состоящие из белка, служат моделью для изучения протеолитической деградации, так как основной механизм их разрушения — гидролиз пептидных связей. Кроме того, были использованы мембранные нановезикулы, полученные из клеток НЕК293. Эти нановезикулы обладают липидным бислоем, стабильность которого в первую очередь определяется pH среды, хотя они также содержат белки, потенциально подверженные протеолизу. В данном разделе последовательно представлены результаты, полученные для альбуминовых наночастиц с разным количеством сшивающего агента и мембранных нановезикул с разной структурой мембраны.

В работе использовали модель альбуминовых наночастиц, различающихся по степени сшивки глутаровым альдегидом. Наночастицы синтезировали из бычьего сывороточного альбумина методом десольватации с последующей сшивкой. Для получения альбуминовых наночастиц с низкой степенью сшивки применяли 0,009% глутарового альдегида, для наночастиц с высокой степенью сшивки — 0,09%.

В качестве модельных соединений, представляющих терапевтический и диагностический интерес, были выбраны две гидрофобные молекулы: малат сунитиниба и родамин 123. Сунитиниб — ингибитор тирозинкиназ, применяемый в клинике для лечения онкологических заболеваний, включая рак почки и молочной железы [203]. Родамин 123 является флуоресцентным красителем, традиционно используемым для окрашивания митохондрий; его применение позволяет количественно отслеживать высвобождение содержимого частиц спектрофотометрическими и микроскопическими методами [204].

Установлено, что для обоих веществ эффективность загрузки в альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки оказалась выше, чем наночастицы с низкой степенью сшивки: 18,2% против 11,2% для сунитиниба и 12,72% против 10,31% для родамина 123 (рис. 19 А,Б). Более высокая загрузочная ёмкость сильно снижает частиц /плохо/

вероятно, связана с их плотной структурой, способствующей удержанию гидрофобных молекул внутри матрикса.

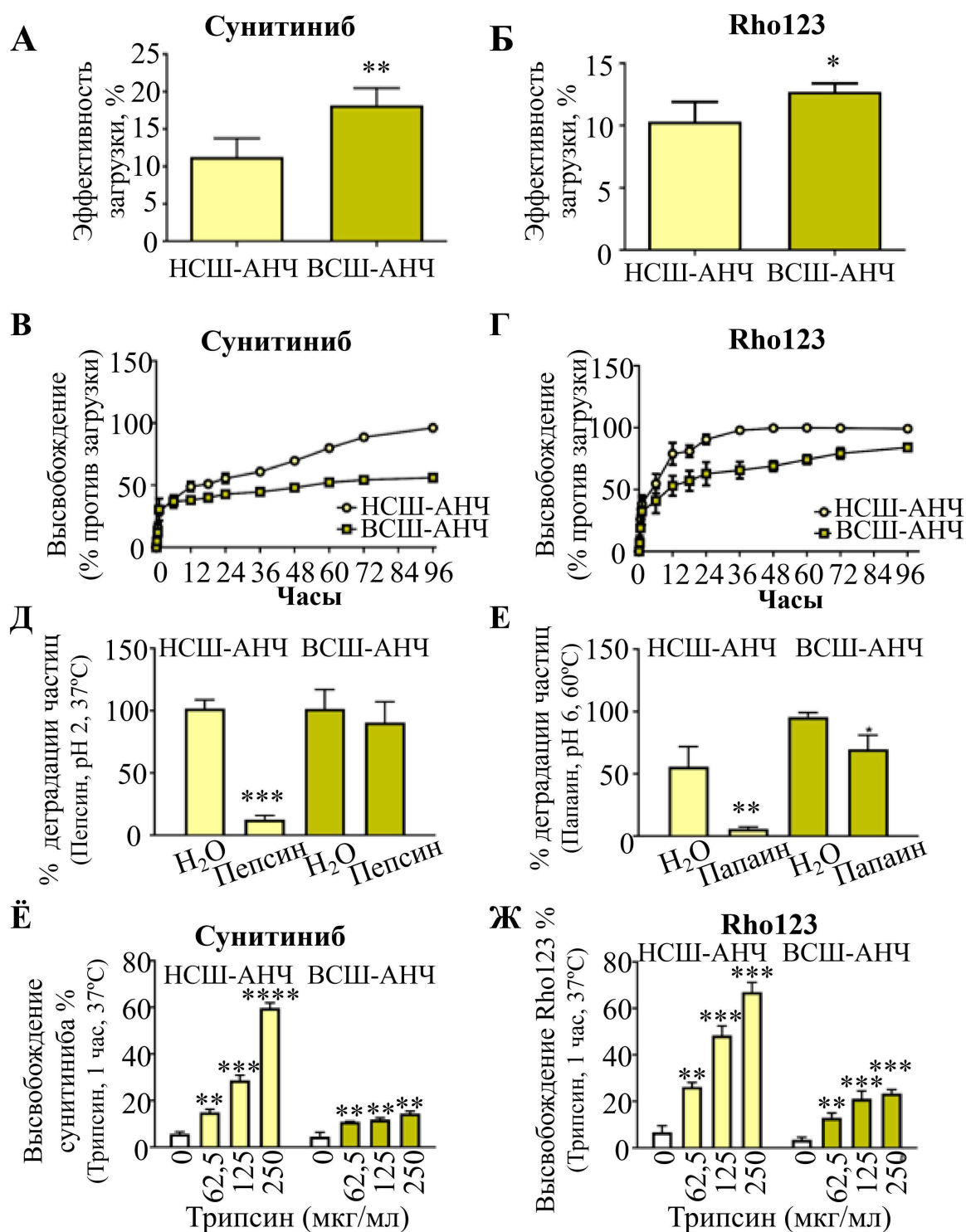


Рисунок 19. Степень сшивки альбуминовых наночастиц влияет на эффективность загрузки и высвобождения препарата. (А) Эффективность загрузки сунитиниба в альбуминовые наночастицы. (Б) Эффективность загрузки родамина 123 (Rho123) в альбуминовые наночастицы. (В) Кинетика высвобождения сунитиниба из альбуминовых наночастиц. (Г) Кинетика высвобождения родамина 123 (Rho123) из альбуминовых наночастиц. (Д) Степень деградации альбуминовых наночастиц после инкубации с пепсином. (Е) Степень деградации альбуминовых наночастиц после инкубации с папаином. (Ё) Высвобождение сунитиниба из альбуминовых наночастиц после инкубации с

трипсином. (Ж) Высвобождение родамина 123 (Rho123) из альбуминовых наночастиц после инкубации с трипсином. НСШ-АНЧ – альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки, ВСШ-АНЧ – альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение ($n \geq 3$). Статистическую значимость оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,0005$, **** $p < 0,000$

Исследование кинетики высвобождения в физиологических условиях (pH 7,4, 37 °C) показало, что альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки демонстрируют более медленное высвобождение по сравнению с альбуминовыми наночастицами с низкой степенью сшивки, причём наибольшие различия зарегистрированы для сунитиниба (рис. 19 В, Г). Этот результат согласуется с представлениями о том, что плотная сетка поперечных сшивок создаёт дополнительное диффузионное сопротивление и замедляет выход молекул из частицы даже в отсутствие протеолитической деградации. Однако в условиях лизосомального микроокружения ключевую роль должно играть ферментативное разрушение матрицы, и в этих условиях различия между альбуминовыми наночастицами с низкой и высокой степенью сшивки могут быть более выраженными.

Принимая во внимание выявленную в ходе предыдущих экспериментов гиперактивность лизосомальных катепсинов в опухолевых клетках, была проведена оценка устойчивости наночастиц к действию протеолитических ферментов. Для этого проведено сравнительное исследование устойчивости альбуминовых наночастиц к действию ряда протеолитических ферментов, выбранных для охвата различных типов протеиназ и моделирования условий, с которыми частицы могут столкнуться в разных компартментах организма. В качестве модельных агентов использовали пепсин, папаин, трипсин и коммерческую протеиназу широкого спектра. Пепсин, будучи аспартатной протеиназой с оптимумом активности в кислой среде (pH 2), позволяет оценить устойчивость частиц в условиях, моделирующих среду желудочного тракта, а также проверить, насколько матрица способна противостоять сочетанному действию кислотной денатурации и протеолиза. Папаин, являющийся цистеиновой протеиназой растительного происхождения, рассматривается как структурный и функциональный аналог лизосомальных катепсинов; его инкубацию проводили при pH 6 и температуре 60 °C, что соответствует оптимальным условиям для данного фермента и позволяет моделировать катепсин-подобную протеолитическую атаку в слабокислой среде, характерной для ранних и поздних эндосом. Трипсин, сериновая протеиназа, активная при физиологических значениях pH (7,4) и 37 °C, имитирует условия внеклеточной среды и цитоплазмы, что даёт возможность оценить стабильность частиц вне лизосомального компартмента. Коммерческая протеиназа широкого спектра (pH 8, комнатная температура) была использована в качестве дополнительного

контроля для проверки устойчивости частиц к неспецифическому гидролизу. Все инкубации проводили в соответствующих буферных системах, а степень деградации оценивали по изменению массы частиц, а также спектрофотометрически в экспериментах с флуоресцентно-меченым альбумином.

Результаты инкубации с пепсином продемонстрировали, что альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки подвергаются более выраженной деградации по сравнению с контрольными условиями, тогда как альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки демонстрировали незначительное уменьшение массы (рис. 19 Д). Сходная закономерность наблюдалась и при действии папаина: альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки разрушались в большей степени, чем с высокой степенью сшивки (рис. 19 Е). Поскольку папаин относится к тому же классу цистеиновых протеиназ, что и лизосомальные катепсины, полученные данные позволяют предположить, что в лизосомах опухолевых клеток будет происходить деградация частиц, причём слабосшитые частицы будут деградировать быстрее, чем сильносшитые.

В контрольных образцах, инкубировавшихся в буфере без добавления фермента при 60 °С, альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки проявляли признаки дестабилизации, что указывает на их меньшую термическую стабильность по сравнению с альбуминовыми наночастицами с высокой степенью сшивки. Сходная картина наблюдалась и при инкубации в щелочном буфере (рН 8), использовавшемся для коммерческой протеиназы: в контрольных условиях (без фермента) альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки подвергались заметной деградации, тогда как стабильность альбуминовых наночастиц с высокой степенью сшивки снижалась незначительно. В присутствии протеиназы деградация усиливалась для обоих типов наночастиц, однако альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки и в этом случае демонстрировали более высокую устойчивость. Таким образом, высокая степень сшивки глутаровым альдегидом обеспечивает альбуминовым наночастицам повышенную устойчивость не только к протеолизу, но и к неблагоприятным физико-химическим факторам среды, таким как щелочной рН и повышенная температура.

Дополнительно отмечено, что предварительное мечение альбумина флуорофором NHS-эфиром AF488 приводило к снижению степени деградации альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки в аналогичных экспериментальных условиях (рис. 20). Вероятно, ковалентная модификация остатков лизина частично блокирует сайты узнавания протеиназ, что следует учитывать при планировании экспериментов по визуализации частиц в живых клетках.

Влияние протеолитического микроокружения на высвобождение загруженных соединений исследовали в экспериментах с трипсином в физиологических условиях (рН 7,4, 37 °С). Установлено, что скорость высвобождения как сунитиниба, так и родамина 123 зависела от концентрации фермента, причём альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки демонстрировали более быстрое и полное высвобождение обеих молекул по сравнению с альбуминовыми наночастицами с высокой степенью сшивки (рис. 19 Ё, Ж). Этот результат подтверждает, что доступность белковой матрицы для протеолитической атаки является ключевым фактором, лимитирующим кинетику высвобождения инкапсулированного агента.

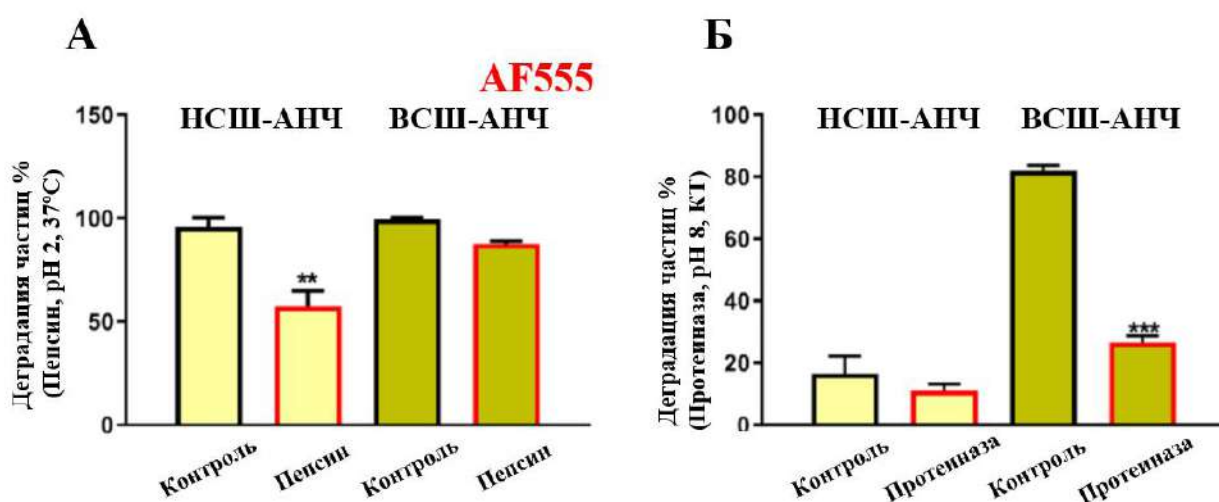


Рисунок 20. Мечение наночастиц флуорофором влияет на их устойчивость в условиях протеолитической деградации. (А) Степень деградации наночастиц после инкубации с пепсином. Примечание: альбумин предварительно метили флуоресцентным красителем AF555. (Б) Степень деградации наночастиц после инкубации с коммерческой протеиназой. НСШ-АНЧ – альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки, ВСШ-АНЧ – альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки.

Для количественной оценки кинетики внутриклеточного высвобождения использовали модельный флуоресцентный краситель родамин 123, который нековалентно вводили в состав альбуминовых наночастиц. Клетки инкубировали с нагруженными частицами в течение 6 часов, после чего тщательно отмывали от несвязавшихся наночастиц и регистрировали изменение интенсивности флуоресценции методом проточной цитометрии на протяжении 14 суток. В обеих исследованных линиях зарегистрировано статистически значимое более быстрое снижение флуоресцентного сигнала в клетках, обработанных альбуминовыми наночастицами с низкой степенью сшивки, по сравнению с клетками, обработанными альбуминовыми наночастицами с высокой степенью сшивки (рис. 21 А–Е).

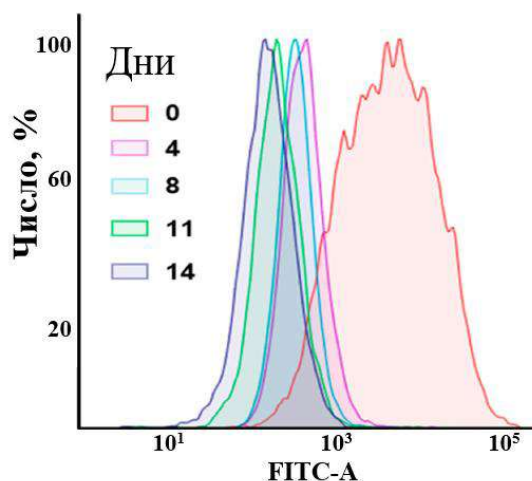
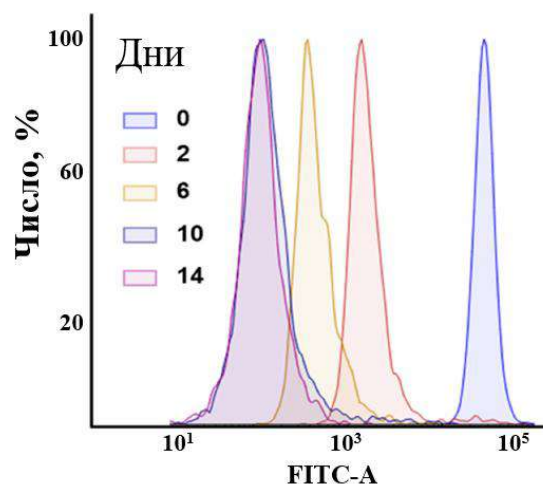
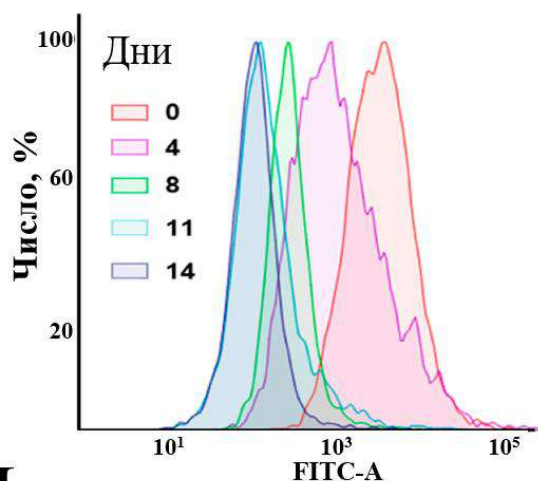
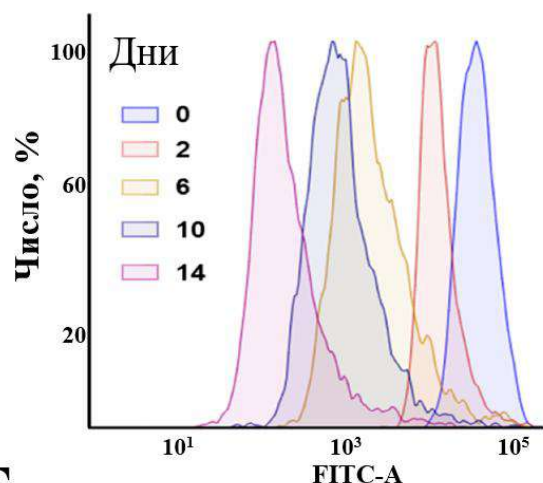
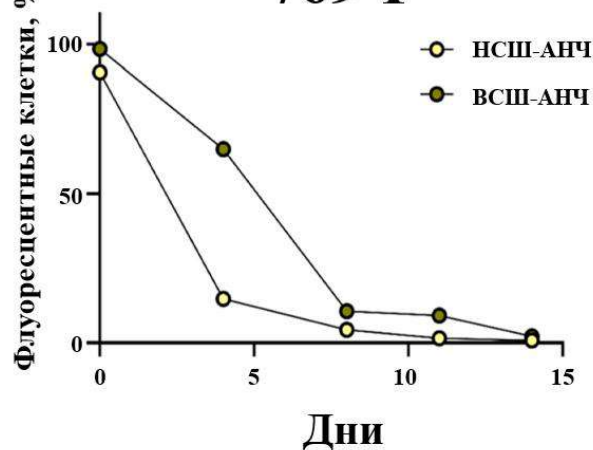
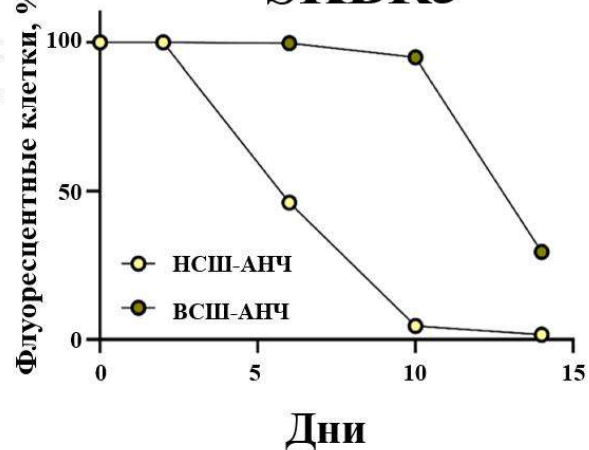
А НСШ-АНЧ/769-Р**Б НСШ-АНЧ /SKBR3****В ВСШ-АНЧ/769-Р****Г ВСШ-АНЧ /SKBR3****Д 769-Р****Е SKBR3**

Рисунок 21. Внутриклеточное высвобождение родамина 123 (Rho123) и эффективность доставки препарата с использованием наночастиц зависят от степени сшивки альбуминовых наночастиц. Наложение гистограмм проточной цитометрии в канале FITC-A, отражающее динамику процента флуоресцентных клеток (А) 769-Р и (Б)

SKBR3 после инкубации с альбуминовыми наночастицами с низкой степенью сшивки, нагруженными Rho123. Наложение гистограмм проточной цитометрии в канале FITC-A, отражающее динамику процента флуоресцентных клеток (В) 769-Р и (Г) SKBR3 после инкубации с альбуминовыми наночастицами с высокой степенью сшивки, нагруженными Rho123. Кинетика снижения процента флуоресцентных клеток в популяциях (Д) 769-Р и (Е) SKBR3. НСШ-АНЧ – альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки, ВСШ-АНЧ – альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки.

Таким образом, полученные для альбуминовых наночастиц данные свидетельствуют о том, что протеолитические ферменты разрушают альбуминовые частицы, а степень сшивки белковой матрицы выступает в качестве регулятора их стабильности. Альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки обладают более высокой устойчивостью к протеолитической деградации, а также к воздействию экстремальных значений pH и температуры, что обуславливает их медленное разрушение в лизосомах опухолевых клеток и, как следствие, пролонгированное высвобождение загруженного препарата. Альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки, напротив, подвержены действию протеиназ, что обеспечивает быстрое высвобождение содержимого в клетках с высокой протеолитической активностью.

Описанные выше альбуминовые наночастицы представляют собой пример носителей, предназначенных для доставки гидрофобных низкомолекулярных соединений, таких как ингибиторы тирозинкиназ (на примере сунитиниба). С целью изучения роли лизосомального компартмента в судьбе наноразмерных систем доставки в работу были включены мембранные нановезикулы — биологические нановезикулы и биоподобные нановезикулы, полученные путём слияния биологических нановезикул с синтетическими липосомами. В отличие от альбуминовых наночастиц, где доминирующим фактором дестабилизации является протеолиз, стабильность мембранных нановезикул зависит от pH среды, что делает их моделью для оценки вклада кислотного фактора лизосомального компартмента в процесс высвобождения загруженного вещества. Кроме того, данные конструкции способны загружать гидрофильные макромолекулы, в частности терапевтические нуклеиновые кислоты, что позволяет расширить круг исследуемых систем и проверить универсальность закономерностей, установленных для белковых матриц.

Стабильность биологических и биоподобных нановезикул в условиях, имитирующих различные этапы эндолизосомального транспорта, оценивали после инкубации нановезикул в буферных растворах с физиологическим значением pH (7,4), а также при значениях pH, соответствующих ранним эндосомам (6,2), поздним эндосомам (5,5) и лизосомам (4,5). В качестве модельного загружаемого соединения использовали короткую РНК, меченную флуорофором FAM (FAM-РНК), что позволяло отслеживать целостность нановезикул и

высвобождение содержимого. Инкубацию проводили в течение 15 минут и 1 часа, после чего анализировали размер и концентрацию частиц методом NTA (рис.22).

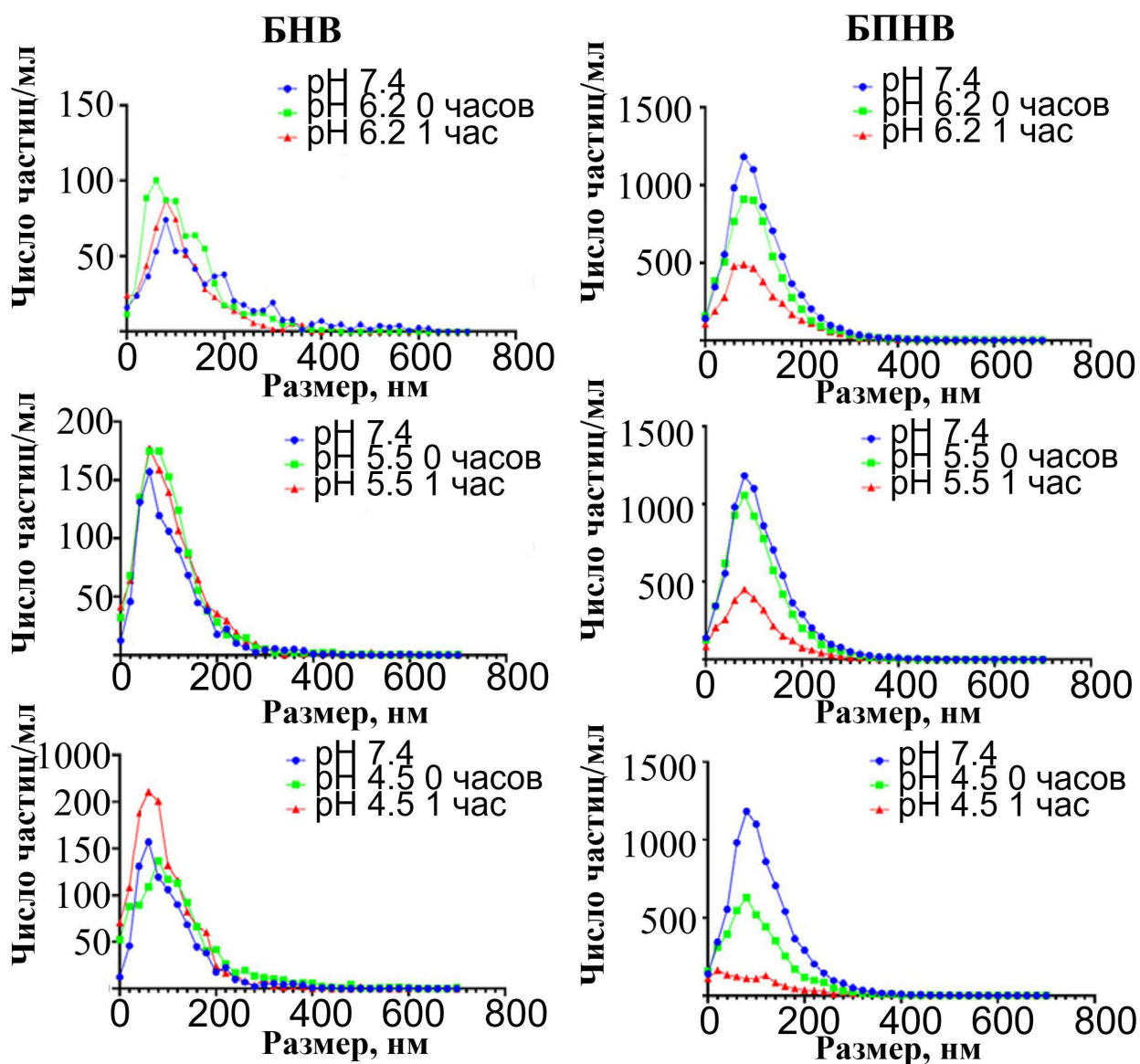


Рисунок 22. Состав мембраны частиц определяет их устойчивость в условиях низкого pH. Динамика изменения размера и количества частиц биологических и биоподобных нановезикул в условиях кислого pH. Нановезикулы инкубировали в буферах с pH 4,5, 5,5, 6,2 в течение 1 часа и измеряли размер и количество частиц. БНВ – биологические нановезикулы, БПНВ – биоподобные нановезикулы.

Установлено, что при кислых значениях pH происходило увеличение среднего размера биологических нановезикул, что указывает на набухание нановезикул в ответ на закисление среды. При инкубации в течение 1 часа при pH 4,5 зарегистрировано снижение общего количества обнаруживаемых биологических нановезикул, что указывает на их разрушение в условиях, моделирующих лизосомальный компартмент. В случае биоподобных нановезикул влияние кислого pH было более выраженным: уменьшение количества

нановезикул фиксировалось уже после 1 часа инкубации при pH 6,2 и прогрессировало по мере дальнейшего снижения pH до 5,5 и 4,5. Таким образом, биологические нановезикулы подвергаются увеличению размера и разрушению при понижении pH, а включение синтетических липидов в состав мембраны биологических нановезикул повышает pH-чувствительность получаемых биоподобных нановезикул.

Методом крио-ПЭМ подтверждены набухание и разрушение как биологических нановезикул, так и биоподобных нановезикул в кислой среде (рис. 23А). Для проверки высвобождения FAM-RНК в кислых условиях нагруженные FAM-RНК биоподобные нановезикулы инкубировали при pH 4,5 или pH 7,4 в течение 15 или 60 минут. Электрофоретическую подвижность высвободившейся РНК анализировали в полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях. Интактные биоподобные нановезикулы удерживают FAM-RНК внутри, что препятствует её миграции в геле и проявляется в отсутствии флуоресцентного сигнала в области низкомолекулярных РНК. Разрушение структуры биоподобных нановезикул сопровождается высвобождением РНК и появлением соответствующей флуоресцентной полосы. При инкубации биоподобных нановезикул при pH 7,4 в течение 15 минут и 1 часа наблюдалась флуоресценция в лунках геля, что свидетельствует о сохранении целостности нановезикул и удержании FAM-RНК внутри (рис. 23 Б, В). В кислых условиях (pH 4,5) зафиксировано исчезновение флуоресцентного сигнала в лунках с одновременным появлением полос, соответствующих высвободившейся FAM-RНК, причём эффект усиливался при увеличении времени инкубации до 1 часа. Эти данные свидетельствуют о высвобождении загруженного содержимого из биоподобных нановезикул при их разрушении в кислой среде.

Таким образом, проведённые эксперименты *in vitro* демонстрируют, что стабильность наноразмерных носителей в условиях, моделирующих лизосомальное микроокружение, определяется их химической природой и структурными параметрами. Альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки проявляют высокую устойчивость к протеолизу, тогда как альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки и биоподобные нановезикулы подвержены деградации — в первом случае преимущественно за счёт действия протеиназ, во втором — за счёт pH-зависимой дестабилизации липидного бислоя. Для выяснения того, в какой степени эти закономерности, выявленные в бесклеточных системах, реализуются в опухолевых клетках, необходимы дальнейшие исследования.

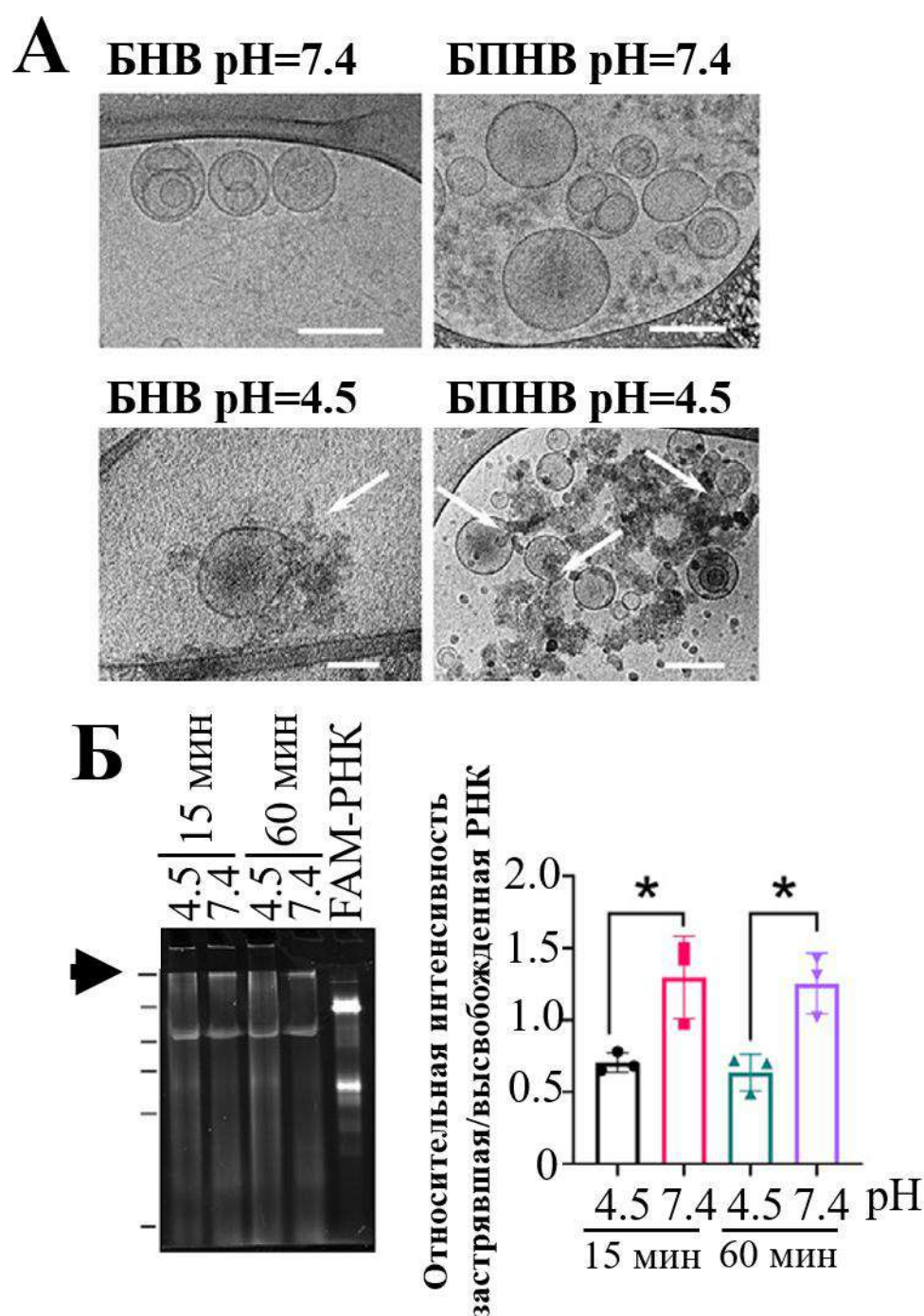


Рисунок 23. Биоподобные нановезикулы легче разрушаются в условиях низкого рН с высвобождением содержимого. (А) Крио-ПЭМ микрофотографии, демонстрирующие набухание и разрушение биологических нановезикул и биоподобных нановезикул. (Б) Электрофореграмма высвобождения FAM-меченной РНК из биоподобных нановезикул после инкубации в течение 15 минут и 1 часа при рН 4,5. (В) Полуколичественный анализ эффективности высвобождения FAM-РНК. Черной стрелкой указано застревание FAM-РНК. БНВ – биологические нановезикулы, БПНВ – биоподобные нановезикулы. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Статистическую значимость оценивали с помощью однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Уровни значимости: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns – различия статистически незначимы.

3.5 Биоподобные нановезикулы подвергаются деградации под действием цистеиновых катепсинов

Проведённые эксперименты *in vitro* показали, что биологические и биоподобные нановезикулы разрушаются в кислой среде, характерной для лизосом, с высвобождением загруженной РНК. Для проверки воспроизводимости данной закономерности в условиях живых клеток и оценки роли цистеиновых катепсинов был проведён анализ транспорта биологических и биоподобных нановезикул и степени их колокализации с лизосомальным компартментом в культуре клеток HepG2. Клетки инкубировали с биологическими и биоподобными нановезикулами, предварительно нагруженными липофильным флуоресцентным зондом DiR и FAM-меченой РНК; визуализацию лизосом осуществляли с использованием красителя LysoTracker Red. Количественный анализ пространственного совпадения сигналов продемонстрировал, что биоподобные нановезикулы характеризуются более высоким уровнем колокализации с лизосомальным маркером по сравнению с биологическими нановезикулами (50% против 30% соответственно; рис. 24 А, Б), при этом для биоподобных нановезикул отмечено увеличение выхода из лизосом в течение первого часа инкубации по сравнению с периодом 12–16 часов. Это наблюдение свидетельствует о том, что часть биоподобных нановезикул способна покидать лизосомальный компартмент, по-видимому, за счёт рН-индуцированной дестабилизации мембраны и последующего эндолизосомального ускользания.

Для непосредственной оценки роли лизосомальных протеиназ в поддержании внутриклеточной стабильности нановезикул была изучена стабильность указанных структур на фоне ингибирования цистеиновых катепсинов с помощью E-64 и Ac-PLVE-FMK. Методом динамической микроскопии установлено, что при ингибировании цистеиновых катепсинов происходит возрастание внутриклеточного сигнала от биоподобных нановезикул, меченных DiR, тогда как для биологических нановезикул аналогичного эффекта не зарегистрировано (рис. 25 А). Изменения сигнала FAM-РНК при этом отсутствовали, что, вероятно, обусловлено сохранением флуоресценции продуктов деградации РНК после разрушения нановезикул (рис. 25 Б). Полученные результаты свидетельствуют о том, что цистеиновые катепсины вносят вклад в деградацию биоподобных нановезикул, тогда как нативные биологические нановезикулы в меньшей степени подвергаются лизосомальному

протеолизу.

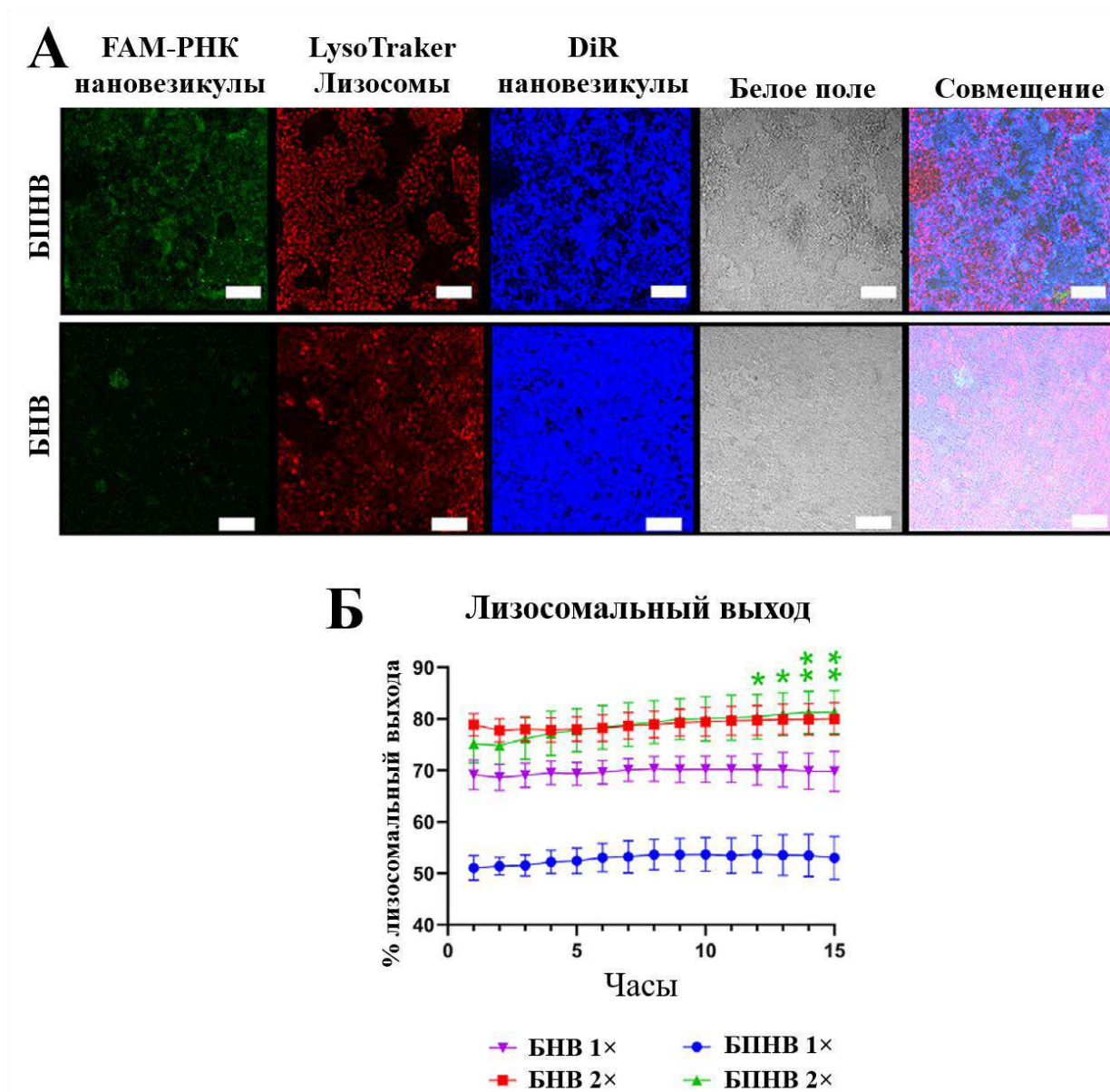


Рисунок 24. Биоподобные нановезикулы быстрее покидают лизосомальный компартмент в сравнении с биологическими нановезикулами. (А) Репрезентативные конфокальные микрофотографии колокализации LysoTracker (красный) и FAM-RНК (зелёный), доставляемой биологическими и биоподобными нановезикулами. Синим цветом обозначены клетки НерG2, интернализовавшие DiR-меченные везикулы. Масштабная шкала – 90 мкм. (Б) Кинетика колокализации FAM-RНК с лизосомами и эффективность эндолизосомального ускользания для двух концентраций биологических и биоподобных нановезикул (1× и 2×). БНВ – биологические нановезикулы, БПНВ – биоподобные нановезикулы. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение. Статистическую значимость оценивали с помощью однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Уровни значимости: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns – различия статистически незначимы.

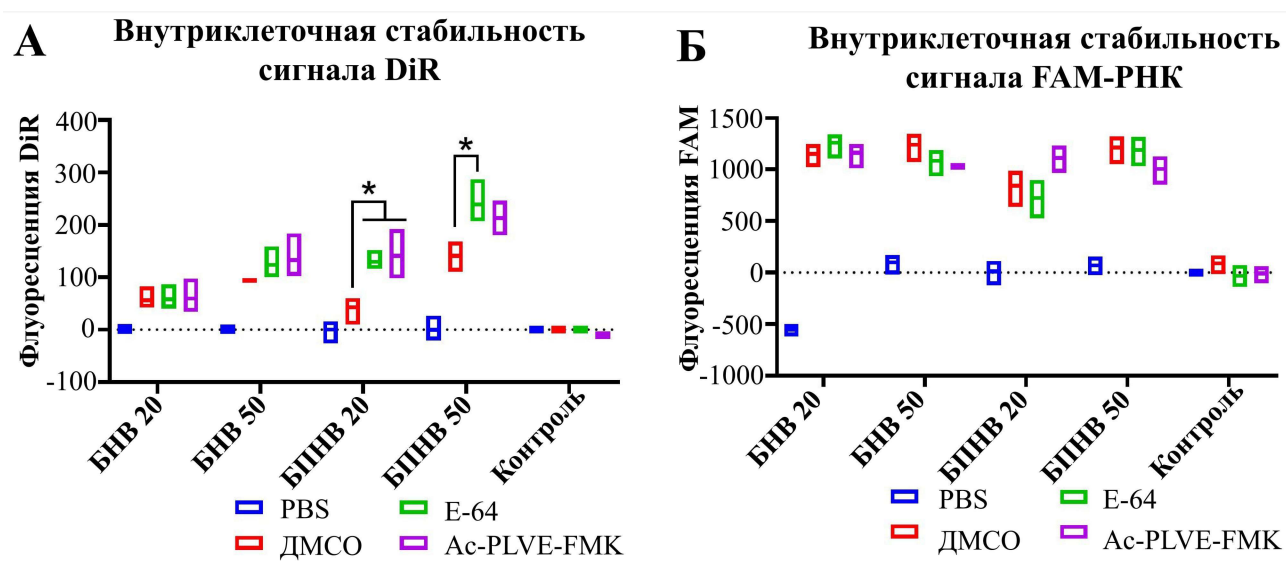


Рисунок 25. Ингибирование цистеиновых катепсинов увеличивает стабильность биоподобных нановезикул в клетках. (А) Внутриклеточная стабильность DiR-меченных биологических и биоподобных нановезикул. (Б) Стабильность FAM-PHK, инкапсулированной в биологические и биоподобные нановезикулы, в клетках HepG2. На панелях представлены усреднённые значения сигнала для двух концентраций биологических и биоподобных нановезикул в клетках, обработанных DMSO (контроль) или ингибиторами катепсинов (E-64, Ac-PLVE-FMK) в интервале 4–44 часов после инкубации с нановезикулами. Контроль – клетки HepG2 без обработки наночастицами и с добавлением PBS. БНВ – биологические нановезикулы, БПНВ – биоподобные нановезикулы. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Различия оценивали с помощью однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) там, где это было применимо. Уровни значимости: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; ns – различия статистически незначимы.

Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что включение липосом в состав мембран биологических нановезикул способствует усилению эндолизосомального захвата и последующей деградации биоподобных нановезикул под действием катепсинов, тогда как нативные биологические нановезикулы в значительной степени минуют данный эндолизосомальный барьер. Таким образом, на примере мембранных нановезикул подтверждено, что активность лизосомальных цистеиновых катепсинов является ключевым фактором, определяющим внутриклеточную стабильность наноструктур, интернализуемых по эндоцитарному пути. Далее в работе решалась задача оценки влияния поступления в клетку наночастиц на её протеолитический профиль.

3.6 Альбуминовые наночастицы влияют на экспрессию катепсинов

С целью оценки изменения уровня экспрессии ключевых лизосомальных протеиназ — цистеинового катепсина В, аспартатного катепсина D и серинового катепсина G — после

обработки клеток альбуминовыми наночастицами с низкой и высокой степенью сшивки был проведён анализ этих протеиназ. Клетки линий 769-Р и SKBR3 (рак молочной железы) инкубировали с альбуминовыми наночастицами в течение 6 часов, затем отмывали от наночастиц и добавляли свежую питательную среду. Клетки анализировали через 24, 48 и 72 часа. Уровень экспрессии катепсинов В, D и G определяли методом вестерн-блоттинга.

Сравнительный анализ полученных данных продемонстрировал, что обработка обоими типами альбуминовых наночастиц приводила к повышению содержания исследуемых протеиназ в обеих клеточных линиях (рис. 26 А, Б). Наиболее выраженные изменения зарегистрированы для катепсина В: в клетках линии 769-Р зарегистрировано прогрессирующее увеличение экспрессии данного белка с течением времени, тогда как в линии SKBR3 его уровень оставался стабильно повышенным на протяжении всего периода наблюдения.

Экспрессия катепсина D увеличивалась в меньшей степени, причём в клетках 769-Р после воздействия альбуминовых наночастиц с высокой степенью сшивки увеличение содержания фермента регистрировали к 72-му часу. Изменения уровня катепсина G в обеих линиях были минимально выраженными, за исключением повышения в клетках 769-Р во всех временных точках и снижения через 72 часа в клетках SKBR3. Полученные результаты свидетельствуют о том, что интернализация альбуминовых наночастиц вызывает активацию лизосомального компартмента, причём данный ответ носит избирательный характер и затрагивает в первую очередь цистеиновый катепсин В.

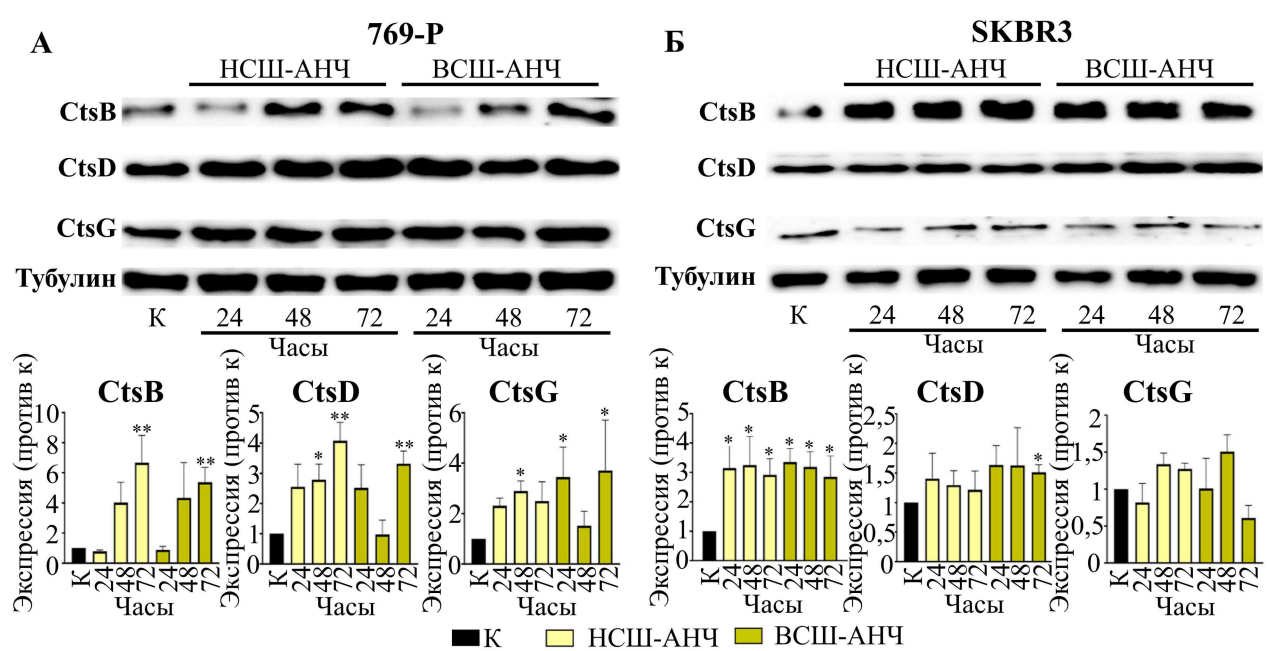


Рисунок 26. Альбуминовые наночастицы вызывают увеличение экспрессии катепсинов. (А) Уровень экспрессии белков CtsB, CtsD и CtsG и результаты количественного анализа (после нормализации к тубулину) в клеточной линии 769-Р. (Б) Уровень экспрессии белков CtsB, CtsD и CtsG и результаты количественного анализа (после

нормализации к тубулину) в клеточной линии SKBR3. Клетки обрабатывали альбуминовыми наночастицами в течение 6 часов; клеточные лизаты собирали через 24, 48 и 72 часа после обработки. НСШ-АНЧ – альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки, ВСШ-АНЧ – альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение (SD). Статистическую значимость различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта: * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$.

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

С целью сравнительного анализа цитотоксичности альбуминовых наночастиц с различной степенью сшивки, нагруженных сунитинибом, а также характера её проявления в клетках с разным уровнем активации катепсина В, было проведено исследование на двух линиях — 769-Р и SKBR3. Оценивали жизнеспособность клеток после обработки свободным сунитинибом, а также сунитинибом, инкапсулированным в альбуминовые наночастицы с низкой и высокой степенью сшивки.

Перед исследованием цитотоксической активности нагруженных препаратом наночастиц была проведена оценка влияния пустых альбуминовых носителей с низкой и высокой степенью сшивки на жизнеспособность клеток SKBR3 и 769-Р. Клетки инкубировали в присутствии возрастающих концентраций наночастиц в течение 72 часов, после чего оценивали жизнеспособность клеток. Установлено, что оба типа частиц не индуцировали статистически значимого снижения жизнеспособности клеток во всём исследованном диапазоне концентраций, за исключением максимальной дозы альбуминовых наночастиц с высокой степенью сшивки в линии 769-Р, где было зарегистрировано снижение числа жизнеспособных клеток (рис. 27). Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии собственной цитотоксичности у альбуминовых наночастиц. На основании проведённого анализа для дальнейших экспериментов была выбрана рабочая концентрация 10 нг на клетку.

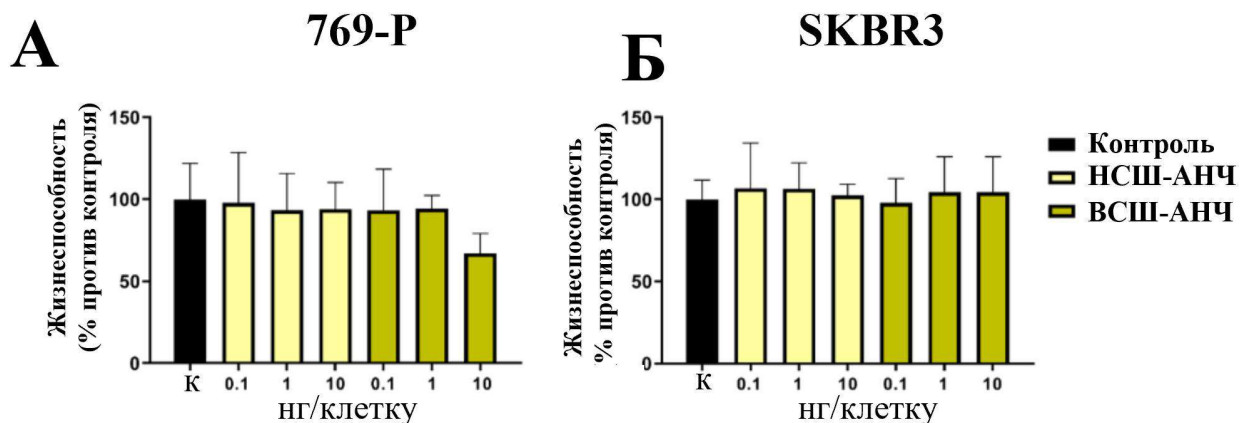


Рисунок 27. Альбуминовые наночастицы вызывают незначительную клеточную гибель при высоких концентрациях. Влияние альбуминовых наночастиц на жизнеспособность клеточных линий: (А) 769-Р и (Б) SKBR3 после 72-часовой инкубации с возрастающими концентрациями альбуминовых наночастиц с низкой и высокой степенью сшивки. НСШ-АНЧ – альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки, ВСШ-АНЧ – альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки.

Далее была проведена сравнительная оценка цитотоксичности альбуминовых наночастиц, нагруженных сунитинибом. Предварительно была определена чувствительность исследуемых линий к свободному сунитинибу, для чего клетки инкубировали с возрастающими концентрациями вещества в течение 16 часов (инкубация в течение ночи), после чего среду заменяли на свежую и через 48 часов регистрировали изменение жизнеспособности. Свободный сунитиниб индуцировал дозозависимое снижение выживаемости клеток обеих линий (рис. 28 А, Б). Аналогичный протокол использовали при тестировании наночастиц — альбуминовых наночастиц с низкой и высокой степенью сшивки, содержащих инкапсулированный препарат. В обоих случаях зарегистрирована дозозависимая цитотоксичность. При этом, несмотря на более низкую эффективность загрузки сунитиниба в альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки, именно данные наночастицы продемонстрировали статистически значимое более выраженное ингибирование жизнеспособности опухолевых клеток по сравнению с альбуминовыми наночастицами с высокой степенью сшивки. Указанное различие было более значительным в линии 769-Р.

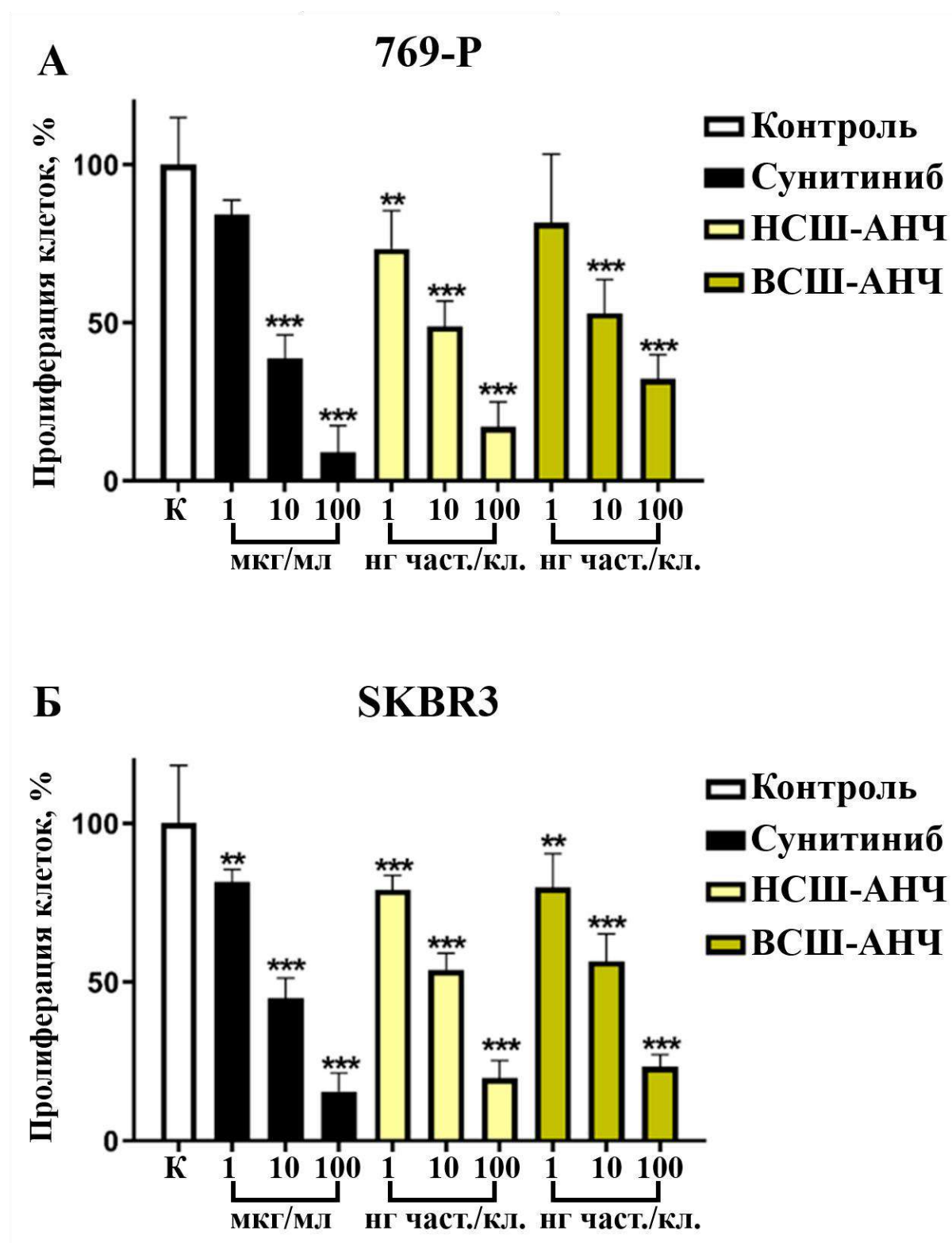


Рисунок 28. Альбуминовые наночастицы, нагруженные сунитинибом, вызывают цитотоксичность. Оценка цитотоксичности альбуминовых наночастиц, нагруженных сунитинибом, в клеточных линиях: (А) 769-Р и (Б) SKBR3. Клетки инкубировали в течение ночи с возрастающими концентрациями свободного сунитиниба и наночастиц, нагруженных сунитинибом, после чего определяли жизнеспособность клеток. НСШ-АНЧ – альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки, ВСШ-АНЧ – альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартное отклонение. Достоверность различий оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа

(ANOVA) с последующим пост-хок тестом Даннетта. Уровень значимости: $^{**}p < 0,005$, $^{***}p < 0,0005$.

Выявленное различие в цитотоксической эффективности альбуминовых наночастиц с низкой и высокой степенью сшивки согласуется с совокупностью полученных ранее данных. Во-первых, альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки продемонстрировали повышенную чувствительность к протеолитической деградации как в бесклеточных системах, так и непосредственно в клетках. Во-вторых, интернализация альбуминовых наночастиц вызывает адаптивное повышение экспрессии катепсина В, причём в линии 769-Р этот ответ носит прогрессирующий характер и проявляется в большей степени, чем в линии SKBR3. Таким образом, в клетках с исходно высоким и дополнительно индуцируемым уровнем цистеиновых катепсинов ускоренное протеолитическое разрушение белковой матрицы альбуминовых наночастиц с низкой степенью сшивки обеспечивает более интенсивное высвобождение сунитиниба, что обуславливает повышенную цитотоксичность данных наночастиц. В то же время высокая стабильность альбуминовых наночастиц с высокой степенью сшивки, определяющая пролонгированное, но замедленное высвобождение препарата, не обеспечивает столь же выраженного цитотоксического эффекта в отношении быстро пролиферирующих опухолевых клеток с активным лизосомальным аппаратом.

4. Обсуждение результатов

Настоящая работа была посвящена комплексному анализу системы цистеиновых катепсинов в клетках почечно-клеточного рака и изучению того, каким образом протеолитический профиль опухолевой клетки определяет её ответ на терапевтические воздействия двух принципиально разных типов — классический химиопрепарат камптотecin и наноразмерные биологические частицы. Полученные результаты позволяют не только расширить фундаментальные представления о биологии катепсинов при ПКР, но и сформулировать ряд положений, имеющих значение для разработки персонализированных подходов к терапии.

Клетки линий ПКР 769-Р и А-498 обладают целостным «протеолитическим фенотипом», который характеризуется гиперэкспрессией катепсинов V, Z, S, L и B, изменением изоформного состава (появление дополнительных промежуточных форм катепсинов C, O, K, H) и перераспределением внутриклеточной локализации. Повышенная экспрессия катепсинов B, L и S, обнаруженная нами, полностью согласуется с данными транскриптомного анализа TCGA и результатами иммуногистохимических исследований ПКР [72,73] и вписывается в общую картину гиперэкспрессии цистеиновых катепсинов при раке мозга, молочной железы, лёгких, кишечника, кожи и простаты [38,62,199,207–219]. С молекулярной точки зрения такая гиперэкспрессия обеспечивает протеолиз белков внеклеточного матрикса, разрушение межклеточных контактов и способствует метастазированию [29]. В частности, в модели RIP1-Tag2 показано, что катепсины B и L расщепляют E-кадгерин, активируя эпителиально-мезенхимальный переход и способствуя химиорезистентности [80,220]; аналогичный механизм может действовать и в клетках почки.

В опухолевых клетках почки нами отмечено смещение баланса форм катепсинов K и O в сторону зрелых каталитически активных форм. Преобладание зрелой формы свидетельствует о более эффективном созревании в лизосомах [221] и согласуется с данными о вкладе активных катепсинов K и O в канцерогенезе простаты и молочной железы [210,217]. Появление множественных промежуточных форм, вероятно, является следствием перекрёстного протеолиза, в частности расщепления катепсина C катепсинами K и V [222]. Различия в профилях катепсинов между линиями 769-Р (светлоклеточный рак) и А-498 (папиллярный) отражают известную молекулярную гетерогенность гистологических подтипов ПКР [223–226].

Принципиально новым результатом является обнаружение ядерной локализации катепсинов O, W, Z и K. Ранее ядерная локализация была описана для других представителей

семейства [27,42,58,63,76,207,212,222–228], и её функциональное значение подтверждено: ядерный катепсин L процессирует транскрипционный фактор CDP/Cux, нарушая клеточный цикл [228–230]; катепсины B, K, L и S регулируют ядерный транспорт SMAD в пути TGF- β [231,232]; ядерный катепсин V вызывает гиперпролиферацию [233]. Поскольку оптимальная активность катепсинов проявляется при кислых значениях pH [234], в нейтральной среде ядра их активность, вероятно, ограничена либо конформационными изменениями [235], либо ингибиторами типа стефинов [236].

Терапия злокачественных новообразований традиционно опирается на низкомолекулярные соединения, способные подавлять пролиферацию и вызывать гибель опухолевых клеток. Камптотецин и его полусинтетические аналоги ингибируют топоизомеразу I, что приводит к накоплению двунитевых разрывов ДНК и репликативному стрессу, инициирующему апоптоз [96]. Однако, будучи слабым основанием, камптотецин способен накапливаться в кислой среде лизосом, утрачивая доступ к ядерной мишени; этот механизм описан для резистентных клеток, характеризующихся увеличенным и закисленным лизосомальным компартментом [100–102]. Кроме того, камптотецин активирует цитопротективную аутофагию, в терминальных стадиях которой задействованы цистеиновые катепсины B и L: их ингибирование, например с помощью E-64d, в клетках MCF-7, обработанных камптотецином, усиливает накопление аутолизосом и смещает баланс в сторону апоптотической гибели [12]. Фармакологическое подавление активности цистеиновых катепсинов усиливает цитотоксический эффект камптотецина в ряде клеточных моделей [99], а лизосомотропные агенты, индуцирующие пермеабиллизацию лизосомальной мембраны (ПЛМ), переводят клетки от цитопротективной аутофагии к лизосомально-опосредованной гибели [106,107]. Таким образом, ответ опухолевой клетки на камптотецин определяется не только прямым генотоксическим действием, но и состоянием лизосом и катепсинов.

Проведённое нами исследование демонстрирует, что действие цистеиновых катепсинов кардинально различается в зависимости от клеточного контекста. В эмбриональных клетках почки человека HEK293 ингибирование цистеиновых катепсинов (E-64 и Ac-PLVE-FMK) дозозависимо подавляло клеточную гибель: доля клеток на ранней стадии гибели (аннексин V⁺/PI⁻) при действии камптотецина снижалась с 37% до 1%. Этот результат полностью согласуется с представлениями о роли лизосомальных катепсинов как инициаторов клеточной гибели после ПЛМ [104,105]. Напротив, в линиях почечно-клеточного рака (ПКР) 769-P и A-498 ингибирование цистеиновых катепсинов не приводило к столь выраженному подавлению популяции аннексин V⁺/PI⁻ клеток, а в ряде случаев даже увеличивало её. Подобная неоднозначность известна из литературы: ингибитор катепсина B

Z-FA-FMK вызывает гибель Jurkat T-клеток посредством генерации активных форм кислорода [237], а ингибитор катепсинов В и L Fmoc-Tyr-Ala-CHN₂ индуцирует апоптоз в нейробластоме, но не в клетках рака молочной железы [145]. Наши данные расширяют эти представления, показывая, что даже в пределах одного гистологического типа (ПКР) разные линии обладают различной чувствительностью к ингибиторам, что, по-видимому, обусловлено исходным протеолитическим фенотипом, детально охарактеризованным нами в динамике (рис. 16–18).

Важнейшим результатом настоящей работы стало прямое доказательство ПЛМ при камптотецин-индуцированной клеточной гибели. Лизосом-зависимая клеточная гибель (ЛЗКГ) характеризуется повреждением мембраны лизосом, высвобождением протеолитических ферментов, а также развитием ионного и окислительного стресса [238–240]. С помощью флуоресцентной микроскопии с LysoTracker Red, иммуноцитохимического окрашивания LAMP-1/катепсина В и проточной цитометрии с LysoTracker Blue нами зафиксированы кластеризация лизосом, снижение их кислотности и диффузное распределение катепсина В в цитоплазме (рис. 13–15). Снижение интенсивности сигнала лизосомотропных красителей является распространённым скрининговым маркером ПЛМ, однако оно зависит от мембранного потенциала и pH. Более надёжным подтверждением служит утрата колокализации LAMP-1 и катепсина В, свидетельствующая о выходе фермента из органелл [108,109]. Именно такая картина наблюдалась нами в клетках HEK293, 769-P и A-498. Механизмы, лежащие в основе ПЛМ при действии камптотецина, активно изучаются. Показано, что уже через 3 часа после обработки камптотецином в лизосомах запускаются процессы, ведущие к их повреждению, а методом протеомного анализа идентифицированы конкретные белки (PKC- δ , NSDHL, PSAP), содержание которых в лизосомах изменяется в ответ на препарат [241]. В частности, камптотецин стимулирует перемещение PKC- δ в лизосомы, что приводит к генерации церамида и последующей дестабилизации лизосомальной мембраны [242]. Аналогичный механизм описан и для этопозида, индуцирующего ПМЛ через церамид-зависимый путь [243]. Полученные нами данные о ПМЛ при действии камптотецина полностью согласуются с этими представлениями и позволяют заключить, что в исследованной модели ПМЛ предшествует финальным стадиям клеточной гибели и служит одним из ключевых триггерных событий.

Принципиальным является вопрос о том, какой именно тип клеточной гибели реализуется под действием камптотецина в исследуемых клетках. Совокупность полученных результатов указывает на смешанный фенотип, сочетающий признаки апоптоза и ЛЗКГ. Во всех трёх линиях детектировались классические маркеры апоптоза: экстернализация фосфатидилсерина (аннексин V-позитивность), расщепление прокаспазы-3 и

антиапоптотического белка Bcl-2, а также межнуклеосомная фрагментация ДНК (рис. 9). С другой стороны, наблюдаемые изменения соответствуют и критериям ЛЗКГ: высвободившиеся при ПМЛ катепсины (особенно B, L, S) способны расщеплять Bid с образованием tBid, инициируя митохондриальный путь апоптоза [105,130]. Показано, что при нейтральных значениях pH папаин-подобные катепсины расщепляют Bid по остаткам Arg65 или Arg71, вызывая высвобождение цитохрома c, тогда как катепсины C, X и D такой способностью не обладают [105]. Тот факт, что ингибирование катепсинов практически полностью блокирует гибель в клетках HEK293, подтверждает причинно-следственную связь между ПЛМ, активацией катепсинов и запуском апоптотического каскада. При этом следует различать частичную и полную ПЛМ: при ограниченной пермеабиллизации мембраны реализуется апоптоз, тогда как массивный выброс гидролаз приводит к некрозу, что мы и наблюдали при высоких концентрациях камптотецина (>10 мкМ, рис. 8). Таким образом, правомерно говорить о ЛЗКГ, или «лизосомальном апоптозе», который характеризуется неполной блокадой пан-каспазным ингибитором и выходом не только катепсинов, но и других гидролаз.

Наиболее показательны для понимания перекрёстной регуляции каспаз и катепсинов эксперименты с пан-каспазным ингибитором Z-VAD-FMK. В нормальных клетках HEK293 Z-VAD-FMK самостоятельно практически полностью предотвращал появление аннексин V^+/PI^- клеток, и оба ингибитора катепсинов по отдельности давали сходный эффект (рис. 11). Это означает, что в нетрансформированных клетках каспазы и катепсины функционально активны и каждого из них достаточно для реализации программы гибели. В опухолевых же клетках Z-VAD-FMK не обеспечивал полной защиты, а его комбинация с ингибитором катепсинов (особенно Ac-PLVE-FMK) приводила к аддитивному подавлению гибели: в клетках A-498 уровень аннексин V^+/PI^- клеток снижался с 27,5% до 9,8%. Ограниченная эффективность Z-VAD-FMK описана и для других опухолей, например, при генистеин-индуцированном апоптозе в клетках мастоцитомы P81 [244]. Полученный результат полностью согласуется с классическими работами Cirman и соавт. (2004) и Droga-Mazovec и соавт. (2008) [104,105], в которых было показано существование двух параллельных, функционально перекрывающихся эффекторных систем апоптоза в опухолевых клетках. Блокировка одного пути не спасает клетку, поскольку гибель реализуется через альтернативный механизм, и только их одновременное ингибирование эффективно предотвращает апоптоз. Более того, литературные данные указывают на прямую деградацию XIAP цистеиновыми катепсинами, что снимает ингибирование каспаз и создаёт петлю положительной обратной связи [104]. По-видимому, именно этот механизм лежит в основе наблюдаемого нами комбинаторного эффекта в клетках ПКР.

Анализ временной динамики процессинга одиннадцати цистеиновых катепсинов (рис. 17–18) выявил принципиальные различия между нормальными и опухолевыми клетками. В эмбриональных клетках НЕК293 большинство катепсинов демонстрировали стабильность экспрессии, а временные изменения (например, для катепсинов С, L, Н) носили обратимый характер, что отражает жёсткий контроль протеолитического гомеостаза. В опухолевых линиях, напротив, наблюдались глубокие и часто необратимые сдвиги. Особого внимания заслуживают три группы ферментов. Катепсины В и О характеризовались снижением содержания промежуточных и зрелых форм без компенсаторного накопления, что может указывать на ингибирование их созревания или усиленную деградацию. Катепсины К, L и Н, напротив, проявляли выраженную активацию: в линии А-498 зрелая форма катепсина К возрастала многократно, а катепсин L накапливался в поздние сроки (36–48 часов). Третью группу составили катепсины с разнонаправленной динамикой (W, С, F), что подчёркивает индивидуальные молекулярные особенности линий ПКР. Выявленные изменения согласуются с данными о способности катепсинов В, L, S, К и Н расщеплять антиапоптотические белки Bcl-xL, Mcl-1, Bax и BimEL [104], а также с сообщениями об усилении оксалиплатин-индуцированного апоптоза при ингибировании катепсина К через стабилизацию p53 [245]. Таким образом, протеолитический фенотип опухолевых клеток характеризуется сдвигом в сторону устойчивой активации определённых катепсинов (К, L, Н), что может служить как механизмом адаптации к стрессу, так и потенциальной мишенью для терапевтического воздействия.

В совокупности, полученные результаты позволяют сформулировать концепцию, согласно которой эффективность камптотецина при ПКР определяется балансом между его генотоксическим действием и состоянием лизосомально-катепсиновой системы. С одной стороны, индукция ЛМП и активация катепсинов способствуют запуску клеточной гибели, а с другой – те же ферменты могут участвовать в механизмах резистентности, включая лизосомальную секвестрацию препарата и цитопротективную аутофагию. Выявленная нами гетерогенность ответа даже среди линий одного гистологического типа подчёркивает необходимость персонализированного подхода при разработке схем терапии, нацеленных на модуляцию активности катепсинов. Дальнейшие исследования должны быть направлены на идентификацию специфических субстратов активированных катепсинов в клетках ПКР и оценку возможности использования комбинаций ингибиторов каспаз и катепсинов для преодоления химиорезистентности.

Среди новых направлений терапии всё большее внимание привлекают наноразмерные биологические частицы, способные нести противоопухолевый агент или иной терапевтический конструктор. Их преимущества — клеточное происхождение, длительная

циркуляция в плазме, высокая биосовместимость, возможность программирования поверхности и загрузки соединений различной природы (от низкомолекулярных веществ до белков и нуклеиновых кислот). Концепция использования протеолитической активности опухолевых клеток для селективного высвобождения лекарств основана на том, что цистеиновые катепсины гиперэкспрессированы при раке молочной железы, колоректальном раке, раке яичников, желудка и почки [29,193–195]. Эта особенность делает катепсины идеальными триггерами для наноразмерных систем доставки, позволяя высвобождать цитотоксический агент именно в опухолевых клетках и снижая системную токсичность.

Показано, что альбуминовые наночастицы с меньшим количеством сшивающего агента значительно быстрее деградируют под действием папаина, пепсина и трипсина по сравнению с альбуминовые наночастицы с большим количеством сшивающего агента. Более того, высокая степень сшивки глutarальдегидом обеспечивает альбуминовые наночастицы с большим количеством сшивающего агента повышенную устойчивость не только к протеолизу, но и к экстремальным значениям pH и повышенной температуре. Эти данные согласуются с классическими представлениями о том, что плотность поперечных сшивок в белковом матриксе напрямую коррелирует с его резистентностью к ферментативной деградации [246].

Важным наблюдением стало то, что ковалентная модификация остатков лизина флуорофором AF555 заметно снижала протеолитическую деградацию альбуминовые наночастицы с меньшим количеством сшивающего агента. Этот феномен, вероятно, связан с пространственным блокированием сайтов узнавания протеиназ, что согласуется с данными о том, что химическая модификация поверхностных аминокислот может изменять взаимодействие наночастиц с биологическими средами [247]. Данный факт имеет принципиальное значение для интерпретации экспериментов по визуализации меченых носителей в живых клетках и указывает на необходимость осторожного выбора флуорофоров для таких исследований.

В отличие от альбуминовых носителей, где доминирующим фактором деградации является протеолиз, стабильность мембранных биологических нановезикул определяется преимущественно pH среды. Нами установлено, что биоподобные нановезикулы, полученные слиянием биологических нановезикул с синтетическими липосомами, демонстрируют значительно более выраженную pH-чувствительность по сравнению с нативными биологическими нановезикулами. Данный механизм широко используется при конструировании pH-чувствительных липосом: например, липосомы на основе DOPE/CHEMS быстро высвобождают содержимое в кислой среде эндосом и лизосом, что подтверждает универсальность подхода [248]. Кроме того, недавние исследования

показывают, что жесткость наночастиц является критическим параметром, определяющим их внутриклеточную судьбу: более жесткие частицы склонны к транцитозу и способны избегать лизосомальной деградации, тогда как менее жесткие — активнее разрушаются в лизосомах [249]. Это наблюдение дополняет нашу модель, объясняя, почему альбуминовые наночастицы с большим количеством сшивающего агента (более жесткие) медленнее высвобождают препарат по сравнению с альбуминовые наночастицы с меньшим количеством сшивающего агента. В совокупности эти данные подтверждают, что pH-зависимая дестабилизация мембраны и протеолитическая деградация матрикса являются ключевыми, взаимодополняющими механизмами, определяющими высвобождение груза из наночастиц в лизосомальном компартменте.

Ключевым результатом является прямое доказательство того, что цистеиновые катепсины вносят существенный вклад в деградацию биоподобных нановезикул, тогда как нативные биологические нановезикулы менее подвержены лизосомальному протеолизу. На фоне ингибирования катепсинов E-64 и Ac-PLVE-FMK внутриклеточный сигнал биоподобных нановезикул значительно возрастал, тогда как для биологических нановезикул аналогичного эффекта не наблюдалось. Эти данные согласуются с концепцией использования ферментативной активности катепсинов в качестве триггера для селективного высвобождения препарата в опухолевых клетках, что активно разрабатывается в современных исследованиях [250]. В частности, показано, что дифференциальная ферментативная активность катепсина В в эндолизосомах опухолевых клеток может быть использована для контролируемого эндосомального ускользания и селективной доставки терапевтических белков. Более того, создание катепсин В-активируемых пролекарств сунитиниба демонстрирует повышенную активность в клеточных линиях с высокой экспрессией катепсина В (например, Saki-1) по сравнению с нерасщепляемыми аналогами [251,252].

Принципиально новым результатом является обнаружение того, что интернализация альбуминовых наночастиц индуцирует повышение экспрессии катепсинов В, D и G, причём наиболее выраженные изменения зарегистрированы для катепсина В. В линии 769-P этот ответ носил прогрессирующий характер, в SKBR3 оставался стабильно повышенным. Эти данные имеют двойственное значение: с одной стороны, повышенная экспрессия катепсина В может усиливать высвобождение груза из носителей, чувствительных к протеолизу; с другой — избыточная протеолитическая активность может способствовать деградации внеклеточного матрикса и инвазии. Литературные данные подтверждают, что альбуминовые частицы вызывают увеличение экспрессии катепсинов В и D на уровне мРНК [253].

Измерение внутриклеточного высвобождения родамина 123 из альбуминовых наночастиц с меньшим и большим количеством сшивающего агента показало статистически значимо более быстрое снижение флуоресцентного сигнала в клетках, обработанных наночастицами с малым количеством сшивающего агента, что коррелирует с их повышенной чувствительностью к протеолизу. Этот результат прямо подтверждает, что ускоренное протеолитическое разрушение «рыхлой» матрицы реализуется в живых клетках и скорость высвобождения груза зависит от протеолитического профиля клеток-мишеней. Эффективность эндолизосомального ускользания, как показывают недавние работы, критически зависит от жёсткости и структурных параметров наночастиц [254].

С терапевтической точки зрения является важным наблюдение, что альбуминовые наночастицы с меньшим количеством сшивающего агента, несмотря на более низкую эффективность загрузки сунитиниба (11,2% против 18,2%), статистически значимо сильнее подавляли жизнеспособность опухолевых клеток, особенно в линии 769-P с исходно высоким и дополнительно индуцируемым уровнем катепсина В. Этот парадоксальный результат объясняется «взрывным высвобождением» препарата при быстрой протеолитической деградации матрикса с меньшим количеством сшивков, что позволяет достичь цитотоксического порога быстрее, чем активируются системы детоксикации [255]. Данная концепция находит подтверждение в современных исследованиях, где показано, что быстрое высвобождение в ответ на специфические триггеры часто превосходит по эффективности традиционное устойчивое высвобождение [256]. Принципиальное отличие нашего подхода от традиционных катепсин-расщепляемых линкеров состоит в комплексном характере протеолитической атаки: деградация альбуминовой сетки требует множественных актов гидролиза, что обеспечивает высокую стабильность в кровотоке и быстрое разрушение только в компартменте с высокой локальной активностью катепсинов.

Полученные данные позволяют сформулировать новый принцип персонализированного выбора наноносителя: в опухолях с доказанной гиперэкспрессией катепсинов (что характерно для многих злокачественных новообразований, включая ПКР) предпочтительны альбуминовые наночастицы с меньшим количеством сшивающего агента, обеспечивающие ускоренное протеолитическое высвобождение препарата. Современные исследования подтверждают, что катепсин В является значимым фактором прогрессии почечно-клеточного рака и помогает в клинической оценке прогноза пациентов [70], а повышенная экспрессия катепсина S в микроокружении опухоли играет критическую роль в иммунной регуляции и терапевтическом ответе [257]. Рандомизированное исследование (2025) подтвердило прямую связь между концентрацией катепсинов (в частности, катепсина В и S) и риском развития ПКР [258]. Эти данные обосновывают необходимость учёта

индивидуального протеолитического профиля опухоли при выборе оптимального типа наноносителя в рамках персонализированной медицины.

5. 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: частицы с низкой степенью сшивки быстро деградируют лизосомальными протеиназами, обеспечивая ускоренное высвобождение агента и более высокую цитотоксичность. Сама интернализация частиц индуцирует экспрессию катепсина B, формируя положительную обратную связь, усиливающую разрушение носителя. На модели мембранных нановезикул установлено, что включение синтетических липидов в биологические нановезикулы придаёт им pH-чувствительность. Избирательное ингибирование катепсинов повышает внутриклеточную стабильность биоподобных нановезикул, 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.

6. Список сокращений

АНЧ-ВСШ	—	альбуминовые наночастицы с высокой степенью сшивки
АНЧ-НСШ	—	альбуминовые наночастицы с низкой степенью сшивки
АФК	—	активные формы кислорода
ВКМ	—	внеклеточный матрикс
ДМСО	—	диметилсульфоксид
ДНК	—	дезоксирибонуклеиновая кислота
Крио-ПЭМ	—	криогенная просвечивающая электронная микроскопия
ЛЗКГ	—	лизосом-зависимая клеточная гибель
Ман-6-Ф	—	маннозо-6-фосфат
мРНК	—	матричная рибонуклеиновая кислота
ОМО	—	опухолевое микроокружение
ПААГ	—	полиакриламидный гель
ПВММ	—	пермеабилзация внешней мембраны митохондрии
ПКР	—	почечно-клеточный рак
ПЛМ	—	пермеабилзация лизосомальной мембраны
ПЦР	—	полимеразная цепная реакция
ПЭГ	—	полиэтиленгликоль
ПЭМ	—	просвечивающая электронная микроскопия
РНК	—	рибонуклеиновая кислота
ТГС	—	транс-Гольджи сеть
ЭМП	—	эпителиально-мезенхимальный переход
ЭПР	—	эндоплазматический ретикулум
ADC	—	конъюгат антитело-лекарственное средство
ADCD	—	аутофагическая клеточная смерть
ANOVA	—	однофакторный дисперсионный анализ
BCA	—	бицинхониновая кислота (метод определения белка)
CA	—	клан цистеиновых протеаз
CA-074Me	—	ингибитор катепсина В
ccRCC	—	светлоклеточный почечно-клеточный рак
CPT	—	камптотецин
CRN	—	заряд-обратимые наноносители
CTS	—	катепсин
DAMPs	—	опасность-ассоциированные молекулярные паттерны
DAPI	—	4',6-диамидино-2-фенилиндол (ядерный краситель)
DISC	—	сигнальный комплекс, индуцирующий гибель
E-64	—	ингибитор цистеиновых протеаз
ECL	—	усиленная хемилюминесценция
EDTA	—	этилендиаминтетрауксусная кислота
EPR	—	повышенная проницаемость и удержание (enhanced permeability and retention)
FACS	—	флуоресцентная сортировка клеток
FAM	—	флуоресцеин (флуоресцентная метка)
GAG	—	гликозаминогликаны
GAPDH	—	глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа
GFLG	—	тетрапептид Gly-Phe-Leu-Gly
GSDMD	—	газдермин D
GSDMD-N	—	N-концевой фрагмент газдермина D
GSH	—	глутатион

ICAD	— ингибитор каспазо-активируемой ДНКазы
IRF-1	— интерферон-регуляторный фактор 1
IVIVC	— корреляция in vitro-in vivo
LAMP-1	— лизосомальный ассоциированный мембранный белок 1
LLOMe	— L-лейцил-L-лейцина метиловый эфир
M6P	— маннозо-6-фосфат
M6PR	— маннозо-6-фосфатный рецептор
MMP	— матриксная металлопротеиназа
MTT	— 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид
NETs	— нейтрофильные внеклеточные ловушки
NLS	— сигнал ядерной локализации
NTA	— анализ траекторий наночастиц
PAMPs	— патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
PARP-1	— поли-(АДФ-рибоза)-полимераза 1
PBS	— фосфатно-солевой буфер
PEI	— полиэтиленимин
PI	— пропидия йодид
PVDF	— поливинилиденфторид
RIPA	— радиоиммунопреципитационный буфер
SDS	— додецилсульфат натрия
SDS-PAGE	— электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
TAMs	— опухоли-ассоциированные макрофаги
tBid	— усечённая форма Bid
TBST	— трис-буферный солевой раствор с Твин 20
TCGA	— атлас ракового генома (The Cancer Genome Atlas)
TEM	— просвечивающая электронная микроскопия
TNF- α	— фактор некроза опухоли альфа
TRAIL	— TNF-связанный апоптоз-индуцирующий лиганд
Tris	— трис(гидроксиметил)аминометан
VA	— дипептид Val-Ala
VCit	— дипептид Val-Cit
XIAP	— X-связанный ингибитор апоптоза
Z-VAD-FMK	— пан-каспазный ингибитор

7. Список литературы

1. Age-Standardized Rate (World) per 100 000, Incidence, Both sexes, in 2024 [Электронный ресурс]. – Global Cancer Observatory (WHO-IARC), 2024. – Режим доступа: https://gco.iarc.who.int/today/en/dataviz/bars?mode=cancer&group_populations=1&types=0
2. Fujii Y, Asadi Z, Mehla K. Cathepsins: Emerging targets in the tumor ecosystem to overcome cancers // *Semin Cancer Biol.* 2025. Vol. 112. P. 150-166.
3. Wang Y, Otte A, Park H, Park K. In vitro-in vivo correlation (IVIVC) development for long-acting injectable drug products based on poly(lactide-co-glycolide) // *J Control Release.* 2025. Vol. 377. P. 186-196.
4. Liu Y, Zhang Z, Du H, et al. An enzyme-responsive hydrogel functionalized with mesoporous silica nanoparticles for co-delivery of cisplatin and shRNA to overcome chemotherapy resistance in non-small cell lung cancer // *RSC Adv.* 2025. Vol. 15, № 29. P. 23966-23977.
5. Rot AE, Hrovatin M, Bokalj B, Lavrih E, Turk B. Cysteine cathepsins: From diagnosis to targeted therapy of cancer // *Biochimie.* 2024. Vol. 226. P. 10-28.
6. Wang X, Li H, Chen C, Liang Z. Understanding of endo/lysosomal escape of nanomaterials in biomedical application // *Smart Mol.* 2025. Vol. 3, № 4.
7. Wei S, Liu W, Xu M, et al. Cathepsin F and Fibulin-1 as novel diagnostic biomarkers for brain metastasis of non-small cell lung cancer // *Br J Cancer* 2022 12612. 2022. Vol. 126, № 12. P. 1795-1805.
8. Malla RR, Gopinath S, Alapati K, Gorantla B, Gondi CS, Rao JS. UPAR and cathepsin B inhibition enhanced radiation-induced apoptosis in gliomaintiating cells // *Neuro Oncol.* 2012. Vol. 14, № 6. P. 745-760.
9. Goulet B, Baruch A, Moon NS, et al. A cathepsin L isoform that is devoid of a signal peptide localizes to the nucleus in S phase and processes the CDP/Cux transcription factor // *Mol Cell.* 2004. Vol. 14, № 2. P. 207-219.
10. Grotsky DA, Gonzalez-Suarez I, Novell A, et al. BRCA1 loss activates cathepsin L-mediated degradation of 53BP1 in breast cancer cells // *J Cell Biol.* 2013. Vol. 200, № 2. P. 187-202.
11. Jiang Y, Oron TR, Clark WT, et al. An expanded evaluation of protein function prediction methods shows an improvement in accuracy // *Genome Biol.* 2016. Vol. 17, № 1. P. 1-19.
12. Lamparska-Przybysz M, Gajkowska B, Motyl T. Cathepsins and BID are involved in the molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to camptothecin. // *J Physiol Pharmacol.* 2005. Vol. 56 Suppl 3. P. 159-179.
13. Rathore B, Sunwoo K, Jangili P, et al. Nanomaterial designing strategies related to cell

- lysosome and their biomedical applications: A review // *Biomaterials*. 2019. Vol. 211. P. 25-47.
14. Yoon MC, Phan V, Podvin S, Mosier C, O'Donoghue AJ, Hook V. Distinct Cleavage Properties of Cathepsin B Compared to Cysteine Cathepsins Enable the Design and Validation of a Specific Substrate for Cathepsin B over a Broad pH Range // *Biochemistry*. 2023. Vol. 62, № 15. P. 2289-2300.
 15. Ren J, Zhang Z, Geng S, et al. Molecular Mechanisms of Intracellular Delivery of Nanoparticles Monitored by an Enzyme-Induced Proximity Labeling // *Nano-Micro Lett*. 2024. Vol. 16, № 1. P. 1-24.
 16. Zhang N, Wu H, Liang Y, et al. Design and preparation of “corn-like” spions@dfk-sbp-m13 assembly for improvement of effective internalization // *Int J Nanomedicine*. 2021. Vol. 16. P. 7091-7102.
 17. Zhang P, Chen D, Fang Y, et al. Bone homeostasis regulation by in vivo generation of osteoclast-derived apoptotic bodies using targeted self-assembly // *Nat Commun*. 2025. Vol. 17, № 1. P. 88.
 18. Geetha D, Skaria T. Cathepsin S: A key drug target and signalling hub in immune system diseases // *Int Immunopharmacol*. 2025. Vol. 155, № 155:114622. P. 114622.
 19. Wang Y, Xiang P, Li Y, Wu Y, Cai H, Luo K. Tumor Microenvironmental Stimuli-Responsive Linear-Dendritic Polymeric Conjugate as Potential Nanomedicine // *Macromol Rapid Commun*. 2026. Vol. 47, № 11.
 20. Egorova VS, Kolesova EP, Lopus M, Yan N, Parodi A, Zamyatnin AA. Smart Delivery Systems Responsive to Cathepsin B Activity for Cancer Treatment // *Pharmaceutics*. 2023. Vol. 15, № 7. P. 1848.
 21. Itoh Y. Proteolytic modulation of tumor microenvironment signals during cancer progression // *Front Oncol*. 2022. Vol. 12, № September. P. 1-16.
 22. Radisky ES. Extracellular proteolysis in cancer: Proteases, substrates, and mechanisms in tumor progression and metastasis // *J Biol Chem*. 2024. Vol. 300, № 6. P. 107347.
 23. Gifford V, Itoh Y. MT1-MMP-dependent cell migration: Proteolytic and non-proteolytic mechanisms // *Biochem Soc Trans*. 2019. Vol. 47, № 3. P. 811-826.
 24. Torres-Paris C, Chen Y, Xiao L, Song HJ, Chen P, Komives EA. The autoactivation of human single-chain urokinase-type plasminogen activator (uPA) // *J Biol Chem*. 2023. Vol. 299, № 10. P. 105179.
 25. Bromme D. *Extracellular Matrix Degradation* (Parks WC, Mecham RP, eds.). Springer Berlin Heidelberg; 2011.
 26. Hu B, Kong LL, Matthews RT, Viapiano MS. The proteoglycan brevican binds to fibronectin after proteolytic cleavage and promotes glioma cell motility // *J Biol Chem*. 2008. Vol. 283,

- № 36. P. 24848-24859.
27. Tedelind S, Poliakova K, Valeta A, et al. Nuclear cysteine cathepsin variants in thyroid carcinoma cells // *Biol Chem*. 2010. Vol. 391, № 8. P. 923-935.
 28. Sloane BF, Rozhin J, Johnson K, Taylor H, Crissman JD, Honn K V. Cathepsin B: Association with plasma membrane in metastatic tumors // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986. Vol. 83, № 8. P. 2483-2487.
 29. Olson OC, Joyce JA. Cysteine cathepsin proteases: regulators of cancer progression and therapeutic response // *Nat Rev Cancer* 2015 1512. 2015. Vol. 15, № 12. P. 712-729.
 30. DE DUVE C, PRESSMAN BC, GIANETTO R, WATTIAUX R, APPELMANS F. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. // *Biochem J*. 1955. Vol. 60, № 4. P. 604-617.
 31. Chapman HA, Riese RJ, Shi GP. Emerging roles for cysteine proteases in human biology // *Annu Rev Physiol*. 1997. Vol. 59, № February 1997. P. 63-88.
 32. Fasanya HO, Siemann DW. The Role of Cathepsins in the Growth of Primary and Secondary Neoplasia in the Bone // *Osteology*. 2020. Vol. 1, № 1. P. 3-28.
 33. Kawakubo T, Yasukochi A, Okamoto K, Okamoto Y, Nakamura S, Yamamoto K. The role of cathepsin E in terminal differentiation of keratinocytes // *Biol Chem*. 2011. Vol. 392, № 6. P. 571-585.
 34. Turk V, Turk B, Turk D. Lysosomal cysteine proteases: Facts and opportunities // *EMBO J*. 2001. Vol. 20, № 17. P. 4629-4633.
 35. Rudzińska M, Parodi A, Soond SM, et al. The Role of Cysteine Cathepsins in Cancer Progression and Drug Resistance // *Int J Mol Sci*. 2019. Vol. 20, № 14. P. 3602.
 36. Dai R, Wu Z, Chu HY, et al. Cathepsin K: The Action in and Beyond Bone // *Front Cell Dev Biol*. 2020. Vol. 8, № June. P. 1-13.
 37. Gao H, Zhang Z, Deng J, Song Y. Cathepsin S: molecular mechanisms in inflammatory and immunological processes // *Front Immunol*. 2025. Vol. 16, № July. P. 1-11.
 38. Santamaría I, Velasco G, Cazorla M, Fueyo A, Campo E, López-Otín C. Cathepsin L2, a novel human cysteine proteinase produced by breast and colorectal carcinomas // *Cancer Res*. 1998. Vol. 58, № 8. P. 1624-1630.
 39. Brömme D, Li Z, Barnes M, Mehler E. Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization // *Biochemistry*. 1999. Vol. 38, № 8. P. 2377-2385.
 40. Wex T, Bühling F, Wex H, et al. Human Cathepsin W, a Cysteine Protease Predominantly Expressed in NK Cells, Is Mainly Localized in the Endoplasmic Reticulum // *J Immunol*. 2001. Vol. 167, № 4. P. 2172-2178.
 41. Duncan EM, Muratore-Schroeder TL, Cook RG, et al. Cathepsin L Proteolytically Processes

- Histone H3 During Mouse Embryonic Stem Cell Differentiation // *Cell*. 2008. Vol. 135, № 2. P. 284-294.
42. Gunter Maubach, Michelle Chin Chia Lim and LZ. Nuclear cathepsin F regulates activation markers in rat hepatic stellate cells // *Mol Biol Cell*. 2008. Vol. 19, № 10. P. 4238-4248.
 43. Stoka V, Turk B, Turk V. Lysosomal cysteine proteases: Structural features and their role in apoptosis // *IUBMB Life*. 2005. Vol. 57, № 4-5. P. 347-353.
 44. Harper E, Berger A. On the size of the active site in proteases: I. Papain // *Biochem Biophys Res Commun*. 1972. Vol. 46, № 5. P. 1956-1960.
 45. Lecaille F, Weidauer E, Juliano MA, Brömme D, Lalmanach G. Probing cathepsin K activity with a selective substrate spanning its active site // *Biochem J*. 2003. Vol. 375, № 2. P. 307-312.
 46. Wiederanders B. The Function of Propeptide Domains of Cysteine Proteinases In: *Cellular Peptidases in Immune Functions and Diseases 2*. Vol 477. Kluwer Academic Publishers; 2000:261-270.
 47. Cygler M, Sivaraman J, Grochulski P, Coulombe R, Storer AC, Mort JS. Structure of rat procathepsin B: Model for inhibition of cysteine protease activity by the proregion // *Structure*. 1996. Vol. 4, № 4. P. 405-416.
 48. M. Manchanda, Nishat Fatima and SSC. Proteases in Physiology and Pathology // *Proteases Physiol Pathol*. 2017. P. 1-619.
 49. Dahl SW, Halkier T, Lauritzen C, et al. Human recombinant pro-dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) can be activated by cathepsins L and S but not by autocatalytic processing // *Biochemistry*. 2001. Vol. 40, № 6. P. 1671-1678.
 50. Vasiljeva O, Dolinar M, Pungerčar JR, Turk V, Turk B. Recombinant human procathepsin S is capable of autocatalytic processing at neutral pH in the presence of glycosaminoglycans // *FEBS Lett*. 2005. Vol. 579, № 5. P. 1285-1290.
 51. Turk B, Dolenc I, Turk D, et al. Regulation of the Activity of Lysosomal Cysteine Proteinases by pH-Induced Inactivation and/or Endogenous Protein Inhibitors, Cystatins // *Biol Chem Hoppe Seyler*. 1995. Vol. 376, № 4. P. 225-230.
 52. Jordans S, Jenko-Kokalj S, Köhl NM, et al. Monitoring compartment-specific substrate cleavage by cathepsins B, K, L, and S at physiological pH and redox conditions // *BMC Biochem*. 2009. Vol. 10, № 1. P. 1-15.
 53. Malara A, Ligi D, Di Buduo C, Mannello F, Balduini A. Sub-Cellular Localization of Metalloproteinases in Megakaryocytes // *Cells*. 2018. Vol. 7, № 7. P. 80.
 54. Puchi M, García-Huidobro J, Cordova C, et al. A new nuclear protease with cathepsin L properties is present in HeLa and Caco-2 cells // *J Cell Biochem*. 2010. Vol. 111, № 5. P. 1099-1106.

55. Tamhane T, Wolters BK, Illukkumbura R, Maeldandsmo GM, Haugen MH, Brix K. Construction of a plasmid coding for green fluorescent protein tagged cathepsin L and data on expression in colorectal carcinoma cells // *Data Br.* 2015. Vol. 5. P. 468-475.
56. Bestvater F, Dallner C, Spiess E. The C-terminal subunit of artificially truncated human cathepsin B mediates its nuclear targeting and contributes to cell viability // *BMC Cell Biol* 2005 61. 2005. Vol. 6, № 1. P. 1-19.
57. Hiwasa T, Sakiyama S. Nuclear localization of procathepsin L/MEP in ras-transformed mouse fibroblasts // *Cancer Lett.* 1996. Vol. 99, № 1. P. 87-91.
58. Sullivan S, Tosetto M, Kevans D, et al. Localization of nuclear cathepsin L and its association with disease progression and poor outcome in colorectal cancer // *Int J Cancer.* 2009. Vol. 125, № 1. P. 54-61.
59. Atypical localization of membrane type 1-matrix metalloproteinase in the nucleus is associated with aggressive features of hepatocellular carcinoma // *Mol Carcinog.* 2007. Vol. 45. P. 225–230.
60. Mäkinen LK, Häyry V, Atula T, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-2, -8, -9, and -13 in oral tongue cancer // *J Oral Pathol Med.* 2012. Vol. 41, № 5. P. 394-399.
61. Khalkhali-Ellis Z, Goossens W, Margaryan N V., Hendrix MJC. Cleavage of histone 3 by cathepsin D in the involuting mammary gland // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 7. P. 1-9.
62. Sivaparthi M, Sawaya R, Gokaslan ZL, Chintala KS, Rao JS. Expression and the role of cathepsin H in human glioma progression and invasion // *Cancer Lett.* 1996. Vol. 104, № 1. P. 121-126.
63. Yang Z, Liu Y, Qin L, et al. Cathepsin H–Mediated Degradation of HDAC4 for Matrix Metalloproteinase Expression in Hepatic Stellate Cells // *Am J Pathol.* 2017. Vol. 187, № 4. P. 781-797.
64. Wang Y, Niu H, Hu Z, et al. Targeting the lysosome by an aminomethylated Riccardin D triggers DNA damage through cathepsin B-mediated degradation of BRCA1 // *J Cell Mol Med.* 2019. Vol. 23, № 3. P. 1798-1812.
65. Kenig S, Frangež R, Pucer A, Lah T. Inhibition of cathepsin L lowers the apoptotic threshold of glioblastoma cells by up-regulating p53 and transcription of caspases 3 and 7 // *Apoptosis.* 2011. Vol. 16, № 7. P. 671-682.
66. Orth JD, Krueger EW, Weller SG, McNiven MA. A Novel Endocytic Mechanism of Epidermal Growth Factor Receptor Sequestration and Internalization // *Cancer Res.* 2006. Vol. 66, № 7. P. 3603-3610.
67. Zheng X, Chu F, Chou PM, et al. Cathepsin L inhibition suppresses drug resistance in vitro and in vivo: a putative mechanism // *Am J Physiol Physiol.* 2009. Vol. 296, № 1. P. C65-C74.
68. Ulbright TM, Tickoo SK, Berney DM, Srigley JR. Best Practices Recommendations in the

- Application of Immunohistochemistry in the Kidney Tumors // *Am J Surg Pathol*. 2014. Vol. 38, № 8. P. e50-e59.
69. Chen CH, Bhasin S, Khanna P, et al. Study of Cathepsin B inhibition in VEGFR TKI treated human renal cell carcinoma xenografts // *Oncogenesis*. 2019. Vol. 8, № 3. P. 15.
 70. Yan Z, Zheng G, Zou J, Zou X, Chai K, Zhang G. Cathepsin B in urological tumors: unraveling its role and therapeutic potential // *Discov Oncol*. 2025. Vol. 16, № 1. P. 707.
 71. Giri A, Hong IS, Kwon TK, et al. Exploring therapeutic and diagnostic potential of cysteine cathepsin as targets for cancer therapy with nanomedicine // *Int J Biol Macromol*. 2025. Vol. 315. P. 144324.
 72. Wang X, Feng B, Guo HY, et al. Roles of cathepsin S expression levels on the prognosis and tumour microenvironment in clear cell renal cell carcinoma // *Discov Oncol*. 2024. Vol. 15, № 1.
 73. Rudzinska-Radecka M, Frolova AS, Balakireva A V., et al. 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.
 74. Zhou X, Chen H, Huang D, et al. Reduced expression of cathepsin F predicts poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma // *Sci Rep*. 2024. Vol. 14, № 1. P. 1-13.
 75. Martignoni G, Bonetti F, Chilosi M, et al. Cathepsin K expression in the spectrum of perivascular epithelioid cell (PEC) lesions of the kidney // *Mod Pathol*. 2012. Vol. 25, № 1. P. 100-111.
 76. Calìò A, Brunelli M, Gobbo S, et al. Cathepsin k: A novel diagnostic and predictive biomarker for renal tumors // *Cancers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 10. P. 1-14.
 77. Merseburger AS, Hennenlotter J, Simon P, et al. Cathepsin D expression in renal cell cancer-clinical implications // *Eur Urol*. 2005. Vol. 48, № 3. P. 519-526.
 78. Vasudev NS, Sim S, Cairns DA, et al. Pre-operative urinary cathepsin D is associated with survival in patients with renal cell carcinoma // *Br J Cancer*. 2009. Vol. 101, № 7. P. 1175-1182.
 79. Xiao LX, Li XJ, Yu HY, et al. Macrophage-derived cathepsin L promotes epithelial-mesenchymal transition and M2 polarization in gastric cancer // *World J Gastroenterol*. 2024. Vol. 30, № 47. P. 5032-5054.
 80. Gocheva V, Zeng W, Ke D, et al. Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis // *Genes Dev*. 2006. Vol. 20, № 5. P. 543-556.
 81. Werner F, Sachse K, Reinheckel T. Secreted Cysteine Cathepsins – Versatile Players in Extracellular Proteolysis In: *Matrix Proteases in Health and Disease*. Wiley; 2012:283-297.
 82. Matarrese P, Ascione B, Ciarlo L, et al. Cathepsin B inhibition interferes with metastatic potential of human melanoma: An in vitro and in vivo study // *Mol Cancer*. 2010. Vol. 9. P.

1-14.

83. Stabuc B, Mrevlje Z, Markovic J, Stabuc-Silih M. Expression and prognostic significance of Cathepsin L in early cutaneous malignant melanoma. // *Neoplasma*. 2006. Vol. 53, № 3. P. 259-262.
84. Small DM, Burden RE, Jaworski J, et al. Cathepsin S from both tumor and tumor-associated cells promote cancer growth and neovascularization // *Int J Cancer*. 2013. Vol. 133, № 9. P. 2102-2112.
85. Sevenich L, Bowman RL, Mason SD, et al. Analysis of tumour- and stroma-supplied proteolytic networks reveals a brain-metastasis-promoting role for cathepsin S // *Nat Cell Biol*. 2014. Vol. 16, № 9. P. 876-888.
86. Lechner AM, Assfalg-Machleidt I, Zahler S, et al. RGD-dependent binding of procathepsin X to integrin $\alpha\beta 3$ mediates cell-adhesive properties // *J Biol Chem*. 2006. Vol. 281, № 51. P. 39588-39597.
87. Zheng X, Chou PM, Mirkin BL, Rebbaa A. Senescence-initiated Reversal of Drug Resistance: Specific Role of Cathepsin L // *Cancer Res*. 2004. Vol. 64, № 5. P. 1773-1780.
88. Storm van's Gravesande K, Layne MD, Ye Q, et al. IFN Regulatory Factor-1 Regulates IFN- γ -Dependent Cathepsin S Expression // *J Immunol*. 2002. Vol. 168, № 9. P. 4488-4494.
89. Bien S, Ritter CA, Gratz M, et al. Nuclear Factor- κ B Mediates Up-Regulation of Cathepsin B by Doxorubicin in Tumor Cells // *Mol Pharmacol*. 2004. Vol. 65, № 5. P. 1092-1102.
90. Houseweart MK, Vilaythong A, Yin X m, Turk B, Noebels JL, Myers RM. Apoptosis caused by cathepsins does not require Bid signaling in an in vivo model of progressive myoclonus epilepsy (EPM1) // *Cell Death Differ*. 2003. Vol. 10, № 12. P. 1329-1335.
91. Duong LT. Therapeutic inhibition of cathepsin K—reducing bone resorption while maintaining bone formation // *Bonekey Rep*. 2012. Vol. 1, № 5. P. 1-8.
92. Adhikari RP, Ghosh NS. Exploring the role of Cathepsin S in mitochondrial energy metabolism: implications for cancer progression and therapeutic targeting // *Med Oncol*. 2025. Vol. 42, № 11. P. 505.
93. Ostenfeld MS, Fehrenbacher N, Høyer-Hansen M, Thomsen C, Farkas T, Jäättelä M. Effective Tumor Cell Death by σ -2 Receptor Ligand Siramesine Involves Lysosomal Leakage and Oxidative Stress // *Cancer Res*. 2005. Vol. 65, № 19. P. 8975-8983.
94. Zhitomirsky B, Assaraf YG. Lysosomal sequestration of hydrophobic weak base chemotherapeutics triggers lysosomal biogenesis and lysosome-dependent cancer multidrug resistance // *Oncotarget*. 2015. Vol. 6, № 2. P. 1143-1156.
95. Hraběta J, Belhajová M, Šubrtová H, Rodrigo MAM, Heger Z, Eckschlager T. Drug sequestration in lysosomes as one of the mechanisms of chemoresistance of cancer cells and the possibilities of its inhibition // *Int J Mol Sci*. 2020. Vol. 21, № 12. P. 1-18.

96. Longacre M, Snyder N, Sarkar S. Drug Resistance in Cancer : An Overview 2014. P. 1769-1792.
97. Ishikawa T, Ikegami Y, Sano K, Nakagawa H, Sawada S. Transport Mechanism-Based Drug Molecular Design: Novel Camptothecin Analogues to Circumvent ABCG2-associated Drug Resistance of Human Tumor Cells // *Curr Pharm Des.* 2005. Vol. 12, № 3. P. 313-325.
98. Saleem A, Edwards TK, Rasheed Z, Rubin EH. Mechanisms of resistance to camptothecins // *Ann N Y Acad Sci.* 2000. Vol. 922. P. 46-55.
99. Dielschneider RF, Henson ES, Gibson SB. Lysosomes as Oxidative Targets for Cancer Therapy. // *Oxid Med Cell Longev.* 2017. Vol. 2017, № 1. P. 3749157.
100. Schindler M, Grabski S, Hoff E, Simon SM. Defective pH Regulation of Acidic Compartments in Human Breast Cancer Cells (MCF-7) Is Normalized in Adriamycin-Resistant Cells (MCF-7adr) // *Biochemistry.* 1996. Vol. 35, № 9. P. 2811-2817.
101. Honeywell RJ, Rudek MA, Beerepoot L V, René J. Lysosomal Sequestration of Sunitinib: A Novel Mechanism of Drug Resistance 2015. Vol. 17, № 23. P. 7337-7346.
102. Zhitomirsky B, Assaraf YG. Lysosomal accumulation of anticancer drugs triggers lysosomal exocytosis 2017. Vol. 8, № 28. P. 45117-45132.
103. Zhang J, Zhou W, Lin J, et al. Autophagic lysosomal reformation depends on mTOR reactivation in H2O2-induced autophagy // *Int J Biochem Cell Biol.* 2016. Vol. 70. P. 76-81.
104. Droga-Mazovec G, Bojič L, Petelin A, et al. Cysteine cathepsins trigger caspase-dependent cell death through cleavage of bid and antiapoptotic Bcl-2 homologues // *J Biol Chem.* 2008. Vol. 283, № 27. P. 19140-19150.
105. Cirman T, Orešić K, Mazovec GD, et al. Selective Disruption of Lysosomes in HeLa Cells Triggers Apoptosis Mediated by Cleavage of Bid by Multiple Papain-like Lysosomal Cathepsins // *J Biol Chem.* 2004. Vol. 279, № 5. P. 3578-3587.
106. Groth-Pedersen L, Jäättelä M. Combating apoptosis and multidrug resistant cancers by targeting lysosomes // *Cancer Lett.* 2013. Vol. 332, № 2. P. 265-274.
107. Yang J, Zhang R, Pan H, et al. Backbone Degradable N-(2-Hydroxypropyl)methacrylamide Copolymer Conjugates with Gemcitabine and Paclitaxel: Impact of Molecular Weight on Activity toward Human Ovarian Carcinoma Xenografts // *Mol Pharm.* 2017. Vol. 14, № 5. P. 1384-1394.
108. De Duve C, De Barse T, Poole B, Trouet A, Tulkens P, Van Hoof F. Lysosomotropic agents // *Biochem Pharmacol.* 1974. Vol. 23, № 18. P. 2495-2531.
109. Turk B, Turk D, Turk V. Protease signalling: the cutting edge // *EMBO J.* 2012. Vol. 31, № 7. P. 1630-1643.
110. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 // *Cell Death Differ.*

2018. Vol. 25, № 3. P. 486-541.
111. Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. The lysosomal – mitochondrial axis theory of postmitotic aging and cell death 2006. Vol. 163. P. 29-37.
 112. Terman A, Kurz T, Gustafsson B, Brunk UT. Lysosomal Labilization 2006. Vol. 58, № September. P. 531-539.
 113. Krönke M. Biophysics of ceramide signaling: interaction with proteins and phase transition of membranes // *Chem Phys Lipids*. 1999. Vol. 101, № 1. P. 109-121.
 114. Heinrich M, Wickel M, Schneider-Brachert W, et al. Cathepsin D targeted by acid sphingomyelinase-derived ceramide // *EMBO J*. 1999. Vol. 18, № 19. P. 5252-5263.
 115. Boya P, Poncet D, Andreau K, et al. Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine 2003. P. 3927-3936.
 116. Yamashita G, Takano N, Kazama H, Tsukahara K, Miyazawa K. p53 regulates lysosomal membrane permeabilization as well as cytoprotective autophagy in response to DNA-damaging drugs // *Cell Death Discov*. 2022. Vol. 8, № 1. P. 1-11.
 117. Paquet C, Sané AT, Beauchemin M, Bertrand R. Caspase- and mitochondrial dysfunction-dependent mechanisms of lysosomal leakage and cathepsin B activation in DNA damage-induced apoptosis // *Leukemia*. 2005. Vol. 19, № 5. P. 784-791.
 118. Yeung BHY, Huang DC, Sinicrope FA. PS-341 (bortezomib) induces lysosomal cathepsin B release and a caspase-2-dependent mitochondrial permeabilization and apoptosis in human pancreatic cancer cells // *J Biol Chem*. 2006. Vol. 281, № 17. P. 11923-11932.
 119. Li Y, Lv C, Li Z, Chen C, Cheng Y. Magnetic modulation of lysosomes for cancer therapy // *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology*. 2024. Vol. 16, № 2.
 120. Hu M, Carraway KL. Repurposing Cationic Amphiphilic Drugs and Derivatives to Engage Lysosomal Cell Death in Cancer Treatment // *Front Oncol*. 2020. Vol. 10, № December. P. 1-7.
 121. Ni J, Wu Z, Stoka V, et al. Increased expression and altered subcellular distribution of cathepsin B in microglia induce cognitive impairment through oxidative stress and inflammatory response in mice // *Aging Cell*. 2019. Vol. 18, № 1.
 122. Serrano-Puebla A, Boya P. Lysosomal membrane permeabilization as a cell death mechanism in cancer cells // *Biochem Soc Trans*. 2018. Vol. 46, № 2. P. 207-215.
 123. Turk B, Stoka V. Protease signalling in cell death: caspases versus cysteine cathepsins // *FEBS Lett*. 2007. Vol. 581, № 15. P. 2761-2767.
 124. de Castro M, Bunt G, Wouters F. Cathepsin B launches an apoptotic exit effort upon cell death-associated disruption of lysosomes // *Cell Death Discov*. 2016. Vol. 2, № 1. P. 1-8.
 125. Xu Y, Wang J, Song X, et al. Protective mechanisms of CA074-me (other than cathepsin-B inhibition) against programmed necrosis induced by global cerebral ischemia/reperfusion

- injury in rats // *Brain Res Bull*. 2016. Vol. 120. P. 97-105.
126. Friedrichs B, Tepel C, Reinheckel T, et al. Thyroid functions of mouse cathepsins B, K, and L // *J Clin Invest*. 2003. Vol. 111, № 11. P. 1733-1745.
 127. Erdal H, Berndtsson M, Castro J, Brunk U, Shoshan MC, Linder S. Induction of lysosomal membrane permeabilization by compounds that activate p53-independent apoptosis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005. Vol. 102, № 1. P. 192-197.
 128. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death // *Toxicol Pathol*. 2007. Vol. 35, № 4. P. 495-516.
 129. Mustafa M, Ahmad R, Tantry IQ, et al. Apoptosis: A Comprehensive Overview of Signaling Pathways, Morphological Changes, and Physiological Significance and Therapeutic Implications // *Cells*. 2024. Vol. 13, № 22. P. 1838.
 130. Blomgran R, Zheng L, Stendahl O. Cathepsin-cleaved Bid promotes apoptosis in human neutrophils via oxidative stress-induced lysosomal membrane permeabilization // *J Leukoc Biol*. 2007. Vol. 81, № 5. P. 1213-1223.
 131. Stoka V, Turk B, Schendel SL, et al. Lysosomal Protease Pathways to Apoptosis // *J Biol Chem*. 2001. Vol. 276, № 5. P. 3149-3157.
 132. Conus S, Perozzo R, Reinheckel T, et al. Caspase-8 is activated by cathepsin D initiating neutrophil apoptosis during the resolution of inflammation // *J Exp Med*. 2008. Vol. 205, № 3. P. 685-698.
 133. Ishisaka R, Utsumi K, Utsumi T. Involvement of Lysosomal Cysteine Proteases in Hydrogen Peroxide-induced Apoptosis in HL-60 Cells // *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002. Vol. 66, № 9. P. 1865-1872.
 134. Boya P, Kroemer G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death // *Oncogene*. 2008. Vol. 27, № 50. P. 6434-6451.
 135. Werneburg N, Guicciardi ME, Yin X ming, Gores GJ. TNF- α -mediated lysosomal permeabilization is FAN and caspase 8/Bid dependent // *Am J Physiol Liver Physiol*. 2004. Vol. 287, № 2. P. G436-G443.
 136. Wang Y, Tjandra N. Structural Insights of tBid, the Caspase-8-activated Bid, and Its BH3 Domain // *J Biol Chem*. 2013. Vol. 288, № 50. P. 35840-35851.
 137. Schrader K, Huai J, Jöckel L, Oberle C, Borner C. Non-caspase proteases: triggers or amplifiers of apoptosis? // *Cell Mol Life Sci*. 2010. Vol. 67, № 10. P. 1607-1618.
 138. Schotte P, Declercq W, Van Huffel S, Vandenabeele P, Beyaert R. Non-specific effects of methyl ketone peptide inhibitors of caspases // *FEBS Lett*. 1999. Vol. 442, № 1. P. 117-121.
 139. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response // *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2006. Vol. 1757, № 9-10. P. 1371-1387.

140. Sevrioukova IF. Apoptosis-Inducing Factor: Structure, Function, and Redox Regulation // *Antioxid Redox Signal*. 2011. Vol. 14, № 12. P. 2545.
141. Voronina M V., Frolova AS, Kolesova EP, Kuldyushev NA, Parodi A, Zamyatnin AA. The Intricate Balance between Life and Death: ROS, Cathepsins, and Their Interplay in Cell Death and Autophagy // *Int J Mol Sci*. 2024. Vol. 25, № 7. P. 4087.
142. Schwartz LM. Autophagic Cell Death During Development – Ancient and Mysterious // *Front Cell Dev Biol*. 2021. Vol. 9, № April. P. 1-7.
143. Zein L, Fulda S, Kögel D, van Wijk SJL. Organelle-specific mechanisms of drug-induced autophagy-dependent cell death // *Matrix Biol*. 2021. Vol. 100-101. P. 54-64.
144. Soori M, Lu G, Mason RW. Cathepsin Inhibition Prevents Autophagic Protein Turnover and Downregulates Insulin Growth Factor-1 Receptor–Mediated Signaling in Neuroblastoma // *J Pharmacol Exp Ther*. 2016. Vol. 356, № 2. P. 375-386.
145. Colella R, Lu G, Glazewski L, et al. Induction of cell death in neuroblastoma by inhibition of cathepsins B and L // *Cancer Lett*. 2010. Vol. 294, № 2. P. 195-203.
146. Xu T, Nicolson S, Sandow JJ, et al. Cp1/cathepsin L is required for autolysosomal clearance in *Drosophila* // *Autophagy*. 2021. Vol. 17, № 10. P. 2734-2749.
147. Chen J, Kos R, Garssen J, Redegeld F. Molecular insights into the mechanism of necroptosis: The necrosome as a potential therapeutic target // *Cells*. 2019. Vol. 8, № 12. P. 1-20.
148. Alu A, Han X, Ma X, Wu M, Wei Y, Wei X. The role of lysosome in regulated necrosis // *Acta Pharm Sin B*. 2020. Vol. 10, № 10. P. 1880-1903.
149. McComb S, Shutinoski B, Thurston S, Cessford E, Kumar K, Sad S. Cathepsins Limit Macrophage Necroptosis through Cleavage of Rip1 Kinase // *J Immunol*. 2014. Vol. 192, № 12. P. 5671-5678.
150. Liu S, Perez P, Sun X, et al. MLKL polymerization-induced lysosomal membrane permeabilization promotes necroptosis // *Cell Death Differ*. 2024. Vol. 31, № 1. P. 40-52.
151. Seo J, Lee EW, Sung H, et al. CHIP controls necroptosis through ubiquitylation- and lysosome-dependent degradation of RIPK3 // *Nat Cell Biol*. 2016. Vol. 18, № 3. P. 291-302.
152. Yu P, Zhang X, Liu N, Tang L, Peng C, Chen X. Pyroptosis: mechanisms and diseases // *Signal Transduct Target Ther*. 2021. Vol. 6, № 1.
153. Broz P. Pyroptosis: molecular mechanisms and roles in disease // *Cell Res*. 2025. Vol. 35, № 5. P. 334-344.
154. Wang Y, Jia L, Shen J, et al. Cathepsin B aggravates coxsackievirus B3-induced myocarditis through activating the inflammasome and promoting pyroptosis // *PLoS Pathog*. 2018. Vol. 14, № 1. P. 1-17.
155. Jungmichel S, Blasius M. Rapid and transient protein acetylation changes in response to DNA damage // *Cell Cycle*. 2013. Vol. 12, № 13. P. 1993.

156. Dixon SJ, Olzmann JA. The cell biology of ferroptosis // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024. Vol. 25, № 6. P. 424-442.
157. Nagakannan P, Islam MI, Conrad M, Eftekharpour E. Cathepsin B is an executioner of ferroptosis // *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2021. Vol. 1868, № 3. P. 118928.
158. Wang J, Wu N, Peng M, et al. Ferritinophagy: research advance and clinical significance in cancers // *Cell Death Discov.* 2023. Vol. 9, № 1. P. 1-10.
159. Hämälistö S, Stahl JL, Favaro E, et al. Spatially and temporally defined lysosomal leakage facilitates mitotic chromosome segregation // *Nat Commun.* 2020. Vol. 11, № 1.
160. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Wardini AB, Pinto-da-Silva LH, Saraiva EM. ETosis: A Microbicidal Mechanism beyond Cell Death // *J Parasitol Res.* 2012. Vol. 2012, № Table 1. P. 1-11.
161. Clancy DM, Henry CM, Sullivan GP, Martin SJ. Neutrophil extracellular traps can serve as platforms for processing and activation of IL-1 family cytokines // *FEBS J.* 2017. Vol. 284, № 11. P. 1712-1725.
162. Krishna S, Overholtzer M. Mechanisms and consequences of entosis // *Cell Mol Life Sci.* 2016. Vol. 73, № 11-12. P. 2379-2386.
163. Oberle C, Huai J, Reinheckel T, et al. Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes // *Cell Death Differ.* 2010. Vol. 17, № 7. P. 1167-1178.
164. Ueno T, Takahashi K. A cathepsin L-specific inhibitor preferentially inhibits degradation of autophagosomal LC3 and GABARAP in HeLa and Huh-7 cells // *Autophagy.* 2009. Vol. 5, № 6. P. 878-879.
165. Burster T, Macmillan H, Hou T, Boehm BO, Mellins ED. Cathepsin G: Roles in antigen presentation and beyond // *Mol Immunol.* 2010. Vol. 47, № 4. P. 658-665.
166. Gabizon AA, de Rosales RTM, La-Beck NM. Translational considerations in nanomedicine: The oncology perspective // *Adv Drug Deliv Rev.* 2020. Vol. 158. P. 140-157.
167. Mitchell MJ, Billingsley MM, Haley RM, Wechsler ME, Peppas NA, Langer R. Engineering precision nanoparticles for drug delivery // *Nat Rev Drug Discov.* 2021. Vol. 20, № 2. P. 101-124.
168. Elzoghby AO, Samy WM EN. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems // *J Control Release.* 2012. Vol. Jan 30, № 157(2). P. 168-182.
169. Fan S, Wang W, Che W, et al. Nanomedicines Targeting Metabolic Pathways in the Tumor Microenvironment: Future Perspectives and the Role of AI // *Metabolites.* 2025. Vol. 15, № 3. P. 201.
170. Danhier F. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? // *J Control Release.* 2016. Vol. 244. P. 108-121.

171. Chen L, Zang F, Wu H, et al. Using PEGylated magnetic nanoparticles to describe the EPR effect in tumor for predicting therapeutic efficacy of micelle drugs // *Nanoscale*. 2018. Vol. 10, № 4. P. 1788-1797.
172. Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, et al. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell // *Chem Soc Rev*. 2017. Vol. 46, № 14. P. 4218-4244.
173. Huotari J, Helenius A. Endosome maturation // *EMBO J*. 2011. Vol. 30, № 17. P. 3481-3500.
174. Zhdanov VP. Release of molecules from nanocarriers // *Phys Chem Chem Phys*. 2023. Vol. 25, № 42. P. 28955-28964.
175. Sun R, Chen Y, Pei Y, et al. The drug release of PLGA-based nanoparticles and their application in treatment of gastrointestinal cancers // *Heliyon*. 2024. Vol. 10, № 18. P. e38165.
176. Du J, Lane LA, Nie S. Stimuli-responsive nanoparticles for targeting the tumor microenvironment // *J Control Release*. 2015. Vol. 219. P. 205-214.
177. Gondi CS, Rao JS. Cathepsin B as a Cancer Target // *Expert Opin Ther Targets*. 2013. Vol. 17, № 3. P. 281.
178. Ruzza P, Quintieri L, Osler A, et al. Fluorescent, internally quenched, peptides for exploring the pH-dependent substrate specificity of cathepsin B // *J Pept Sci*. 2006. Vol. 12, № 7. P. 455-461.
179. Shinn J, Kwon N, Ah S, Yonghyun L. Smart pH - responsive nanomedicines for disease therapy // *J Pharm Investig*. 2022. Vol. 52, № 4. P. 427-441.
180. El Sadda RR. Glutathione responsive nanomedicine leverages tumor redox imbalance for targeted cancer theranostics // *Discov Oncol*. 2026. Vol. 17, № 1. P. 288.
181. Hu C, Ma J, Su Z, Wang J, Zhang X, Pang L, Qu Y, Shi J ZJ. Co-delivery of doxorubicin and glycyrrhetic acid via acid/glutathione dual responsive nano-prodrug with sodium bicarbonate carry-on for advanced combinational cancer treatment // *J Colloid Interface Sci*. Vol. 687. P. 248-260.
182. Jiang C, Li X, Wan S, et al. Copper-Doped Polydopamine Nanoparticles-Mediated GSH/GPX4-Depleted Ferroptosis and Cuproptosis Sensitizes Lung Tumor to Checkpoint Blockade Immunotherapy // *Small*. 2025. Vol. 21, № 23.
183. Giri A, Shin Y, Ha J, Chae S, Shrestha P, Pham KY, Kwon TK, Park JH, Jeong JH, Lee NK YS. Design of cathepsin-sensitive linkers for tumor-selective bioconjugate drug delivery // *J Control Release*. Vol. 10, № 387. P. 114197.
184. Anderson CF, Cui H. Protease-Sensitive Nanomaterials for Cancer Therapeutics and Imaging // *Ind Eng Chem Res*. 2017. Vol. 56, № 20. P. 5761-5777.
185. Öztürk K, Kaplan M, Çalış S. Effects of nanoparticle size, shape, and zeta potential on drug delivery // *Int J Pharm*. 2024. Vol. 666, № October. P. 124799.

186. Sadat Tabatabaei Mirakabad F, Nejati-Koshki K, Akbarzadeh A, Yamchi MR, Milani M, Zarghami N, Zeighamian V, Rahimzadeh A, Alimohammadi S, Hanifehpour Y JS. PLGA-based nanoparticles as cancer drug delivery systems // *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014. Vol. 15(2). P. 517-535.
187. Saadat M, Zahednezhad F, Zakeri-Milani P, Reza Heidari H, Shahbazi-Mojarrad J, Valizadeh H. Drug Targeting Strategies Based on Charge Dependent Uptake of Nanoparticles into Cancer Cells // *J Pharm Pharm Sci*. 2019. Vol. 22, № 9. P. 191-220.
188. Chou W chun, Lin Z. Impact of protein coronas on nanoparticle interactions with tissues and targeted delivery // *Curr Opin Biotechnol*. 2024. Vol. 85. P. 103046.
189. Gómez-Lázaro L, Martín-Sabroso C, Aparicio-Blanco J, Torres-Suárez AI. Assessment of In Vitro Release Testing Methods for Colloidal Drug Carriers: The Lack of Standardized Protocols // *Pharmaceutics*. 2024. Vol. 16, № 1. P. 103.
190. Wu W, Luo L, Wang Y, et al. Endogenous pH-responsive nanoparticles with programmable size changes for targeted tumor therapy and imaging applications // *Theranostics*. 2018. Vol. 8, № 11. P. 3038-3058.
191. Skotland T, Geir T, Llorente A, Sandvig K. Biodistribution , pharmacokinetics and excretion studies of intravenously injected nanoparticles and extracellular vesicles : Possibilities and challenges q // *Adv Drug Deliv Rev*. 2022. Vol. 186. P. 114326.
192. Karimi M, Bahrami S, Ravari SB, et al. Albumin nanostructures as advanced drug delivery systems // *Expert Opin Drug Deliv*. 2016. Vol. 13, № 11. P. 1609-1623.
193. Sevenich L, Schurigt U, Sachse K, et al. Synergistic antitumor effects of combined cathepsin B and cathepsin Z deficiencies on breast cancer progression and metastasis in mice // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010. Vol. 107, № 6. P. 2497.
194. Vasiljeva O, Korovin M, Gajda M, et al. Reduced tumour cell proliferation and delayed development of high-grade mammary carcinomas in cathepsin B-deficient mice // *Oncogene*. 2008. Vol. 27, № 30. P. 4191-4199.
195. Kolwijck E, Massuger LFAG, Thomas CMG, et al. Cathepsins B, L and cystatin C in cyst Xuid of ovarian tumors // *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010. Vol. 136, № 5. P. 771-778.
196. Sinha AA, Gleason DF, Limas C, et al. Localization of cathepsin B in normal and hyperplastic human prostate by immunoperoxidase and protein A-gold techniques // *Anat Rec*. 1989. Vol. 223, № 3. P. 266-275.
197. El-Nadi M, Hassan H, Amer M, Mohamed MM, El-Shinawi M, Ibrahim SA. Cathepsin L is A Potential Marker for Triple-Negative Breast Cancer // *Egypt Acad J Biol Sci C, Physiol Mol Biol*. 2019. Vol. 11, № 1. P. 29-36.
198. Singh N, Das P, Gupta S, et al. Plasma cathepsin L: A prognostic marker for pancreatic cancer // *World J Gastroenterol*. 2014. Vol. 20, № 46. P. 17532.

199. Schweiger A, Christensen IJ, Nielsen HJ, Sørensen S, Brünner N, Kos J. Serum Cathepsin H as a Potential Prognostic Marker in Patients with Colorectal Cancer // *Int J Biol Markers*. 2004. Vol. 19, № 4. P. 289-294.
200. Omidian H, Gill EJ, Cubeddu LX. Conjugate Nanoparticles in Cancer Theranostics // *J Nanotheranostics*. 2025. Vol. 6, № 3. P. 24.
201. Parodi A, Miao J, Soond SM, Rudzińska M, Zamyatnin AA. Albumin nanovectors in cancer therapy and imaging // *Biomolecules*. 2019. Vol. 9, № 6. P. 1-23.
202. Görgens A, Corso G, Hagey DW, et al. Identification of storage conditions stabilizing extracellular vesicles preparations // *J Extracell Vesicles*. 2022. Vol. 11, № 6.
203. Golovastova MO, Korolev DO, Tsoy L V., et al. Biomarkers of Renal Tumors: the Current State and Clinical Perspectives // *Curr Urol Rep*. 2017. Vol. 18, № 1. P. 3.
204. Johnson L V., Walsh ML, Chen LB. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. // *Proc Natl Acad Sci*. 1980. Vol. 77, № 2. P. 990-994.
205. Rudzińska M, Parodi A, Maslova VD, et al. Cysteine cathepsins inhibition affects their expression and human renal cancer cell phenotype // *Cancers (Basel)*. 2020. Vol. 12, № 5. P. 1-20.
206. Prokhorova EA, Kopeina GS, Lavrik IN, Zhivotovsky B. Apoptosis regulation by subcellular relocation of caspases // *Sci Reports 2018 81*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 1-11.
207. Tamhane T, Njenga RW, Burden RE, et al. Trafficking of full-length and N-terminally truncated cathepsin B in human colorectal carcinoma cells // *Appl Sci*. 2021. Vol. 11, № 24. P. 1-17.
208. Kos J, Stabuc B, Schweiger A, et al. Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. // *Clin Cancer Res*. 1997. Vol. 3, № 10. P. 1815-1822.
209. Jevnikar Z, Rojnik M, Jamnik P, Doljak B, Fonović UP, Kos J. Cathepsin H mediates the processing of talin and regulates migration of prostate cancer cells // *J Biol Chem*. 2013. Vol. 288, № 4. P. 2201-2209.
210. Wu N, Wang YZ, Wang KK, et al. Cathepsin K regulates the tumor growth and metastasis by IL-17/CTSK/EMT axis and mediates M2 macrophage polarization in castration-resistant prostate cancer // *Cell Death Dis 2022 139*. 2022. Vol. 13, № 9. P. 1-9.
211. Rojnik M, Jevnikar Z, Mirkovic B, et al. Cathepsin H indirectly regulates morphogenetic protein-4 (BMP-4) in various human cell lines // *Radiol Oncol*. 2011. Vol. 45, № 4. P. 259.
212. Burton LJ, Dougan J, Jones J, et al. Targeting the Nuclear Cathepsin L CCAAT Displacement Protein/Cut Homeobox Transcription Factor-Epithelial Mesenchymal Transition Pathway in Prostate and Breast Cancer Cells with the Z-FY-CHO Inhibitor // *Mol Cell Biol*. 2017. Vol. 37, № 5.

213. Cheng X, Ren Z, Liu Z, et al. Cysteine cathepsin C: a novel potential biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma // *Cancer Cell Int.* 2022. Vol. 22, № 1. P. 1-14.
214. Majc B, Habič A, Novak M, et al. Upregulation of Cathepsin X in Glioblastoma: Interplay with γ -Enolase and the Effects of Selective Cathepsin X Inhibitors // *Int J Mol Sci.* 2022. Vol. 23, № 3. P. 23.
215. Verbovšek U, Motaln H, Rotter A, et al. Expression Analysis of All Protease Genes Reveals Cathepsin K to Be Overexpressed in Glioblastoma // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 10. P. e111819.
216. Xiao Y, Cong M, Li J, et al. Cathepsin C promotes breast cancer lung metastasis by modulating neutrophil infiltration and neutrophil extracellular trap formation // *Cancer Cell.* 2021. Vol. 39, № 3. P. 423- 437.e7.
217. Cairns J, Ingle JN, Wickerham LD, Weinshilboum R, Liu M, Wang L. SNPs near the cysteine proteinase cathepsin O gene (CTSO) determine tamoxifen sensitivity in ER α -positive breast cancer through regulation of BRCA1 // *PLOS Genet.* 2017. Vol. 13, № 10. P. e1007031.
218. Sereesongsaeng N, McDowell SH, Burrows JF, Scott CJ, Burden RE. Cathepsin V suppresses GATA3 protein expression in luminal A breast cancer // *Breast Cancer Res.* 2020. Vol. 22, № 1. P. 1-12.
219. Yang L, Zeng Q, Deng Y, Qiu Y, Yao W, Liao Y. Glycosylated Cathepsin V Serves as a Prognostic Marker in Lung Cancer // *Front Oncol.* 2022. Vol. 12, № April. P. 1-10.
220. Loh CY, Chai J, Tang T, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges // *Cells.* 2019. Vol. 8, № 10. P. 1118.
221. Yadati T, Houben T, Bitorina A, Shiri-Sverdlov R. The Ins and Outs of Cathepsins: Physiological Function and Role in Disease Management // *Cells.* 2020. Vol. 9, № 7. P. 1679.
222. Lamort AS, Hamon Y, Czaplewski C, et al. Processing and Maturation of Cathepsin C Zymogen: A Biochemical and Molecular Modeling Analysis // *Int J Mol Sci* 2019, Vol 20, Page 4747. 2019. Vol. 20, № 19. P. 4747.
223. Brodaczewska KK, Szczylik C, Fiedorowicz M, Porta C, Czarnecka AM. Choosing the right cell line for renal cell cancer research // *Mol Cancer.* 2016. Vol. 15, № 1. P. 83.
224. Sinha R, Winer AG, Chevinsky M, et al. Analysis of renal cancer cell lines from two major resources enables genomics-guided cell line selection // *Nat Commun* 2017 81. 2017. Vol. 8, № 1. P. 1-10.
225. Carvalho M, Ferreira PJ, Mendes VS, et al. Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. // *Food Chem Toxicol.* 2010. Vol. 48, № 1. P. 441-447.

226. Griffith TS, Fialkov JM, Williams RD, et al. Induction and regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand-mediated apoptosis in renal cell carcinoma // *Cancer Res.* 2002. Vol. 62, № 11. P. 3093-3099.
227. Goulet B, Sansregret L, Leduy L, et al. Increased expression and activity of nuclear cathepsin L in cancer cells suggests a novel mechanism of cell transformation // *Mol Cancer Res.* 2007. Vol. 5, № 9. P. 899-907.
228. Tamhane T, Llukumbura R, Lu S, Maeldandsmo GM, Haugen MH, Brix K. Nuclear cathepsin L activity is required for cell cycle progression of colorectal carcinoma cells // *Biochimie.* 2016. Vol. 122. P. 208-218.
229. Goulet B, Truscott M, Nepveu A. A novel proteolytically processed CDP/Cux isoform of 90 kDa is generated by cathepsin L // *Biol Chem.* 2006. Vol. 387, № 9. P. 1285-1293.
230. Feng F, Zhao Z, Zhou Y, Cheng Y, Wu X, Heng X. CUX1 Facilitates the Development of Oncogenic Properties Via Activating Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Glioma // *Front Mol Biosci.* 2021. Vol. 8. P. 1.
231. Zhao M, Mishra L, Deng CX. The role of TGF- β /SMAD4 signaling in cancer // *Int J Biol Sci.* 2018. Vol. 14, № 2. P. 111.
232. MaruYama T, Chen WJ, Shibata H. TGF- β and Cancer Immunotherapy // *Biol Pharm Bull.* 2022. Vol. 45, № 2. P. 155-161.
233. Al-Hashimi A, Venugopalan V, Sereesongsaeng N, et al. Significance of nuclear cathepsin V in normal thyroid epithelial and carcinoma cells // *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2020. Vol. 1867, № 12. P. 118846.
234. Turk B, Dolenc I, Lenarčič B, et al. Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L activity // *Eur J Biochem.* 1999. Vol. 259, № 3. P. 926-932.
235. Boris Turk, Iztok Dolenc, Eva Zerovnik, Dusan Turk, Franc Gubensek and VT. Human Cathepsin B Is a Metastable Enzyme Stabilized by Specific Ionic Interactions Associated with the Active Site // *Biochemistry.*
236. Paraoan L, Ratnayaka A, Spiller DG, Hiscott P, White MRH, Grierson I. Unexpected Intracellular Localization of the AMD-Associated Cystatin C Variant // *Traffic.* 2004. Vol. 5, № 11. P. 884-895.
237. Liow KY, Chow SC. The cathepsin B inhibitor z-FA-CMK induces cell death in leukemic T cells via oxidative stress // *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018. Vol. 391, № 1. P. 71-82.
238. Qi K, Mu Y, Hu Y, Li J, Liu J. Comprehensive landscape of cell death mechanisms: from molecular cross-talk to therapeutic innovation in oncology // *Front Cell Dev Biol.* 2025. Vol. 13, № July. P. 1-31.
239. Yuan J, Ofengeim D. A guide to cell death pathways // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2024. Vol. 25,

- № 5. P. 379-395.
240. Tang D, Kang R, Berghe T Vanden, Vandenabeele P, Kroemer G. The molecular machinery of regulated cell death // *Cell Res*. 2019. Vol. 29, № 5. P. 347-364.
 241. Parent N, Winstall E, Beauchemin M, Paquet C, Poirier GG, Bertrand R. Proteomic analysis of enriched lysosomes at early phase of camptothecin-induced apoptosis in human U-937 cells // *J Proteomics*. 2009. Vol. 72, № 6. P. 960-973.
 242. Parent N, Scherer M, Liebisch G, Schmitz G, Bertrand R. Protein kinase C- δ isoform mediates lysosome labilization in DNA damage-induced apoptosis // *Int J Oncol*. 2011. Vol. 38, № 2. P. 313-324.
 243. Lin CF, Tsai CC, Huang WC, et al. Glycogen synthase kinase-3 β and caspase-2 mediate ceramide-And etoposide-induced apoptosis by regulating the lysosomal-mitochondrial axis // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, № 1. P. 1-14.
 244. Yee SB, Soo JB, Hwan TP, et al. zVAD-fmk, unlike BocD-fmk, does not inhibit caspase-6 acting on 14-3-3/Bad pathway in apoptosis of p815 mastocytoma cells // *Exp Mol Med*. 2006. Vol. 38, № 6. P. 634-642.
 245. Seo SU, Woo SM, Kim S, et al. Inhibition of cathepsin K sensitizes oxaliplatin-induced apoptotic cell death by Bax upregulation through OTUB1-mediated p53 stabilization in vitro and in vivo // *Oncogene*. 2022. Vol. 41, № 4. P. 550-559.
 246. Li FQ, Su H, Wang J, et al. Preparation and characterization of sodium ferulate entrapped bovine serum albumin nanoparticles for liver targeting // *Int J Pharm*. 2008. Vol. 349, № 1-2. P. 274-282.
 247. Malekizadeh M, Rafati H. A comparative study of cross-linked human serum albumin nanoparticles using ultrasonication or glutaraldehyde; The impact on the corona protein adsorption using SDS-PAGE and MALDI-TOF // *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2024. Vol. 690. P. 133797.
 248. Lu ZR, Sun D. Mechanism of pH-sensitive Amphiphilic Endosomal Escape of Ionizable Lipid Nanoparticles for Cytosolic Nucleic Acid Delivery // *Pharm Res*. 2025. Vol. 42, № 7. P. 1065-1077.
 249. Yuan D, Niu Z, Zheng W, Zhao Q, Zhou F, Zhao M. Mind the Particle Rigidity: Blooms the Bioavailability via Rapidly Crossing the Mucus Layer and Alters the Intracellular Fate of Curcumin // *ACS Nano*. 2024. Vol. 18, № 39. P. 27026-27041.
 250. Chen P, Yang W, Mochida Y, et al. Selective Intracellular Delivery of Antibodies in Cancer Cells with Nanocarriers Sensing Endo/Lysosomal Enzymatic Activity // *Angew Chemie Int Ed*. 2024. Vol. 63, № 14.
 251. Karnthaler-Benbakka C, Koblmüller B, Mathuber M, et al. Synthesis, Characterization and in vitro Studies of a Cathepsin B-Cleavable Prodrug of the VEGFR Inhibitor Sunitinib // *Chem*

- Biodivers.* 2019. Vol. 16, № 1.
252. Wang L, Yang H, Huang W, et al. Tumor-specific cathepsin B-triggered fluorescence imaging and prodrug activation // *Eur J Med Chem.* 2025. Vol. 292. P. 117661.
 253. Syrocheva AO, Gorbacheva VI, Egorova VS, Zamyatnin AA, Parodi A, Kolesova EP. Inorganic Silica Nanoparticles Increase Lysosomal Biology and Protease Activity // *Int J Mol Sci.* 2025. Vol. 26, № 17. P. 1-18.
 254. Zhang Y, Hui Y, Guo Z, et al. Impact of Nanoparticle Stiffness on Endosomal Escape and Signaling Pathways in Cytosolic Delivery // *Adv Healthc Mater.* 2025. Vol. 14, № 28.
 255. He X, Xu B, Fang A, et al. A cascade-responsive nanoplatform with tumor cell-specific drug burst release for chemotherapy // *Acta Biomater.* 2023. Vol. 162. P. 120-134.
 256. Song X, Cai H, Shi Z, et al. Enzyme-Responsive Branched Glycopolymer-Based Nanoassembly for Co-Delivery of Paclitaxel and Akt Inhibitor toward Synergistic Therapy of Gastric Cancer // *Adv Sci.* 2024. Vol. 11, № 2. P. 1-16.
 257. Zhou H, Ying J, Xu X, Huang J. CTSS in the tumor microenvironment links immune escape and immunotherapy sensitivity in kidney renal clear cell carcinoma // *Discov Oncol.* 2025. Vol. 16, № 1.
 258. Peng T, Li T, Zhang C. Correlation between cathepsins and the likelihood of renal cancer: a Mendelian randomization study // *Postgrad Med J.* 2025. Vol. 101, № 1198. P. 730-736.