

ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-КЛИНИЧЕСКИЙ ЦЕНТР
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЫ
имени АКАДЕМИКА Ю.М. ЛОПУХИНА
ФЕДЕРАЛЬНОГО МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА

На правах рукописи

Шнайдер Полина Владимировна

**“Исследование вклада межклеточной коммуникации в возникновение
резистентности злокачественных опухолей яичника к противоопухолевым препаратам”**

1.5.4. Биохимия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Кандидат химических наук
Шендер Виктория Олеговна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ.....	2
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность и степень разработанности темы исследования.....	7
Цель и задачи работы.....	8
Научная новизна исследования.....	8
Теоретическая и практическая значимость работы.....	9
Объект, методология и методы исследования.....	9
Степень достоверности полученных результатов.....	10
Основные положения, выносимые на защиту.....	10
Личный вклад автора.....	10
Апробация результатов.....	10
Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS:.....	11
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1. ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ КАК ЯВЛЕНИЕ В ЦЕЛОМ.....	12
1.1. Статистика.....	12
1.2. Типы лечения.....	13
1.2.1. Хирургическое вмешательство.....	13
1.2.2. Лучевая терапия.....	13
1.2.3. Химиотерапия.....	14
1.2.3.1. Алкилирующие агенты.....	14
1.2.3.2. Антиметаболиты.....	15
1.2.3.3. Антимитотические препараты.....	15
1.2.3.4. Ингибиторы топоизомеразы.....	16
1.2.3.5. Ингибиторы тирозинкиназ.....	16
1.2.3.6. Ингибиторы PARP.....	17
1.2.4. Иммунотерапия.....	18
2. ПУТИ ПРИОБРЕТЕНИЯ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ.....	18

2.1. Клональная селекция.....	19
2.2. Внутриклеточные механизмы приобретённой химиорезистентности.....	22
2.2.1. Клеточный цикл.....	24
2.2.2. Эпителиально-мезенхимальный переход.....	25
2.4. Межклеточная коммуникация и приобретённая устойчивость к терапии.....	28
2.4.1. От опухолевых клеток к опухолевой клетке.....	28
2.4.2. От клеток микроокружения к опухолевой клетке.....	31
2.4.2.1 Опухоль-ассоциированные фибробласты.....	33
2.4.2.2 Опухоль-ассоциированные макрофаги.....	33
2.4.2.1 Мезенхимальные стволовые клетки.....	34
3. РАК ЯИЧНИКА.....	35
3.1. Асцитная жидкость.....	36
3.1.1. Клеточные компоненты.....	37
3.1.2. Белковые компоненты.....	38
3.1.3. Нуклеиновые кислоты.....	38
3.1.4. Метаболиты.....	39
3.2. Типы лечения.....	40
МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	42
1. Пациенты и биологические образцы.....	42
2. Пробоподготовка асцитных жидкостей.....	43
3. Инкубация первичных культур с асцитными жидкостями.....	43
4. Ведение клеточных культур.....	43
5. Получение секретомов для клеточных тестов и анализа треков наночастиц.....	44
6. Получение секретомов для протеомного анализа.....	45
7. Тесты на цитотоксичность.....	45
8. Анализ ДНК-комет.....	46
9. Анализ клеточного цикла.....	46
10. Выделение РНК.....	46
11. Секвенирование РНК.....	47
12. Анализ данных РНК-секвенирования.....	47

13. Определение концентрации белка.....	47
14. Масс-спектрометрический (LC-MS/MS) анализ:.....	48
13.1 Лизис клеток.....	48
13.2. Обработка секретомов.....	48
13.3 Трипсинолиз в растворе.....	48
13.4. Обессоливание.....	49
13.5 Хроматомасс-спектрометрический анализ триптических пептидов.....	49
13.6 Анализ хроматомасс-спектрометрических данных.....	50
15. Ферментативное расщепление белка протеиназой К.....	50
16. Вестерн-блоттинг.....	51
17. Анализ треков наночастиц.....	52
18. Флуоресцентная микроскопия.....	53
19. Проточная цитометрия магнитных частиц.....	53
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	55
1. Опухолевые клетки, полученные из асцитных жидкостей от пациентов после химиотерапии, обладают повышенной устойчивостью к химиотерапии.....	55
2. Инкубация реципиентных первичных культур опухолевых клеток с асцитными жидкостями после ХТ имитируют условия межклеточной коммуникации в ходе ХТ in vivo	61
3. Подбор условий для генерации секретомов от погибающих клеток в системе in vitro.....	63
4. Длительность протективного эффекта АпоС.....	68
5. Инкубация реципиентных клеток SKOV3 с аутологичными АпоС приводит к запуску молекулярных каскадов, отвечающих за формирования более агрессивного опухолевого фенотипа.....	70
6. АпоС способствуют формированию химиорезистентности у опухолевых, но не нормальных клеток.....	72
7. Сравнение паттернов секреции нормальными и опухолевыми клетками в ответ на повреждение ДНК.....	76
8. Цитопротективный эффект секретомов зависит от процессов ядерного экспорта, везикулярного транспорта и апоптоза.....	78
9. Белки сплайсосомы инкапсулированы во внеклеточные везикулы.....	81
10. Обработка клеток нормального эпителия секретомами от погибающих клеток не	

приводит к изменению транскриптомного профиля в сторону более химиорезистентного фенотипа.....	83
11. Секретомы от погибающих клеток способствуют удлинению S-фазы клеточного цикла и возникновению устойчивости к ряду ДНК-повреждающих агентов.....	86
12. Реципиентные клетки, прединкубированные с АпоС, обладают более эффективным аппаратом репарации ДНК.....	88
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	93
ВЫВОДЫ.....	94
БЛАГОДАРНОСТИ.....	95
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	96

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АДФ — аденозиндифосфат

АТФ — аденозинтрифосфат

АпоС — секреты от погибающих клеток

ДС — додецилсульфат натрия

ДМСО — диметилсульфоксид

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ — дитиотреитол

ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

ЭМП — эпителиально-мезенхимальный переход

КС — контрольные секреты

ЛД50 — доза, вызывающая гибель 50% клеточной популяции

МТТ — тиазолил синий тетразолий бромид / тест на цитотоксичность

НХТ — неoadьювантная химиотерапия

ОАФ — опухоль-ассоциированные фибробласты

РНК — рибонуклеиновая кислота

DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндол

FBS — фетальная бычья сыворотка

FDR — ложная норма обнаружения (false discovery rate)

FITC — флуоресцеин-5-изотиоцианат

GSEA — анализ обогащения по функциональной принадлежности (gene set enrichment analysis)

KEGG — база данных генов и геномов (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

LC-MS/MS — жидкостная хроматография в сочетании с tandemной масс-спектрометрией

НК-клетки — натуральные киллеры (естественные киллеры)

NTA — метод анализа треков наночастиц (Nanoparticle tracking analysis)

PBS — фосфатно-солевой буфер

PBST — фосфатно-солевой буфер с твином

PMSF — фенилметилсульфонил фторид

SDB-RPS — стирол-дивинилбензоловые сополимеры с обращенной фазой (Styrene-divinylbenzene-reverse phase sulfonate)

TRITC — тетраметилпродамин изотиоцианат

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Согласно статистике, примерно у 38% людей на протяжении всей жизни так или иначе будет диагностировано злокачественное новообразование [1]. Несмотря на то, что число смертей, вызванных этим заболеванием, сокращается, онкологические заболевания по-прежнему являются второй по распространенности причиной смерти после заболеваний сердечно-сосудистой системы. В настоящее время существует большое количество противоопухолевых препаратов, но даже самые инновационные из них не могут обеспечить пациентам полного выздоровления и отсутствия рецидива.

В последнее время обширно развивается область исследования коммуникации опухолевых клеток и клеток микроокружения. Также достаточно подробно разобраны отличия в секреции чувствительными и резистентными к лечению опухолевыми клонами [2–8]. Эти исследования подчеркивают весомый вклад межклеточной коммуникации в формирование устойчивости к лечению, но преимущественно описывают случаи, когда опухоль не подвергается стрессовому воздействию (например, терапии). Однако, исследования на клеточных моделях рака молочной железы, яичников, легких и других типов рака показали, что секретлируемые погибающими опухолевыми клетками молекулы могут оказывать существенное влияние на устойчивость реципиентных опухолевых клеток к терапии, но в большинстве случаев механизмы действия этих молекул остаются неясными [9–14]. Основным недостатком имеющихся исследований является их сосредоточение на клеточных моделях *in vitro*, которые часто не отражают сложные взаимодействия, происходящие в живых организмах. Решением данной проблемы может быть использование биологических образцов различных жидкостей, контактирующих с опухолью. Так, например, ценной моделью для изучения коммуникации опухолевых клеток являются асцитные жидкости пациентов с аденокарциномой яичника.

Таким образом, изучение механизмов коммуникации опухолевых клеток, особенно в условиях терапевтического стресса, представляет собой важное направление современных исследований в области онкологии. Эти процессы играют ключевую роль в формировании устойчивости опухолей к лечению и могут стать основой для разработки более эффективных терапевтических подходов. Использование биологических образцов, таких как асцитные жидкости, позволяет исследовать опухолевую коммуникацию в естественных условиях, что значительно повысит ценность получаемых данных.

Цель и задачи работы

Целью настоящей работы являлось изучение вклада межклеточной коммуникации в формирование устойчивости к ДНК-повреждающим агентам в клетках аденокарциномы яичника.

Для выполнения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Выяснить, как секретомы погибающих под действием цисплатина опухолевых клеток изменяют фенотип и молекулярные каскады в опухолевых клетках в условиях *in vivo* и *ex vivo*.
- 2) Изучить влияние секретомов от погибающих клеток на опухолевые клетки и клетки нормального эпителия *in vitro*.
- 3) Исследовать компоненты, секретируемые погибающими опухолевыми клетками и определить способ секреции сигнальных молекул в условиях *in vitro*.
- 4) Определить молекулярные каскады, способствующие формированию устойчивости опухолевых клеток к ДНК-повреждающим агентам.

Научная новизна исследования

В ходе данной работы впервые был проведен анализ того, как химиотерапия (ХТ) изменяет биологические эффекты асцитных жидкостей при аденокарциноме яичника, а именно их способность формировать устойчивость опухолевых клеток к цисплатину и приводить к сопутствующим перестройкам внутриклеточных молекулярных каскадов.

Нами был разработан протокол генерации секретомов опухолевых клеток, имитирующий схему лечения химиотерапевтическими препаратами и позволяющий использовать полученные секретомы как для культивирования реципиентных клеток, так и для изучения состава секретомов различными методами.

Используя разработанный протокол, мы оценили протективный эффект и белковый состав секретомов погибающих и контрольных опухолевых клеток, а также клеток неонкотрансформированных тканей. Мы показали, что только секретомы от погибающих опухолевых клеток способны приводить к формированию устойчивости к терапии реципиентных опухолевых клеток. Это сопровождалось значительными отличиями в профилях белков, секретируемых погибающими опухолевыми клетками, и значительным изменением экспрессии генов в реципиентных опухолевых клетках под действием таких секретомов. Также

мы обнаружили, что секретомы от погибающих опухолевых клеток не приводят к формированию устойчивости у клеток нормальных тканей и не вызывают значительной перестройки их транскриптомного профиля.

Применение различных методов клеточной биологии и омиксных технологий позволило продемонстрировать ранее не описанный механизм приобретения химиорезистентности. Так, было показано, что протективный эффект секретомов от погибающих опухолевых клеток не обладает положительной обратной связью и, скорее всего, не обусловлен изменениями на генетическом или эпигенетическом уровнях. Также мы показали, что секретомы от погибающих под действием цисплатина опухолевых клеток приводят к формированию устойчивости не только к цисплатину, но и к другим ДНК-повреждающим агентам за счет предварительной активации систем репарации ДНК в реципиентных опухолевых клетках.

Теоретическая и практическая значимость работы

Исследование расширяет существующие знания об особенностях межклеточной коммуникации опухолевых и нормальных клеток в ответ на химиотерапию (ХТ) и ее вкладе в формирование устойчивости к лечению. Впервые проведен анализ влияния секретомов от погибающих клеток на химиорезистентность и определены основные события, приводящие к эффективному ответу реципиентных опухолевых клеток на ДНК-повреждающие препараты. Эти данные способствуют развитию фундаментальных представлений о динамике взаимодействий между опухолевыми клетками под действием ХТ и открывают новые перспективы для изучения механизмов приобретенной резистентности к противоопухолевым препаратам.

Полученные результаты имеют прикладное значение для разработки более эффективных стратегий противоопухолевой терапии. Выявленные механизмы могут служить основой для разработки новых подходов для предотвращения устойчивости к ХТ ДНК-повреждающими агентами, направленные на блокирование межклеточной коммуникации.

Объект, методология и методы исследования

В работе использован комплексный подход, включающий эксперименты *ex vivo* и *in vitro*. Для изучения влияния химиотерапии на формирование химиорезистентности мы использовали 3 клеточные линии рака яичника и первичные культуры, выделенные из асцитных жидкостей от 13 пациентов. Методы исследования включали получение внеклеточных везикул, клеточные

тесты на цитотоксичность, анализ ДНК-комет, анализ клеточного цикла, выделение и секвенирование РНК, масс-спектрометрический анализ белков, вестерн-блот, анализ треков наночастиц и флуоресцентную микроскопию.

Степень достоверности полученных результатов

Все эксперименты проводились в двух и более повторностях. Результаты представлены в виде среднего значения с указанием среднеквадратического отклонения. Статистические различия между двумя группами оценивались с помощью непарного двухстороннего t-теста. Используемые экспериментальные модели и методики соответствуют общепризнанным международным стандартам.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Химиотерапия изменяет профили секреции опухолевых клеток и вызывает более интенсивную секрецию внеклеточных везикул.
- 2) Погибающие под действием химиотерапии опухолевые клетки секретируют набор молекул, способствующий формированию химиорезистентности в оставшейся опухоли.
- 3) Явление приобретенной химиорезистентности, опосредованной секреторами, характерно только для опухолевых клеток и не наблюдается в нормальных клетках.
- 4) Секреты от погибающих клеток повышают эффективность репарации ДНК, подготавливая опухолевые клетки к последующему терапевтическому воздействию.

Личный вклад автора

Основные результаты были получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автор осуществлял планирование и проведение экспериментов, анализ полученных результатов, подготовку публикаций и диссертации.

Апробация результатов

Результаты работы представлены на 13 российских и международных конференциях: V Международная Конференция “Постгеном 2018” (Казань, 2018), EuPA 2019 (Потсдам, Германия, 2019), IX Российский Симпозиум «Белки и Пептиды» (Сочи, 2019), 44th FEBS

Congress (Краков, Польша, 2019), 45th FEBS Virtual Congress (Любляна, Словения, 2021), NUPO ReConnect (2021), X Российский Симпозиум «Белки и Пептиды» (Сочи, 2021), Итоговая Научно-Практическая Конференция ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России (Москва, 2021), Experimental Biology (Филадельфия, США, 2022), NUPO 2023 (Пусан, Южная Корея, 2023), Итоговая Научно-Практическая Конференция ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА им. Лопухина России (Москва, 2023), Биохимия человека 2024 (Москва, 2024), VI Международная Конференция “Постгеном 2024” (Москва, 2024).

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS:

1. Shender V.O., Anufrieva K.S., Shnaider P.V., Arapidi G.P., Pavlyukov M.S., Ivanova O.M., Malyants I.K., Stepanov G.A., Zhuravlev E., Ziganshin R.H., Butenko I.O., Bukato O.N., Klimina K.M., Veselovsky V.A., Grigorieva T.V., Malanin S.Y., Aleshikova O.I., Slonov A.V., Babaeva N.A., Ashrafyan L.A., Khomyakova E., Evtushenko E.G., Lukina M.M., Wang Z., Silantiev A.S., Nushtaeva A.A., Kharlampieva D.D., Lazarev V.N., Lashkin A.I., Arzumanyan L.K., Petrushanko I.Y., Makarov A.A., Lebedeva O.S., Bogomazova A.N., Lagarkova M.A., Govorun V.M. Therapy-induced secretion of spliceosomal components mediates pro-survival crosstalk between ovarian cancer cells // Nature communications. – 2020. – Vol.15(1). – P.1-26.
2. Shnaider P.V., Petrushanko I.Y., Aleshikova O.I., Babaeva N.A., Ashrafyan L.A., Borovkova E.I., Dobrokhotova J.E., Borovkov I.M., Shender V.O., Khomyakova E. Expression level of CD117 (KIT) on ovarian cancer extracellular vesicles correlates with tumor aggressiveness // Frontiers in cell and developmental biology. – 2023. – Vol.11 – P.1-9.
3. Shnaider P.V., Ivanova O.M., Malyants I.K., Anufrieva K.S., Semenov I.A., Pavlyukov M.S., Lagarkova M.A., Govorun V.M., Shender V.O. New insights into therapy-induced progression of cancer // International journal of molecular sciences. – 2020. – Vol. 21(21) – P.1-29.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫЕ ОПУХОЛИ КАК ЯВЛЕНИЕ В ЦЕЛОМ

1.1. Статистика

Злокачественные новообразования являются одними из наиболее распространенных и опасных заболеваний в мире. По данным Американского онкологического общества, только в Соединенных Штатах на 2024 год прогнозируется 2,001,140 новых случаев рака и 611,720 смертей, вызванных им. Среди всех типов злокачественных опухолей наиболее распространенным является рак молочной железы, рак предстательной железы, рак легкого и рак толстой кишки [1](Рисунок 1).



Рисунок 1. Top-10 типов злокачественных новообразований для разных полов. Данные предоставлены для Соединенных Штатов Америки на 2024 год. Адаптировано из [1]

Основные причины образования опухолей включают генетические факторы, вредные привычки (включая курение и употребление алкоголя), а также неправильное питание и отсутствие физической активности. Некоторые виды злокачественных новообразований также могут быть вызваны инфекциями, такими как вирус папилломы человека, который может привести к раку шейки матки или *Helicobacter pylori*, которая приводит к раку желудка [1,15].

Средняя продолжительность жизни пациентов со злокачественным новообразованием зависит от многих факторов, включая тип и стадию заболевания, возраст пациента, наличие других заболеваний и доступность лечения. Согласно данным Национального института рака США, пятилетняя выживаемость пациентов со злокачественным образованием в США составляет около 67%, что является значительным улучшением по сравнению с прошлыми десятилетиями [1].

1.2. Типы лечения

Существует несколько типов противоопухолевого лечения, включая хирургическое вмешательство, лучевую терапию, химиотерапию, иммунотерапию и таргетную терапию. Каждое из них имеет свои преимущества и недостатки, а выбор лечения зависит от типа и стадии заболевания, а также от общего состояния здоровья и медицинской истории пациента.

1.2.1. Хирургическое вмешательство

Хирургическое вмешательство является широко используемым методом лечения различных видов злокачественных новообразований, включая рак молочной железы, легких, предстательной железы, толстой кишки и кожи. В некоторых случаях хирургическое вмешательство является единственным требуемым лечением, в то время как в других случаях оно может использоваться в сочетании с лучевой терапией и/или химиотерапией [16].

1.2.2. Лучевая терапия

В ходе лучевой терапии ионизирующее излучение непосредственно приводит к формированию одно- и двухцепочечных разрывов в ДНК, что приводит к запуску апоптоза или некроза. Опосредованно, лучевая терапия вызывает образование активных форм кислорода, которые также способны повреждать ДНК и приводить к окислительному стрессу в клетке. Лучевая терапия применяется в 50% случаев всех онкологических заболеваний и может быть использована как единственный вид лечения или в комбинации с другими типами противоопухолевой терапии [17,18].

1.2.3. Химиотерапия

В настоящее время существует более 300 лицензированных химиотерапевтических препаратов, используемых в борьбе со злокачественными новообразованиями [19]. Химиопрепараты можно разделить на несколько групп, опираясь на их структуру и механизм действия. В основном, действие препаратов в конечном счёте направлено на остановку клеточного цикла и запуск клеточной гибели [20].

1.2.3.1. Алкилирующие агенты

Алкилирующие агенты — это класс химиотерапевтических препаратов, используемых в лечении различных видов рака. Один из механизмов действия алкилирующих агентов заключается в связывании между собой отдельных цепей ДНК, что предотвращает их расплетение и нормальную репликацию, в конечном итоге приводя к гибели клетки. Другой механизм заключается в алкилировании гуанина, что, в дальнейшем, приводит к неправильному спариванию оснований и последующему формированию мутаций или фрагментации ДНК, что затем запускает клеточную гибель [21].

Цисплатин является одним из наиболее часто используемых алкилирующих агентов при лечении опухолей яичника, мочевого пузыря, легких, головы и шеи. Гидратированный цисплатин связывается с нуклеофильными сайтами N7 на пуринах митохондриальной и ядерной ДНК. Повреждения ДНК, вызванные цисплатином, удаляются системами репарации. Если же повреждение оказывается непоправимым, происходит арест клеточного цикла или наступает программируемая клеточная смерть [22]. Моно- и дигидратированные формы цисплатина крайне электрофильны и склонны к образованию ковалентных связей как с метионином, так и со значительной группой цистеинсодержащих пептидов и полипептидов, включая восстановленный глутатион и металлотионеины [23]. Эти взаимодействия могут иметь двойные последствия. С одной стороны, это истощает пул восстанавливающих компонентов цитозоля, что затем приводит к окислительному стрессу, в ходе которого может быть повреждена ДНК. С другой стороны, это приводит к инактивации некоторой части химически активного цисплатина [22].

Темозоломид — это алкилирующий агент, который используется для лечения глиом. Он пересекает гематоэнцефалический барьер и превращается в активную форму в цитоплазме опухолевых клеток. Последующее гиперметилование ДНК запускает апоптоз в опухолевых клетках [24,25].

Циклофосфамид является алкилирующим агентом, который используется при лечении лимфомы и рака мочевого пузыря. Он превращается в активную форму в печени, которая затем связывается с ДНК и образует кросс-сшивки между двумя цепями, что в конечном итоге приводит к запуску программируемой клеточной гибели [26]. Также, циклофосфамид обладает иммуносупрессорной активностью [27].

1.2.3.2. Антиметаболиты

Другой группой химиотерапевтических препаратов, нацеленных на ДНК, являются антиметаболиты. Эти препараты блокируют биосинтез нуклеиновых кислот, что препятствует делению клеток и запускает апоптоз [28].

Гемцитабин является основным антиметаболитом, используемым в химиотерапии при лечении злокачественных новообразований поджелудочной железы, легкого, мочевого пузыря, яичника, молочной железы и острого лимфобластного лейкоза. Механизм действия гемцитабина заключается в его способности встраиваться в ДНК вместо дезоксицитидина, что останавливает синтез ДНК. Гемцитабин также ингибирует рибонуклеотидредуктазу, что приводит к прерыванию синтеза нуклеотидов, необходимых для деления клетки. Все это замедляет рост опухоли, активирует клеточный ответ на ДНК-повреждения и запускает апоптоз [29].

5-фторурацил — еще один представитель класса антиметаболитов, является антагонистом пиримидинов и используется при лечении рака толстой кишки. 5-фторурацил ингибирует синтез тимидилат-синтазы, что приводит к остановке синтеза ДНК, а также встраивается в РНК. Всё это запускает процесс клеточной гибели [30].

1.2.3.3. Антимитотические препараты

Антимитотические химиотерапевтические препараты нацелены на клетки, проходящие митоз. Эти препараты либо предотвращают образование микротрубочек (структур, необходимых для правильного разделения хромосом во время клеточного деления), либо разрушают уже существующие микротрубочки. Это и приводит к активации путей клеточной гибели в раковых клетках.

Одним из классов антимитотических препаратов являются таксаны — паклитаксел и доцетаксел. Эти препараты связываются с микротрубочками и стабилизируют их, что нарушает нормальный митотический процесс и приводит к гибели клеток. Таксаны используются для лечения различных видов рака, включая рак молочной железы, яичника и легких [31].

Другим классом антимитотических препаратов являются винка-алкалоиды, которые включают винбластин, винкристин и винорелбин. Эти препараты связываются с тубулиновыми субъединицами микротрубочек, предотвращая их сборку и разрушая митотическое веретено. Винка-алкалоиды используются для лечения лимфомы, лейкемии и рака легких [32,33].

1.2.3.4. Ингибиторы топоизомеразы

Топоизомеразы — это ферменты, участвующие в процессах репликации ДНК и транскрипции. Топоизомеразы релаксируют сверхскрученные участки ДНК внося разрывы в одну или обе цепи. Существует два основных типа ингибиторов топоизомеразы: ингибиторы топоизомеразы I и ингибиторы топоизомеразы II. Ингибиторы топоизомеразы I, такие, как иринотекан и топотекан, связываются с комплексом топоизомераза I-ДНК и стабилизируют его, что приводит к повреждению ДНК и гибели клеток. Ингибиторы топоизомеразы II, такие, как этопозид и доксорубицин, действуют путем связывания комплекса топоизомераза II-ДНК и предотвращения повторного лигирования ДНК, которое вызывает двухцепочечные разрывы в ДНК и, в конечном итоге, приводит к гибели клеток. В основном, ингибиторы топоизомераз используют при лечении аденокарциномы яичника, легких, молочной железы и толстой кишки [34,35].

1.2.3.5. Ингибиторы тирозинкиназ

Тирозинкиназы фосфорилируют определенные аминокислоты в белках, что приводит к изменениям передачи сигнала внутри каскадов, регулирующих процессы пролиферации, миграции и гибели клеток. Изменение активности процессов фосфорилирования в клетке может привести к формированию различных заболеваний, в том числе злокачественных образований [36]. Следовательно, ингибирование aberrантных каскадов фосфорилирования может быть использовано при лечении этих заболеваний.

Тирозинкиназы человека имеют консервативную последовательность Асп-Фен-Гли (DFG), которая регулирует способность связывания АТФ, определяя активность фермента. Существует два пространственных положения этой последовательности – DFG-in, когда киназа способна связывать АТФ и DFG-out, когда АТФ не может быть связан [37]. Ингибиторы тирозинкиназ I-ого типа (гефитиниб, эрлотиниб) конкурируют с АТФ в конформации DFG-in, тем самым, препятствуя активации киназы. Ингибиторы тирозинкиназ II-ого типа (иматиниб, сорафениб) стабилизируют тирозинкиназу в конформации DFG-out, что исключает связывание

АТФ. Ингибиторы тирозинкиназ III-го и IV-го типов (траметиниб, асциминиб) напрямую не взаимодействуют с АТФ-связывающим карманом, но приводят к конформационным изменениям, приводящим к инактивации киназы. Все эти четыре типа ингибиторов обладают обратимым механизмом связывания, так как не приводят к формированию ковалентных связей. Однако существует отдельный класс ингибиторов тирозинкиназ, образующих ковалентные связи в зоне связывания АТФ. К ним относятся афатиниб и ибрутиниб [38,39].

Формирование резистентности к ингибиторам тирозинкиназ в первую очередь связано с появлением мутаций в киназах-мишенях или изменением их экспрессии, выкачиванием препарата из клетки или активацией компенсаторных путей [40]. Данный тип лечения может сопровождаться рядом осложнений на сердечно-сосудистую систему, желудочно-кишечный тракт и возникновением дерматологических заболеваний [41].

1.2.3.6. Ингибиторы PARP

В ответ на повреждение ДНК в клетке активируется целый ряд механизмов репарации. Поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) – ферменты, участвующие в репарации одноцепочечных разрывов ДНК. Они обнаруживают разрывы ДНК и связываются с ними, после чего начинают синтез цепи поли(АДФ-рибозы), что в конечном итоге рекрутирует другие белки-участники и организует комплекс репарации в целом.

Для некоторых типов опухолей (рак яичника, аденокарцинома молочной железы, рак простаты, рак поджелудочной железы) характерно наличие мутации в генах *BRCA 1/2*. Данная мутация снижает эффективность гомологичной репарации двухцепочечных разрывов ДНК. Однако также известно, что ингибирование активности PARP в клетках приводит к формированию двухцепочечных разрывов ДНК на месте одноцепочечных разрывов. Таким образом, ингибиторы PARP (олапариб, рупапариб, нирапариб, талазопариб), воздействуя на клетки с мутацией в генах *BRCA1* или *BRCA2*, вызывают их гибель [42–44].

На данный момент проходят исследования эффективности использования ингибиторов PARP с различными типами противоопухолевой терапии. Так, например было показано, что ингибиторы PARP повышают эффективность лечения ингибиторами АТР, агентами платины и ингибиторами иммунных чекпоинтов [45].

1.2.4. Иммуноterapia

Иммуноterapia — одна из самых молодых и многообещающих отраслей противоопухолевой терапии. Она заключается в активации естественного противоопухолевого ответа иммунной системы.

Одной из особенностей опухолевых клеток является избегание иммунного ответа. Так, некоторые раковые клетки экспонируют рецепторы иммунных клеток (так называемые чекпоинты), тем самым подавляя развитие иммунного ответа. В таком случае в качестве противоопухолевой терапии справедливо использование ингибиторов иммунных чекпоинтов (PD-1, PD-L1 или CTLA4), что приводит к активации иммунной системы и её атаке опухолевых клеток [46].

Цитокиноterapia – еще один тип противоопухолевой терапии, основанной на активации иммунных клеток. Она работает путем усиления иммунного ответа организма на раковые клетки через стимуляцию активности иммунных клеток (лимфоцитов, нейтрофилов и макрофагов) посредством обработки цитокинами. К широко применяемым цитокинам относят интерлейкин-2 (стимулирует производство лимфоцитов), интерферон-альфа и интерферон-гамма (повышают активность макрофагов и нейтрофилов). Цитокиноterapia используется для лечения меланомы, рака почек и рака мочевого пузыря. Однако её применение осложнено серьезными побочными эффектами и ограниченной эффективностью [47].

В последнее время для лечения некоторых видов рака крови стали использовать CAR-T (chimeric antigen receptor) терапию. Она основывается на использовании Т-лимфоцитов, которые извлекаются из крови пациента, генетически модифицируются в лаборатории (чтобы они стали способны распознавать и атаковать опухолевые клетки), а затем вводятся обратно в кровоток пациента. CAR-T терапия имеет высокую эффективность и может дать длительную ремиссию у пациентов с некоторыми формами лейкомии и лимфомы. Однако этот метод лечения имеет и ряд ограничений, таких как высокая стоимость и возможные побочные эффекты, а также низкую эффективность при лечении солидных опухолей [48].

2. ПУТИ ПРИОБРЕТЕНИЯ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Существующие успехи в разработке противоопухолевой терапии привели к тому, что в настоящее время большинство типов злокачественных опухолей в той или иной мере поддаются лекарственному воздействию. Главной причиной неудовлетворительных результатов лечения

онкологических больных является формирование многочисленных метастазов и возникновение резистентности к применяемой терапии [49–51]. Так, например, количество рецидивов среди пациентов с раком яичников составляет порядка 85% с выживаемостью без прогрессирования менее двух лет [52,53].

Опухоль представляет собой гетерогенную популяцию клеток, которая претерпевает значительные изменения в ответ на противоопухолевую терапию. Важно учитывать, что опухолевые клетки непрерывно взаимодействуют не только друг с другом, но и со стромальными и иммунными клетками. Терапевтическое вмешательство оказывает избирательное воздействие и одновременно изменяет характер межклеточной коммуникации, тем самым создавая условия, повышающие выживаемость оставшихся опухолевых клеток [54,55].

Механизмы резистентности могут быть классифицированы в соответствии с первоначальным клеточным ответом на терапию (Рисунок 2). В самом простом случае лечение вызывает гибель наиболее чувствительных клеток, за которой следует пролиферация ранее существовавших резистентных клеток. Такой механизм получил название “клональная селекция”. Второй механизм резистентности включает активацию различных сигнальных путей внутри опухолевых клеток, запускаемых химиотерапевтическим средством *de novo*, которые поддерживают их выживание и пролиферацию. Третий механизм включает секрецию умирающими опухолевыми клетками сигнальных молекул, активирующих механизмы резистентности в соседних клетках, например компенсаторную пролиферацию. Однако важно отметить, что в реальных условиях, в опухолях эти три процесса происходят одновременно и тесно взаимосвязаны.

2.1. Клональная селекция

Современные технологии секвенирования единичных клеток показали, что в некоторых опухолях редкие популяции резистентных к терапии клеток существуют еще до начала лечения [12,56–58]. На ранних стадиях опухолевого роста эти резистентные клетки не имеют значительных преимуществ в скорости пролиферации и поэтому их популяция постоянно находится на низком уровне. Однако после лечения гибель основной массы опухолевых клеток дает возможность этой небольшой популяции увеличиваться и вызывать рецидив опухоли (Рисунок 3).

В большинстве случаев селективное преимущество получают опухолевые клетки, несущие мутации в генах, являющихся целью используемой таргетной терапии [59]. Более того,

противоопухолевая терапия сама по себе может приводить к появлению дополнительных мутаций и новых устойчивых клонов [60–63]. Однако, по всей видимости, клетки с устойчивыми генотипами зачастую уже существуют в опухолях и успешно проходят селекцию [12,56–58]. Помимо знания о том, какие именно генотипы проходят клональную селекцию и распространяются по популяции, не менее важным является понимание дальнейшей эволюции таких клеток и приобретения ими всё более устойчивого фенотипа.

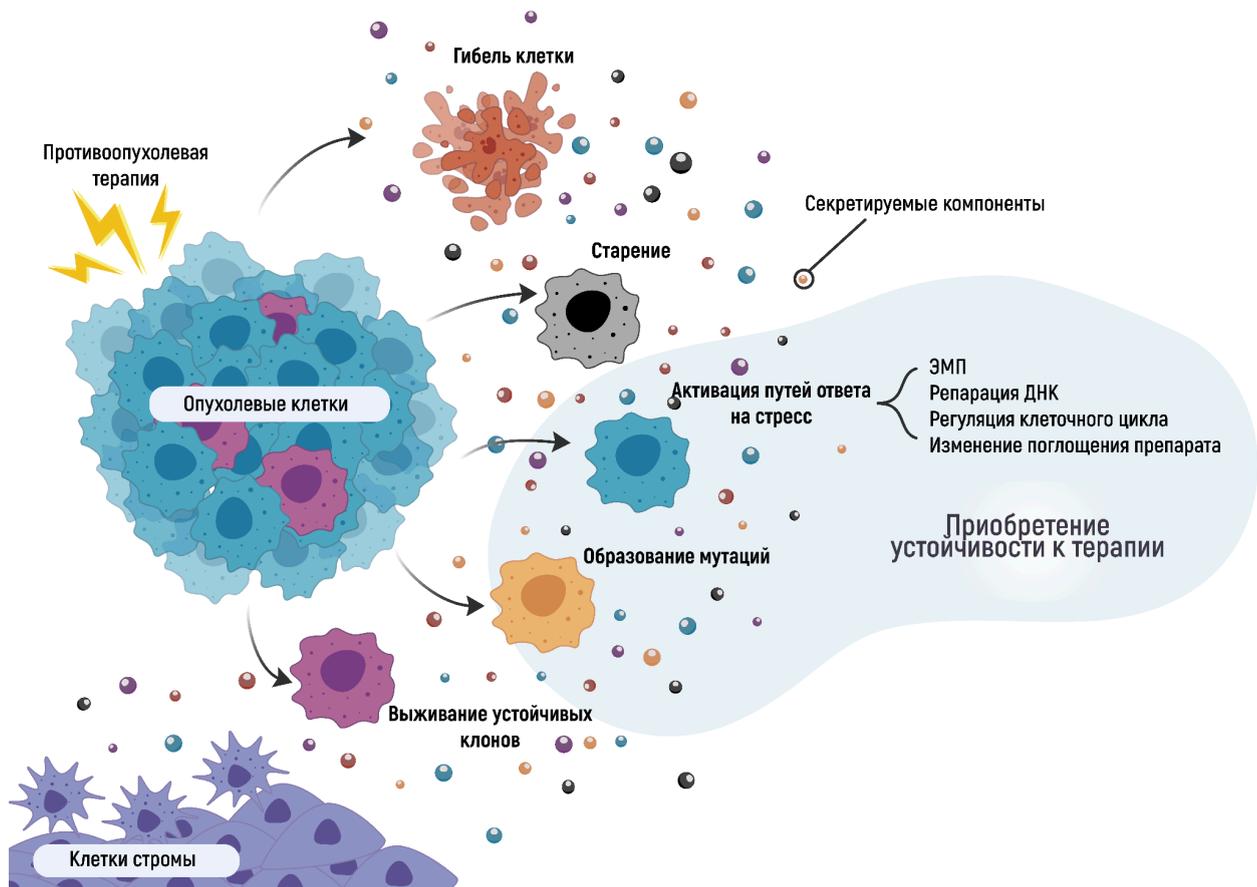


Рисунок 2. Развитие резистентности опухолевых клеток к терапии. Опухоль неоднородна, включает как чувствительные, так и резистентные клетки и окружена иммунными и стромальными клетками, образуя уникальное опухолевое микроокружение. Терапия запускает множество процессов одновременно: гибель клеток, старение, выживание ранее существовавших резистентных клонов, приобретение новых генетических и эпигенетических признаков и активацию механизмов реагирования на стресс. Эти процессы не только изменяют клеточный состав опухоли и ее стромы, но и трансформируют профили секреции всех участников межклеточной коммуникации. Такая коммуникация улучшает реакцию клеток на стресс, что, наряду с нестабильностью генома и клональной селекцией, способствует адаптации клеток к терапии, увеличению популяции наиболее устойчивых опухолевых клеток и, в конечном итоге, рецидиву опухоли. ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход. Адаптировано из [64].

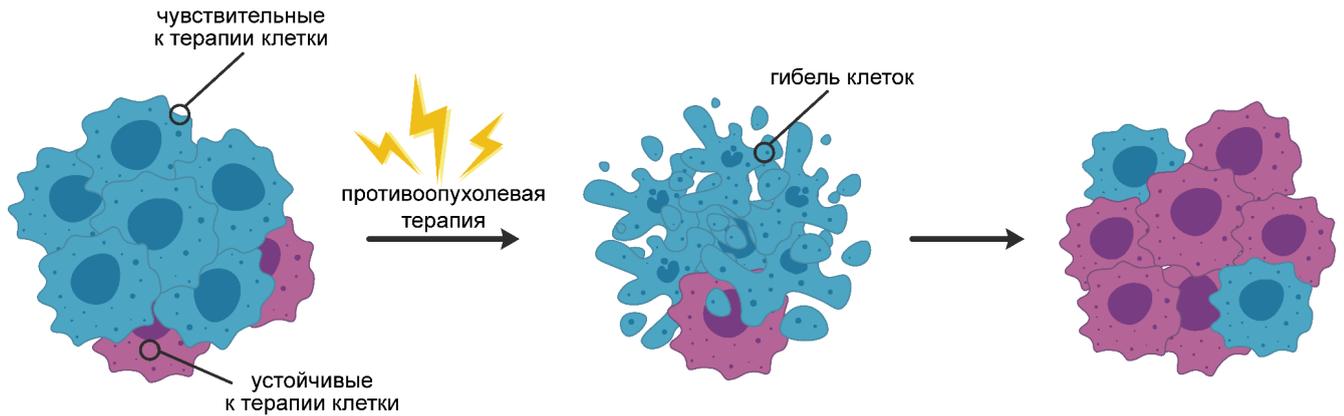


Рисунок 3. Схематическое изображение клональной селекции опухолевых клеток в ответ на противоопухолевую терапию. Адаптировано из [64].

Благодаря развитию секвенирования РНК единичных клеток стало возможным проводить исследования транскриптомных профилей отдельных клеток и проследить, как именно терапия репрограммирует транскрипцию генов. Так, на клетках трижды негативного рака молочной железы было показано, что программы транскрипционного репрограммирования не заданы в опухолевых клетках изначально, а активируются после неoadьювантной химиотерапии. В ответ на химиотерапию в опухолевых клетках повышалась экспрессия генов, отвечающих за деградацию внеклеточного матрикса, активацию пути PI3K/AKT/mTOR, сигнального пути гипоксии, ангиогенеза, а также эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) [58].

В исследовании с использованием ксенотрансплантатов, полученных из опухолевой ткани пациента с мышечно-инвазивным уротелиальным раком мочевого пузыря, лечение типифарнибом (ингибитором фарнезилтрансферазы) показало, что выжившие опухолевые клетки перешли в состояние покоя, характеризующееся повышенной экспрессией генов *IGFBP7*, *MDK* и *B2M*. Это состояние, вероятно, способствует выживанию клеток во время терапии. В дальнейшем такие клетки потенциально могут дать начало активно пролиферирующим резистентным клеткам. Так, например, было показано, что B2M индуцирует ЭМП, активируя пути PI3K/AKT/mTOR и ERK независимо от RAS [65].

В образцах ткани аденокарциномы яичника химиотерапия вызвала значительные изменения в транскриптомных профилях опухолевых клеток [66]. Интересно, что после лечения определенные субпопуляции опухолевых клеток и опухоль-ассоциированных фибробластов (ОАФ) демонстрировали совместную активацию пути Jak/STAT, что свидетельствует о возможности паракриной и/или аутокринной передачи сигналов. Эта коактивация также может

указывать на коэволюцию и перестройку микроокружения опухоли в сторону более агрессивного фенотипа, устойчивого к химиотерапии.

Анализ транскриптома опухолевых клеток, полученных методом секвенирования РНК единичных клеток из образцов метастазирующего рака легких, выявил изменения в их транскрипционной активности на разных стадиях лечения (перед началом терапии, в ходе терапии, при регрессии или стабилизации, а также при прогрессировании заболевания) [67]. Было установлено, что активация сигнального пути WNT/ β -катенин способствовала выживаемости опухолевых клеток после проведения терапии. С прогрессированием заболевания активировались пути кинуренина, плазминогена и образования щелевых контактов, которые исследователи связали с воспалительными процессами, развитием опухоли и подавлением противоопухолевого иммунитета.

На клеточной культуре рака толстой кишки под действием 5-фторурацила было определено 3 уникальных транскриптомных фенотипа, относящихся к апоптозу, аресту клеточного цикла или ответу на стресс. В качестве генов-модуляторов дифференциального ответа были предложены *CDKN1A* и *TP53* [68].

Большинство упомянутых выше исследований сочетали секвенирование РНК единичных клеток с секвенированием ДНК, что показало менее выраженную гетерогенность транскриптомных профилей по сравнению с геномной гетерогенностью. Несмотря на огромное количество мутаций, паттерны изменений транскриптомных профилей в ответ на химиотерапию, как правило, сходятся на специфических сигнальных путях.

Суммируя всё вышесказанное, можно сказать, что химиотерапия приводит к возникновению нескольких популяций клеток с различными транскрипционными профилями. Несмотря на гибель части опухоли, в оставшихся популяциях опухолевых клеток могут запускаться процессы формирования устойчивости к терапии – арест клеточного цикла и репарация повреждений ДНК за счёт активации сигнальных путей PI3K/AKT/mTOR, Jak/STAT, WNT/ β -катенин и других. Более того, известно, что все эти сигнальные пути способны индуцировать ЭМП, который часто ассоциируют с более агрессивным опухолевым фенотипом [69–71].

2.2. Внутриклеточные механизмы приобретённой химиорезистентности

Некоторые механизмы, которые способствуют *de novo* адаптации опухолей к терапии, уже детально изучены. К ним относят: изменение уровня накопления химиопрепарата в клетке, подавление апоптоза, модификацию целевых белков и активацию альтернативных сигнальных

путей. Таким образом, под воздействием терапии в клетке запускаются процессы, позволяющие ей адаптироваться, выжить в ходе лечения и в дальнейшем способствовать развитию новой опухоли.

Например, важную роль в развитии химиорезистентности играют механизмы поглощения, выведения и инактивации лекарственных препаратов [72]. Часто терапия провоцирует появление мутаций, которые изменяют активность или уменьшают представленность рецепторов к препарату либо белков-транспортеров. Это приводит к снижению скорости проникновения химиопрепаратов в клетку и развитию устойчивости к лечению [73,74]. Кроме того, под действием лечения может активироваться или усилиться экспрессия ABC-транспортеров (например, *MDR1*, *MRP1*, *MXR*), что формирует множественную лекарственную устойчивость [75–77].

Кроме того, многочисленные исследования демонстрируют значительные изменения в мутационном профиле по мере развития опухоли, особенно под воздействием стрессовых факторов, таких как химио- или радиотерапия. Эти воздействия усиливают мутагенез из-за высокой геномной нестабильности и митотических катастроф [78]. В процессе прогрессирования опухоли и в ответ на химиотерапию могут возникать мутации, которые способствуют устойчивости опухолевых клеток к применяемым препаратам. Например, среди мутаций, индуцируемых химиотерапией, часто встречаются изменения в генах, связанных с EGFR-зависимыми сигнальными путями (*EGFR*, *HER2*, *RAS*) [79–82]. Помимо мутаций, снижающих эффективность таргетной терапии, существуют такие, которые помогают избежать действия менее специфических химиопрепаратов через регуляцию репарации ДНК или блокировку апоптоза. Примерами таких мутаций являются изменения в генах онкосупрессорах *BRCA1* и *BRCA2* [83,84]. Мутации в этих генах не только усиливают геномную нестабильность, но и повышают чувствительность опухолевых клеток к ДНК-повреждающим агентам, таким как препараты на основе платины [85,86] а также к ингибиторам поли(АДФ-рибоза)-полимеразы [84]. Повторные или вторичные мутации могут восстанавливать функциональность этих генов, что приводит к развитию резистентности к текущим методам лечения [83,87,88]. Также было показано, что мутации в гене *TP53*, возникающие под действием химиотерапии, способствуют формированию устойчивости к терапии [89,90].

Наряду с генетическими изменениями, опухолевые клетки могут проходить и через эпигенетические изменения. К ним относятся: гиперметилирование ДНК, приводящее к подавлению ключевых генов-супрессоров опухоли [91,92], модификация гистонов и ремоделирование хроматина [93]. Однако генетические и эпигенетические изменения сами по себе не могут полностью объяснить возникновение лекарственной устойчивости [94].

Помимо уже хорошо изученных процессов, описанных в литературе, существует ряд механизмов, которые требуют более глубокого изучения, поскольку их вклад в развитие химиорезистентности опухолевых клеток остается спорным. Например, роль эпителиально-мезенхимального перехода (ЭМП) в индукции устойчивости к химиотерапии все еще вызывает вопросы. Кроме того, многие неспецифические препараты оказывают эффективное воздействие на опухолевые клетки лишь в определенных фазах клеточного цикла. Однако, из-за асинхронности клеточного цикла опухолевых клеток на момент лечения, предсказать влияние конкретного препарата на выживаемость опухолевых клеток затруднительно.

2.2.1. Клеточный цикл

Многие химиотерапевтические препараты оказывают избирательное действие на клетки, находящиеся в определенных фазах клеточного цикла. Препараты, которые напрямую или косвенно повреждают ДНК, такие, как доксорубин, 5-фторурацил и топотекан, проявляют наибольшую активность, преимущественно в S-фазе клеточного цикла [95]. В то же время, препараты, нарушающие сборку митотического веретена, такие как алкалоиды винка и таксаны (доцетаксел и паклитаксел), наиболее токсичны для клеток в M-фазе [96].

Арест клеточного цикла в фазе, предшествующей фазе действия химиопрепарата, может снизить эффективность лечения. Было показано, что арест клеточного цикла в G1-фазе вызывает резистентность клеток меланомы к бортезомибу (ингибитор протеасом) и темозоломиду (алкилирующий агент). Например, предварительное лечение меланомы препаратами, вызывающими арест в G1-фазе (например, ингибиторами MAPK-пути), может привести к развитию резистентности к бортезомибу и темозоломиду, однако обратная последовательность лечения не вызывает устойчивости [97]. Ресвератрол, вызывающий арест клеточного цикла в S-фазе, замедляет вход клеток в митоз. Это снижает эффективность паклитаксела, специфичного для M-фазы, но увеличивает токсичность цисплатина, активного в S-фазе [98]. В то же время, синхронизация клеток в M-фазе повышает чувствительность клеток аденокарциномы яичника к паклитакселу в 2-3 раза [99]. Арест в G1-фазе, вызванный гипоксией, увеличивает устойчивость клеток рака полости рта к 5-фторурацилу в 10 раз [100]. Также показано, что клетки, находящиеся в G1-фазе и с высокой экспрессией *MUCN*, демонстрируют устойчивость к доксорубину [97].

Арест клеточного цикла в определенной фазе не только защищает клетки от воздействия химиопрепаратов, но и дает им время для восстановления перед вступлением в митоз.

Преждевременное деление поврежденных клеток может привести к апоптозу. Это особенно заметно при использовании агентов, повреждающих ДНК. Например, цисплатин вызывает репликативный стресс, который активирует киназы ATR, CHK1 и WEE1, что приводит к остановке клеточного цикла в S-фазе и задержке деления опухолевых клеток. Недостаток WEE1 вызывает преждевременный вход в митоз в клетках с серьезными повреждениями ДНК, что ведет к их гибели [101].

Другая группа исследователей показала, что устойчивость клеточных линий трижды негативного рака молочной железы к цисплатину не всегда объясняется нарушениями репарации ДНК. Важным фактором здесь являются механизмы регуляции клеточного цикла в ответ на стресс. Так, резистентные линии, в отличие от чувствительных, вступают в митоз только после полного восстановления поврежденной ДНК. Было предложено, что ключевую роль в этом процессе играют белки G3BP2, HMMR и NEK2 [94].

Однако в литературе встречается и противоположное мнение – продолжительный арест клеточного цикла не предотвращает апоптоз, а наоборот, может его запускать. В исследованиях на линии рака легких A549 и её резистентном аналоге A549R было установлено, что резистентные клетки избегают ареста в фазе G2/M [102,103]. Подобное наблюдение было сделано и на клетках рака молочной железы MDA-MB-231 и её устойчивом варианте MDA-MB-231R: после воздействия доксорубицином резистентные клетки продолжали экспрессировать гены, контролирующие прохождение клеточного цикла, тогда как чувствительные клетки скапливались в суб-G1 фазе и вступали в апоптоз [104].

Таким образом, фаза клеточного цикла, в которой находятся опухолевые клетки во время воздействия химиопрепарата, может существенно влиять как на непосредственный эффект терапии, так и на последующую реакцию клеток на лечение (Рисунок 4). Глубокое понимание механизмов регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках, а также влияние различных химиопрепаратов на эти процессы при комбинированной терапии, может способствовать разработке более эффективных стратегий лечения.

2.2.2. Эпителиально-мезенхимальный переход

Принято считать, что опухолевые клетки мезенхимального фенотипа обладают более агрессивными и инвазивными свойствами по сравнению с клетками эпителиального фенотипа, а эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) нередко связывают с развитием резистентности к противоопухолевой терапии [105,106]. Тем не менее вопрос остается

открытым: вызывает ли ЭМП сам по себе устойчивость к лечению или лишь сопутствует другим процессам, приводящим к химиорезистентности.

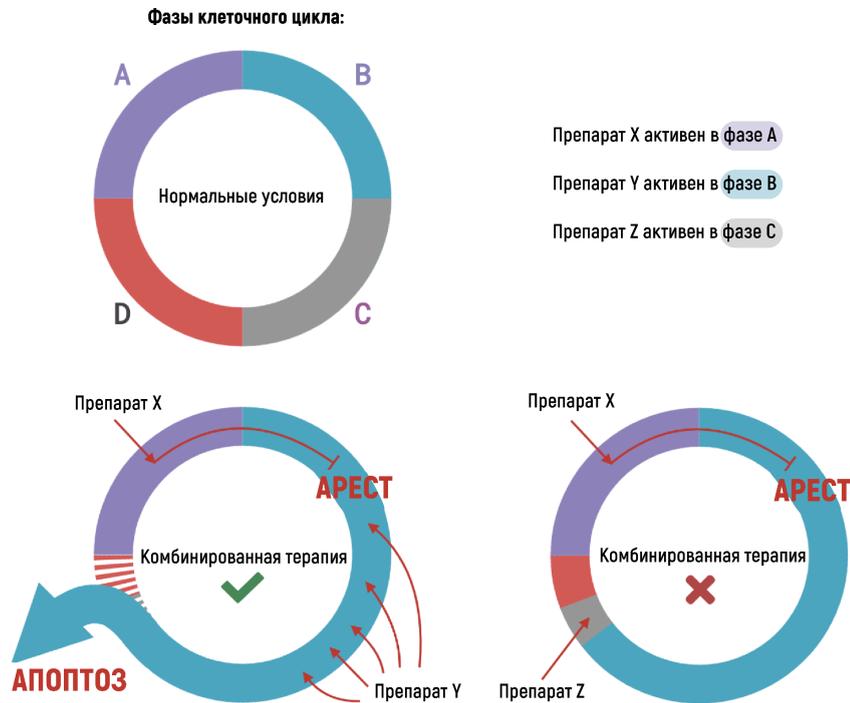


Рисунок 4. Эффективность комбинированной химиотерапии зависит от того, в какой фазе клеточного цикла находится опухолевая клетка. Применение препаратов, которые вызывают арест клеточного цикла, может как повысить, так и понизить результативность лечения. Если клеточный цикл останавливается в фазе, оптимальной для действия второго препарата, это увеличивает его эффективность. Однако остановка клеточного цикла в фазе, предшествующей действию второго препарата, может ослабить его влияние. A, B, C и D условно символизируют четыре фазы клеточного цикла. Адаптировано из [64].

Для исследования связи между ЭМП и химиорезистентностью обычно устанавливается корреляция между чувствительностью клеток к препарату и экспрессией генов, характерных для того или иного фенотипа. Например, в клеточных линиях рака печени была выявлена связь между сниженной чувствительностью к цисплатину, гемцитабину и 5-фторурацилу и пониженной экспрессией *CDH1* (Е-кадгерина), наряду с повышенной экспрессией транскрипционного фактора *ZEB1*, который ингибирует Е-кадгерин [107]. Одним из основных отличий резистентной версии клеточной линии рака легких A549 является повышение экспрессии транскрипционного фактора *FOXO2*, участвующего в ЭМП [108]. Подобные результаты были получены при анализе экспрессии генов, отвечающих за ЭМП, в образцах

опухолевой ткани пациентов и первичных культурах клеток глиобластомы [109], рака простаты [110], молочной железы [111] и немелкоклеточного рака легких [112].

ZEB1 является ключевым транскрипционным фактором, который играет значительную роль в активации ЭМП. Этот фактор активируется в ответ на внешние стимулы через такие внутриклеточные сигнальные каскады, как PI3K/AKT/mTOR, RAS/ERK, WNT/ β -катенин, и NF- κ B. В то же время ZEB1 подавляет экспрессию генов, характерных для эпителиального фенотипа, таких как *CDH1* (E-кадгерин), *ESRP1*, *EPCAM*, *ESR1* (ER- α), *RAB25* и *ST14* [113]. Исследования показали, что нокаун *ZEB1* в клеточных линиях рака молочной железы, немелкоклеточного рака легких и остеосаркомы повышает чувствительность клеток к радиотерапии, а его искусственная экспрессия в клетках рака молочной железы снижает эффективность лечения [114].

Однако важно отметить, что транскрипционные факторы, включая ZEB1, часто регулируют несколько различных процессов одновременно. Помимо влияния на ЭМП, ZEB1 и другие транскрипционные факторы ЭМП (SNAIL, SLUG и TWIST) вовлечены в регуляцию клеточного цикла, пролиферацию, репарацию ДНК, метаболизм липидов, выведение химиопрепаратов и активацию Т-лимфоцитов [114–119]. Эти механизмы так же участвуют в формировании устойчивости опухолевых клеток к терапии. Более того, известно, что ZEB1 способствует формированию резистентности к радиотерапии, не вызывая ЭМП [114].

ЭМП тесно связан с процессами инвазии и метастазирования опухолевых клеток. В исследованиях на клеточных моделях рака молочной железы было показано, что ключевые процессы, обеспечивающие прогрессирование опухоли (пролиферация, поддержание энергетического обмена, липогенез, иммунные взаимодействия, инвазия и ремоделирование тканей), не могут происходить одновременно [120]. Этот феномен, который заключается в невозможности сочетания процессов пролиферации и инвазии, был также подтвержден другими исследователями [121–123]. Таким образом, опухолевая клетка встает перед выбором – поддерживать метаболизм за счёт глюкозы или за счет липидов; активно пролиферировать, избегать иммунного ответа или метастазировать [120]. Как уже упоминалось в главе “2.2.1. Клеточный цикл”, активная пролиферация или определенная стадия клеточного цикла могут существенно влиять на чувствительность опухолевых клеток к лечению. Так, например, метастазирующие клетки зачастую более устойчивы к препаратам, направленным на стабилизацию микротрубочек или повреждение ДНК.

В связи с этим, сигнальные пути, активирующие ЭМП, нередко запускают и другие процессы, способствующие развитию химиорезистентности, что затрудняет вычленение

эффекта, связанного исключительно с ЭМП. Тем не менее, изменения в маркерах ЭМП могут использоваться для оценки эффективности противоопухолевой терапии.

2.4. Межклеточная коммуникация и приобретённая устойчивость к терапии

Ранее были рассмотрены два механизма (клональная селекция и внутриклеточные изменения, индуцированные терапией), которые развиваются на уровне отдельных клеток и приводят к возникновению резистентности. Однако кроме этих процессов, существуют более сложные механизмы, основанные на взаимодействии различных клеточных популяций между собой. Терапия способна вызвать значительные изменения в опухолевых клетках и их микроокружении, что сопровождается секрецией сигнальных молекул как в свободной форме, так и заключённых во внеклеточные везикулы. Эти секретируемые вещества могут воздействовать на опухолевые клетки, способствуя их устойчивости к лечению.

Важно понимать, что опухолевые клетки функционируют в опухолевом микроокружении, где погибающие и выжившие опухолевые клетки постоянно обмениваются информацией как друг с другом, так и с клетками опухолевой стромы. Существует несколько способов осуществления межклеточной коммуникации – прямой (через щелевые контакты, связывание по типу рецептор–лиганд или через туннельные нанотрубки) и непрямой (посредством передачи сигналов внеклеточными везикулами или растворимыми молекулами) [124]. В контексте приобретённой устойчивости к терапии, больше всего внимания уделяется именно секреции и поглощению сигнальных молекул, как свободных, так и включённых во внеклеточные везикулы.

2.4.1. От опухолевых клеток к опухолевой клетке

Во время химиотерапии, особенно в предоперационный период, наблюдается значительное уменьшение опухоли, что связано с массивной гибелью клеток. При этом большая часть чувствительных опухолевых клеток подвергается апоптозу, однако, по ряду причин (например, отсутствие пролиферативной активности или неравномерное распределение препарата в опухолевой ткани), часть клеток переживает стресс и продолжает существовать после лечения. Таким образом, можно выделить несколько типов секреции опухолевых клеток после химиотерапии: (I) секреция резистентных и чувствительных клонов, на которые не повлияла химиотерапия; (II) секреция погибающих опухолевых клеток; (III) секреция опухолевых клеток, перешедших в состояние псевдостарения.

Известно, что чувствительные и резистентные опухолевые клетки секретируют во внеклеточное пространство разные наборы сигнальных молекул [2–8]. Более того, на клеточных моделях рака пищевода [125], рака яичника [126,127], рака молочной железы [128–133], немелкоклеточного рака легкого [134], острого лимфобластного лейкоза [135], острого миелоидного лейкоза [136], колоректального рака [137], рака простаты [138], остеосаркомы [139], рака почки [140] и меланомы [141,142], было показано, что резистентные к терапии опухолевые клетки выделяют во внеклеточное пространство ряд молекул, которые способствуют приобретению резистентности более чувствительными опухолевыми клетками.

Одной из ключевых групп таких молекул являются микроРНК: miR-30a и miR-100 [128], miR-19b и miR-20a [136], miR-155 [133], miR-221 [129], miR-222 [128,129,132,134]. Также важную роль играют белки, такие как ALKres [142], GSTP1, p-STAT3 [137], PDGFRb [141], UCH-L1 [131], Syntaxin 6 [143,144], EphA2 [143]. Точные механизмы действия этих молекул пока изучены недостаточно, но уже известно, что многие из них способствуют избеганию клеточной гибели или подавляют экспрессию мишеней таргетной терапии, влияя на регуляцию клеточного цикла, ЭМП или аутофагию.

Феномен передачи белков ABC-транспортеров от резистентных опухолевых клеток к чувствительным заслуживает особого внимания. Было показано, что белки множественной лекарственной устойчивости, а также их транскрипты могут экспортироваться резистентными клетками в составе внеклеточных везикул и поглощаться чувствительными клетками [127,130,131,135,136,139]. Это приводит к снижению накопления химиопрепарата внутри реципиентных клеток, что, в свою очередь, уменьшает их чувствительность к терапии.

Во время лечения изменяется доля резистентных клонов в опухоли, что приводит к увеличению количества секретлируемых ими молекул в общем секрете опухоли. В результате оставшиеся чувствительные клоны подвергаются воздействию изменившегося внеклеточного окружения и приобретают устойчивость к терапии в ходе коммуникации с увеличивающимися в представленности резистентными опухолевыми клетками. Важно отметить, что многие исследования, описывающие особенности межклеточной коммуникации опухолевых клеток, касаются клеток, не подвергавшихся стрессовому воздействию, таким образом не учитывается вклад терапии в изменение состава секретлируемых молекул.

Было продемонстрировано, что межклеточный транспорт может включать не только перенос отдельных молекул и везикул, но и передачу более крупных структур, таких как митохондрии. Этот процесс наблюдается как при взаимодействии опухолевых клеток с их микроокружением, так и внутри самой опухолевой популяции [145]. Особенно интересен не только сам факт передачи митохондрий, но и механизм, включающий образование туннельных

нанотрубок [146–149]. Клетки опухоли, у которых нарушена митохондриальная функция (например, вследствие терапии) могут получить "здоровые" митохондрии от доноров, восстанавливая свою энергетическую активность. Кроме того, выделение митохондрий самими опухолевыми клетками влияет на соседние клетки стромы, не затронутые онкотрансформацией [150].

Наиболее значимую роль в межклеточной коммуникации, вероятно, играют секреторируемые погибающими клетками молекулы, поскольку на первых этапах химиотерапии, особенно предоперационной, происходит гибель существенной части опухоли и происходит массивная перестройка внутриклеточных процессов, ведущих за собой изменение состава секретомов. Оказывается, погибающие опухолевые клетки способны секретировать во внешнюю среду молекулы, которые помогают оставшимся живым клеткам адаптироваться к стрессу и повышают их устойчивость к дальнейшей терапии [9–14].

Так, исследование, направленное на изучение причин снижения эффективности терапии ингибиторами тирозин-киназ, показало, что погибающие клетки меланомы и рака легких секреторируют вещества, стимулирующие химиорезистентность и метастазирование соседних опухолевых клеток через активацию пути PI3K/AKT/mTOR [9]. При этом устойчивость к терапии у реципиентных клеток наблюдалась только при условии присутствия рядом значительного количества погибающих опухолевых клеток. Однако конкретные молекулы, ответственные за этот процесс, установлены не были.

Также было показано, что секреция простагландина E2 и арахидоновой кислоты погибающими опухолевыми клетками способствовала репопуляции остаточной опухоли молочной железы или мочевого пузыря. Это происходило через активацию WNT/ β -катенинового пути и стимуляцию ЭМП [11,12]. Секреция простагландина E2 и арахидоновой кислоты происходила вследствие активации кальций-независимой фосфолипазы A2 под воздействием каспазы 3 в клетках, подвергающихся апоптозу.

На модели глиобластомы показали, что под действием радиотерапии погибающие опухолевые клетки секреторируют апоптотические везикулы, содержащие белки сплайсосомы. При этом инкубация реципиентных клеток с везикулами от погибающих донорных клеток приводила к формированию более агрессивного фенотипа. Эти везикулы изменяли процесс сплайсинга мРНК, кодирующих ключевые белки, регулирующие ЭМП и клеточный цикл, а также способствовали переключению метаболизма реципиентных клеток на гликолиз. Например, сплайсинговый фактор RBM11 может переноситься в апоптотических везикулах и регулировать клеточный цикл, связываясь с мРНК циклина D1 и MDM4, переключая их сплайсинг на изоформы, ассоциированные с неблагоприятным прогнозом [10].

Примечательно, что взаимодействие между опухолевыми клетками активируется различными видами противоопухолевого лечения, такими как радиотерапия [10,151], применение алкилирующих агентов [152,153], ингибиторы топоизомераз [154], антиметаболиты [155,156], таксаны [157,158], а также ингибиторы киназ [9,154]. В роли ключевых участников процесса развития химиорезистентности опухолевых клеток были предложены различные молекулы: компоненты сплайсосомы [10], простагландин E2 [11,12]; сурвивин [157,159], Р-гликопротеин [160], HMGB1 [161,162], FGF2 [14], различные метаболиты [13], ряд микроРНК (miR-21 [153], miR-155 [155,156], miR-194-5p [151]), а также lncRNA-VLDLR [154].

Несмотря на перспективность изучения этого феномена, существует лишь ограниченное количество исследований, в которых анализировал глобальные изменения в профилях секреции опухолевых клеток до и после химиотерапии. Это затрудняет выявление молекул, ответственных за формирование более агрессивного фенотипа реципиентных клеток. Дополнительную сложность представляет тот факт, что профили секреции клеток, погибающих различными механизмами могут существенно различаться [163]. Так, было показано, что клетки, погибающие некроптозом, высвобождают значительное количество лизосомальных белков. В то время как апоптотирующие клетки секретируют во внеклеточное пространство преимущественно гистоны и другие компоненты ядерной фракции.

Кроме того, под действием химиотерапии опухолевые клетки могут входить в состояние обратимого или необратимого псевдостарения. Псевдостареющие опухолевые клетки так же секретируют молекулы, способствующие возникновению химиорезистентности у реципиентных хемонаивных опухолевых клеток. Данный процесс был описан в исследованиях, посвящённых злокачественным клеткам мезотелиомы плевры, клеткам меланомы и рака молочной железы [164–168].

Таким образом, секретируемые опухолевыми клетками молекулы могут значительно нарушить гомеостаз хемонаивных клеток и спровоцировать их переход к состоянию, более устойчивому к лечению (Рисунок 5).

2.4.2. От клеток микроокружения к опухолевой клетке

Клетки опухолевого микроокружения (опухоль-ассоциированные фибробласты, иммунные клетки, мезенхимальные стволовые клетки, адипоциты и клетки эндотелия) могут играть двойственную роль: поддерживать рост опухоли или, напротив, ингибировать его [124,169,170]. Вклад клеток стромы в развитие резистентности к лечению варьируется между пациентами, так как представленность клеток микроокружения может значительно отличаться даже в пределах одного типа опухоли [171]. Более того, доля стромальных клеток может

изменяться в ходе лечения, оказывая влияние на его исход. Исследования показывают, что высокая представленность стромальных клеток может быть ассоциирована с неблагоприятным прогнозом для пациента [172].

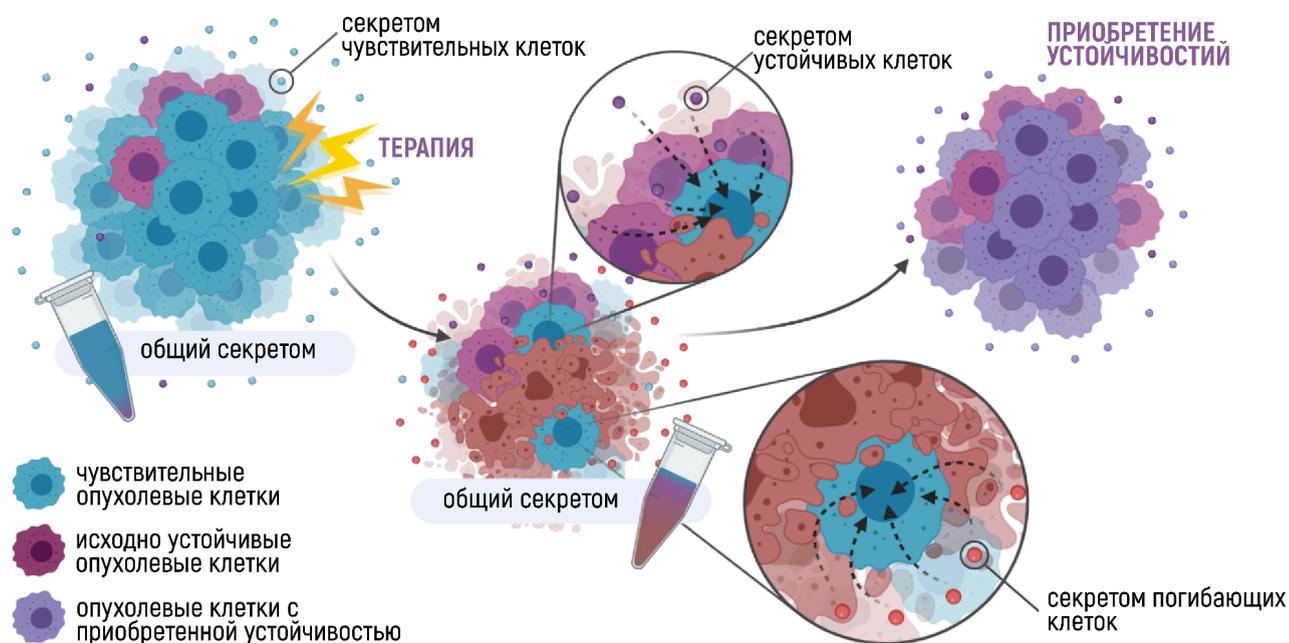


Рисунок 5. В ходе лечения происходит гибель большинства чувствительных опухолевых клеток, что приводит к уменьшению их доли в опухолевой популяции и увеличению числа резистентных клонов. Таким же образом изменяется состав суммарного секретома и, следовательно, его способность приводить к формированию устойчивости к терапии. Погибающие под действием химиотерапии опухолевые клетки выделяют во внеклеточное пространство ряд молекул, способных вызывать формирование устойчивости хемонаивными опухолевыми клетками. Адаптировано из [64].

Однако и клетки опухоли способны влиять на свое микроокружение. Например, погибающие в ходе химиотерапии опухолевые клетки секретируют молекулы, способные регулировать иммунный ответ, стимулировать ангиогенез, изменять физико-химические параметры опухолевой среды или усиливать клеточную инвазию [173]. Было показано, что молекулы, секретируемые погибающими опухолевыми клетками, обладают иммуносупрессивным действием. Например, CCL20 рекрутирует регуляторные Т-клетки, активируя сигнальный путь FOXP1/CEBPB/NF-κB [174]. Сфингозин-1-фосфат способствует поляризации опухоль-ассоциированных макрофагов в макрофаги типа M2. Этот тип макрофагов секретирует противовоспалительные молекулы, такие как IL-10 и простагландин E2, которые в

свою очередь поддерживают ангиогенез и миграцию клеток эндотелия [175]. Простагландин E2, помимо этого, привлекает к опухоли макрофагов, опухоль-ассоциированных фибробластов, нейтрофилов и подавляет противоопухолевую активность Т- и NK-клеток [176].

2.4.2.1 Опухоль-ассоциированные фибробласты

Основным компонентом опухолевой стромы являются опухоль-ассоциированные фибробласты (ОАФ) [177]. Многие исследования показали, что опухолевые клетки способны приобретать устойчивость к терапии за счет коммуникации с ОАФ. Так, было показано, что ОАФ секретируют как различные белковые молекулы, так и микроРНК, которые вызывают в реципиентных опухолевых клетках активацию пролиферации, ЭМП и ингибирование проапоптотических каскадов (Таблица 1). Отдельного внимания заслуживает тот факт, что часть из перечисленных в таблице молекул, а именно miR-106b [178], miR-522 [179], IL-11 [180], PAI-1 [181] и GDNF [182], секретируются ОАФ именно в ответ на терапевтическое воздействие.

2.4.2.2 Опухоль-ассоциированные макрофаги

Химиотерапия неизбежно вызывает повреждение тканей, что привлекает большое количество миелоидных клеток, преимущественно опухоль-ассоциированных макрофагов, способствующих восстановлению опухолевых тканей. Этот процесс включает супрессию Т-клеточного иммунного ответа, ингибирование клеточной гибели в опухолевых клетках (через секрецию факторов роста, хемокинов и цитокинов), а также активацию ангиогенеза [183].

Так, на примере колоректального рака показали, что пониженная экспрессия miR155-5p в опухоль-ассоциированных макрофагах приводит к увеличению в них экспрессии *CEBPB* и секреции IL6, что ведет к активации пути IL6R/STAT3/miR-204-5p и индукции химиорезистентности в реципиентных опухолевых клетках [184]. Было показано, что секретируемые макрофагами M2 экзосомы активируют в реципиентных клетках аденокарциномы легкого путь АКТ/ERK1/2/STAT3, тем самым снижая вызванный гефитинибом апоптоз [185]. Поглощение секретированного макрофагами miR-21 запускает в клетках глиобластомы сигнальный каскад STAT3/miR-21/PDCD4, что способствует формированию устойчивости к темозоломиду [186]. При раке легких была обнаружена передача экзосомальной miR-3679-5p от макрофагов к опухолевым клеткам, что запускало в последних резистентность к цисплатину через путь miR-3679-5p/NEDD4L/c-Мус [187].

Таблица 1. Молекулы, секретируемые ОАФ и их вклад в формирование устойчивости к химиотерапии в опухолевых клетках.

Секретируемая молекула	Эффекты в реципиентной клетке	Тип рака	Устойчивость к химиопрепарату	Ссылка
GDNF	Усиленная пролиферация и инвазия	Рак простаты	Митоксантрон, доцетаксел	[182]
HGF, IGF-1	Запуск ЭМП, повышение экспрессии <i>ANXA2</i>	Немелкоклеточный рак легких	Гефитиниб	[188]
IL-11	Фосфорилирование STAT3, повышение экспрессии <i>BCL2</i> и сурвивина	Немелкоклеточный рак легких, рак желудка	Цисплатин	[180,189]
IL-6	Запуск ЭМП, активация пути STAT3/NF-κB	Немелкоклеточный рак легких, рак пищевода	Цисплатин	[190,191]
IL-8	Активация NF-κB, повышение экспрессии <i>ABCB1</i>	Рак желудка	Цисплатин	[192]
PAI-1	Активация сигнальных путей АКТ и ERK1/2, ингибирование каспазы 3	Рак пищевода	Цисплатин	[181]
TGFβ1	Формирование устойчивости к химотерапии	Рак пищевода	Цисплатин, иринотекан, 5-фторурацил, карбоплатин, доцетаксел, винкристин	[193]
miR-21	Ингибирование АРАF1, нарушение активации каспазы 3	Рак яичника	Паклитаксел	[194]
miR-522	Ингибирование ALOX15 и ферроптоза	Рак желудка	Цисплатин	[179]
miR-92a-3p	Ингибирование FBXW7 и MOAP1, активация ЭМП и ингибирование апоптоза	Колоректальный рак	Оксалиплатин, 5-фторурацил	[195]
miRNA-106b	Снижение экспрессии <i>TP53INP</i> (антипролиферативный и проапоптотический белок)	Рак поджелудочной железы	Гемцитабин	[178]

2.4.2.1 Мезенхимальные стволовые клетки

Все больше исследований указывает на критическую роль полученных от МСК экзосом в формировании устойчивого к химиотерапии опухолевого фенотипа. На примере рака желудка было показано, что экзосомы мезенхимальных стволовых клеток предотвращают апоптоз и повышают устойчивость опухолевых клеток к 5-фторурацилу запуская в них сигнальный каскад CaM-Ks/Raf/MEK/ERK [196]. На модели рака молочной железы была показана передача

miR-222/223, которая останавливала деление опухолевых клеток и, тем самым приводила к снижению эффективности действия карбоплатина, в то время как ингибирование этой микроРНК восстанавливало чувствительность к препарату [197]. Исследования аденокарциномы поджелудочной железы показали, что после обработки гемцитабином мезенхимальные стволовые клетки активно секретируют CXCL10, тем самым активируя CXCR3 сигналинг в опухолевых клетках. Все это приводит к формированию химиорезистентности и росту опухоли [198].

С другой стороны, некоторые исследования показывают, что экзосомы, полученные от МСК, могут повышать чувствительность к химиотерапии. Например, экзосомы, полученные от мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани, снижали резистентность опухолевых клеток молочной железы к цисплатину, за счет передачи miR-1236 и последующего подавления активности SLC9A1 в опухолевых клетках [199].

Рассмотренные примеры коммуникации между опухолевыми клетками и клетками опухолевого микроокружения позволяют сделать вывод, что терапия приводит не только к изменению состава опухолевого микроокружения, но и к изменению профилей секреции входящих в него клеток. Вместе, это вносит вклад в приобретение опухолью устойчивости к используемой терапии (Рисунок 6).

3. РАК ЯИЧНИКА

Рак яичника — это гетерогенное заболевание, разделяемое на несколько подтипов, каждый из которых обладает различными молекулярными и клиническими характеристиками. Порядка 90% всех случаев рака яичника относятся к эпителиальному типу, который в свою очередь делится на 6 гистологических подтипов: серозные аденокарциномы (68-71%), эндометриоидные опухоли (9-11%), муцинозные карциномы (3%), опухоль Бреннера (1%) и смешанные карциномы (6%) [200].

Несмотря на достижения в диагностике и лечении, рак яичника остается одним из самых смертоносных гинекологических видов рака. По данным Американского онкологического общества в 2024 году в Соединенных Штатах будет диагностировано 19680 новых случаев рака яичника, и примерно 12740 женщин умрут от этого заболевания. Пятилетняя выживаемость при раке яичников составляет всего 50%, что подчеркивает необходимость в более эффективных методах лечения.

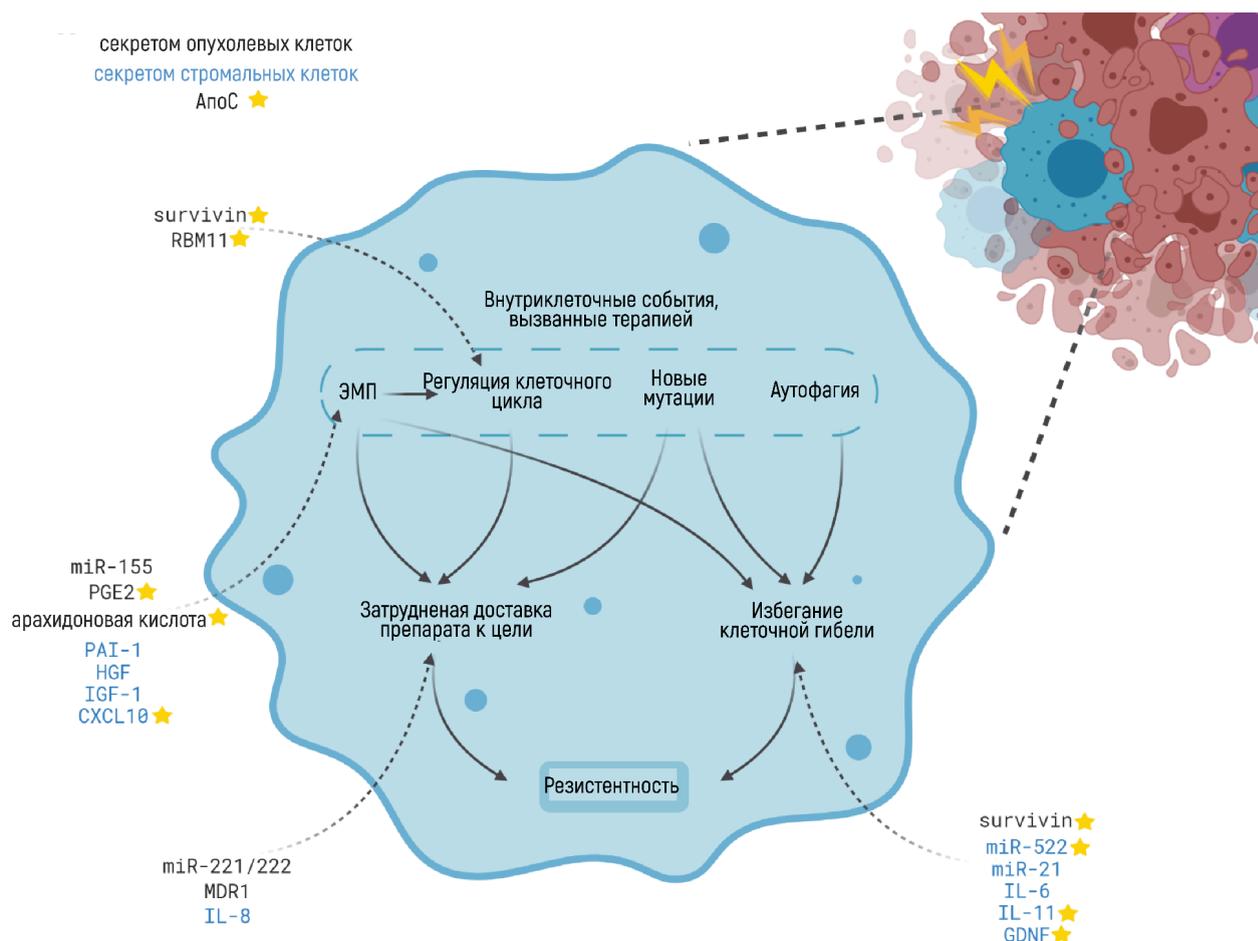


Рисунок 6. Стрессовые воздействия, обусловленные противоопухолевой терапией, запускают ряд событий (приобретение новых мутаций, изменение регуляции клеточного цикла, ЭМП), которые затем приводят к избеганию клеточной смерти и изменению эффективности поглощения/активации химиопрепарата. Помимо внутриклеточных сигналов, в запуске этих событий участвуют молекулы, поступающие в клетку извне от клеток стромы и от других опухолевых клеток. Черный – сигналы от опухолевых клеток, голубой – сигналы от стромальных клеток, молекулы со звездочкой – сигналы от погибающих клеток, ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход, АпоС – секреты от погибающих клеток. Адаптировано из [64].

3.1. Асцитная жидкость

Одним из ключевых признаков поздних стадий аденокарциномы яичника является образование асцита. Развитие опухоли сопровождается активным ангиогенезом, что способствует увеличению площади поверхности кровеносных сосудов и повышает трансудацию плазмы крови в брюшную полость. Накопление жидкости в полости малого таза определяется как объемом выделяемой жидкости, так и скоростью ее выведения из брюшной

полости. При нарушении баланса между выделением и выведением формируется асцитная жидкость, которая омывает брюшину и яичники, обладающие схожей эпителиальной выстилкой, что значительно облегчает метастазирование опухоли на близлежащие органы через эту жидкость [201].

3.1.1. Клеточные компоненты

Асцитная жидкость обогащена как клеточными компонентами (опухолевого и нормального происхождения), так и различными биомолекулами (белки, нуклеиновые кислоты, метаболиты). Всё это формирует среду для прогрессирования опухоли и избегания ею иммунного ответа [202].

В недавней работе Бенджамина Изара [66] было проведено секвенирование РНК единичных клеток из 22 образцов асцитных жидкостей, полученных от 11 пациентов с аденкарциномой яичника. Помимо опухолевых клеток, были выявлены и описаны нормальные клетки микроокружения, такие как опухоль-ассоциированные фибробласты, макрофаги, дендритные клетки, эритроциты, а также В- и Т-лимфоциты. Несмотря на предварительную деплецию CD45⁺ клеток, иммунные клетки составили в среднем около 67% клеточной массы в асцитной жидкости. Одним из ключевых выводов стало обнаружение нескольких типов макрофагов и ОАФ. Вариативность макрофагов была обусловлена: а) экспрессией M1-ассоциированных генов, IFNGR1 и главного комплекса гистосовместимости I; б) экспрессией M2-ассоциированных генов и факторов комплемента. Предполагается, что эти популяции сосуществуют в балансе в экосистеме асцитной жидкости. Однако терапия препаратами платины может сдвигать равновесие в сторону макрофагов M2, изменяя дифференцировку моноцитов. В свою очередь, ОАФ делились на иммуномодулирующие и воспалительные. Обнаруженная совместная активация JAK/STAT-пути в опухолевых клетках и в ОАФ предполагает, что паракринная и/или аутокринная передача сигналов по этому пути может способствовать формированию устойчивости к терапии и формированию более агрессивной опухоли. Таким образом асцитные жидкости содержат большое разнообразие клеток, между которыми непрерывно происходит процесс межклеточной коммуникации.

Асцитные жидкости являются естественной средой для межклеточной коммуникации опухолевых клеток и их микроокружения. Таким образом, они представляют собой резервуар для всех секретируемых низко- и высокомолекулярных соединений. Однако, одним из наиболее широко изученных типов молекул в асцитных жидкостях являются белки.

3.1.2. Белковые компоненты

Ранее нами было проведено сравнение протеомных профилей асцитных жидкостей от пациентов с аденокарциномой яичника и пациентов с циррозом печени. Оказалось, что 424 белка и 41 метаболит были представлены исключительно в опухолевых асцитных жидкостях. К наиболее обогащенным белковым кластерам относились факторы выживания (включая цитокины, хемокины и факторы роста), фрагменты внеклеточного матрикса, компоненты сплайсосомы и протеасомы [203].

Исследовательская группа Рольфа Мюллера [204] провела протеомный анализ 20 образцов асцитных жидкостей и 30 образцов плазмы крови пациентов с аденокарциномой яичника. Наличие информации о безрецидивной выживаемости пациентов, принявших участие в исследовании, позволило определить белковые компоненты асцитов, отвечающие за более длинный или короткий период безрецидивной выживаемости. Помимо уже известных активных компонентов асцитных жидкостей (цитокинов, факторов роста, эфринов) к белкам, ассоциированным с худшим прогнозом отнесли HSPA1A (heat shock 70 kDa protein 1), VCAM (basal cell adhesion molecule), CTSZ (Cathepsin Z) и DKK1 (dickkopf-related protein 1).

Еще одна группа исследователей под руководством Памелы Кригер [205] провела анализ зависимости представленности панели белковых молекул от прогноза пациентов с аденокарциномой яичника. Так, с более длительным безрецидивным периодом были ассоциированы высокая представленность белков FAS-лиганда и CCL20, и низкая представленность белков MMP-2 и EMMPRIN.

3.1.3. Нуклеиновые кислоты

Одним из недавних открытий стало обнаружение внеклеточной циркулирующей опухолевой ДНК (вкДНК) в асцитных жидкостях пациентов с аденокарциномой яичника. Стало известно, что вкДНК представляют собой последовательности ДНК различных длин (от 150 пар оснований и выше), которые сохраняют свою стабильность в асцитной жидкости до 72 часов. Вероятнее всего, эта стабильность обусловлена упаковкой вкДНК во внеклеточные везикулы [206]. Также было показано, что мутационный статус вкДНК соотносится с мутационным статусом соответствующей опухоли яичника в 90% случаев [207].

Несколько исследовательских групп обнаружили связь между уровнем представленности некоторых микроРНК в асцитных жидкостях с активацией или ингибированием важнейших для опухолевых клеток путей. Так, повышенный уровень miR-6780b-5p соотносят с активацией

ЭМП [208]. Повышенный уровень miR-1246 и miR-1290 способствует миграции и инвазии [209]. Целый ряд микроРНК семейства miR-200 является регулятором ЭМП и вносит свой вклад в процессы инициации опухоли, её роста и метастазирования, а также ответа на химиотерапию [210,211]. Помимо влияния на опухолевые клетки, некоторые микроРНК способны репрограммировать опухолевое микроокружение. Например, miR-940 стимулирует M2-поляризацию макрофагов, что способствует пролиферации и миграции опухолевых клеток [212].

3.1.4 Метаболиты

Асцитные жидкости пациентов с аденокарциномой яичника обогащены различными метаболитами. Группа Дэна Конга [213] провела метаболомный анализ асцитных жидкостей от 37 пациентов и соответствующих им опухолей. Была проведена оценка метаболома асцитных жидкостей с учетом наличия проведенных курсов химиотерапии и общего прогноза. Авторами статьи были отмечены девять наиболее статистически важных метаболитов: карнозин, лейкотриен E4, себациновая кислота, 1,25-дигидроксивитамин D3-26,23-лактон, 20a,22b-дигидроксихолестерин, 3a,6a,7b-тригидрокси-5b-холиновая кислота, 3a,7a,12a,19-тетрагидрокси-5b-холиновая кислота, дигидротимин и гексадекановая кислота. Из представленных метаболитов себациновая кислота и лейкотриен E4 были повышены в асцитных жидкостях пациентов после химиотерапии. Высокое содержание свободных жирных кислот в асцитной жидкости представляет собой огромный источник энергии и репрограммирует метаболизм опухолевых клеток с аэробного гликолиза на β -окисление жирных кислот [214]. Также было показано, что для группы пациентов, устойчивых к химиотерапии, характерен отличающийся уровень метаболитов, связанных с метаболизмом холестерина и репрограммированием пути деградации пиримидина.

Другим хорошо изученным метаболитом асцитных жидкостей пациентов с раком яичника является лизофосфатидиловая кислота. Она представляет собой небольшой биоактивный фосфолипид, обнаруженный не только в асцитах, но и в сыворотке крови пациентов с раком яичников. Лизофосфатидиловая кислота поддерживает активную пролиферацию раковых клеток, увеличивая экспрессию гена теломеразы, участвует в перестройке цитоскелета, регулирует миграцию и энтоз опухолевых клеток [215,216]. Помимо этого, она может косвенно регулировать выделение таких важных цитокинов как IL-8 и IL-6, тем самым, облегчая инвазию опухоли [217]. Более того, лизофосфатидиловая кислота может быть использована в качестве диагностического маркера рака яичника [218]. Еще одним важным

биоактивным фосфолипидом является сфингозин-1-фосфат, который участвует в развитии опухоли. Помимо влияния на экспрессию IL-8 [219], он может быть вовлечен в ингибирование апоптоза и инвазию. Причем в маленьких концентрациях (0,5 μM), сфингозин-1-фосфат является ингибитором, а в больших концентрациях (20 μM) – активатором инвазии опухоли [220].

3.2. Типы лечения

Хирургическое вмешательство является основным методом лечения рака яичников, целью которого является удаление как можно большей части пораженных опухолью тканей. Химиотерапия также широко применяется, как отдельно, так и в сочетании с хирургическим вмешательством. Выбор схемы химиотерапии зависит от подтипа рака яичников и стадии заболевания. Например, серозный рак яичников высокой степени тяжести обычно лечат химиотерапией на основе платины, в то время как светлоклеточный рак яичников может быть устойчив к этому типу химиотерапии.

Существует две стратегии медикаментозного лечения – неоадьювантная и адьювантная химиотерапия. Неоадьювантная химиотерапия (НХТ) проводится до совершения радикальной операции для уменьшения очага заболевания и подавления метастазов, в то время как адьювантная химиотерапия проводится только после хирургического вмешательства. НХТ, обычно включает препараты группы платины (паклитаксел и карбоплатин), и проводится для пациентов на поздних стадиях заболевания, особенно когда проведение радикальной операции невозможно. Исследования показывают, что НХТ может привести к более высоким показателям уменьшения размеров опухоли и выживаемости, а также с меньшим количеством осложнений [221–223]. Адьювантная терапия, которая следует за хирургическим вмешательством, традиционно состоит из шести циклов химиотерапии, часто дополняемых таргетной терапией (ингибиторы PARP) в случае наличия у пациента специфических генетических мутаций [224]. Хотя оба подхода направлены на улучшение выживаемости, выбор между НХТ и адьювантной терапией должен быть индивидуальным, основанным на стадии заболевания, возможности хирургического вмешательства и характеристиках пациента.

Таргетная и иммунная терапия стали многообещающим подходом к лечению рака яичника. Так было показано, что ингибиторы PARP (поли (АДФ-рибоза) полимеразы), эффективны при лечении опухолей, несущих мутации в генах *BRCA1/2*, а ингибиторы PD-L1 (лиганда рецептора программируемой клеточной гибели 1) эффективны против опухолей, несущих мутации в генах *RAD51*, *BARD1* и *TP53* [225]. Однако несмотря на высокую

эффективность первоначальной терапии, опухолевые клетки быстро приобретают устойчивость к используемому типу терапии, что приводит к возникновению рецидивов заболевания [226].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Пациенты и биологические образцы

Парные асцитные жидкости были собраны у 16 пациентов с диагностированным раком яичников до и после неoadъювантной химиотерапии с использованием карбоплатина и таксанов (Таблица 2). Образцы были получены из Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздрава России (Москва, Россия) и Российского научного центра рентгенорадиологии (РНЦРР) Минздрава России (Москва, Россия).

Таблица 2. Информация о пациентах, от которых были получены биологические образцы.

Пациент	Возраст	Диагноз	Стадия	Кол-во курсов
1	45	Карцинома яичников мелкоклеточного типа	III	3
2	58	Серозная аденокарцинома яичников	IV	4
3	68	Серозная аденокарцинома яичников	III	4
4	50	Серозная аденокарцинома яичников	III	6
5	57	Серозная аденокарцинома яичников	III	6
6	49	Серозная аденокарцинома яичников	IV	3
7	64	Серозная аденокарцинома яичников	IV	3
8	55	Серозная аденокарцинома яичников	IIIС	2
9	62	Серозная аденокарцинома яичников	III	3
10	58	Серозная аденокарцинома яичников	III	8
11	76	Серозная аденокарцинома яичников	IV	4
12	59	Серозная аденокарцинома яичников	IV	3
13	42	Серозная аденокарцинома яичников	III	4
14	48	Серозная аденокарцинома яичников	IIIС	2
15	77	Серозная аденокарцинома яичников	III	4
16	57	Серозная аденокарцинома яичников	IV	6

Асцитную жидкость, полученную до начала терапии, собирали во время постановки диагноза посредством лапароцентеза, аспирации во время диагностической лапароскопии или пункции через задний свод влагалища. Асцитную жидкость после химиотерапии собирали интраоперационно после нескольких курсов неoadъювантной химиотерапии. Все пациенты предоставили письменное информированное согласие на участие. Также было получено

этическое одобрение комитетов по этике Российского научного центра рентгенорадиологии Минздрава России и Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. академика В.И. Кулакова Минздрава России.

2. Пробоподготовка асцитных жидкостей

Асциты отбирали в стерильные 50-мл пробирки. Далее их центрифугировали со скоростью 200 g при температуре 4°C в течение 15 минут для осаждения клеток. Супернатант аликвотили по 1 мл и хранили при температуре -70°C. При необходимости, проводили лизис эритроцитов в оставшемся клеточном осадке путем гипотонического лизиса стерильной MilliQ H₂O с последующим добавлением двухкратного раствора PBS для восстановления осмотического давления. Часть оставшихся клеток замораживали в протективной среде, содержащей 90% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS) и 10% ДМСО, и хранили в жидком азоте. Оставшиеся клетки культивировали на среде RPMI с добавлением 10% FBS, 2 mM глутамина, 1% заменимых аминокислот и 1% пенициллина/стрептомицина при температуре 37°C и 5% уровне CO₂. На третьем пассаже культивирования клетки заливали буфером RLT для последующего выделения РНК (см. пункт 10 Главы Материалы и Методы).

3. Инкубация первичных культур с асцитными жидкостями

Полученные из асцитных жидкостей до ХТ первичные культуры опухолевых клеток инкубировали в среде RPMI-1640 (Панэко), содержащей 25% асцитной жидкости в течение 72 часов, после чего клетки подвергали обработке цисплатином (10 μM) для цитотоксических тестов, либо пробоподготовке для протеомного и транскриптомного анализов.

4. Ведение клеточных культур

В работе были использованы адгезионные клеточные линии человека SKOV3 (ATCC, HTB-77), MESOV (ATCC, CLR-3272), OVCAR3 (ATCC, HTB-161), HaCaT (CLS, 300493), hTERT FT282 (ATCC, CRL-3449) и первичная культура дермальных фибробластов, предоставленная лабораторией клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА России. Клеточные линии аденокарциномы яичников SKOV3, MESOV и клетки кератиноцитов человека HaCaT выращивали в культуральной среде DMEM с добавлением 10% FBS, 2 mM глутамина и 1% пенициллина/стрептомицина. Клеточную линию аденокарциномы яичников OVCAR3

выращивали в среде RPMI-1640, содержащей 10% FBS, 2 mM глутамина и 1% пенициллина/стрептомицина. Клеточная линия эпителия фаллопиевой трубы hTERT FT282 выращивали в среде DMEM/F12 содержащей 10% FBS, 2 mM глутамина и 1% пенициллина/стрептомицина. Первичную культуру дермальных фибробластов человека выращивали в среде DMEM, содержащей 10% FBS, 1% заменимых аминокислот, 2 mM глутамина и 1% пенициллина/стрептомицина. На получение и использование клеточной линии фибробластов было получено одобрение этического комитета ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю. М. Лопухина ФМБА России. Все клеточные линии инкубировали при 37°C и 5% уровне CO₂.

5. Получение секретомов для клеточных тестов и анализа треков наночастиц

Для получения секретомов использовали клеточные линии, достигшие 70-80% конфлюентности. Клетки инкубировали с цисплатином (или без него) в бессывороточной среде в течение 7 часов при следующих концентрациях: 40 μM для SKOV3, 60 μM для MESOV, 25 μM для OVCAR3 и HaCaT, 80 μM для дермальных фибробластов и hTERT FT282. После этого среду забирали, клетки трижды промывали PBS для удаления остатков цисплатина, и заменяли среду на бессывороточную DMEM/F12 Advanced (или на DMEM без фенолового красного для анализа треков наночастиц) и инкубировали 41 час. Дозы цисплатина были подобраны так, чтобы к моменту сбора секретомов выживала примерно половина донорных клеток (ЛД₅₀).

В экспериментах с ингибиторами, донорные клетки обрабатывали комбинацией одного из ингибиторов и цисплатина в течение 7 часов. Были использованы следующие ингибиторы и концентрации: лептомицин В (37 нМ) для ингибирования ядерно-цитоплазматического экспорта, брэфельдин А (6 мкг/мл) для ингибирования везикулярного транспорта, и Z-VAD-FMK (50 μM) для блокирования апоптоза. После инкубации клетки промывали PBS, и заменяли среду на бессывороточную DMEM/F12 Advanced на следующие 17 часов для генерации секретомов.

Секретомы центрифугировали в течение 10 минут при 500g и 16°C для удаления клеточного дебриса. Далее супернатант наносили на ультрафильтрационные картриджи Amicon Ultra (Merck) с отсечкой по молекулярной массе 100 кДа при температуре 16°C и на рекомендуемых производителем скоростях. В случае использования секретомов для последующей инкубации с реципиентными клетками, полученную фракцию внеклеточных везикул разводили в свежей среде DMEM/F12 Advanced (или RPMI Advanced для клеточной линии OVCAR3) с добавлением 2% FBS, 2 mM глутамина и 1% пенициллина/стрептомицина. Для анализа треков наночастиц сконцентрированные на картриджах секретомы дополнительно

промывали PBS на тех же картриджах и замораживали при температуре -70°C в итоговом объеме 80-100 мкл.

6. Получение секретомов для протеомного анализа

Для протеомных экспериментов, донорные клетки были обработаны или не обработаны цисплатином как описывалось выше. Через 7 часов клетки промывали 3 раза PBS от остатков цисплатина, после чего среду заменяли на бессывороточную и не содержащую фенолового красного среду ДМЕМ. Через 41 час среду забирали, вносили ингибиторы протеаз (Sigma-Aldrich, GE80-6501-23) и центрифугировали на протяжении 10 минут на скорости 500 g при температуре 16°C для удаления клеточного дебриса. Далее супернатант переносили в чистые пробирки, замораживали и лиофилизовали.

7. Тесты на цитотоксичность

Опухолевые клетки сажали на 96-луночные планшеты так, чтобы в момент обработки цисплатином конfluence достигала 70-90%. После этого клетки обрабатывали растворами секретомов/асцитной жидкости (см. пункты 3 и 5 Главы Материалы и Методы). Через 72 часа к клеткам добавляли раститровку химиопрепарата: цисплатина (Teva Pharmaceutical Industries Ltd, N011590/02), этопозида (Cell Signaling Technologies, 2200S), доксорубицина (Sigma-Aldrich, D1515), стауроспорина (Cell Signaling Technologies, 9953), паклитаксела (Cell Signaling Technologies, 9807S).

Еще через 48 часов клетки обрабатывали реактивом МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолий бромид) и инкубировали 3 часа при температуре 37°C . После чего, МТТ-содержащую среду отбирали и добавляли к клеткам по 100 мкл ДМСО (диметилсульфоксида) для растворения образовавшихся кристаллов формазана. Колориметрические измерения производили с помощью спектрофотометра iMark Microplate Reader (Bio-Rad) при длине волны 570 нм.

Для анализа активности каспазы 3/7 клетки окрашивали с помощью набора для проточной цитометрии CellEvent Caspase-3/7 Green (Thermo Fisher Scientific) согласно протоколу производителя и анализировали на проточном цитометре NovoCyte (ACEA Biosciences).

8. Анализ ДНК-комет

Клетки SKOV3 инкубировали с секретами от погибающих или контрольных клеток на протяжении 72 часов, после чего обрабатывали цисплатином в концентрации 10 μM на протяжении 48 часов. После снятия трипсином и подсчета клеток, 3000 клеток подвергали электрофорезу единичных клеток по протоколу Trevigen (# 4250-050-K). Препараты, окрашенные SYBR Green I, были сфотографированы на микроскопе Nikon Eclipse Ts2. Анализ ДНК-комет был проведен с использованием программного обеспечения CometScore Pro Software (TriTek Corp.).

9. Анализ клеточного цикла

Клетки SKOV3 инкубировали с секретами на протяжении 3 дней, после чего обрабатывали 10 μM цисплатина на протяжении 24 часов. Клетки фиксировали ледяным 70% этанолом при температуре -20°C на протяжении 16 часов, после чего инкубировали с раствором 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI в PBS на протяжении 30 минут на льду. Проточная цитофлуориметрия была проведена на приборе NovoCyte Flow Cytometer с последующим анализом в программном обеспечении NovoExpress software (ACEA Biosciences).

10. Выделение РНК

Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen, #74104) из следующих типов образцов: i) клеток рака яичников, выделенных из асцитных жидкостей до и после химиотерапии; ii) первичных культур рака яичника, полученных из асцитных жидкостей до химиотерапии и инкубированных с аутологичными асцитными жидкостями до и после химиотерапии на протяжении трех дней; iii) иммортализованных клеточных линий SKOV3 и hTERT FT282, инкубированных с индуцированной терапией или контрольными секретами на протяжении трех дней. Для удаления остаточной ДНК полученные образцы РНК обрабатывали Turbo ДНКазой в соответствии с протоколом к набору TURBO DNA-free kit (Thermo Fisher Scientific, #AM2238) в объеме 50 μl , после чего РНК очищали с использованием магнитных частиц Agencourt RNA Clean XP (Beckman Coulter, A66514). Концентрацию и качество тотальной РНК оценивали с использованием набора Quant-it RiboGreen RNA assay (Thermo Fisher Scientific, #R11490) и чипа RNA 6000 Pico (Agilent Technologies), соответственно.

11. Секвенирование РНК

Обогащение фракции полиаденилированной РНК и подготовка библиотеки кДНК для секвенирования были выполнены с помощью модуля NEBNext Poly(A) mRNA Magnetic Isolation и набора NEBNext Ultra II Directional RNA Library Prep Kit (NEB, #E7490S, #E7760S), соответственно, в соответствии с протоколом производителя. Финальную очистку полученных библиотек кДНК проводили с использованием магнитных частиц Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter, #A63882), качество и количество библиотеки проверяли с помощью ДНК-чипа высокой чувствительности (Agilent Technologies) и набора Quant-iT DNA Assay Kit, High Sensitivity (ThermoFisher, #Q33120), соответственно. Полученные библиотеки смешивали в эквимольных количествах (12 пМ) и использовали для массового параллельного секвенирования на платформе Illumina HiSeq-2500 в формате парных концевых прочтений длиной 100 п.о.

12. Анализ данных РНК-секвенирования

Полученные данные были конвертированы в формат FASTQ с использованием программного обеспечения “bcl2fastq” (Illumina). Далее, прочтения подвергались этапу предобработки, включающий тримминг адаптерных последовательностей и контроль качества с использованием пакета "Trim Galore" (v.0.5.0), после чего проводилось картирование прочтений против аннотированного генома *Homo sapiens* GRCh38.13 на уровне транскриптов с использованием программы "Salmon" (v. 1.4) [227]. Агрегация полученных данных на уровне генов была проведена с использованием пакета “tximport” языка программирования "R" [228]. В анализ брались только риды, содержащие суммарно больше одного прочтения на все образцы в пределах одного анализа. Идентификацию дифференциально экспрессированных генов проводили с помощью пакета "DESeq2" для языка программирования R [229]. Анализ обогащения по функциональной принадлежности (Gene Set Enrichment Analysis) производился с использованием ресурса STRING [230].

13. Определение концентрации белка

Для измерения концентрации белка в образцах, содержащих ДДС (додецилсульфат натрия) или мочевины использовали наборы BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific, #23225) или Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad, #5000201), соответственно. Измерения

проводили по протоколу производителя, а в качестве калибровочного стандарта использовался бычий сывороточный альбумин.

14. Масс-спектрометрический (LC-MS/MS) анализ:

13.1 Лизис клеток

Реципиентные клетки SKOV3 или первичные культуры опухолевых клеток инкубировали на протяжении трех дней с секретами или аутологичными асцитными жидкостями, соответственно. Далее клетки были сняты раствором трипсин-ЭДТА (Thermo Fisher Scientific), трижды промыты PBS и лизированы в растворе, содержащем 4% ДДС, 100 мМ TRIS-HCl (pH=8) и ингибиторы протеаз (Sigma-Aldrich, GE80-6501-23), на протяжении 30 минут при температуре 60°C. Затем клеточные лизаты подвергали ультразвуковой дезинтеграции на льду (3 цикла по 10 секунд с амплитудой 30%) и откручивали от клеточного дебриса на скорости 16000g 15 минут при температуре 4°C. Полученный супернатант подвергался трипсинолизу в растворе.

13.2. Обработка секретомов

Лиюфилизаты секретомов ресуспензировали в буфере, содержащем 6М Gd-HCl, 10 мМ TRIS-HCl (pH=8) и 2 мМ дитиотреитола (ДТТ) на протяжении 30 минут на шейкере. Далее образцы центрифугировали на скорости 16000g 10 минут при температуре 4°C. Полученный супернатант наносили на подготовленный (промытый 100 мМ TRIS-HCl (pH=8)) ультрафильтрационный картридж с отсечкой по молекулярной массе в 5 кДа (Corning Spin-X UF6, Sigma-Aldrich, #431482). Для полной замены буфера образцы разбавляли на картриджах в 100 раз буфером, состоящим из 100 мМ TRIS-HCl (pH=8) и концентрировали до минимального объема. Полученный образец подвергался трипсинолизу в растворе.

13.3 Трипсинолиз в растворе

Для восстановления дисульфидных связей к образцам добавляли ДТТ до конечной концентрации 5 мМ и инкубировали 30 минут при комнатной температуре. Затем добавляли иодоацетамид до конечной концентрации 10 мМ и инкубировали в темноте в течение 20 минут при комнатной температуре, после чего останавливали реакцию повторным добавлением ДТТ

до 5 mM. Далее проводилось высаживание белка десятикратным объемом ледяного ацетона при температуре -20°C на протяжении 16 часов. После центрифугирования на скорости 15000g на протяжении 10 минут при температуре 4°C белковый осадок промывали ледяным ацетоном и подвергали повторному центрифугированию. Полученный сухой осадок растворяли в 50 мкл раствора, содержащего 8 M мочевины, 2 M тиомочевины и 10 mM TRIS-HCl (pH=8) на протяжении 20 минут, с последующим измерением концентрации белка. Образцы, содержащие 100 мкг белка разводили раствором бикарбоната аммония (50 mM) в четыре раза, после чего к ним был добавлен 1 мкг трипсина (Promega, #V511A) на 16 часов при температуре 37°C .

13.4. Обессоливание

Реакцию трипсинолиза останавливали добавлением трифторуксусной кислоты до конечной концентрации 0,5%. Для очистки триптических пептидов образец наносили на мембрану SDB-RPS (Styrenedivinylbenzene-reverse phase sulfonate, Sigma-Aldrich, 66886-U) в составе системы Stage-Tips [231], центрифугировали при скорости 300g до полного прохождения образца, промывали буфером, содержащим 0,2% трифторуксусной кислоты и элюировали раствором, содержащим 5% гидроксида аммония и 50% ацетонитрила. Полученные элюаты высушивали под вакуумом и хранили при -80°C до LC-MS/MS анализа.

13.5 Хроматомасс-спектрометрический анализ триптических пептидов

Пептидные фракции после трипсинолиза в водном растворе, содержащем 5% ацетонитрила и 0,1% трифторуксусной кислоты, наносили на колонку длиной 50 см с сорбентом Acclaim PepMap 100 C18 3 μm (Thermo Fisher Scientific). Разделение пептидов проводили на хроматографической системе Ultimate 3000 Nano LC System (Thermo Fisher Scientific), сопряженной с масс-спектрометром Q Exactive HF (Thermo Fisher Scientific) посредством наноэлектроспрейного источника (Thermo Fisher Scientific). Пептиды загружали в колонку, термостатируемую при температуре 40°C , в буфере А (0,2% муравьиной кислоты) и затем элюировали с линейным градиентом 4-55% буфера В (0,1% муравьиной кислоты, 80% ацетонитрила) в буфере А в течение 120 минут при скорости потока 350 нл/мин. Масс-спектрометрические данные сохраняли при автоматическом переключении между MS1 сканированием и вплоть до 15 MS/MS-сканирований (метод topN). Целевое значение для MS1-сканирования было выставлено 3×10^6 в диапазоне 300–1200 m/z с максимальным временем инжектирования ионов 60 мс и разрешением 60000. Изолирование ионов-прекурсоров

осуществляли при ширине окна 1,4 m/z и фиксированной первой массе 100 m/z. Ионы-прекурсоры фрагментировали методом высокоэнергетической диссоциации в ловушке C-trap с нормализованной энергией столкновения 28 эВ. MS/MS-сканы сохраняли с разрешением 15000 при m/z 400 и при значении 1×10^5 для целевых ионов в диапазоне 200-2000 m/z с максимальным временем инжектирования ионов 30 мсек.

13.6 Анализ хроматомасс-спектрометрических данных

Для анализа LC-MS/MS данных исходные файлы преобразовали в масс-листы, расширения .mgf, с помощью MSConvert от ProteoWizard Software Foundation. Использовали следующие параметры: "--mgf --filter peakPicking true [1,2]". Для идентификации белков в полученных масс-листах провели поиск с помощью поисковых программ MASCOT (версия 2.5.1) и X! Tandem (ALANINE, 2017.02.01). Поиск проводили против базы данных UniProt Knowledgebase, таксон Homo sapiens. Проверку статистической достоверности идентификаций осуществляли на основании поиска по реверсированной базе данных белковых последовательностей (decoy reversed database). Допустимые отклонения от массы иона предшественника и фрагмента были 20 ppm и 0,04 Да, соответственно. Параметры поиска по базе данных были следующие: триптический гидролиз с допущением одного пропущенного сайта специфического трипсинолиза; фиксированная модификация – карбамидометилирование всех цистеинов; и переменная модификация – окисление метионина. Затем полученные файлы загрузили в программное обеспечение Scaffold 4 (версия 4.0.7) для проверки и мета-анализа. В качестве достоверно идентифицированных пептидов и белков рассматривали компоненты, попадающие по уровню достоверности в массив идентификаций с Local FDR 5%, относительно реверсированной базы данных белковых последовательностей.

15. Ферментативное расщепление белка протеиназой K

Фракция внеклеточных везикул была получена способом, описанным в пункте 5 Главы Материалы и Методы. Далее каждый из секретомов делился на 4 равные по объему образца: к первому добавляли 5 нг протеиназы K (Invitrogen, 25530049), ко второму добавляли 10 нг протеиназы K, к третьему – 4% ДДС и 5 нг протеиназы K, последний оставался необработанным. Сначала один из образцов обрабатывали 4% ДДС при температуре 90°C на протяжении 5 минут для полного разрушения мембран везикул, после чего образец инкубировали с 5 нг протеиназы K. Второй и третий образцы инкубировали только с

протеиназой К (5 или 10 нг). Четвертый образец оставался интактным. Все инкубации с протеиназой К проводили при температуре 37°C 20 минут с последующей инактивацией PMSF (Roche, 10837091001) до итоговой концентрации 5 мМ и незамедлительным использованием образцов для вестерн-блоттинга.

16. Вестерн-блоттинг

а) Секретомы

Секретомы после обработки протеиназой К инкубировали в буфере Лэммли 5 минут при температуре 95°C. Далее проводили электрофорез в полиакриламидном геле (12%) с последующим переносом белков на мембрану из поливинилиденфторида (Millipore, IPVH20200) и использованием системы Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad). Полученные мембраны блокировали на протяжении 1 часа 5% нежирным сухим молоком (Blotting Grade Blocker Nonfat Dry Milk, Bio-Rad, #1706404), после чего инкубировали с первичными антителами против белков DHX9 (Abcam, ab183731), SYNCRIP (HNRNPQ/R Cell Signaling Technology, #8588), SRSF2 (Abcam, ab204916) или SRSF3 (Abcam, ab198291) в буфере, содержащем 5% сухое молоко и азид натрия. На следующий день мембраны промывали три раза раствором PBST (0,1% Tween в PBS) и помещали в соответствующие вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Invitrogen, G-21040, G-21234), на 1 час. Отмытые PBST мембраны анализировали при помощи ChemiDoc MP Gel Imaging System (Bio-Rad, США).

б) Клеточные лизаты

Клеточные лизаты были центрифугированы при скорости 16000 g на протяжении 15 минут при температуре 4°C. На полиакриламидный гель (12%) наносилось одинаковое количество тотального белка (15 мкг), с последующим переносом белков на мембрану из поливинилиденфторида (Millipore, IPVH20200) и использованием системы Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad). Полученные мембраны блокировали на протяжении 1 часа 5% нежирным сухим молоком (Blotting Grade Blocker Nonfat Dry Milk, Bio-Rad, #1706404), после чего инкубировали с первичными антителами против белков CD63 (Abcam, ab134045), p53 (Cell Signaling Technology, #2524), LIG1 (Abcam, ab177946), TDP1 (Cell Signaling, #59710), FOXM1 (Cell Signaling Technology, #5436) или RAD51 (Abcam, ab213) в буфере, содержащем 5% сухое молоко и азид натрия. В качестве контроля нанесения материала были использованы антитела

против белков GAPDH (HyTest, 5G4/5G4cc), β -Tubulin (Cloud-Clone Corp., PAB870Hu0) или LMNB1 (Cloud-Clone Corp., PAF548Hu01). На следующий день мембраны промывали три раза раствором PBST (0,1% Tween в PBS) и помещали во вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Invitrogen) на 1 час. Отмытые PBST мембраны анализировали при помощи ChemiDoc MP Gel Imaging System (Bio-Rad, США).

17. Анализ треков наночастиц

Для выделения внеклеточных везикул 1 мл асцитной жидкости последовательно центрифугировали на скорости 500g 15 минут, и на скорости 10000g 30 минут при температуре 4°C. Полученный супернатант разбавили в 2 раза раствором PBS и нанесли на ультрафильтрационный картридж с отсечкой по молекулярной массе в 1000 кДа (Sartorius, #VS0161), промыли дважды PBS и сконцентрировали до минимального объема. Последующая очистка заключалась в нанесении образца на градиент сахарозы (48%, 40% и 20% м/об). Сначала 62% сахарозу очищали на ультрафильтрационных картриджах с отсечкой по молекулярной массе в 100 кДа (Amicon, Merck, UFC910024) для избавления от везикулоподобных структур. Образец разводили в очищенной 62% сахарозе до достижения сахарозой 48% в 600 мкл и наносили на дно пробирки, после чего последовательно наслаивали сахарозу 40% (500 мкл) и 20% (4 мл). Затем образец центрифугировали на скорости 205000g на протяжении 3 часов при температуре 4°C на роторе MLS-50 (Beckman, США). Внеклеточные везикулы, находящиеся на границе разделения фаз 48% и 40% сахарозы были собраны, дважды промыты PBS и сконцентрированы на ультрафильтрационных картриджах с отсечкой по молекулярной массе в 100 кДа (Amicon, Merck).

Для оценки распределения размера частиц был использован прибор Nanosight LM10 HS-BF (Nanosight Ltd, UK) со следующими параметрами: лазерная установка LM12 с длиной волны 405 нм, мощностью 65 МВт без контроля температуры; высокочувствительная камера типа EMCCD. Измерения проводили в соответствии со стандартом ASTM E2834-12 (ISO 19430:2016) с использованием камер и систем обработки видео, оптимизированных для внеклеточных везикул. Конфигурации для прибора были выбраны как описано ранее [233] за исключением более высокого предела и порога детекции (10920 и 8 вместо 11180 и 9, соответственно) для более эффективного обнаружения мелких частиц. Измерения проводили в нескольких повторах (n=12-14), которые затем объединяли для получения в общей сложности не менее 5000 треков.

18. Флуоресцентная микроскопия

Клетки инкубировали с АпоС или контрольными секретами в слайд-флаконах (SPL, США) на протяжении 3 дней, после чего к клеткам добавлялось 25 μ M цисплатина Teva Pharmaceutical Industries Ltd, N011590/02) на 3, 6, 9 или 24 часа. Клетки фиксировали в ночь 70% ледяным этанолом (для окрашивания сшивок цисплатин-ДНК) или 4% параформальдегидом на протяжении 15 минут (для всех других случаев) с последующей пермеабиллизацией раствором 0,1% Triton X-100 на протяжении 15 минут. Далее клетки инкубировали в ночь с первичными антителами против γ H2AX (Sigma-Aldrich, 05-636), RPA32/RPA2 (phospho S33) (Abcam, ab211877) или сшивок цисплатин-ДНК (Abcam, ab103261) в блокирующем буфере (1% бычьего сывороточного альбумина). На следующий день клетки инкубировали со вторичными антителами Alexa Fluor 555 (Thermo Fisher Scientific, A-21428) или Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, A-11008) на протяжении 2 часов, после чего ядра окрашивали раствором DAPI (100 ng/ml) еще 15 минут. Предметные стекла покрывались средой для заливки препаратов Fluoroshield (Sigma-Aldrich, F6937) и накрыты покровным стеклом. Съемку осуществляли на микроскопе Nikon Eclipse Ni-E в каналах DAPI, FITC и TRITC.

19. Проточная цитометрия магнитных частиц

Клетки SKOV3 трансфицировали pTagGFP2-SNU13 или pTagGFP2-SYNCRIP во флаконах для культивирования клеток площадью 25 см². Через 2 дня клетки обрабатывали 40 μ M цисплатина в течение 7 ч, затем трижды промывали PBS и инкубировали еще 41 ч в свежей среде DMEM, не содержащей FBS и фенолового красного. Полученные кондиционные среды центрифугировали на скорости 500 g в течение 10 мин для удаления клеточного дебриса. Внеклеточные везикулы собирали ультрафильтрацией через картридж с отсечкой, соответствующей молекулярной массе белка 100 кДа (Amicon, Merck) и промывали PBS два раза.

Внеклеточные везикулы были иммунопреципитированы при помощи набора для выделения CD9-положительных внеклеточных везикул человека (ThermoFisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Магнитные частицы, конъюгированные с антителами к CD9, инкубировали с полученными внеклеточными везикулами 16 часов при температуре 4°C. После инкубации магнитные частицы, покрытые внеклеточными везикулами, промывали буфером 0,05% Tween 20 в PBS. Красную (RFP, канал PE) и зеленую (GFP, канал FITC) флуоресценцию магнитных частиц детектировали при помощи проточного цитометра BD

LSRFortessa™ Cell Analyzer (BD, США). Данные были проанализированы с помощью программного обеспечения Kaluza (Beckman Coulter, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Асцитная жидкость, образуемая в процессе метастазирования рака яичника, содержит низко- и высокомолекулярные соединения, играющие большую роль в прогрессировании заболевания. Так, в работе Шендер Виктории было показано, что асцитные жидкости пациентов с аденокарциномой яичника характеризуются повышенной представленностью многих метаболитов и белковых молекул по сравнению с асцитными жидкостями, полученными от пациентов с циррозом печени. Более того, оказалось, что химиотерапия вносит дополнительный вклад в это разнообразие — асцитные жидкости после химиотерапии были обогащены компонентами сплайсосомы (как белками, так и малыми ядерными РНК). Также было показано, что асцитные жидкости от пациентов после химиотерапии приводят к формированию у реципиентных опухолевых клеток устойчивости к химиотерапии [232]. Подобный вклад сигналов от погибающих клеток был описан и другими группами исследователей [9–14], однако механизм приобретения химиорезистентности опухолевыми клетками до сих пор до конца не ясен.

Обнаружение компонентов сплайсосомы во внеклеточном пространстве было неожиданным, так как сплайсосома относится к ядерному компартменту [233]. Однако в последнее время стало известно, что функции сплайсосомы не ограничиваются сплайсингом пре-мРНК — сплайсинговые белки участвуют в регуляции транскрипции и трансляции, репарации ДНК и формировании стрессовых гранул [234].

На данный момент опубликован ряд работ, в которых изучался состав секретомов опухолевых клеток [2–8]. Чаще всего в качестве исследуемых объектов использовали клеточные линии различных типов рака в нормальных условиях без воздействия стрессового фактора. Тем не менее, для изучения процессов приобретения химиорезистентности в ответ на химиотерапию, таких результатов недостаточно. Данная работа посвящена изучению изменения профиля секреции опухолевыми клетками в ответ на химиотерапию и механизмов действия секретомов от апоптозирующих клеток (АпоС), приводящих к возникновению химиорезистентности у хемонаивных реципиентных опухолевых клеток.

1. Опухолевые клетки, полученные из асцитных жидкостей от пациентов после химиотерапии, обладают повышенной устойчивостью к химиотерапии

Асцитные жидкости пациентов с аденокарциномой яичника содержат большое количество опухолевых клеток, мигрировавших из первичной опухоли. Таким образом,

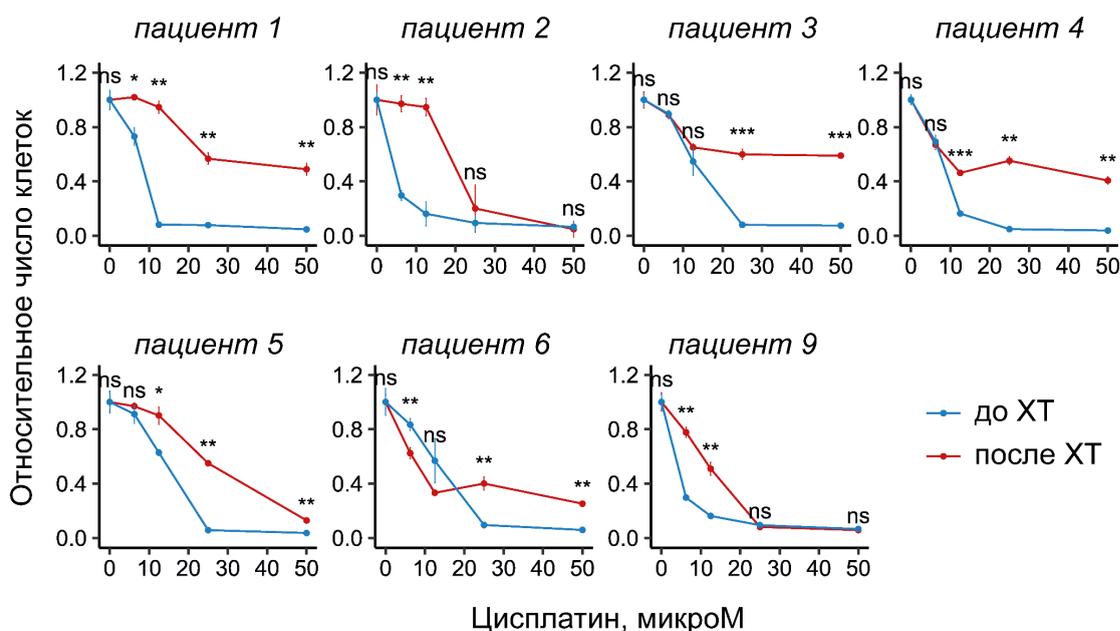
исследование первичных культур опухолевых клеток, полученных из асцитных жидкостей, позволяет наблюдать за изменениями, происходящими в опухоли [235].

Для данного исследования была собрана коллекция парных асцитных жидкостей до и после химиотерапии от 16 пациентов (Таблицы 2,3). Пробоподготовка представляла собой центрифугирование асцитных жидкостей и последующее отделение клеточной компоненты от супернатанта (асцита). Затем были получены первичные культуры опухолевых клеток, выделенных из асцитных жидкостей, и определена их чувствительность к цисплатину.

Таблица 3. Перечень проведенных экспериментов с образцами, полученными от пациентов с аденокарциномой яичника. RNAseq – секвенирование РНК, NTA – метод анализа треков наночастиц (Nanoparticle tracking analysis).

Пациент	Клетки из асцитной жидкости		Инкубация первичных культур опухолевых клеток с асцитными жидкостями			NTA
	MTT-тест	RNAseq	MTT-тест	RNAseq	Протеомный анализ	
1	+		+			
2	+	+				
3	+	+	+	+		
4	+	+				
5	+	+				
6	+	+	+	+		
7		+				
8		+				
9	+					
10			+		+	
11			+	+	+	
12			+		+	
13			+		+	+
14						+
15						+
16						+

Оказалось, что клетки, полученные от пациентов после химиотерапии, обладали сниженной чувствительностью к цисплатину по сравнению с клетками от тех же пациентов до химиотерапии (Рисунок 7). Таким образом, мы показали, что химиотерапия приводит к формированию более химиорезистентной популяции опухолевых клеток.



Рисунок

7. Кривая выживаемости (MTT-тест) в ответ на различные концентрации цисплатина для первичных культур опухолевых клеток, полученных из асцитных жидкостей пациентов до и после химиотерапии (ХТ). MTT-тест проводился через 48 часов после добавления цисплатина. Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “*” — $p\text{-value} < 0,05$; “**” — $p\text{-value} < 0,005$, “***” — $p\text{-value} < 0,00005$, “ns” — $p\text{-value} > 0,05$. Каждое измерение проведено в трех биологических повторах.

Чтобы исследовать, за счет активации каких сигнальных каскадов обеспечивается обнаруженная химиорезистентность, нами был проведен транскриптомный анализ клеток из асцитных жидкостей от одних и тех же пациентов до и после химиотерапии (ХТ). Анализ полученных данных методом главных компонент показал, что образцы группируются в большей степени в зависимости от статуса лечения, а не по принципу принадлежности к одному и тому же пациенту (Рисунок 8), что говорит о значимости вклада химиотерапии в транскриптомные профили клеток.

Всего нами было обнаружено 1504 дифференциально экспрессирующихся гена ($|\text{Log}_2\text{FoldChange}| \geq 1$, $p\text{-value} < 0,05$), из них 686 продемонстрировали повышенную экспрессию в клетках, полученных из асцитных жидкостей после ХТ, относительно клеток до ХТ. Далее нами был проведен функциональный анализ этих генов (Рисунок 9).

Было показано, что после нескольких курсов химиотерапии в опухолевых клетках активируются пути, отвечающие за процессы регуляции клеточного цикла, синтеза белка и ответа на повреждение ДНК. Многие из генов, повысивших свою экспрессию, ассоциированы с

формированием более агрессивного опухолевого фенотипа или развитием устойчивости к терапии (Таблица 4).

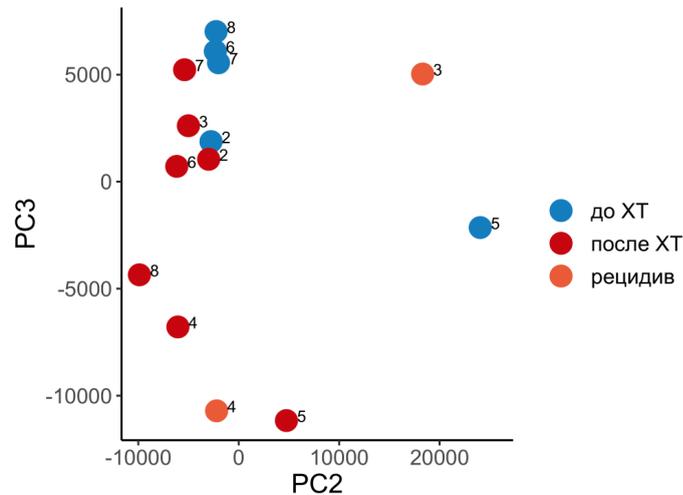


Рисунок 8. Анализ транскриптомных данных методом главных компонент для первичных культур клеток, полученных из асцитных жидкостей пациентов до и после химиотерапии (ХТ) или при возникновении рецидива. Нумерация образцов соответствует нумерации пациентов из Таблиц 1 и 2.

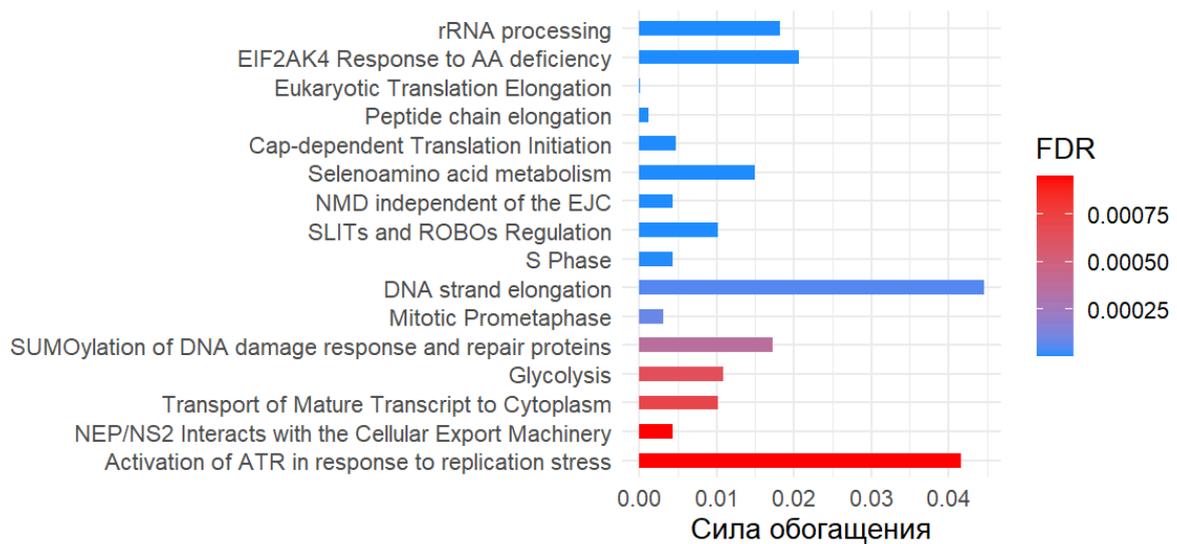


Рисунок 9. Анализ обогащения по функциональной принадлежности (Gene set enrichment analysis, GSEA), повышающих экспрессию в клетках из асцитов пациентов после ХТ относительно клеток из асцитов до ХТ. Формула для ранжирования списка генов: $\text{Log}_2\text{FoldChange} * \log_{10}(p\text{-value})$. Результаты обогащения были получены с использованием базы данных Reactome.

Таблица 4. Наиболее интересные гены, повысившие свою экспрессию в клетках, полученных из асцитной жидкости после химиотерапии относительно клеток из асцитной жидкости до химиотерапии. *Log2FoldChange* – степень изменения экспрессии гена в клетках из асцита после ХТ относительно клеток до ХТ.

Ген	Log2Fold Change	p-value	Эффекты	Тип опухоли
<i>CXCL8</i> (IL-8)	2,54	1,48E-05	Участвует в процессах метастазирования, ангиогенеза, подавления иммунного ответа, межклеточной коммуникации и формирования устойчивости к противоопухолевой терапии	Многие типы [236]
<i>CYP1B1</i>	1,14	2,75E-04	Связывают с формированием устойчивости к паклитакселу [237,238], к цисплатину [239] и к доцетакселу [240]	Рак яичника [237,240], рак простаты [238], рак желудка [239]
<i>EGRI</i>	5,05	3,48E-06	Способствует ЭМП, снижая уровень E-кадгерина	Рак яичника [241]
<i>EREG</i>	6,12	5,33E-10	Приводит к формированию устойчивости к противоопухолевой терапии, усиленному клеточному делению, метастазированию и ЭМП	Многие типы [242]
<i>GDF15</i>	1,56	9,17E-04	Высокий уровень ассоциирован с резистентностью к цисплатину [243,244], паклитакселу [245] и ингибиторам PD-1 [246]	Рак яичника[243], рак желудка [244], рак молочной железы [245], меланома [246]
<i>GLII</i>	2,28	2,46E-02	Способствует ЭМП и репарации ДНК	Многие типы[247]
<i>HMGA2</i>	2,97	4,37E-05	Способствует стабилизации генома и формированию резистентности к ДНК-повреждающим агентам [248,249]	Колоректальный рак [248], рак легких, фибросаркома и рабдомиосаркома [249]

Ген	Log2Fold Change	p-value	Эффекты	Тип опухоли
<i>KIT</i> (CD117)	5,29	5,23E-05	Маркер стволовых клеток аденокарциномы яичника. Участвует в процессах пролиферации, метаболизма, клеточного роста, миграции, дифференцировки и апоптоза опухолевых клеток	Рак яичника [250]
<i>NLRP3</i>	1,98	2,44E-05	Способствует метастазированию, пролиферации, ангиогенезу и устойчивости к противоопухолевой терапии, ингибирует апоптоз и иммунный ответ	Многие типы [251]
<i>PAX6</i>	5,90	9,98E-05	Способствует метастазированию[252], возникновению устойчивости к цисплатину [252] и палбоциклибу [253]	Немелкоклеточный рак легких [252] и рак желудка [253]
<i>PLAU</i>	3,40	8,96E-09	Способствует пролиферации, ЭМП, метастазированию[254–257], а также устойчивости к цисплатину [258]	Плоскоклеточный рак головы и шеи [254], аденокарцинома протоков поджелудочной железы [255], рак шейки матки [256], рак молочной железы [257], немелкоклеточный рак легких [258]
<i>SOX11</i>	3,90	3,79E-04	Участвует в регуляции экспрессии генов <i>CXCR4</i> и <i>FAK</i> , а также активации пути <i>FAK/PI3K/AKT</i> , что приводит к формированию более агрессивного опухолевого фенотипа и формированию химиорезистентности	Мантийноклеточная лимфома [259]
<i>WNT5B</i>	4,58	5,93E-08	Способствует миграции и пролиферации	Колоректальный рак [260]
<i>WNT6</i>	3,97	1,85E-05	Способствует миграции и пролиферации, регулирует клеточный цикл и ингибирует апоптоз	Рак толстой кишки [261]

Полученные результаты описывают изменения, произошедшие в популяции опухолевых клеток после нескольких курсов химиотерапии, то есть через несколько месяцев после начала лечения. Таким образом, при интерпретации данных стоит учитывать, что в таком случае оценивается не только влияние прямого стрессового воздействия, вызывающего изменения в межклеточной коммуникации опухолевых клеток, но и влияние клональной селекции.

2. Инкубация реципиентных первичных культур опухолевых клеток с асцитными жидкостями после ХТ имитируют условия межклеточной коммуникации в ходе ХТ *in vivo*

Для изучения процесса приобретения химиорезистентности в более контролируемых условиях было решено использовать опухолевые клетки от пациентов до химиотерапии и инкубировать их с асцитными жидкостями от тех же пациентов до и после химиотерапии на протяжении трех дней. Такая постановка эксперимента имитирует процесс межклеточной коммуникации опухолевых клеток в ответ на химиотерапию на более коротком временном промежутке.

В первую очередь мы подтвердили, что инкубация первичных культур опухолевых клеток с асцитными жидкостями от пациенток после химиотерапии действительно способствует снижению чувствительности к цисплатину (Рисунок 10).

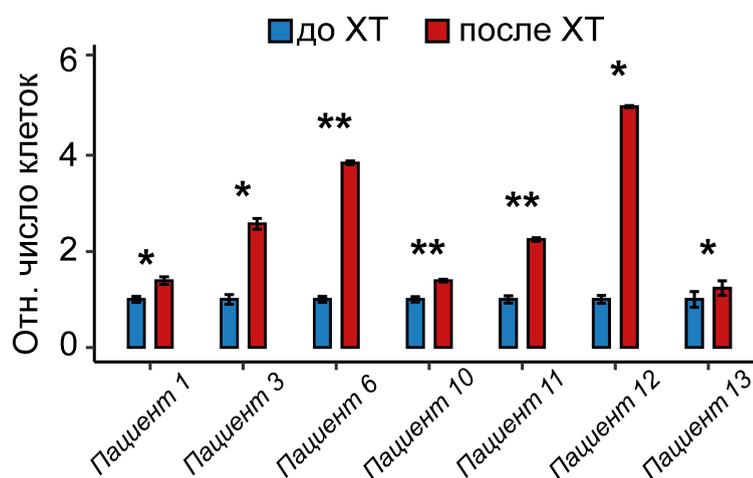


Рисунок 10. Результаты цитотоксического теста (MTT-теста) первичных культур опухолевых клеток из асцитных жидкостей до ХТ после инкубации с аутологичными асцитными жидкостями (до и после ХТ) в течение 72 часов и последующей инкубации с 10 μM цисплатина в течение 48 часов. Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “*” — $p\text{-value} < 0,05$; “**” — $p\text{-value} < 0,005$. Каждое измерение проведено в трех биологических повторях.

Далее нами был проведен транскриптомный анализ первичных культур опухолевых клеток из асцитных жидкостей трех пациентов до ХТ, инкубированных с аутологичными асцитными жидкостями до и после ХТ. Из обнаруженных нами 365 дифференциально экспрессирующихся генов ($|\text{Log2FoldChange}| \geq 1$, $p\text{-value} < 0,05$), 134 гена повышали свою экспрессию.

Функциональная аннотация полученных результатов была проведена с помощью анализа обогащения по функциональной принадлежности (Gene set enrichment analysis, GSEA). Транскриптомный анализ реципиентных клеток показал, что асцитные жидкости после химиотерапии повышают экспрессию генов, отвечающих за изменение клеточного цикла, регуляцию трансляции, сплайсинг пре-мРНК, метаболизм, а также репарацию ДНК (Рисунок 11).

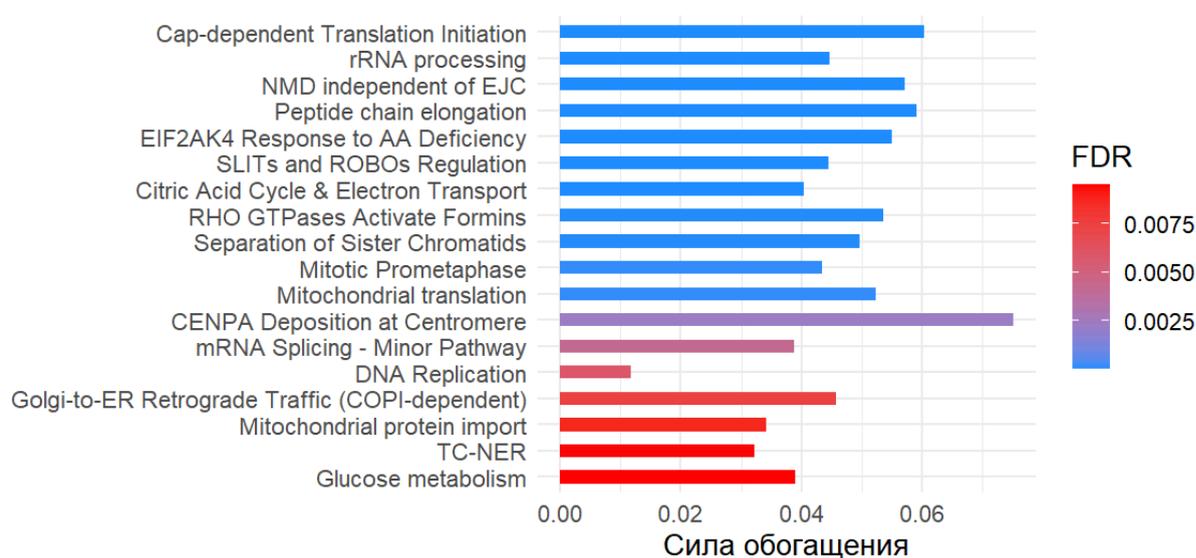


Рисунок 11. Анализ обогащения по функциональной принадлежности (Gene set enrichment analysis, GSEA) для первичных культур клеток, инкубированных с асцитными жидкостями до и после ХТ. На диаграмме представлены пути, характеризующие гены с повышенной экспрессией в опухолевых клетках, инкубированных с асцитами после лечения относительно асцитных жидкостей до ХТ. Формула для ранжирования списка генов: $\text{Log2FoldChange} * \log_{10}(p\text{-value})$. Результаты обогащения были получены с использованием базы данных Reactome.

Чтобы узнать, как изменения экспрессии генов отображаются на уровне белков, нами был проведен протеомный анализ первичных культур опухолевых клеток из асцитных жидкостей четырех пациентов до ХТ, инкубированных с аутологичными асцитными жидкостями до и после ХТ. Всего было обнаружено 7129 белков. Из них (в среднем, по всем пациентам) 833 повышали и 471 понижали свою представленность в реципиентных клетках минимум в два раза. Анализ полученных списков белков с использованием базы данных Gene

Ontology Biological Process показал, что асцитные жидкости после ХТ приводят к активации путей регулирующих репарацию ДНК и клеточный цикл (Рисунок 12).

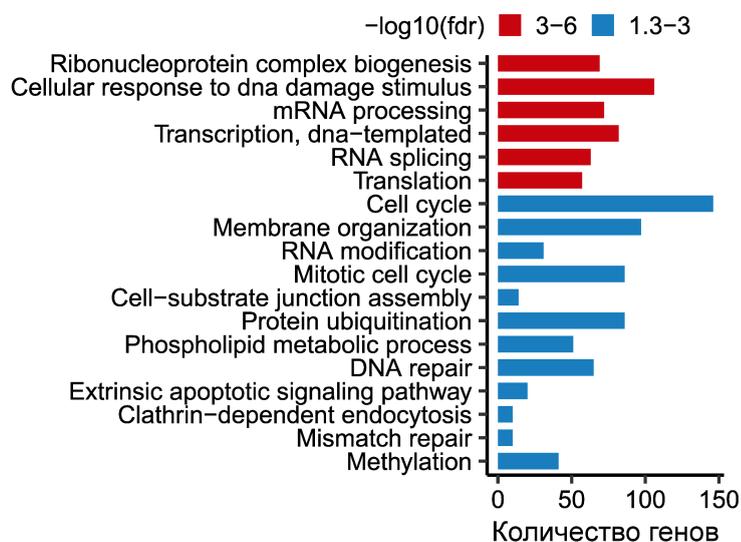


Рисунок 12. Функциональная аннотация белков, повышающих свою представленность в первичных культурах клеток, инкубированных с асцитными жидкостями после ХТ относительно клеток, проинкубированных с асцитными жидкостями до ХТ ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 1$). Результаты обогащения были получены с использованием базы данных Gene Ontology Biological Process.

Из результатов протеомного и транскриптомного анализа видно, что под действием сигнальных молекул от погибающих клеток (асцитных жидкостей после химиотерапии) в реципиентных опухолевых клетках происходит активация путей, отвечающих за сплайсинг пре-мРНК, ответ на повреждение ДНК и регуляцию клеточного цикла. Таким образом можно сделать вывод, что асцитные жидкости после ХТ приводят к масштабным перестройкам внутри реципиентной клетки, подготавливающим её к последующему стрессовому воздействию.

3. Подбор условий для генерации секретомов от погибающих клеток в системе *in vitro*

Асцитная жидкость содержит молекулы, секретируемые не только опухолевыми клетками, но и клетками опухолевого окружения. Дополнительными факторами, теоретически вносящими вклад в биологические эффекты асцитных жидкостей, являются объем асцитов, время накопления и количество курсов ХТ – параметры, варьирующиеся от пациента к пациенту. Таким образом, для определения вклада секреции погибающими опухолевыми клетками в приобретение химиорезистентности, необходимо исключить вклад неопухолевых клеток и стандартизовать физические параметры генерации секретомов (объем секрета,

время сбора и доза химиопрепарата). Для выполнения данной задачи нами был создан протокол генерации секретомы погибающими опухолевыми клетками в условиях *in vitro*.

Во время терапии значительная часть опухолевых клеток погибает, секретируя многочисленные сигнальные молекулы. В свою очередь, выжившая популяция опухолевых клеток находится в плотном контакте с высвободившимися секретируемыми факторами. Таким образом, чтобы воспроизвести этот сценарий в лабораторных условиях, секретомы должны быть получены от большого числа погибающих донорных клеток и добавлены к значительно меньшему количеству реципиентных клеток.

Для генерации секретомов мы использовали клеточную линию аденокарциномы яичника SKOV3. Опухолевые клетки обрабатывались или не обрабатывались химиопрепаратом цисплатином на протяжении 7 часов. После чего среда, содержащая цисплатин, отбиралась, клетки промывались фосфатно-солевым буфером (PBS) три раза и помещались в среду для сбора секретомы без содержания сыворотки еще на 41 час (Рисунок 13). Концентрация цисплатина для генерации секретомы была подобрана таким образом, что в момент сбора секретомы погибала половина донорных клеток (Рисунок 14).

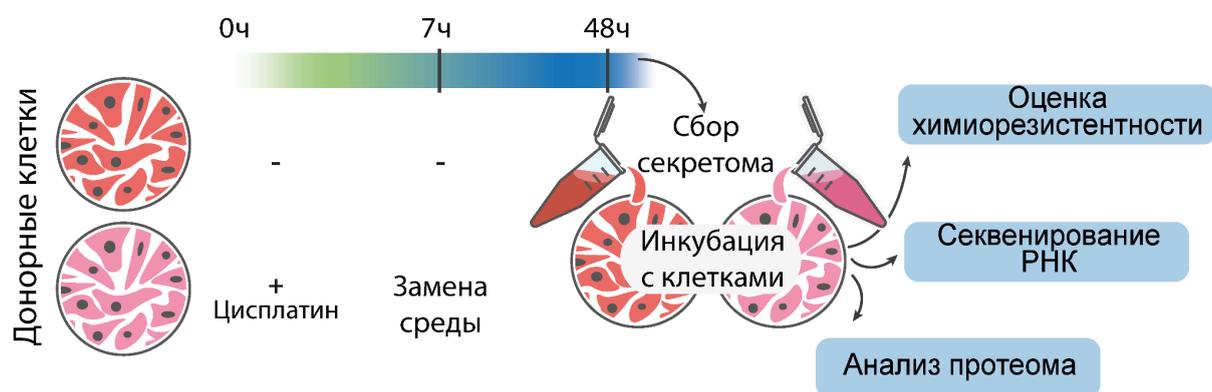


Рисунок 13. Схема генерации секретомов от клеток, погибающих под действием цисплатина, и контрольных клеток SKOV3.

Секретомы собирали в бессывороточную среду, так как сыворотка содержит большое число собственных экзосом и высокомолекулярных соединений, которые могут адсорбировать на себя сигнальные молекулы и мешать последующей пробоподготовке [262]. Для уменьшения эффекта голодания на донорные клетки в качестве бессывороточной среды была использована среда DMEM/F12 Advanced (Gibco). Она содержит компоненты, поддерживающие клеточный метаболизм в условиях отсутствия сыворотки и позволяет избежать индукции стрессовых путей. Дополнительно мы подтвердили, что в момент сбора секретомы контрольные клетки не погибали апоптозом, то есть отсутствие сыворотки не вызывало клеточную гибель (Рисунок 15).

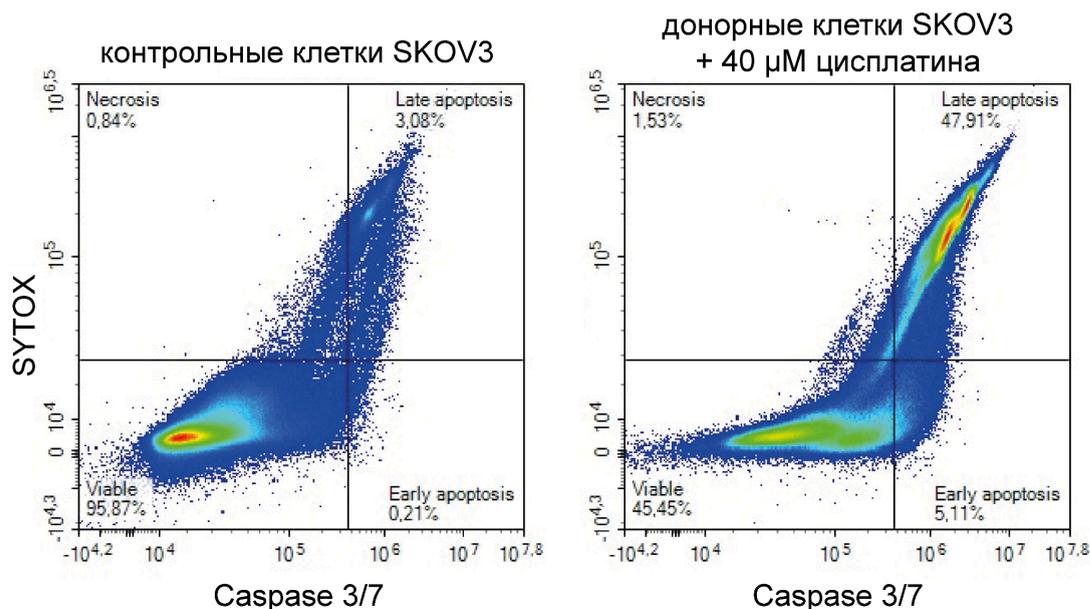


Рисунок 14. Результат теста на апоптоз (CellEvent Caspase-3/7 Green) донорных клеток SKOV3. Клетки проинкубировали с 40 μM цисплатина на протяжении 7 часов, после чего клетки промывали 3 раза PBS и заменяли среду на бессывороточную, не содержащую цисплатин, затем клетки инкубировали еще 41 час.

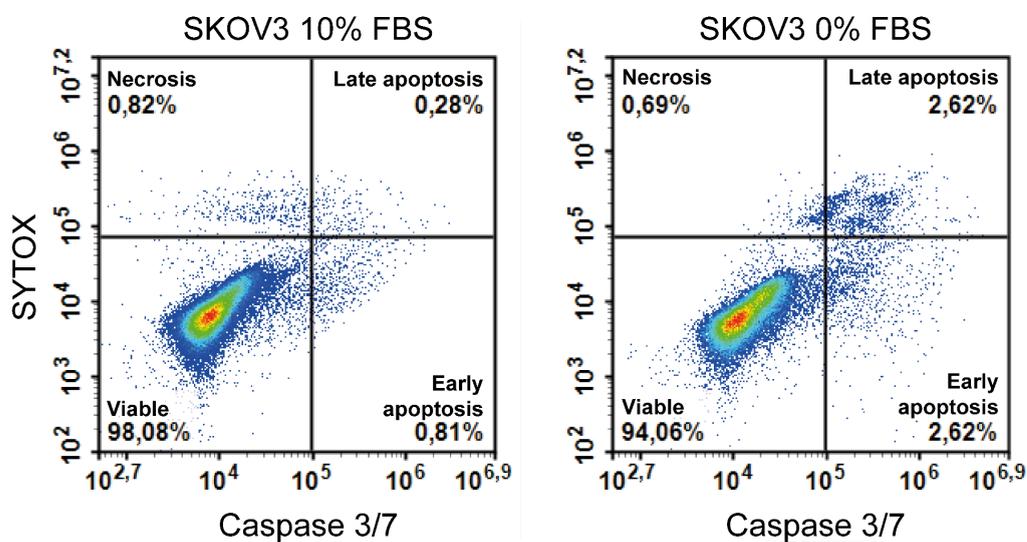


Рисунок 15. Результат теста на апоптоз (CellEvent Caspase-3/7 Green) клеток SKOV3. Клетки культивировали на бессывороточной среде DMEM/F12 Advanced 48 часов.

Также мы обнаружили, что секреты от погибающих клеток в условиях *in vitro* содержали значительно меньшее количество внеклеточных везикул, чем асцитные жидкости, что объясняется меньшими сроками генерации секрета и вероятно меньшим количеством клеток. Вместе с тем, мы обратили внимание на то, что относительная эффективность асцитных

жидкостей на приобретение химиорезистентности не зависела от концентрации везикул как таковых. Например, Пациенты 1 и 13 обладали минимальной и максимальной концентрацией везикул в асцитных жидкостях после химиотерапии из имеющейся выборки. Однако степень цитопротективного эффекта данных секретомов была схожа (Рисунки 7, 10, 16). Таким образом, можно предположить, что для биологического эффекта везикул важно не только их количество, но и их содержание.

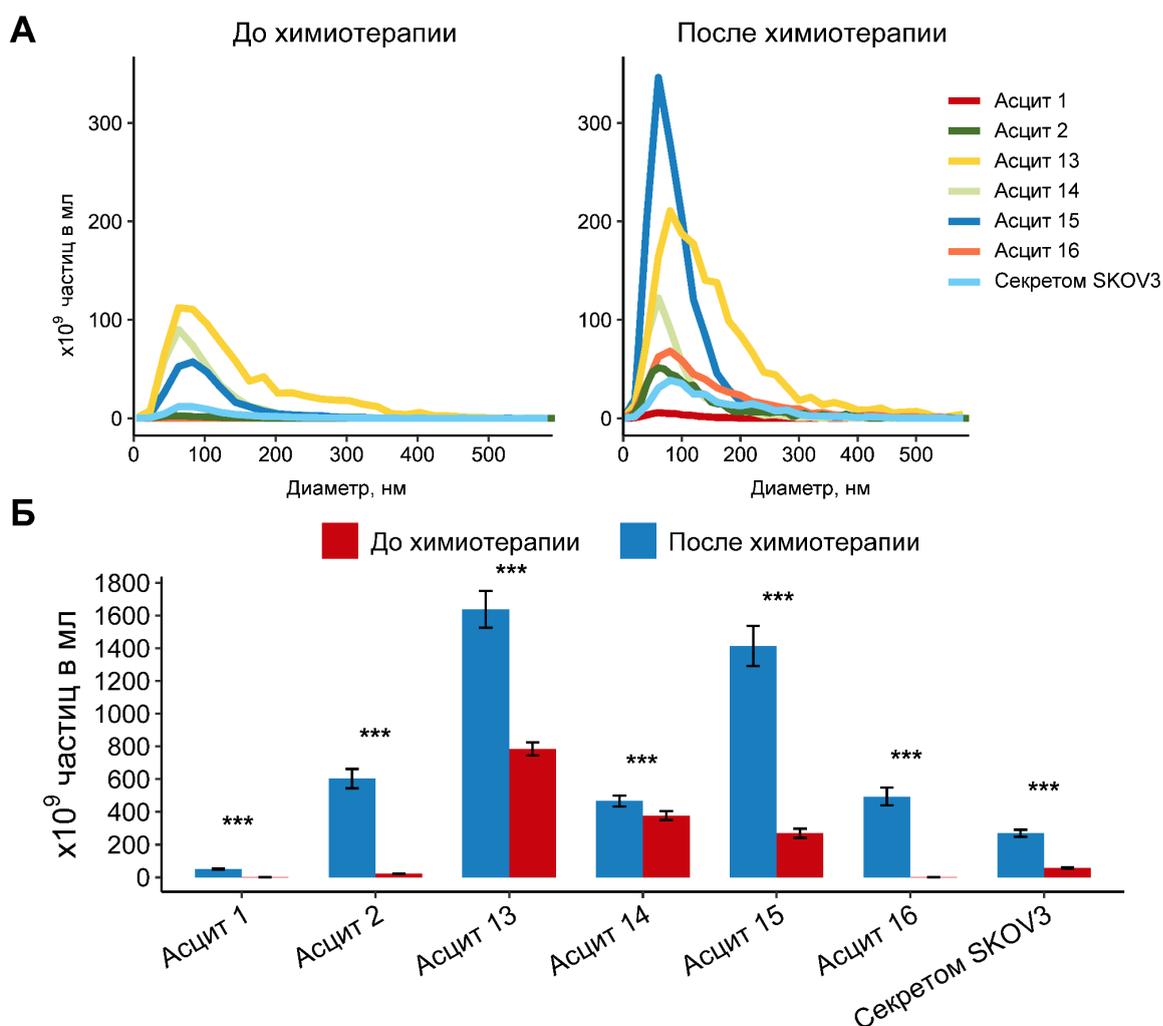


Рисунок 16. Распределение размеров внеклеточных везикул (А) и их концентрация (Б) в образцах парных асцитных жидкостей (до и после ХТ) или секретомов клеточной линии SKOV3. Результаты получены при помощи NTA-анализа. Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “***” — p -value < 0,00005.

Для составления протокола генерации секретомов, в первую очередь необходимо выбрать степень их концентрирования для инкубации с реципиентными клетками. Мы провели серию экспериментов, где реципиентные клетки инкубировали с разными концентрациями секретомов как от погибающих, так и контрольных клеток (Рисунок 17). Основной целью

такого эксперимента является подбор оптимальной концентрации АпоС. Однако также можно определить, является ли эффект дозозависимым и можно ли достичь цитопротективного эффекта от контрольных секретомов, сконцентрировав их до уровня АпоС.

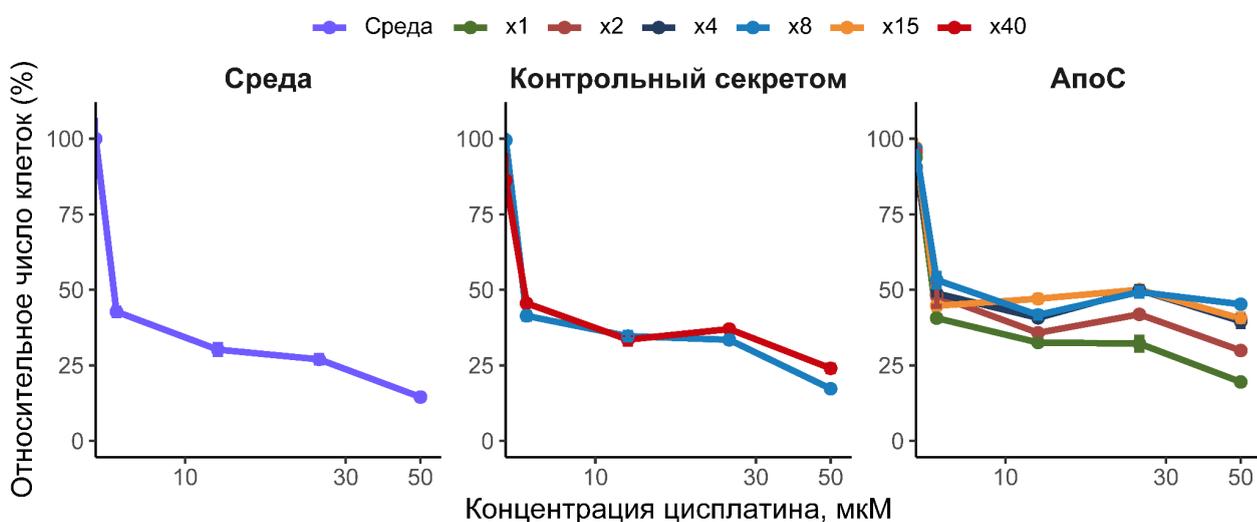


Рисунок 17. Результаты теста на цитотоксичность (МТТ-тест) реципиентных клеток, инкубированных с культуральной средой или секретомами от погибающих (АпоС) или контрольных клеток разной степени концентрирования (x1, x2, x4, x8, x15, x40) на протяжении 72 часов и затем с цисплатином на протяжении последующих 48 часов. Каждое измерение проведено в трех биологических повторах.

Так как концентрация везикул в секретоматах от погибающих клеток значительно выше, чем в контрольных секретоматах, было решено довести контрольные секретоматы до максимального концентрирования в 40 раз и концентрирования в 8 раз, в то время как секретоматы от погибающих клеток концентрировались в 1, 2, 4, 8 и 15 раз для определения оптимальной концентрации. Полученные секретоматы были добавлены к реципиентным опухолевым клеткам SKOV3 на три дня. Далее к клеткам добавляли раститровку цисплатина на 48 часов, после чего оценивали уровень гибели клеток при помощи МТТ-теста. Тест на цитотоксичность показал, что устойчивость к цисплатину формируется только при воздействии секретоматов от погибающих клеток, сконцентрированных в 2, 4, 8 и 15 раз. Наиболее стабильным эффектом обладали секретоматы, сконцентрированные в 8 раз.

Секретоматы от погибающих и контрольных клеток характеризуются разным количеством везикул. Мы предположили, что эффект секретоматов от погибающих клеток SKOV3 может быть обусловлен высокими концентрациями везикул в этих секретоматах, а отсутствие эффекта от контрольных секретоматов — низкой концентрацией. Мы сопоставили точные концентрации внеклеточных везикул в секретоматах опухолевых клеток, полученные с помощью NTA-анализа (Рисунок 16 Б), с результатами МТТ-теста (Рисунок 17) под действием 25 мкМ цисплатина и

оценили зависимость протективного эффекта секретомов от концентрации везикул в них (Рисунок 18). Оказалось, что при одинаковой концентрации внеклеточных везикул секретомы от погибающих клеток обладают бóльшим цитопротективным эффектом по сравнению с контрольными секретомы. Из этого можно сделать вывод, что для биологического эффекта внеклеточных везикул важно не только их количество, но и их содержимое. Также заметно, что эффективность АпоС увеличивается с концентрированием секрета до определенного уровня (8 раз), после чего секретомы становятся менее эффективны. Таким образом, для дальнейших экспериментов было выбрано концентрирование везикул (как контрольных, так и апоптотических) в 8 раз.

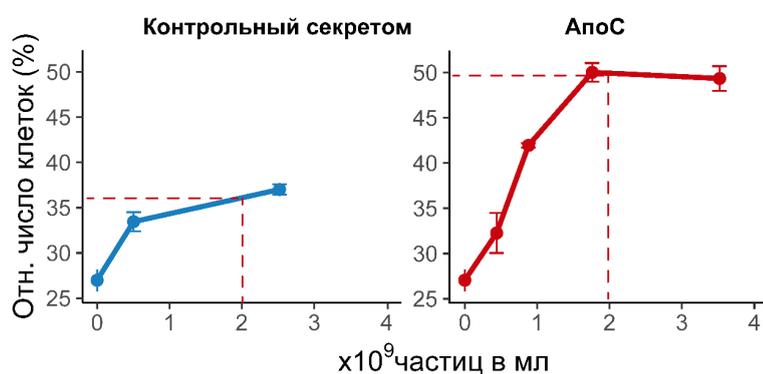


Рисунок 18. Зависимость выживаемости реципиентных клеток под действием 25 μM цисплатина от концентрации внеклеточных везикул в секретомы, с которыми они были инкубированы.

4. Длительность протективного эффекта АпоС

Во всех ранее проведенных нами экспериментах использовались клетки, которые непрерывно культивировали с секретомы или асцитной жидкостью в течение короткого промежутка времени. Таким образом, формирование химиорезистентности реципиентных опухолевых клеток происходило при постоянном присутствии эффекторных молекул в культуральной среде. Однако остается неясным, способен ли цитопротективный эффект АпоС сохраняться при удалении компонентов секретомы из среды и усиливаться при более длительном культивировании с секретомы.

Для оценки длительности протективного эффекта АпоС мы инкубировали реципиентные опухолевые клетки с секретомы на протяжении 3 суток, после чего среду заменяли на свежую. Клетки культивировали 3 дня в отсутствие секретомы, а затем тестировали их устойчивость к цисплатину (Рисунок 19). Оказалось, что при отсутствии сигнала от погибающих клеток чувствительность к цисплатину восстанавливается до исходного уровня

(Рисунок 20). Это свидетельствует о том, что для сохранения цитопротективного эффекта секретомов реципиентные клетки должны контактировать с сигнальными молекулами от погибающих клеток непосредственно перед терапевтическим воздействием.

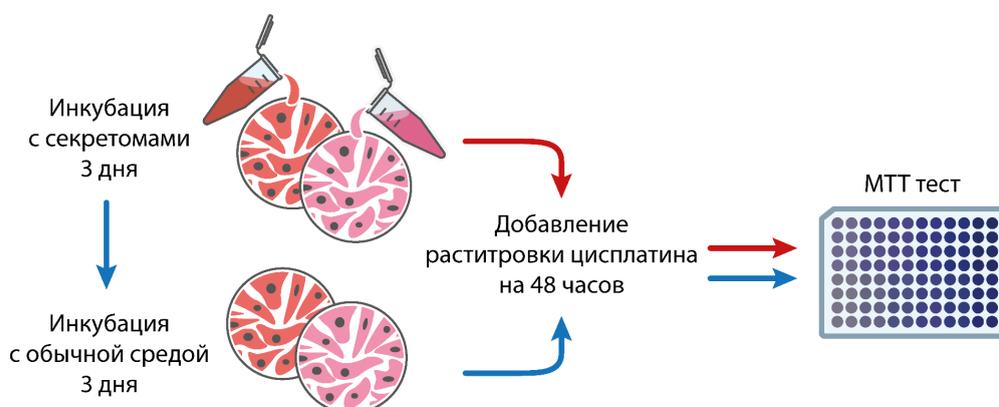


Рисунок 19. Схема эксперимента по оценке длительности протективного эффекта секретомов.

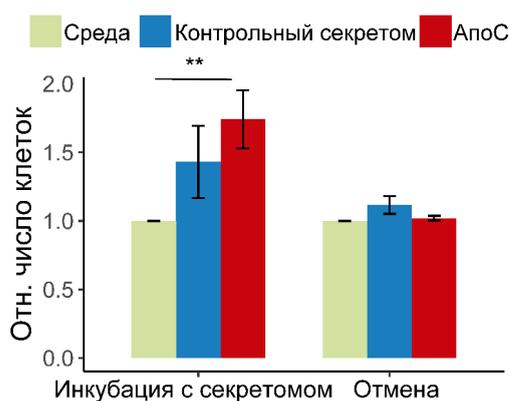


Рисунок 20. Результаты цитотоксического теста (MTT-теста) реципиентных клеток SKOV3, прединкубированных 3 дня с секретомом (“Инкубация с секретомом”), затем 3 дня без секретомов (“Отмена”). После чего, клетки были обработаны 10 μM цисплатина в течение 48 часов. Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “***” — $p\text{-value} < 0,00005$. Каждое измерение проведено в трех биологических повторах.

Для оценки влияния длительности инкубации с АпоС на степень цитопротективного эффекта мы инкубировали реципиентные клетки с секретомом от погибающих и контрольных клеток на протяжении 21 дня. Оказалось, что длительная непрерывная инкубация с АпоС не приводит к усилению цитопротективного эффекта секретомов, что может говорить об отсутствии петли положительной обратной связи и/или о существовании лимитирующих условий, препятствующих повышению устойчивости к цисплатину (Рисунок 21). Также нами не было замечено снижения цитопротективного эффекта со временем. Таким образом, длительное

присутствие сигнальных молекул от погибающих клеток во внеклеточном пространстве не приводит к активации процессов, ингибирующих такую межклеточную коммуникацию.

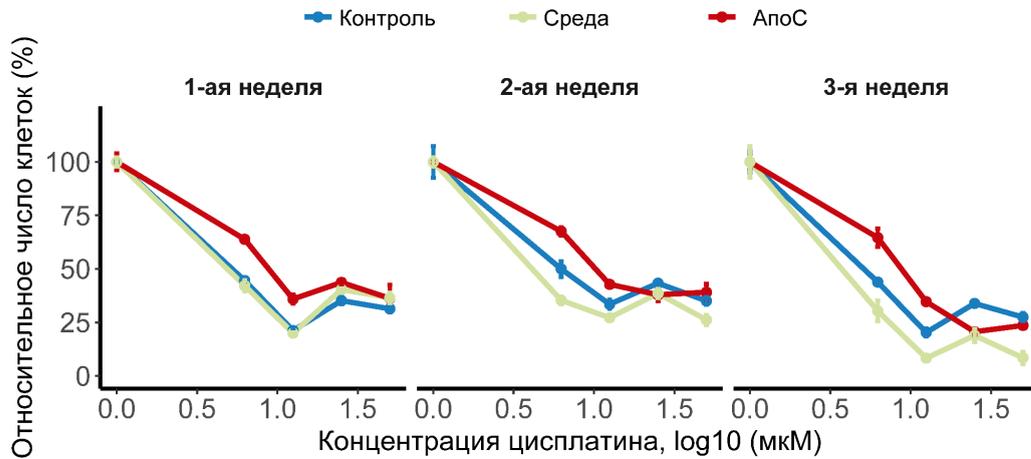


Рисунок 21. Результаты цитотоксического теста (MTT-теста) реципиентных клеток SKOV3, проинкубированных с секретами (Контроль и АпоС) на протяжении 1, 2 и 3 недель.

5. Инкубация реципиентных клеток SKOV3 с аутологичными АпоС приводит к запуску молекулярных каскадов, отвечающих за формирования более агрессивного опухолевого фенотипа

Для исследования процессов, активирующихся в реципиентных клетках под действием АпоС, был проведен протеомный и транскриптомный анализы реципиентных клеток SKOV3, инкубированных с секретами от погибающих и контрольных клеток (Рисунок 22).

Всего нами было обнаружено 1117 дифференциально экспрессирующихся гена ($|\text{Log2FoldChange}| \geq 1$, p-value с поправкой на множественное сравнение $< 0,05$), из них 726 повышали свою экспрессию в реципиентных клетках, инкубированных с АпоС относительно контрольных секретомов. Далее нами был проведен функциональный анализ этих транскриптов (Рисунок 22). Оказалось, что в ответ на добавление АпоС в реципиентных клетках SKOV3 на уровне изменения транскрипции активируются преимущественно пути, связанные с регуляцией клеточного цикла и репарации ДНК.

Далее нами был проведен протеомный анализ реципиентных клеток, инкубированных с секретами от погибающих или контрольных клеток. Всего нами было идентифицировано 1157 белков, изменивших свою представленность ($|\text{Log2FoldChange}| \geq 1$). Из них 712 повышали свою представленность более чем в два раза в реципиентных клетках, инкубированных с АпоС по сравнению с контрольными секретами. Функциональная аннотация этих генов показала, что на белковом уровне в реципиентных клетках активируются пути репарации ДНК,

метаболизма РНК, внутриклеточного транспорта, а также регуляции клеточного цикла (Рисунок 22).

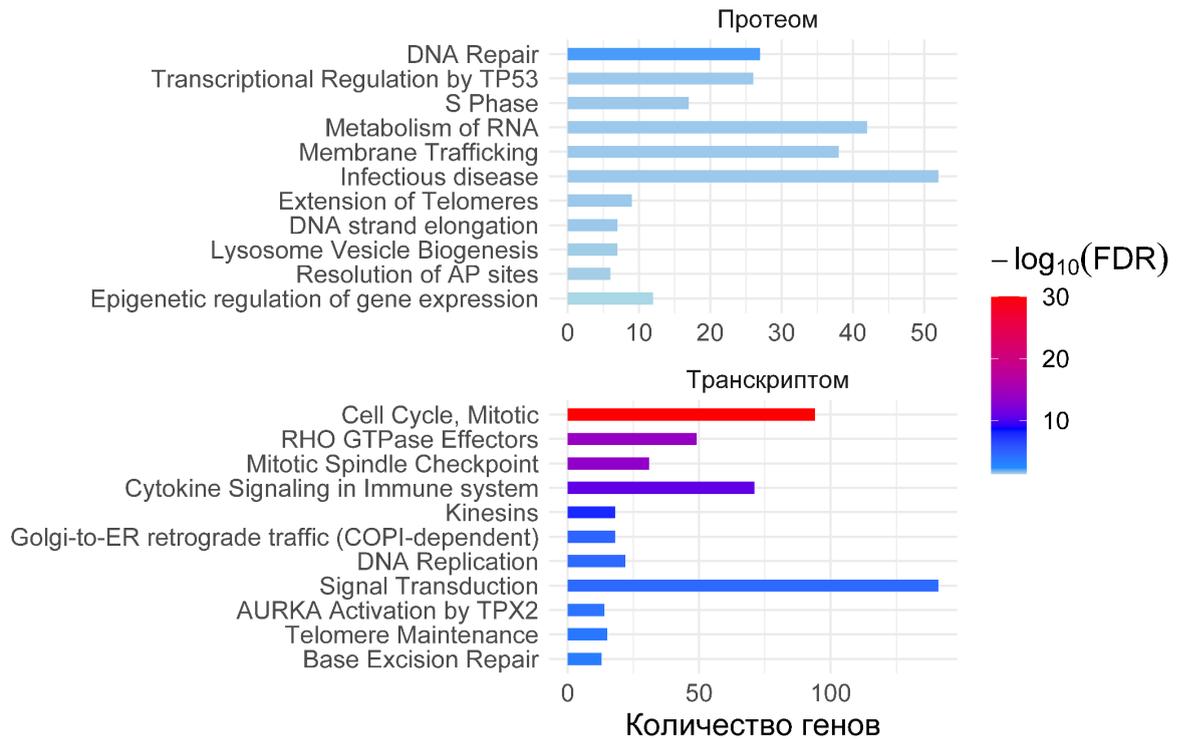


Рисунок 22. Функциональная аннотация генов, повышающих свою экспрессию (снизу), и белков, повышающих свою представленность (сверху), в клетках, инкубированных с АпоС относительно контрольных секретомов ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 1$). Результаты обогащения были получены с использованием базы данных Reactome.

Интересно, что список генов, повысивших свою экспрессию в реципиентных клетках после инкубации с АпоС мало совпадал со списком белков, повышающих свою представленность (Рисунок 23). Этому можно дать несколько объяснений: i) изменения на транскриптомном уровне предшествуют изменениям на трансляционном уровне с задержкой в несколько часов [263]; ii) изменения как на транскриптомном, так и на трансляционном уровне обусловлены не только процессами биосинтеза, но и стабильностью молекул; iii) увеличение числа транскриптов и белков может происходить за счёт поглощения молекул из окружающей среды (в том числе в составе внеклеточных везикул).

Несмотря на ограниченное совпадение в списках генов, изменения на транскриптомном и протеомном уровнях демонстрируют общие тенденции на уровне активирующихся молекулярных каскадов (Таблица 5). В частности, под влиянием секретомов от погибающих клеток в реципиентных клетках активируются пути, связанные с репарацией ДНК, регуляцией клеточного цикла и клеточным ответом на стресс. Например, на транскриптомном уровне (гены

AURKA, *AURKB*, *PLK1*, *CCNB1*, *CDK1*) и на протеомном уровне (гены *CDK2*, *ATM*) повышалась экспрессия ключевых генов, регулирующих клеточный цикл и обеспечивающих более эффективные процессы репарации ДНК [264–271]. Транскриптомный анализ также показал одновременное повышение экспрессии генов *MDC1* и *H2AX*, чьи продукты участвуют в инициации репарации двухцепочечных разрывов ДНК [272]. Повышенная экспрессия (на транскриптомном и протеомном уровнях) *LIG1* в реципиентных клетках, прединкубированных с АпоС, может способствовать устойчивости к цисплатину за счет лигирования фрагментов ДНК в ходе эксцизионной репарации [273]. Так же мы заметили увеличение числа транскриптов гена *FOXMI*, который кодирует транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл, репарацию ДНК и апоптоз, что также может приводить к формированию устойчивости к цисплатину [274–278].

Важно отметить, что эти каскады запускаются в хемонаивных реципиентных клетках, то есть в клетках, неподвергнутых обработке цисплатином. Возможно активация этих сигнальных каскадов может заранее подготовить клетки к цитотоксическому воздействию.

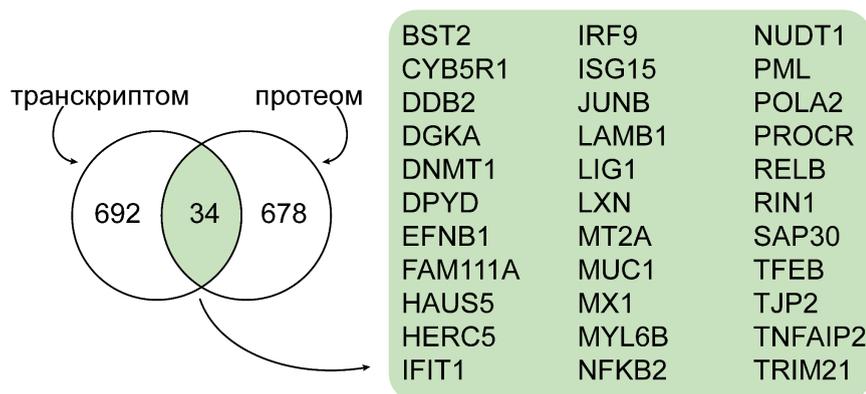


Рисунок 23. Диаграмма Венна, отображающая пересечение списков генов, повышающих свою экспрессию на уровне мРНК и на уровне белков в ответ на добавление АпоС.

6. АпоС способствуют формированию химиорезистентности у опухолевых, но не нормальных клеток

Эффекты секретомов от погибающих под действием цисплатина клеток, наблюдаемые на клеточной линии SKOV3, хорошо соотносятся с эффектами, наблюдаемыми в ходе экспериментов *ex vivo* с асцитными жидкостями и первичными культурами опухолевых клеток. Однако обнаруженный нами протективный эффект асцитных жидкостей может быть опосредован также вкладом клеток из опухолевого микроокружения.

Таблица 5. Функциональная аннотация генов, повышающих свою экспрессию (транскриптом), или белков (протеом), повышающих свою представленность, в реципиентных клетках, обработанных АноС относительно контрольных секретомов ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 1$). Результаты обогащения были получены с использованием базы данных Gene Ontology Biological Process.

Название пути	Число генов			False Discovery Rate	
	в пути (всего)	транскриптом	протеом	транскриптом	протеом
Response to stress	3358	252	153	7,28E-15	1,20E-04
Regulation of cell cycle process	716	86	45	1,04E-12	2,90E-03
Regulation of cell cycle	1108	110	66	1,19E-11	2,10E-04
Chromosome organization	968	97	61	2,26E-10	1,10E-04
Regulation of chromosome organization	253	40	22	1,69E-08	6,40E-03
Regulation of mitotic cell cycle	493	57	31	1,04E-07	3,36E-02
DNA repair	497	57	45	1,34E-07	4,49E-07
Regulation of mitotic cell cycle phase transition	332	44	24	2,43E-07	2,69E-02
Response to cytokine	804	76	44	4,61E-07	3,54E-02
Regulation of cell cycle phase transition	431	50	33	8,18E-07	1,30E-03
Cellular response to stress	1572	113	91	6,31E-05	5,41E-06
Cell cycle checkpoint signaling	157	23	16	2,90E-04	1,22E-02
DNA replication	203	23	18	7,80E-03	1,98E-02
Regulation of protein modification process	1560	96	74	4,42E-02	2,69E-02
Cellular response to DNA damage stimulus	744	71	67	1e-06	3,93E-11

Для оценки паттернов секреции нормальными клетками нами были выбраны три клеточные линии: hTERT FT282 (эпителий фаллопиевой трубы), HaCaT (кератиноциты, эпителиальный фенотип) и дермальные фибробласты (мезенхимальный фенотип). Также мы расширили панель опухолевых клеток, добавив клеточные линии, принадлежащие разным подтипам рака яичника – OVCAR3 (серозный рак яичника) и MESOV (цистаденокарцинома). Мы провели генерацию секретомов от погибающих и контрольных клеток по протоколу, разработанному ранее (Пункт 3.3). Дозы цисплатина, используемые при сборе секретомы, были подобраны так, что к моменту сбора секретомы половина донорных клеток погибала апоптозом (Рисунок 24). Для клеток OVCAR3 и HaCaT полуметальная доза цисплатина составляла 25 μM , для клеток SKOV3 – 40 μM , для клеток MESOV – 60 μM , а для клеток hTERT FT282 и дермальных фибробластов – 80 μM .

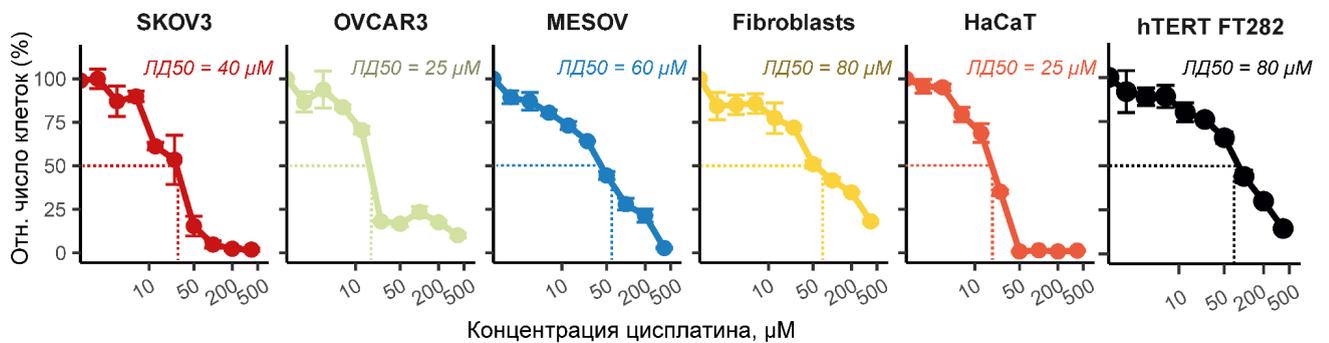


Рисунок 24. Подбор концентрации цисплатина для различных клеточных линий. Тест на цитотоксичность (MTT-тест) был проведен через 41 час после 7-часовой инкубации с цисплатином. LD50 - полуметальная доза. Каждое измерение проведено в трех биологических повторях

Мы показали, что обработка реципиентных нормальных клеток аутологичными секретомы (т.е. секретомы той же клеточной линии) от погибающих клеток не приводила к формированию устойчивости к цисплатину, в отличие от опухолевых клеток (Рисунок 25А).

Протективный эффект секретомы является результатом двух независимых процессов: секреции погибающими донорными клетками и запуска молекулярных каскадов в реципиентных клетках. Мы провели эксперимент где в роли доноров выступали клетки SKOV3, а в качестве реципиентов — нормальные клетки. Оказалось, что секретомы от SKOV3 (формирующие устойчивость к цисплатину у клеток SKOV3) не приводят к возникновению устойчивости к цисплатину у нормальных клеток. Более того, АпоС от опухолевых клеток оказался токсичным для клеточной линии HaCaT и дермальных фибробластов (Рисунок 25Б).

Также был проведен обратный эксперимент, когда в качестве доноров выступали нормальные клетки, а в роли реципиентных — клетки SKOV3. В результате оказалось, что секретомы от нормальных клеток обладают слабым протективным эффектом или не обладают вовсе (Рисунок 25В).

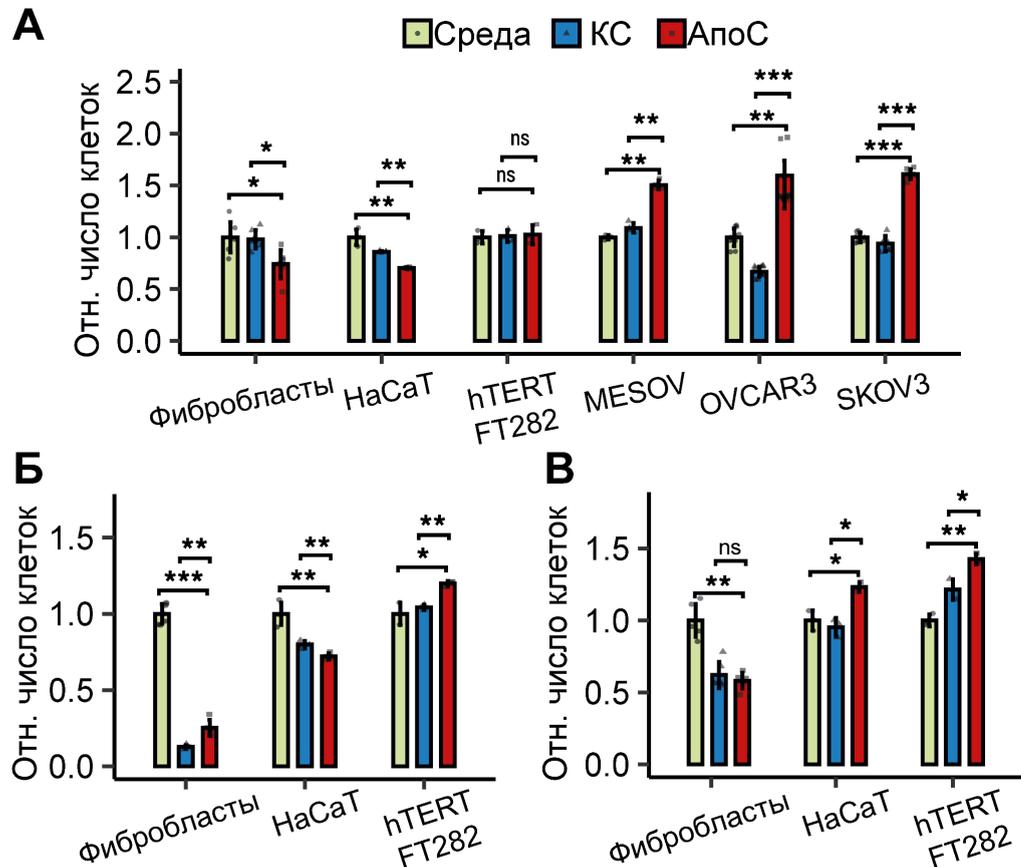


Рисунок 25. Результаты цитотоксического теста (MTT-теста) реципиентных клеток после инкубации с секретомы (КС и АпоС) или средой, а также цисплатином по схеме, представленной на рисунке 5. (А) Донорными и реципиентными были клетки одной и той же клеточной линии. (Б) Доноры – SKOV3, реципиенты – неопухолевые клетки. (В) Доноры – неопухолевые клетки, реципиенты – SKOV3. Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “*” — p -value < 0,05; “**” — p -value < 0,005, “***” — p -value < 0,00005, “ns” — p -value > 0,05. Каждое измерение проведено в трех биологических повторах.

Таким образом, нами было показано, что только опухолевые клетки способны приобретать химиорезистентность в результате межклеточной коммуникации, опосредованной терапией. Это может быть объяснено отличающимися паттернами секреции нормальных клеток в условиях стресса и/или их неспособностью отвечать на сигналы, исходящие от погибающих клеток.

7. Сравнение паттернов секреции нормальными и опухолевыми клетками в ответ на повреждение ДНК

Мы обратили внимание, что эффекты секретомов от погибающих опухолевых клеток сильно отличаются от эффектов секретомов опухолевых клеток при обычных условиях и секретомов нормальных клеток в целом. Для оценки паттернов секреции нормальными и опухолевыми клетками в условиях стресса мы провели сбор секретомов от контрольных и погибающих под действием цисплатина клеток: донорные клетки обрабатывали или не обрабатывали цисплатином в бессывороточной среде на протяжении 7 часов в соответствии с их дозами ЛД50, после чего клетки промывали от цисплатина три раза раствором PBS и заменяли среду на бессывороточную и несодержащую фенолового красного. Через 41 час секретомы собирали, центрифугировали от клеточного дебриса, супернатант замораживали и использовали для протеомного анализа.

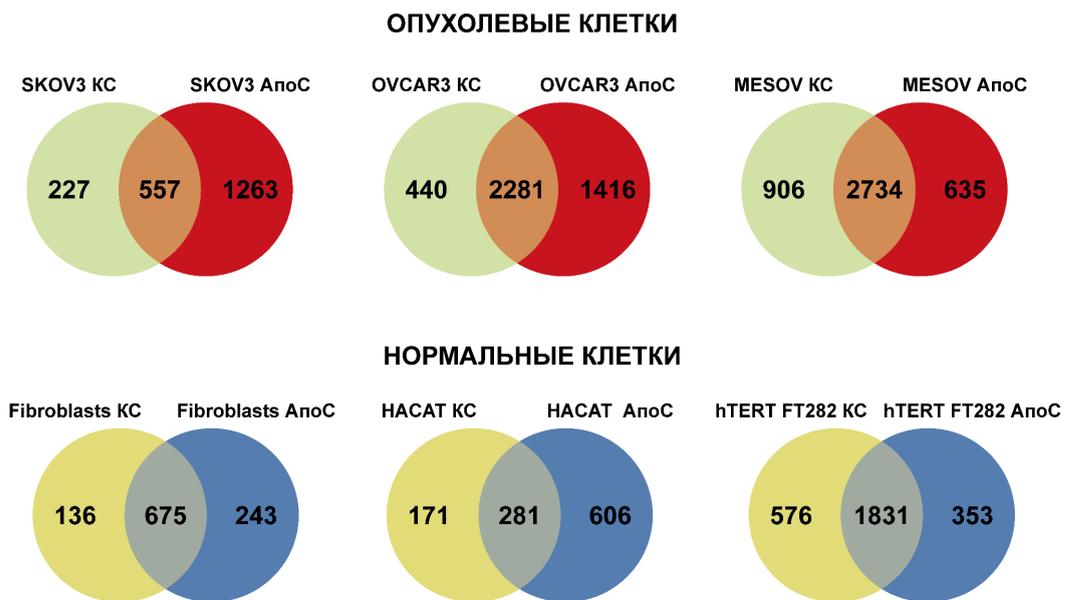


Рисунок 26. Диаграммы Венна для протеомных профилей AnoC и контрольных секретомов (KC) опухолевых (SKOV3, OVCAR3, MESOV) и нормальных клеток (HaCaT, hTERT FT282, фибробластов).

В данном эксперименте были проанализированы протеомы секретомов клеточных линий различных подтипов рака яичника SKOV3, OVCAR3 и MESOV, а также клеточных линий нормальных клеток HaCaT, hTERT FT282 и дермальных фибробластов. Из Рисунка 26 видно, что у большинства клеточных линий (за исключением hTERT FT282 и MESOV) секретомы после обработки цисплатином обладали бо́льшим белковым разнообразием относительно

секретомов от клеток без воздействия. Также можно отметить, что опухолевые клетки в целом характеризуются более богатыми профилями секреции, чем нормальные клетки.

Мы провели функциональную аннотацию белков, повышенных в представленности в АпоС ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 1$), с использованием базы данных KEGG. Из обогащений, представленных на Рисунке 27 видно, что в ответ на химиотерапию опухолевые клетки секретируют большое количество белков, участвующих в сплайсинге, репарации ДНК, трансляции, сплайсинге пре-мРНК и клеточном цикле. Профиль секреции нормальных клеток в ответ на стресс заметно отличается – их секретомы содержат преимущественно белки, участвующие в иммунных каскадах и процессе клеточного старения. Таким образом, можно сказать, что в контексте паттернов секреции донорных клеток, нормальные клетки характеризуются более бедным составом секретомы. Это проявляется как на уровне общего разнообразия белковых молекул секретомы, так и на уровне функциональных обогащений.

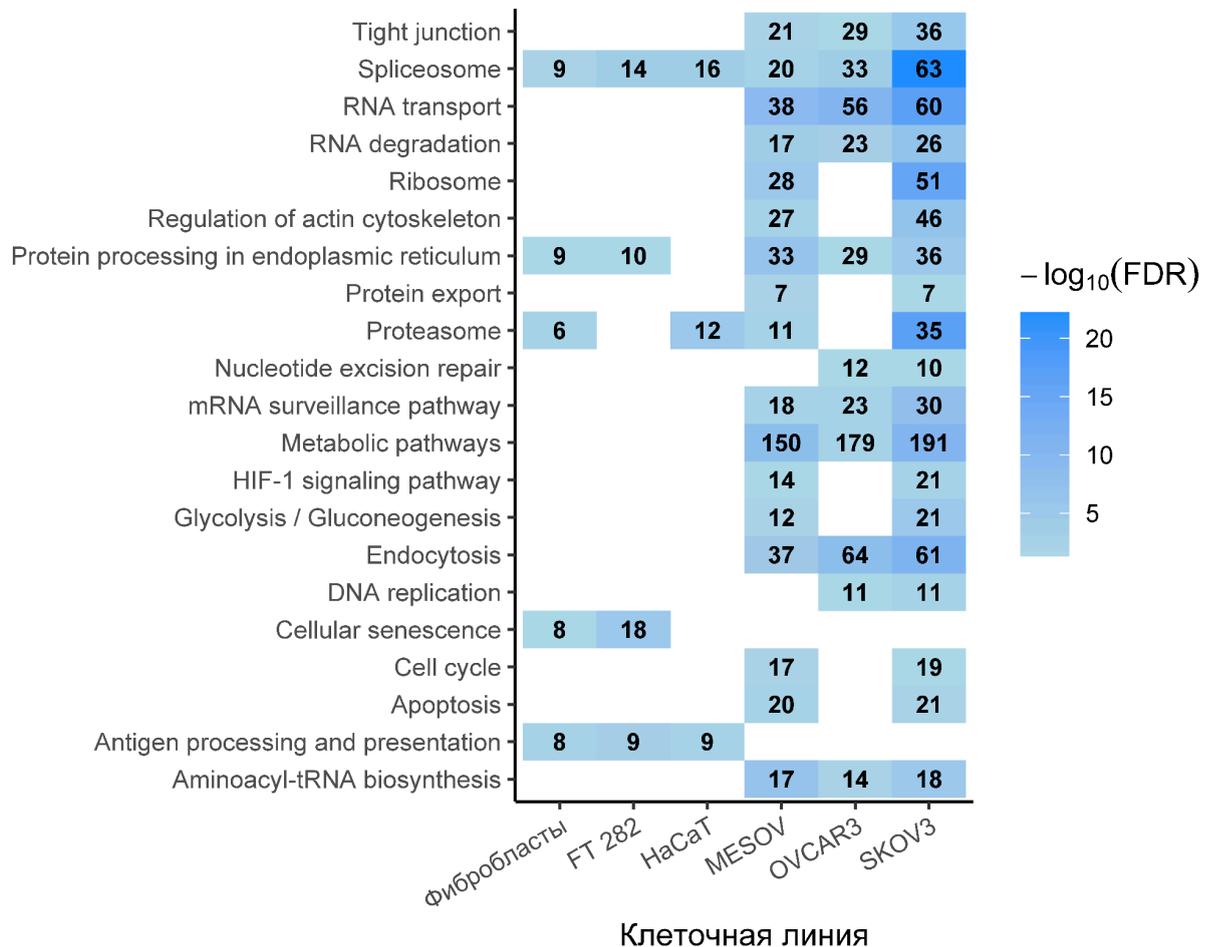


Рисунок 27. Функциональная аннотация белков, дифференциально повышающих свою представленность в АпоС относительно контрольных секретомов ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 1$). Числа в ячейках соответствуют числу генов, цвет отображает частоту ложных открытий (FDR). Результаты обогащения были получены с использованием базы данных KEGG.

8. Цитопротективный эффект секретомов зависит от процессов ядерного экспорта, везикулярного транспорта и апоптоза

Классическим методом исследования механизмов биологических эффектов является использование ингибиторов, блокирующих предполагаемых участников процесса, что позволяет оценить их роль в исследуемом явлении.

В секретомых погибающих клеток мы обнаружили весомую часть белков с ядерной локализацией (Рисунок 28). Однако для секреции этих белков необходим их транспорт из ядра в цитоплазму. Для определения вклада ядерных белков в цитопротективный эффект секретомов мы ингибировали ядерно-цитоплазматический экспорт в донорных клетках с использованием лептомицина В, который подавляет экспорт через взаимодействие с экспортином-1 [279]. Оптимальная концентрация лептомицина В (37 нМ) была установлена на основе вестерн-блот анализа ядерной фракции лизатов клеток SKOV3 (Рисунок 29). При совместном воздействии лептомицина В и цисплатина (40 μM) мы наблюдали аккумуляцию белка p53 в ядре, что подтверждало ингибирование ядерного экспорта.

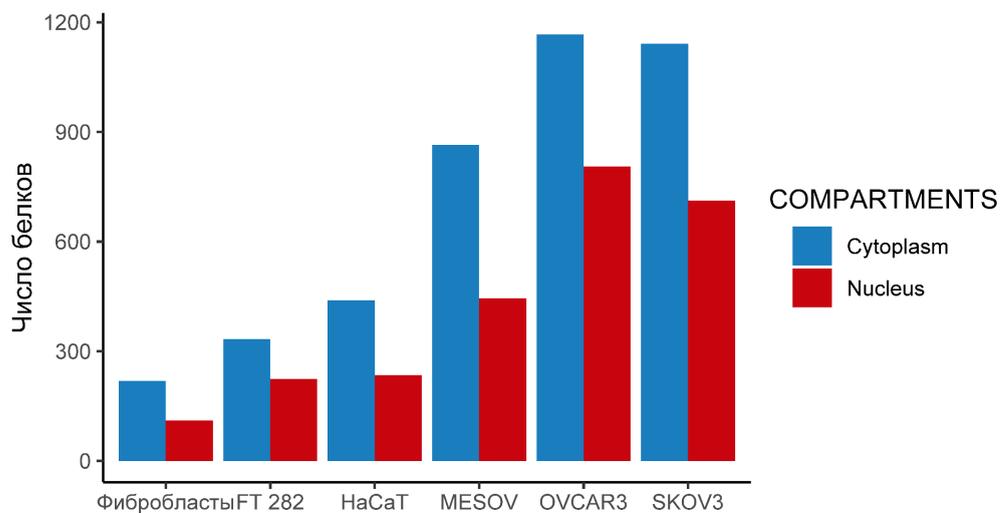


Рисунок 28. Функциональная аннотация белков, повышающих свою представленность в АпоС относительно контрольных секретомов ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 1$). Результаты обогащения были получены с использованием базы данных COMPARTMENTS.

Для изучения роли везикулярного транспорта использовали брефельдин А – ингибитор комплекса Гольджи, нарушающий формирование транспортных везикул [280]. Оптимальная концентрация брефельдина А (6 мкг/мкл) была определена также с использованием вестерн-блот анализа, который показал накопление белка CD63 (маркера экзосом) в клетке при

совместной обработке цисплатином (40 μM), что свидетельствовало о нарушении секреции везикул (Рисунок 30).

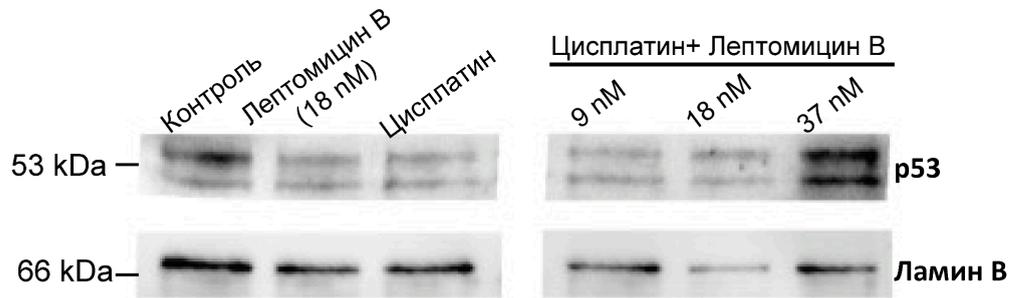


Рисунок 29. Вестерн-блот ядерной фракции лизатов клеток SKOV3, обработанных или необработанных Лептомицином В и/или цисплатином (40 μM).

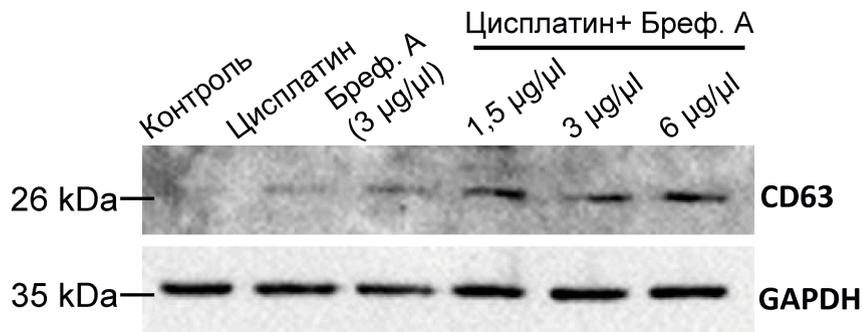


Рисунок 30. Вестерн-блот лизатов клеток SKOV3, обработанных или необработанных Брефельдином А (Бреф. А) и/или цисплатином (40 μM).

Ингибирование апоптоза проводилось с помощью ингибитора Z-VAD-FMK, который блокирует каспазы — ключевые ферменты апоптотического пути. Мы протестировали действие ингибитора в сочетании с цисплатином и установили, что при концентрации Z-VAD-FMK 50 μM цисплатин (40 μM) не вызывал апоптоз, тогда как при его отсутствии апоптоз был индуцирован (Рисунок 31).

Для оценки вклада ядерного экспорта, везикулярного транспорта и апоптоза донорные клетки SKOV3 обрабатывали комбинацией одного из ингибиторов (37 нМ лептомицина В, 6 мкг/мкл брефельдина А или 50 μM Z-VAD-FMK) и 40 μM цисплатина. Инкубация длилась 7 часов, после чего клетки промывали PBS и заменяли среду на бессывороточную. Секретомы собирали через 24 часа после начала обработки. Реципиентные клетки инкубировали с секретомы в течение 72 часов, затем добавляли цисплатин и продолжали инкубацию еще 48 часов. Далее проводили тест на цитотоксичность (МТТ-тест) для оценки влияния секретомов на чувствительность клеток к цисплатину (Рисунок 32).

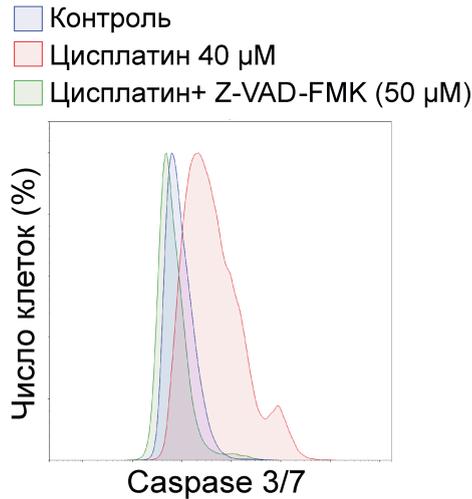


Рисунок 31. Проточная цитометрия клеток SKOV3 на активность каспаз-3/7. Клетки инкубировали с 50 μM Z-VAD-FMK и/или 40 μM цисплатина на протяжении 7 часов, после чего клетки промывали 3 раза PBS и заменяли среду на бессывороточную, не содержащую цисплатин, после чего клетки инкубировали еще 41 час и проводили тест на активность каспаз-3/7 (CellEvent Caspase-3/7 Green).

В результате экспериментов выяснилось, что секреты от погибающих опухолевых клеток с ингибированным ядерным экспортом снижали свою эффективность по сравнению с секретами от погибающих клеток с активным ядерным экспортом. Эти данные подтверждают важную роль ядерно-цитоплазматического транспорта в формировании цитопротективного эффекта. Ингибирование везикулярного транспорта брефельдином А полностью устраняло цитопротективный эффект секретов, что указывает на необходимость наличия активного везикулярного транспорта для передачи сигнальных молекул. Подавление апоптоза с помощью Z-VAD-FMK приводило к тому, что секреты становились токсичными для реципиентных клеток. Предполагается, что ингибирование апоптоза изменяет состав секретов, возможно, способствуя накоплению поврежденных или токсичных компонентов. Напротив, активный апоптоз, вызванный цисплатином, формирует секреты, содержащие факторы, способные индуцировать химиорезистентность в реципиентных клетках.

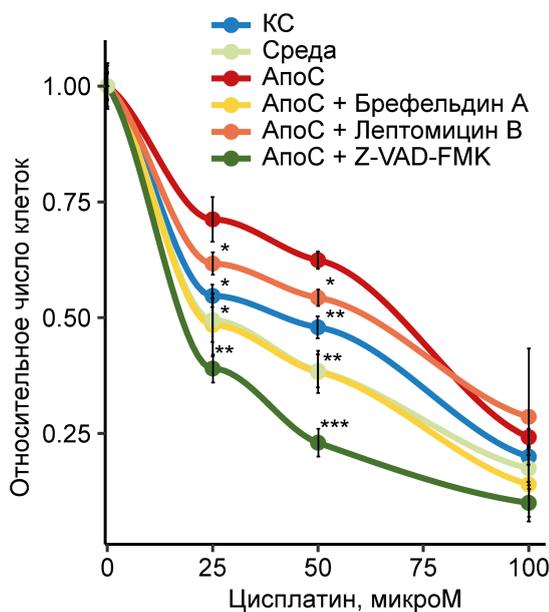


Рисунок 32. Результаты теста на цитотоксичность (MTT-теста) реципиентных клеток SKOV3, прединкубированных с секретами от донорных клеток, обработанных или не обработанных цисплатином (40 μM) и комбинациями цисплатина (40 μM) с ингибиторами (37 нМ лептомицина В, 6 мкг/мкл брефельдина А или 50 μM Z-VAD-FMK). Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где "*" — p -value < 0,05; "***" — p -value < 0,005, "****" — p -value < 0,00005. Каждое измерение проведено в трех биологических повторах.

Таким образом, наши данные демонстрируют, что для индукции устойчивости к цисплатину в реципиентных клетках необходимы активные процессы ядерного экспорта, везикулярного транспорта и апоптоза в донорных клетках под действием цисплатина. Эти механизмы могут обеспечивать секрецию белков и внеклеточных везикул, которые способствуют выживанию и повышению устойчивости к химиотерапии.

9. Белки сплайсосомы инкапсулированы во внеклеточные везикулы

Ранее мы продемонстрировали, что асцитные жидкости пациентов после химиотерапии и секретомы от погибающих опухолевых клеток обогащены компонентами сплайсосомы. В ряде работ было показано участие белков сплайсосомы в процессах репарации ДНК, регуляции клеточного цикла, расплетения R-петель и регуляции трансляции [281]. Также существуют данные, что белки сплайсосомы могут участвовать в упаковке РНК в стрессовые гранулы или внеклеточные везикулы [234], но отсутствуют доказательства того, что эти белки могут быть секретированы в составе везикул. Инкапсуляция белков сплайсосомы во внеклеточные везикулы повышает вероятность сохранения их функциональной активности. Мы предполагаем, что белки сплайсосомы в составе секрета инкапсулируются во внеклеточные везикулы, а не находятся там в свободном виде.

Для подтверждения инкапсуляции белков сплайсосомы мы получили секретомы от погибающих и контрольных клеток SKOV3 по схеме, представленной на Рисунке 13 и провели их обработку протеиназой К. Протеиназа К не способна проникать сквозь мембраны везикул, а значит, не воздействует на их внутреннее содержимое. Изменение уровня представленности белка в образце после обработки протеиназой К позволяет оценить его доступность для протеиназы К (его инкапсуляцию). Для контроля активности протеиназы К к одному из образцов дополнительно добавлялся ДДС до 4%, чтобы разрушить мембраны внеклеточных везикул. Таким образом, при наличии активности протеиназы К все белки в образце, включая те, которые были инкапсулированы в везикулы, должны быть разрушены. Как видно из Рисунка 33А, белки сплайсосомы, такие, как DHX9, SYNCRIP, SRSF2 и SRSF3, не расщепляются протеиназой К.

Чтобы дополнительно валидировать наличие сплайсосомных белков во внеклеточных везикулах, мы трансфицировали донорные клетки SKOV3 плазмидой, кодирующей белок сплайсосомы SNU13 или SRSF4, слитый с флуоресцентной меткой (pTagGFP2-SNU13 или pTagRFP-C-SRSF4) и обработали клетки цисплатином на протяжении 7 часов, после чего среду заменили на бессывороточную и безиндикаторную. Еще через 41 час кондиционную среду

собирали, удаляли клеточный дебрис и наносили ее на ультрафильтрационный картридж с отсечкой, соответствующей молекулярной массе белка в 100 кДа. Далее секретом инкубировали с магнитными частицами, конъюгированными с антителом к белковому маркеру внеклеточных везикул CD9. Таким образом на магнитных частицах происходила иммунопреципитация внеклеточных везикул из секретомов. Далее с помощью проточной цитометрии магнитных частиц с преципитированными на их поверхности внеклеточными везикулами был измерен сигнал флуоресценции от белков SNU13 и SRSF4, слитыми с зеленым и красным флуорофром, соответственно. Таким образом, во внеклеточных везикулах от погибающих под действием цисплатина клеток SKOV3 было подтверждено наличие сплайсосомных белков SNU13-GFP и SRSF4-RFP (Рисунок 33Б).

На основании полученных данных можно сделать вывод, что белки сплайсосомы инкапсулированы во внеклеточные везикулы в составе секретомов от погибающих клеток.

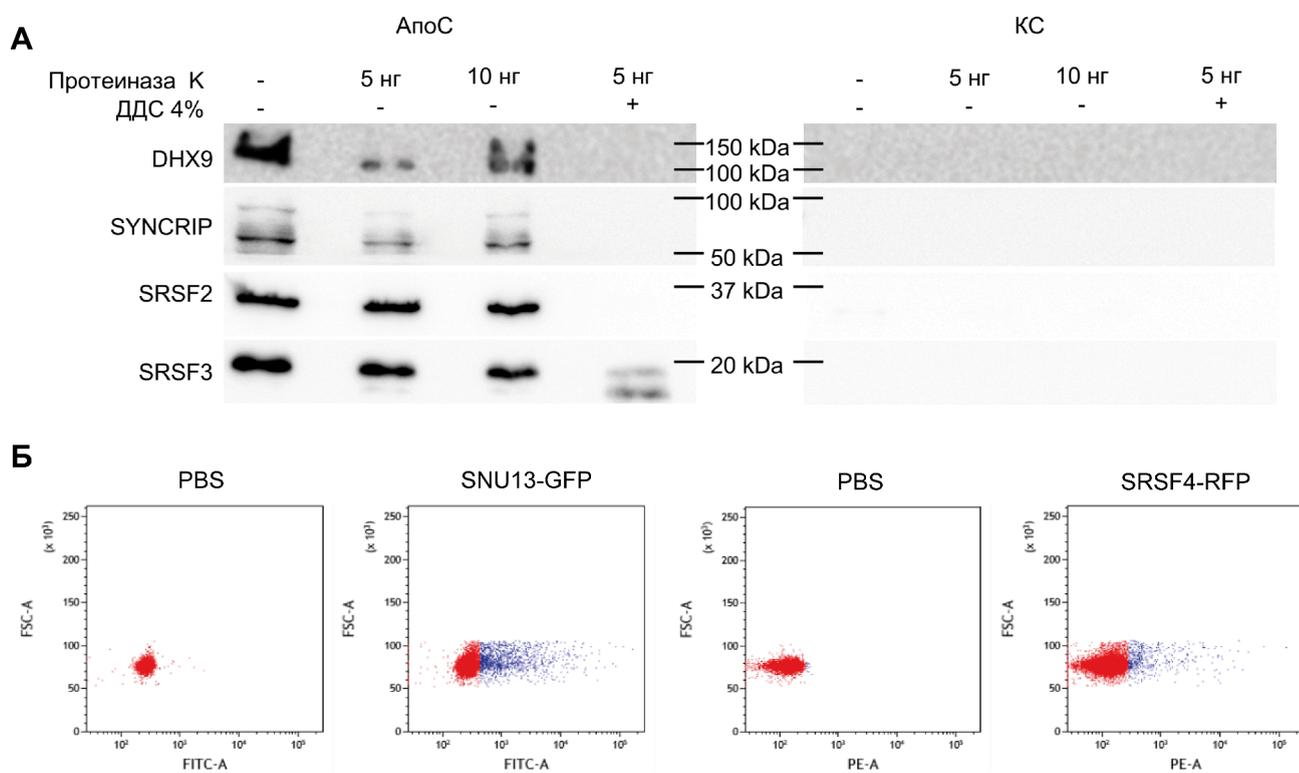


Рисунок 33. (А) Вестерн-блот секретомов от погибающих или контрольных клеток SKOV3. Образцы обрабатывались протеиназой К и додецилсульфатом натрия (ДДС), часть образцов оставляли интактными. АпоС – секретом от погибающих клеток, КС – контрольный секретом. (Б) Точечная диаграмма проточной цитометрии магнитных частиц, конъюгированных с CD9-положительными везикулами, полученными из секретомов от погибающих клеток. FSC – прямое светорассеяние, FITC-A или PE-A – интенсивность флуоресценции белков сплайсосомы SNU13 и SRSF4, соответственно.

10. Обработка клеток нормального эпителия секретами от погибающих клеток не приводит к изменению транскриптомного профиля в сторону более химиорезистентного фенотипа

Ранее мы обратили внимание на то, что секреты от погибающих опухолевых клеток приводят к формированию устойчивости к химиотерапии у реципиентных опухолевых клеток, но при этом не действуют на нормальные клетки. Также мы заметили, что секреты погибающих нормальных клеток значительно отличаются по своему белковому составу от секретов погибающих опухолевых клеток. Поэтому мы решили проанализировать ответ нормальных клеток на добавление АпоС как опухолевого, так и нормального происхождения. Для этого эксперимента мы провели транскриптомный анализ реципиентных клеток hTERT FT282, инкубированных с АпоС и контрольными секретами как от опухолевых, так и от нормальных клеток (SKOV3 и hTERT FT282, соответственно) на протяжении 72 часов.

Прежде всего, было определено количество дифференциально экспрессирующихся генов в реципиентных клетках hTERT FT282 под действием секретов от погибающих клеток SKOV3 или hTERT FT282 относительно контрольных секретов от тех же клеточных линий. Как видно из рисунка 34, количество генов, изменивших свою экспрессию (как в сторону повышения, так и понижения) на порядок выше для реципиентных клеток hTERT FT282, инкубированных с АпоС от hTERT FT282, по сравнению с АпоС от клеток SKOV3.

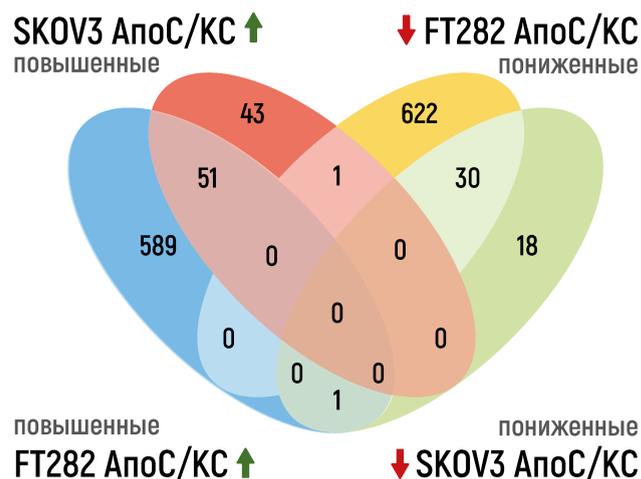


Рисунок 34. Диаграмма Венна для транскриптомных профилей реципиентных клеток hTERT FT282, инкубированных с секретами от опухолевых клеток SKOV3 и нормальных клеток hTERT FT282. На диаграмме Вена представлены пересечения списков генов, дифференциально экспрессирующихся в реципиентных клетках в ответ на добавление АпоС относительно соответствующих контрольных секретов ($|\text{Log}_2\text{FoldChange}| \geq 1$, $\text{adjusted } p\text{-value} < 0,05$).

Проведенный анализ проводился путем сравнения транскриптомных профилей клеток hTERT FT282 под действием секретомов от погибающих и контрольных клеток от одних и тех же клеточных линий (то есть эффект секретомы от погибающих клеток SKOV3 оценивался относительно эффекта от секретомы контрольных клеток SKOV3). Однако во время инкубации с секретомы от погибающих опухолевых клеток в нормальных клетках могут активироваться каскады ответа не только на сигналы от погибающих клеток, но и на сигналы опухолевых клеток в целом. Возможно, слабая разница транскриптомных профилей клеток hTERT FT282 под действием АпоС и КС от опухолевых клеток обусловлена тем, что эти секретомы сами по себе сильно изменяют транскриптомные профили нормальных клеток, что снижает вклад сигналов от погибающих клеток. Для оценки данного предположения мы проанализировали, как секретомы от опухолевых клеток SKOV3 и hTERT FT282 изменяют экспрессию генов в клетках hTERT FT282 относительно контрольного секретомы hTERT FT282. Таким образом мы учитываем вклад не только состояния, но и типа донорных клеток.

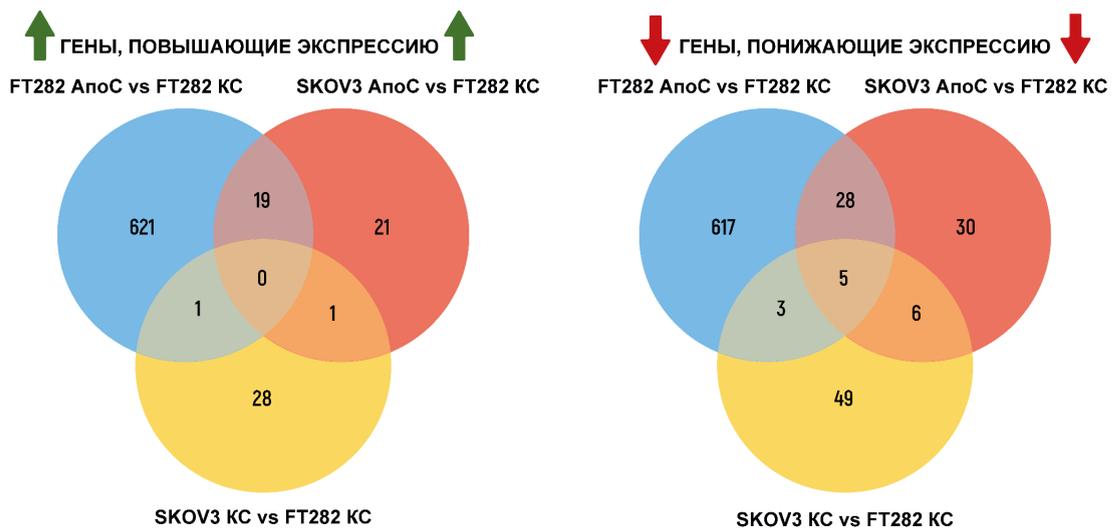


Рисунок 35. Транскриптомные профили реципиентных клеток hTERT FT282, инкубированных с секретомы от опухолевых клеток SKOV3 и нормальных клеток hTERT FT282. На диаграмме Вена представлены пересечения списков генов, повышенных (слева) или пониженных (справа) в экспрессии в реципиентных клетках в ответ на добавление секретомы как от SKOV3, так и hTERT FT282 относительно контрольных секретомы hTERT FT282 ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 1$, $\text{adjusted } p\text{-value} < 0,05$).

Оказалось, что профили транскрипции реципиентных клеток нормального эпителия hTERT FT282 по-прежнему изменялись (как в сторону повышения, так и понижения экспрессии) только в ответ на добавление секретомы от погибающих клеток hTERT FT282 (Рисунок 35). Следовательно, можно сделать вывод, что инкубация клеток нормального

эпителия с секретами от опухолевых клеток (как апоптотических, так и контрольных) не приводят к обширному изменению транскриптомного профиля реципиентных клеток.

Функциональная аннотация генов, изменивших свою экспрессию в реципиентных клетках, с использованием базы данных KEGG показала, что инкубация нормальных клеток hTERT FT282 с аутологичными секретами от погибающих клеток приводит к понижению экспрессии генов, отвечающих за пути эксцизионной репарации нуклеотидов и репарации ошибочно спаренных нуклеотидов, репликации ДНК и клеточного цикла (Рисунок 36). Ранее мы показали, что инкубация опухолевых клеток SKOV3 с аутологичными АпоС, наоборот, приводит к активации этих путей (см. пункт 5 Главы Результаты и Обсуждение). В то же время в реципиентных клетках hTERT FT282 происходит повышение экспрессии генов, отвечающих за различные метаболические и иммунные каскады, а также сразу за несколько типов клеточной гибели – апоптоза, ферроптоза и некроптоза (Рисунок 37).

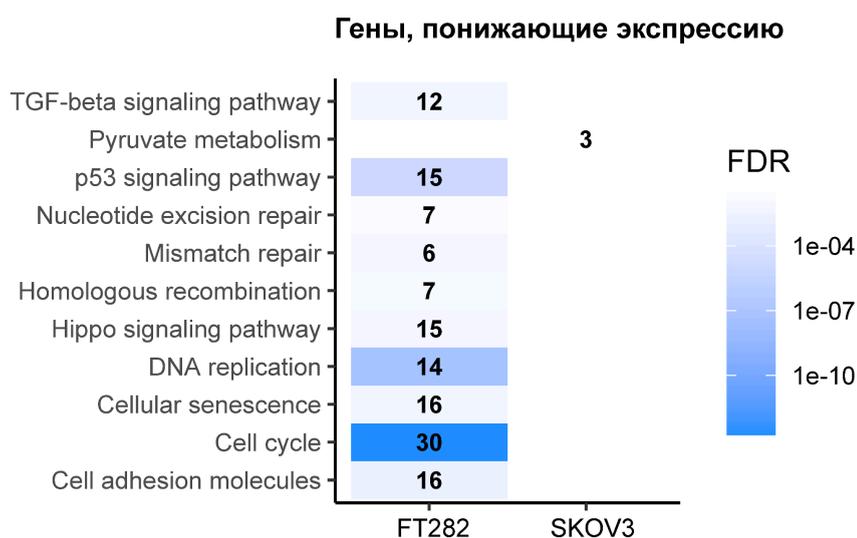


Рисунок 36. Функциональная аннотация генов, понижающих свою экспрессию в реципиентных клетках hTERT FT282, инкубированных с АпоС от hTERT FT282 или SKOV3 относительно контрольных секретомов от hTERT FT282 ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 1$, $p\text{-val} < 0,05$). Числа в ячейках соответствуют числу генов, цвет отображает частоту ложных открытий (FDR). Результаты обогащения были получены с использованием базы данных KEGG.

Таким образом, мы видим, что клетки нормального эпителия hTERT FT282 реагируют на инкубацию с аутологичным АпоС значительными изменениями на уровне транскриптома. Однако такой клеточный ответ не приводит к формированию устойчивости к химиотерапии, так как характер этих изменений противоположен тем, что мы наблюдаем при развитии устойчивости у опухолевых клеток, где происходит активация репарации ДНК и изменение

клеточного цикла. В то же время инкубация hTERT FT282 с АпоС опухолевых клеток не вызывает ни формирования устойчивости, ни значительных изменений в экспрессии генов. Это позволяет предположить, что для формирования устойчивости к химиотерапии необходимы не только секретомы, способные вызывать химиорезистентность, но и клетки, которые могут быстро реагировать на внешние стимулы. Вероятно, нормальные клетки либо менее проницаемы для внеклеточных везикул, либо имеют более строгую регуляцию экспрессии генов по сравнению с опухолевыми клетками, что ограничивает их способность приобретать устойчивость к терапии за счет экзогенных сигналов [282–284].

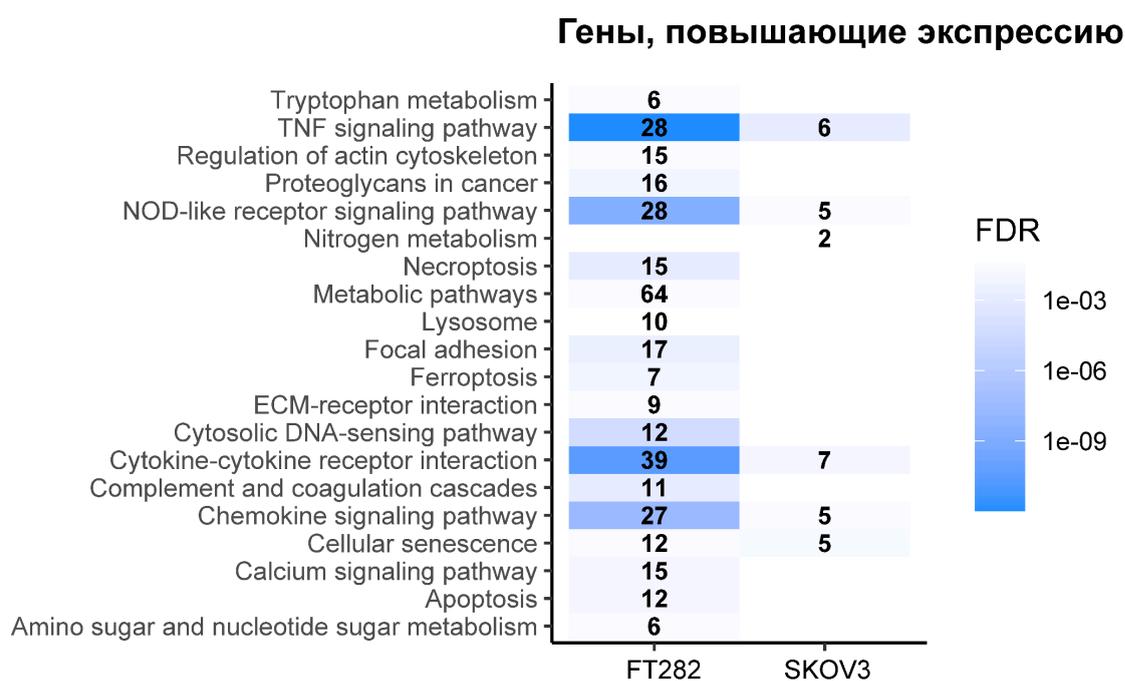


Рисунок 37. Функциональная аннотация генов, повышающих свою экспрессию в реципиентных клетках hTERT FT282, инкубированных с АпоС от hTERT FT282 или SKOV3 относительно контрольных секретомов от hTERT FT282 ($\text{Log}_2\text{FoldChange} \geq 1$, $p\text{-val} < 0,05$). Числа в ячейках соответствуют числу генов, цвет отображает частоту ложных открытий (FDR). Результаты обогащения были получены с использованием базы данных KEGG.

11. Секретомы от погибающих клеток способствуют удлинению S-фазы клеточного цикла и возникновению устойчивости к ряду ДНК-повреждающих агентов.

Результаты транскриптомного и протеомного анализов показали, что возникновение химиорезистентности в реципиентных опухолевых клетках сопровождается изменением экспрессии генов, участвующих в регуляции клеточного цикла. Как упомянуто в разделе 2.2.1

"Клеточный цикл" Обзора Литературы, способность клетки регулировать свой клеточный цикл в ответ на повреждения ДНК может быть решающей для её выживания.

Мы инкубировали клетки SKOV3 с секретами от погибающих или контрольных клеток в течение трёх суток, после чего добавили к ним 10 μM цисплатина на 24 часа. Затем был проведен анализ клеточного цикла реципиентных клеток. Как показано на Рисунке 38, опухолевые клетки, прединкубированные с секретами от погибающих клеток, имеют удлинённую S-фазу клеточного цикла в ответ на добавление цисплатина. Известно, что увеличение числа клеток в S-фазе может свидетельствовать о более эффективном аресте клеточного цикла в ответ на цисплатин, что дает клетке больше времени для репарации поврежденной ДНК [285].

На протеомном уровне мы показали, что АпоС приводит к активации каскадов репарации ДНК в реципиентных опухолевых клетках. Мы предположили, что АпоС могут обеспечивать защиту не только от цисплатина, но и других агентов, повреждающих ДНК, и при этом быть неэффективными при использовании с химиопрепаратами других классов. Чтобы проверить эту гипотезу, мы получили секреты от контрольных клеток и клеток, погибающих от цисплатина. Затем мы добавили эти секреты к реципиентным клеткам на 72 часа, после чего клетки обрабатывали несколькими химиопрепаратами, имеющими разные механизмы действия, на протяжении 48 часов и провели МТТ-тест (Рисунок 39).

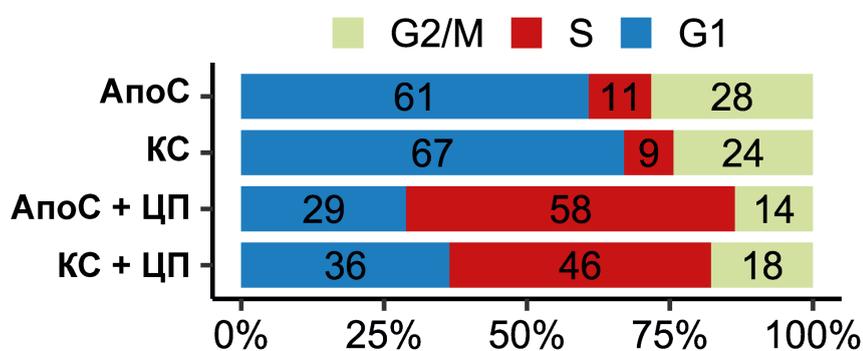


Рисунок 38. Результаты анализа клеточного цикла реципиентных клеток SKOV3, прединкубированных с секретами от погибающих клеток (АпоС) или контрольными секретами (КС) на протяжении 72 часов и обработанных 10 μM цисплатина на протяжении 24 часов. Процентное соотношение фаз клеточного цикла было получено при помощи программного обеспечения проточного цитометра NovoExpress.

Оказалось, что секреты от погибающих в результате повреждения ДНК клеток действительно способствовали возникновению у реципиентных клеток химиорезистентности именно к ДНК-повреждающим агентам, но не другим препаратам. Таким образом, можно

предположить, что эффект секретомов от погибающих под действием цисплатина клеток заключается в более эффективной репарации повреждений ДНК, но не является универсальным защитным механизмом к любому типу стресса.

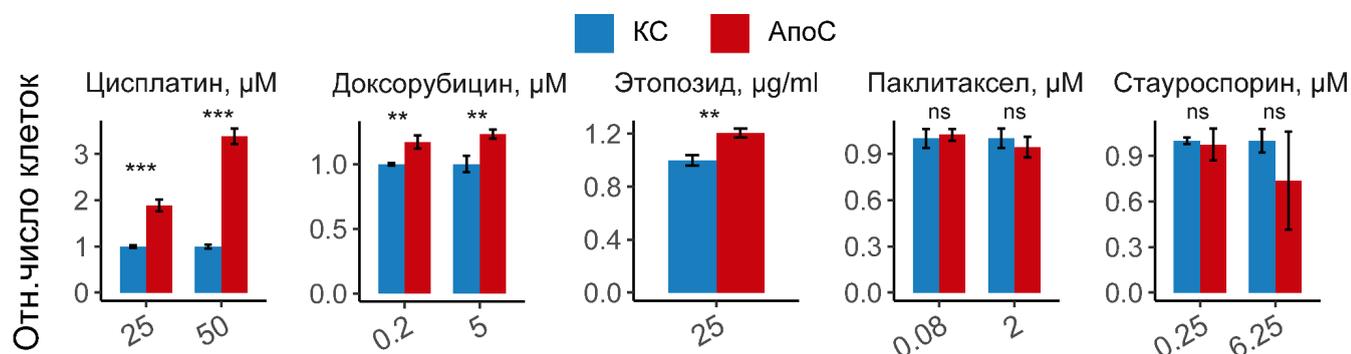


Рисунок 39. Результаты теста на цитотоксичность (МТТ-теста) реципиентных клеток SKOV3, прединкубированных с секретомами от погибающих клеток (АпоС) или контрольными секретомами на протяжении 72 часов и различными химиопрепаратами на протяжении 48 часов.

12. Реципиентные клетки, прединкубированные с АпоС, обладают более эффективным аппаратом репарации ДНК

Далее мы исследовали, каким образом секретомы от погибающих клеток могут влиять на процессы репарации ДНК в реципиентных клетках SKOV3. Так, нами была проведена оценка степени повреждения ДНК этих клеток с использованием анализа ДНК-комет. Этот анализ базируется на различной электрофоретической подвижности молекул ДНК в зависимости от степени их повреждения. Мы показали, что реципиентные клетки, прединкубированные с АпоС, характеризуются значительно меньшей степенью повреждения ДНК в ответ на цисплатин по сравнению с клетками, прединкубированными с контрольными секретомами (Рисунок 40).

Также нами было проведено иммуноцитохимическое окрашивание реципиентных клеток антителами против сшивок платины и ДНК, после чего было посчитано число фокусов окрашивания на одно ядро (Рисунок 40). В клетках, прединкубированных с АпоС, а затем обработанных цисплатином, число сшивок цисплатина с ДНК значительно меньше, чем в клетках, прединкубированных с контрольными секретомами, однако присутствует на ощутимом уровне. Таким образом, можно сделать вывод, что цисплатин проникает в клетки и даже образует сшивки с ДНК в реципиентных клетках, прединкубированных с АпоС, однако

репарация этих сшивок происходит эффективнее, что приводит к формированию устойчивости к цисплатину.

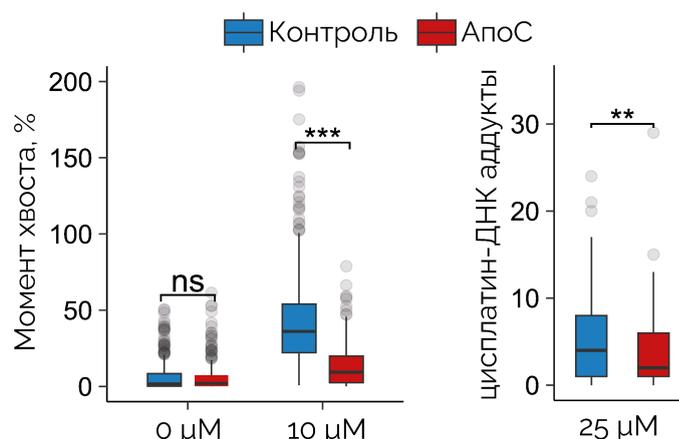


Рисунок 40. Момент хвоста (слева) и количество фокусов окрашивания сшивок цисплатин-ДНК (справа) в ядрах реципиентных опухолевых клеток, инкубированных с контрольными секретами (КС) или секретами от погибающих клеток (АпоС) и затем обработанными цисплатином на протяжении 48 и 24 часов, соответственно. Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “**” — p -value < 0,005; “***” — p -value < 0,00005, “ns” — p -value > 0,05.

Фосфорилирование гистона H2AX по остатку серина в положении 139 (γ H2AX) является маркером быстрого ответа клетки на двухцепочечные повреждения ДНК [286]. Мы инкубировали реципиентные клетки SKOV3 с секретами от погибающих и контрольных клеток на протяжении 72 часов, после чего к клеткам добавлялось 25 μ M цисплатина. Клетки фиксировали через 3 и 6 часов и окрашивали антителами против γ H2AX, после чего проводили подсчет количества фокусов фосфорилирования в ядрах клеток (Рисунок 41). Инкубация реципиентных клеток с АпоС приводила к снижению фокусов γ H2AX при обычных условиях без воздействия цисплатина (точка 0 часов), и при этом, приводила к тому, что реципиентные клетки быстрее реагировали на повреждение ДНК (точка 3 часа) цисплатином, тем самым, снижая вероятность запуска клеточной гибели.

Еще одним маркером, используемым при оценке репликативного стресса и ответа клетки на повреждение ДНК, является фосфорилированная форма белка RPA (по остатку серина в положении 33). RPA фосфорилируется киназами ATR и DNA-ПК в ответ на повреждение ДНК или при наличии большого числа одноцепочечной ДНК в клетке. Его фосфорилированная форма служит одним из ключевых факторов в координации белков репарации ДНК путем гомологичной рекомбинации (BRCA1, BRCA2 и RAD51) для восстановления двухцепочечных разрывов. Однако уровень фосфорилирования RPA может изменяться и в ходе нормального

течения клеточного цикла – так, он фосфорилируется в S-фазе клеточного цикла и дефосфорилируется в M-фазе [287].

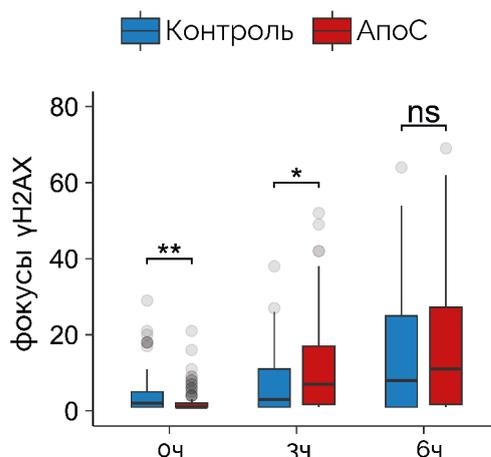


Рисунок 41. Количество фокусов γ H2AX в ядрах реципиентных клеток, инкубированных с контрольными секретами (КС) или секретами от погибающих клеток (АпоС) и обработанными цисплатином (25 μ M). Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “*” — p -value < 0,05; “****” — p -value < 0,00005.

Мы провели окрашивание реципиентных клеток антителами против phRPA через 3, 6 и 9 часов после добавления цисплатина (25 μ M) к реципиентным клеткам, прединкубированным с секретами на протяжении трех дней (Рисунок 42). Интересно, что уровень фосфорилирования RPA в клетках, инкубированных с АпоС, но до воздействия цисплатина, был значительно выше, чем в контрольных клетках, что может объясняться усиленной пролиферативной активностью реципиентных клеток, инкубированных с секретами от погибающих клеток. Однако далее, в ответ на добавление цисплатина, уровень phRPA в этих клетках был снижен, что говорит о меньшем количестве свободных участков одноцепочечной ДНК, образующейся в ходе гомологичной рекомбинации, вследствие меньшего числа разрывов ДНК.

Согласно нашим протеомным данным инкубация с АпоС приводит к повышенной представленности белков, участвующих в репарации ДНК, в реципиентных опухолевых клетках. Мы провели вестерн-блот анализ реципиентных клеток, прединкубированных с секретами или культуральной средой, на панель белков, необходимых на разных этапах репарации ДНК (Рисунок 43).

FOXМ1 — транскрипционный фактор, участвующий в процессах клеточного цикла и деления, репарации ДНК, регуляции апоптоза и ответа клетки на окислительный стресс [274–277]. FOXМ1 запускает транскрипцию генов, отвечающих за гомологичную репарацию, нехомологичное соединение концов, эксцизионную репарацию оснований, эксцизионную

репарацию нуклеотидов и репарацию ошибочно спаренных нуклеотидов. Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза I (TDP1) устраняет остатки тирозина, оставшиеся после действия топоизомеразы I, которые могут блокировать процесс репарации ДНК [288]. ДНК-лигаза I (LIG1) восстанавливает целостность фосфодиэфирного остова ДНК, соединяя разрывы, возникшие в одной из цепочек ДНК [289]. Rad51 – белок, связывающийся с одноцепочечной ДНК в ходе гомологичной репарации [290].

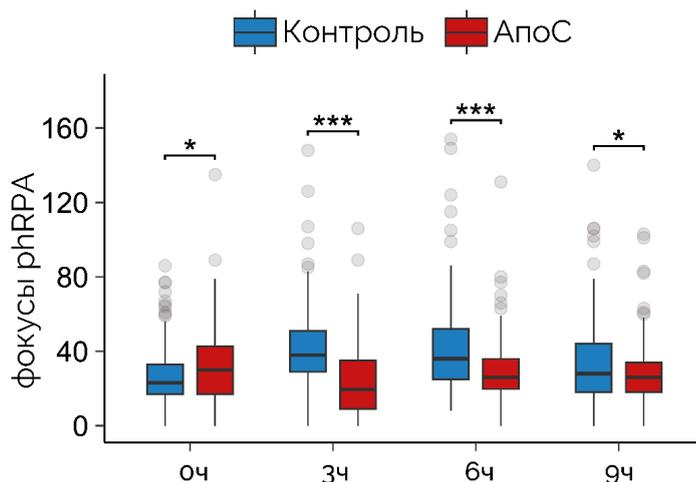


Рисунок 42. Количество фокусов фосфорилированной формы RPA в ядрах реципиентных клеток, инкубированных с контрольными секретами (КС) или секретами от погибающих клеток (АпоС) и обработанными цисплатином (25 μ M). Статистическая значимость была определена при помощи критерия Стьюдента, где “*” — p -value < 0,05; “***” — p -value < 0,0000005.

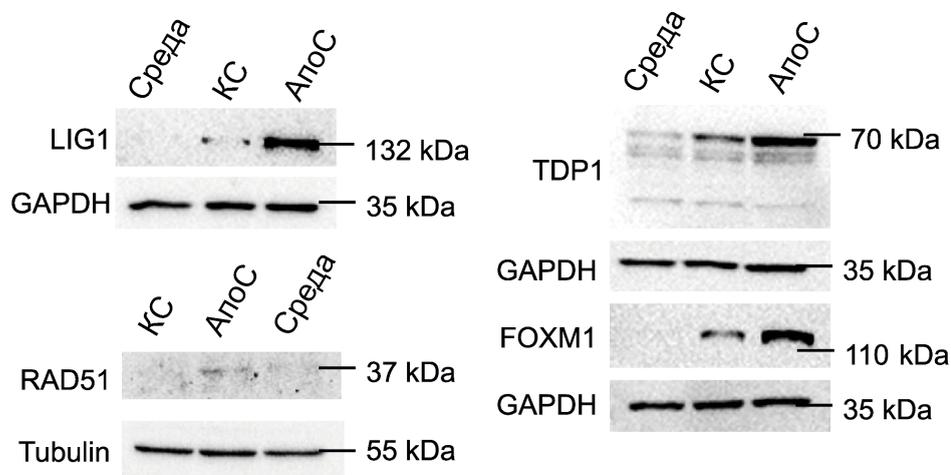


Рисунок 43. Вестерн-блот реципиентных клеток, инкубированных с секретами или культуральной средой на протяжении 72 часов.

Хорошо заметно, что, действительно, в ходе инкубации с АпоС в реципиентных клетках возрастает представленность белков, необходимых для успешной репарации поврежденной ДНК. Интересно, что этот эффект мы наблюдаем без добавления цисплатина к реципиентным клеткам. Можно предположить, что инкубация с секретами повышает устойчивость реципиентных клеток к повреждению ДНК за счёт повышения базового уровня белков, отвечающих за репарацию ДНК. Тем самым реципиентная клетка сокращает время ответа на повреждение ДНК за счёт отсутствия затрат на транскрипцию и трансляцию необходимых ей белков, что повышает её шансы на выживание.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Формирование устойчивости к лекарственной терапии является одной из основных проблем противоопухолевого лечения. На сегодняшний день в литературе широко описаны механизмы возникновения резистентности, но в основном данные работы сосредоточены на событиях, происходящих в масштабах одной клетки и не учитывают изменение пула сигнальных молекул, окружающих клетку. В ходе данной работы была проведена оценка вклада межклеточной коммуникации в возникновение устойчивости к химиотерапии на модели аденокарциномы яичников. Преимуществом этого исследования является возможность наблюдать процесс становления химиорезистентности как в условиях *ex vivo* (в ходе экспериментов с первичными культурами клеток и асцитными жидкостями), так и *in vitro* (в ходе экспериментов с кондиционными средами). Так, было показано, что межклеточная коммуникация, изменяющая на фоне химиотерапии, приводит к формированию более устойчивой к терапии популяции опухолевых клеток. В то же время, на моделях *in vitro* удалось обнаружить возможный механизм формирования химиорезистентности. Погибающие апоптозом опухолевые клетки секретируют во внеклеточное пространство ряд молекул (в том числе белков сплайсосомы), инкапсулированных во внеклеточные везикулы. Эти внеклеточные везикулы приводят к глобальной перестройке внутриклеточных молекулярных каскадов, связанных с регуляцией клеточного цикла (а именно удлинение S-фазы при воздействии цисплатина), а также активация путей репарации ДНК в реципиентных опухолевых клетках (Рисунок 44).

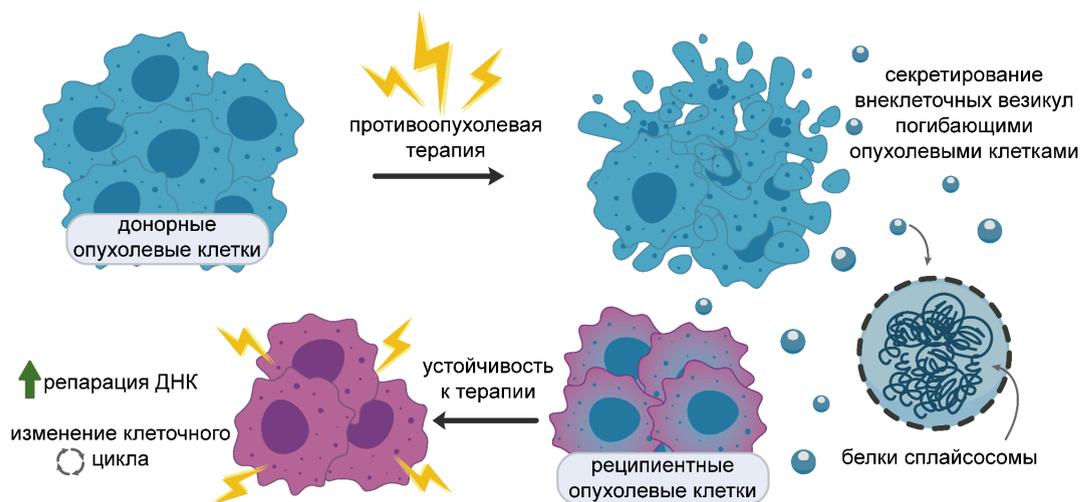


Рисунок 44. Схематическое изображение механизма приобретения химиорезистентности опухолевыми клетками в результате межклеточной коммуникации в условиях химиотерапии.

Более того, в ходе данной работы были определены особенности данного явления: i) приобретенная химиорезистентность сохраняется только при постоянной передаче сигнала от

погибающих клеток; ii) секретомы от опухолевых клеток, погибающих под действием ДНК-повреждающего агента цисплатина, приводят к устойчивости только к ДНК-повреждающим агентам.

Полученные результаты расширяют знания о поведении опухоли в ответ на химиотерапию и механизмах возникновения устойчивости к ней, а также могут лечь в основу разработки новых комбинированных терапевтических стратегий, нацеленных на подавление межклеточной коммуникации опухолевых клеток и предотвращающих формирование химиорезистентности.

ВЫВОДЫ

1. Секретомы от погибающих под действием химиотерапии опухолевых клеток приводят к формированию устойчивости опухолевых клеток к цисплатину *ex vivo* и *in vitro*.
2. Межклеточная коммуникация, опосредованная химиотерапией, не приводит к возникновению устойчивости к цисплатину у клеток эпителия фаллопиевой трубы hTERT FT282, кератиноцитов HaCaT и дермальных фибробластов.
3. Погибающие под действием цисплатина опухолевые клетки секретируют белки сплайсосомы, такие как DHX9, SYNCRIP, SRSF2, SRSF3, SRSF4, SNU13 и другие в составе внеклеточных везикул.
4. Секретомы от погибающих под действием цисплатина клеток повышают эффективность репарации ДНК в реципиентных опухолевых клетках, заранее подготавливая их к последующему действию химиотерапии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю благодарность своему научному руководителю к.б.н. Шендер Виктории Олеговне за чуткое руководство, бесценный опыт, поддержку и глубокую заинтересованность на всех этапах работы. Также хотелось бы поблагодарить коллектив лабораторий молекулярной онкологии, системной биологии и клеточной биологии ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА им. Лопухина за неоценимую помощь в преодолении трудностей, активное участие в обсуждении научных вопросов, моральную поддержку и дружественную обстановку. Особую благодарность выражаю чл.-корр. РАН, профессору РАН, д.б.н. Лагарьковой Марии Андреевне за помощь в выполнении работы и мотивацию в написании текста диссертации. Выражаю благодарность академику РАН, профессору, д.б.н. Говоруну Вадиму Марковичу за критические замечания и ценные советы по развитию научных вопросов. Благодарю д.х.н. Зиганшина Рустама Хусмановича за помощь в постановке методики масс-спектрометрического анализа. Благодарю Иванову Ольгу Максимовну и сотрудников Центра Коллективного Пользования ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА им. Лопухина за помощь в проведении экспериментов по секвенированию РНК. Благодарю к.б.н. Лукину Марию Максимовну за помощь в постановке методов флуоресцентной микроскопии и анализа комет. Благодарю Евтушенко Евгения Геннадьевича за помощь в выполнении анализа треков наночастиц. Благодарю академика РАН, д.м.н., профессора, заслуженного врача РФ Ашрафяна Льва Андреевича и к.м.н. Алешикову Ольгу Ивановну (ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова»), а также к.м.н. Слонова Андрея Владимировича (Клиническая Больница №123 ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА им. Лопухина) за предоставленный биологический материал.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Siegel R.L., Giaquinto A.N., Jemal A. Cancer statistics, 2024 // *CA Cancer J. Clin.* 2024. Vol. 74, № 1. P. 12–49.
2. Xiang Y. et al. A secretomic study on human hepatocellular carcinoma multiple drug-resistant cell lines // *Oncol. Rep.* 2015. Vol. 34, № 3. P. 1249–1260.
3. Bosse K. et al. Mass spectrometry-based secretome analysis of non-small cell lung cancer cell lines // *Proteomics.* 2016. Vol. 16, № 21. P. 2801–2814.
4. Böttger F. et al. Proteome analysis of non-small cell lung cancer cell line secretomes and patient sputum reveals biofluid biomarker candidates for cisplatin response prediction // *J. Proteomics.* 2019. Vol. 196. P. 106–119.
5. Bateman N.W. et al. Elevated AKAP12 in paclitaxel-resistant serous ovarian cancer cells is prognostic and predictive of poor survival in patients // *J. Proteome Res.* 2015. Vol. 14, № 4. P. 1900–1910.
6. Teng P.-N. et al. Identification of candidate circulating cisplatin-resistant biomarkers from epithelial ovarian carcinoma cell secretomes // *Br. J. Cancer.* 2014. Vol. 110, № 1. P. 123–132.
7. Yao L. et al. Discovery of IL-18 as a novel secreted protein contributing to doxorubicin resistance by comparative secretome analysis of MCF-7 and MCF-7/Dox // *PLoS One.* 2011. Vol. 6, № 9. P. e24684.
8. Wojtuszkiewicz A. et al. Exosomes Secreted by Apoptosis-Resistant Acute Myeloid Leukemia (AML) Blasts Harbor Regulatory Network Proteins Potentially Involved in Antagonism of Apoptosis // *Mol. Cell. Proteomics.* 2016. Vol. 15, № 4. P. 1281–1298.
9. Obenauf A.C. et al. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression // *Nature.* 2015. Vol. 520, № 7547. P. 368–372.
10. Pavlyukov M.S. et al. Apoptotic Cell-Derived Extracellular Vesicles Promote Malignancy of Glioblastoma Via Intercellular Transfer of Splicing Factors // *Cancer Cell.* 2018. Vol. 34, № 1. P. 119–135.e10.
11. Huang Q. et al. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy // *Nat. Med.* 2011. Vol. 17, № 7. P. 860–866.
12. Kurtova A.V. et al. Blocking PGE2-induced tumour repopulation abrogates bladder cancer chemoresistance // *Nature.* 2015. Vol. 517, № 7533. P. 209–213.
13. Källberg J. et al. Intratumor heterogeneity and cell secretome promote chemotherapy resistance and progression of colorectal cancer // *Cell Death Dis.* 2023. Vol. 14, № 5. P. 306.
14. Bock F.J. et al. Apoptotic stress-induced FGF signalling promotes non-cell autonomous resistance

- to cell death // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, № 1. P. 6572.
15. Alipour M. Molecular Mechanism of *Helicobacter pylori*-Induced Gastric Cancer // *J. Gastrointest. Cancer.* 2021. Vol. 52, № 1. P. 23–30.
 16. Surgery for cancer [Electronic resource] // National Cancer Institute. 2015. URL: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/surgery> (accessed: 27.04.2023).
 17. Gong L. et al. Application of Radiosensitizers in Cancer Radiotherapy // *Int. J. Nanomedicine.* 2021. Vol. 16. P. 1083–1102.
 18. Baskar R. et al. Cancer and radiation therapy: current advances and future directions // *Int. J. Med. Sci.* 2012. Vol. 9, № 3. P. 193–199.
 19. Database cancer drugs [Electronic resource] // Anticancer Fund. URL: <https://www.anticancerfund.org/database-cancer-drugs> (accessed: 10.07.2024).
 20. Rahman M. Metabolic pathways and chemotherapy drugs // *Frontiers in Drug Design & Discovery* / ed. Rahman M. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2016. P. 3–35.
 21. Ralhan R., Kaur J. Alkylating agents and cancer therapy // *Expert Opin. Ther. Pat.* Taylor & Francis, 2007. Vol. 17, № 9. P. 1061–1075.
 22. Galluzzi L. et al. Systems biology of cisplatin resistance: past, present and future // *Cell Death Dis.* 2014. Vol. 5, № 5. P. e1257.
 23. Timerbaev A.R. et al. Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: advances in characterization using modern analytical methodology // *Chem. Rev.* 2006. Vol. 106, № 6. P. 2224–2248.
 24. Barciszewska A.-M. et al. A New Epigenetic Mechanism of Temozolomide Action in Glioma Cells // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 8. P. e0136669.
 25. Wesolowski J.R., Rajdev P., Mukherji S.K. Temozolomide (Temodar) // *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 2010. Vol. 31, № 8. P. 1383–1384.
 26. Colvin O.M. An overview of cyclophosphamide development and clinical applications // *Curr. Pharm. Des.* 1999. Vol. 5, № 8. P. 555–560.
 27. Ahlmann M., Hempel G. The effect of cyclophosphamide on the immune system: implications for clinical cancer therapy // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2016. Vol. 78, № 4. P. 661–671.
 28. Kasper D.L. et al. *Harrison's Principles of Internal Medicine 20/E (Vol.1 & Vol.2)* (ebook). McGraw Hill Professional, 2018. 3790 p.
 29. Ciccolini J. et al. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as a mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2016. Vol. 78, № 1. P. 1–12.
 30. Longley D.B., Harkin D.P., Johnston P.G. 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical

- strategies // *Nat. Rev. Cancer*. 2003. Vol. 3, № 5. P. 330–338.
31. Kampan N.C. et al. Paclitaxel and Its Evolving Role in the Management of Ovarian Cancer // *Biomed Res. Int*. 2015. Vol. 2015. P. 413076.
 32. Di Cesare E. et al. Mitotic cell death induction by targeting the mitotic spindle with tubulin-inhibitory indole derivative molecules // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 12. P. 19738–19759.
 33. Dhyani P. et al. Anticancer potential of alkaloids: a key emphasis to colchicine, vinblastine, vincristine, vindesine, vinorelbine and vincamine // *Cancer Cell Int*. 2022. Vol. 22, № 1. P. 206.
 34. Dehshahri A. et al. Topoisomerase inhibitors: Pharmacology and emerging nanoscale delivery systems // *Pharmacol. Res*. 2020. Vol. 151. P. 104551.
 35. Talukdar A. et al. Topoisomerase I inhibitors: Challenges, progress and the road ahead // *Eur. J. Med. Chem*. 2022. Vol. 236. P. 114304.
 36. Jiao Q. et al. Advances in studies of tyrosine kinase inhibitors and their acquired resistance // *Mol. Cancer*. 2018. Vol. 17, № 1. P. 36.
 37. Modi V., Dunbrack R.L. Jr. Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2019. Vol. 116, № 14. P. 6818–6827.
 38. Wu P., Nielsen T.E., Clausen M.H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors // *Trends Pharmacol. Sci*. 2015. Vol. 36, № 7. P. 422–439.
 39. Cortes J.E. et al. Asciminib monotherapy in patients with chronic-phase chronic myeloid leukemia with the T315I mutation after ≥ 1 prior tyrosine kinase inhibitor: 2-year follow-up results // *Leukemia*. 2024. Vol. 38, № 7. P. 1522–1533.
 40. Sun J. et al. Mechanisms underlying therapeutic resistance of tyrosine kinase inhibitors in chronic myeloid leukemia // *Int. J. Biol. Sci*. 2024. Vol. 20, № 1. P. 175–181.
 41. Thomson R.J., Moshirfar M., Ronquillo Y. Tyrosine Kinase Inhibitors // *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing, 2023.
 42. Morales J. et al. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*. 2014. Vol. 24, № 1. P. 15–28.
 43. Hirschl N. et al. PARP Inhibitors: Strategic Use and Optimal Management in Ovarian Cancer // *Cancers*. 2024. Vol. 16, № 5.
 44. Li S. et al. The synthetic lethality of targeting cell cycle checkpoints and PARPs in cancer treatment // *J. Hematol. Oncol*. 2022. Vol. 15, № 1. P. 147.
 45. Bhamidipati D. et al. PARP inhibitors: enhancing efficacy through rational combinations // *Br. J. Cancer*. 2023. Vol. 129, № 6. P. 904–916.
 46. Topalian S.L., Taube J.M., Pardoll D.M. Neoadjuvant checkpoint blockade for cancer

- immunotherapy // *Science*. 2020. Vol. 367, № 6477.
47. Conlon K.C., Miljkovic M.D., Waldmann T.A. Cytokines in the Treatment of Cancer // *J. Interferon Cytokine Res.* 2019. Vol. 39, № 1. P. 6–21.
 48. Pan K. et al. CAR race to cancer immunotherapy: from CAR T, CAR NK to CAR macrophage therapy // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2022. Vol. 41, № 1. P. 119.
 49. Housman G. et al. Drug resistance in cancer: an overview // *Cancers* . 2014. Vol. 6, № 3. P. 1769–1792.
 50. Holohan C. et al. Cancer drug resistance: an evolving paradigm // *Nat. Rev. Cancer.* 2013. Vol. 13, № 10. P. 714–726.
 51. Dillekås H., Rogers M.S., Straume O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? // *Cancer Med.* 2019. Vol. 8, № 12. P. 5574–5576.
 52. Corrado G. et al. Optimizing treatment in recurrent epithelial ovarian cancer // *Expert Rev. Anticancer Ther.* 2017. Vol. 17, № 12. P. 1147–1158.
 53. Sjoquist K.M. et al. Progression-free survival as a surrogate endpoint for overall survival in modern ovarian cancer trials: a meta-analysis // *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2018. Vol. 10. P. 1758835918788500.
 54. Baghban R. et al. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance // *Cell Commun. Signal.* 2020. Vol. 18, № 1. P. 59.
 55. Madden E.C. et al. Tumour Cell Secretome in Chemoresistance and Tumour Recurrence // *Trends Cancer Res.* 2020. Vol. 6, № 6. P. 489–505.
 56. Liu D. et al. Mutational patterns in chemotherapy resistant muscle-invasive bladder cancer // *Nat. Commun.* 2017. Vol. 8, № 1. P. 2193.
 57. Stiehl T. et al. Clonal selection and therapy resistance in acute leukaemias: mathematical modelling explains different proliferation patterns at diagnosis and relapse // *J. R. Soc. Interface.* 2014. Vol. 11, № 94. P. 20140079.
 58. Kim C. et al. Chemoresistance Evolution in Triple-Negative Breast Cancer Delineated by Single-Cell Sequencing // *Cell.* 2018. Vol. 173, № 4. P. 879–893.e13.
 59. Venkatesan S. et al. Treatment-Induced Mutagenesis and Selective Pressures Sculpt Cancer Evolution // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2017. Vol. 7, № 8.
 60. Kim H. et al. Whole-genome and multisector exome sequencing of primary and post-treatment glioblastoma reveals patterns of tumor evolution // *Genome Res.* 2015. Vol. 25, № 3. P. 316–327.
 61. Kolodziejczyk A.A. et al. The technology and biology of single-cell RNA sequencing // *Mol. Cell.* 2015. Vol. 58, № 4. P. 610–620.
 62. Patch A.-M. et al. Whole-genome characterization of chemoresistant ovarian cancer // *Nature.*

2015. Vol. 521, № 7553. P. 489–494.
63. Szikriszt B. et al. A comprehensive survey of the mutagenic impact of common cancer cytotoxics // *Genome Biol.* 2016. Vol. 17. P. 99.
 64. Shnaider P.V. et al. New Insights into Therapy-Induced Progression of Cancer // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. Vol. 21, № 21.
 65. Lee H.W. et al. Single-cell RNA sequencing reveals the tumor microenvironment and facilitates strategic choices to circumvent treatment failure in a chemorefractory bladder cancer patient // *Genome Med.* 2020. Vol. 12, № 1. P. 47.
 66. Izar B. et al. A single-cell landscape of high-grade serous ovarian cancer // *Nat. Med.* 2020. Vol. 26, № 8. P. 1271–1279.
 67. Maynard A. et al. Therapy-Induced Evolution of Human Lung Cancer Revealed by Single-Cell RNA Sequencing // *Cell.* 2020. Vol. 182, № 5. P. 1232–1251.e22.
 68. Park S.R. et al. Single-Cell Transcriptome Analysis of Colon Cancer Cell Response to 5-Fluorouracil-Induced DNA Damage // *Cell Rep.* 2020. Vol. 32, № 8. P. 108077.
 69. Karimi Roshan M. et al. Role of AKT and mTOR signaling pathways in the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) process // *Biochimie.* 2019. Vol. 165. P. 229–234.
 70. Jin W. Role of JAK/STAT3 Signaling in the Regulation of Metastasis, the Transition of Cancer Stem Cells, and Chemoresistance of Cancer by Epithelial-Mesenchymal Transition // *Cells.* 2020. Vol. 9, № 1.
 71. Hu W. et al. IQGAP1 promotes pancreatic cancer progression and epithelial-mesenchymal transition (EMT) through Wnt/ β -catenin signaling // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 7539.
 72. Zahreddine H., Borden K.L.B. Mechanisms and insights into drug resistance in cancer // *Front. Pharmacol.* 2013. Vol. 4. P. 28.
 73. Yoshida A. et al. SLC36A1-mTORC1 signaling drives acquired resistance to CDK4/6 inhibitors // *Sci Adv.* 2019. Vol. 5, № 9. P. eaax6352.
 74. Muley H. et al. Drug uptake-based chemoresistance in breast cancer treatment // *Biochem. Pharmacol.* 2020. Vol. 177. P. 113959.
 75. Baxter D.E. et al. Neoadjuvant Endocrine Therapy in Breast Cancer Upregulates the Cytotoxic Drug Pump ABCG2/BCRP, and May Lead to Resistance to Subsequent Chemotherapy // *Clin. Breast Cancer.* 2018. Vol. 18, № 6. P. 481–488.
 76. Yu T. et al. GPER mediates decreased chemosensitivity via regulation of ABCG2 expression and localization in tamoxifen-resistant breast cancer cells // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2020. Vol. 506. P. 110762.
 77. Robey R.W. et al. Revisiting the role of ABC transporters in multidrug-resistant cancer // *Nat.*

- Rev. Cancer. 2018. Vol. 18, № 7. P. 452–464.
78. Gerstung M. et al. The evolutionary history of 2,658 cancers // *Nature*. 2020. Vol. 578, № 7793. P. 122–128.
 79. Harrison P.T., Vyse S., Huang P.H. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer // *Semin. Cancer Biol.* 2020. Vol. 61. P. 167–179.
 80. Sampera A. et al. HER-Family Ligands Promote Acquired Resistance to Trastuzumab in Gastric Cancer // *Mol. Cancer Ther.* 2019. Vol. 18, № 11. P. 2135–2145.
 81. Bray S.M. et al. Genomic characterization of intrinsic and acquired resistance to cetuximab in colorectal cancer patients // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9, № 1. P. 15365.
 82. Del Re M. et al. Implications of KRAS mutations in acquired resistance to treatment in NSCLC // *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, № 5. P. 6630–6643.
 83. Gornstein E.L. et al. BRCA2 Reversion Mutation Associated With Acquired Resistance to Olaparib in Estrogen Receptor-positive Breast Cancer Detected by Genomic Profiling of Tissue and Liquid Biopsy // *Clin. Breast Cancer*. 2018. Vol. 18, № 2. P. 184–188.
 84. Faraoni I., Graziani G. Role of BRCA Mutations in Cancer Treatment with Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) Inhibitors // *Cancers* . 2018. Vol. 10, № 12.
 85. Tassone P. et al. BRCA1 expression modulates chemosensitivity of BRCA1-defective HCC1937 human breast cancer cells // *Br. J. Cancer*. 2003. Vol. 88, № 8. P. 1285–1291.
 86. Kwa M. et al. Ovarian cancer in BRCA mutation carriers: improved outcome after intraperitoneal (IP) cisplatin // *Ann. Surg. Oncol.* 2014. Vol. 21, № 5. P. 1468–1473.
 87. Sakai W. et al. Secondary mutations as a mechanism of cisplatin resistance in BRCA2-mutated cancers // *Nature*. 2008. Vol. 451, № 7182. P. 1116–1120.
 88. Pishvaian M.J. et al. BRCA2 secondary mutation-mediated resistance to platinum and PARP inhibitor-based therapy in pancreatic cancer // *Br. J. Cancer*. 2017. Vol. 116, № 8. P. 1021–1026.
 89. Lorenzon I. et al. Identification and Characterization of a New Platinum-Induced TP53 Mutation in MDAH Ovarian Cancer Cells // *Cells*. 2019. Vol. 9, № 1.
 90. Williams D.S. et al. Overexpression of TP53 protein is associated with the lack of adjuvant chemotherapy benefit in patients with stage III colorectal cancer // *Mod. Pathol.* 2020. Vol. 33, № 3. P. 483–495.
 91. Brown R. et al. Poised epigenetic states and acquired drug resistance in cancer // *Nat. Rev. Cancer*. 2014. Vol. 14, № 11. P. 747–753.
 92. Romero-Garcia S., Prado-Garcia H., Carlos-Reyes A. Role of DNA Methylation in the Resistance to Therapy in Solid Tumors // *Front. Oncol.* 2020. Vol. 10. P. 1152.
 93. Ponnusamy L. et al. Role of cellular reprogramming and epigenetic dysregulation in acquired

- chemoresistance in breast cancer // CDR . 2019.
94. Heijink A.M. et al. Modeling of Cisplatin-Induced Signaling Dynamics in Triple-Negative Breast Cancer Cells Reveals Mediators of Sensitivity // Cell Rep. 2019. Vol. 28, № 9. P. 2345–2357.e5.
 95. Hoffman R.M., Yano S. Tumor-Specific S/G2-Phase Cell Cycle Arrest of Cancer Cells by Methionine Restriction // Methods Mol. Biol. 2019. Vol. 1866. P. 49–60.
 96. Zhou J., Giannakakou P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy // Curr. Med. Chem. Anticancer Agents. 2005. Vol. 5, № 1. P. 65–71.
 97. Beaumont K.A. et al. Cell Cycle Phase-Specific Drug Resistance as an Escape Mechanism of Melanoma Cells // J. Invest. Dermatol. 2016. Vol. 136, № 7. P. 1479–1489.
 98. Mao Q.-Q. et al. Resveratrol confers resistance against taxol via induction of cell cycle arrest in human cancer cell lines // Mol. Nutr. Food Res. 2010. Vol. 54, № 11. P. 1574–1584.
 99. Wang X. et al. Cell-cycle synchronization reverses Taxol resistance of human ovarian cancer cell lines // Cancer Cell Int. 2013. Vol. 13, № 1. P. 77.
 100. Yoshida S. et al. Hypoxia induces resistance to 5-fluorouracil in oral cancer cells via G(1) phase cell cycle arrest // Oral Oncol. 2009. Vol. 45, № 2. P. 109–115.
 101. Zheng H. et al. WEE1 inhibition targets cell cycle checkpoints for triple negative breast cancers to overcome cisplatin resistance // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. P. 43517.
 102. Sarin N. et al. Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest // PLoS One. 2017. Vol. 12, № 7. P. e0181081.
 103. Horibe S. et al. Cisplatin resistance in human lung cancer cells is linked with dysregulation of cell cycle associated proteins // Life Sci. 2015. Vol. 124. P. 31–40.
 104. Tormo E. et al. The miRNA-449 family mediates doxorubicin resistance in triple-negative breast cancer by regulating cell cycle factors // Sci. Rep. 2019. Vol. 9, № 1. P. 5316.
 105. Dongre A., Weinberg R.A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2019. Vol. 20, № 2. P. 69–84.
 106. Pradella D. et al. EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression // Mol. Cancer. 2017. Vol. 16, № 1. P. 8.
 107. Zhou P. et al. The epithelial to mesenchymal transition (EMT) and cancer stem cells: implication for treatment resistance in pancreatic cancer // Mol. Cancer. 2017. Vol. 16, № 1. P. 52.
 108. He Y. et al. FOXC2 promotes epithelial-mesenchymal transition and cisplatin resistance of non-small cell lung cancer cells // Cancer Chemother. Pharmacol. 2018. Vol. 82, № 6. P. 1049–1059.
 109. Chandra A. et al. Clonal ZEB1-Driven Mesenchymal Transition Promotes Targetable Oncologic

- Antiangiogenic Therapy Resistance // *Cancer Res.* 2020. Vol. 80, № 7. P. 1498–1511.
110. Marín-Aguilera M. et al. Epithelial-to-mesenchymal transition mediates docetaxel resistance and high risk of relapse in prostate cancer // *Mol. Cancer Ther.* 2014. Vol. 13, № 5. P. 1270–1284.
111. Creighton C.J. et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2009. Vol. 106, № 33. P. 13820–13825.
112. Weng C.-H. et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) beyond EGFR mutations per se is a common mechanism for acquired resistance to EGFR TKI // *Oncogene.* 2019. Vol. 38, № 4. P. 455–468.
113. Zhang Y. et al. The roles of ZEB1 in tumorigenic progression and epigenetic modifications // *Biomed. Pharmacother.* 2019. Vol. 110. P. 400–408.
114. Zhang P., Sun Y., Ma L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance // *Cell Cycle.* 2015. Vol. 14, № 4. P. 481–487.
115. Jiang Z.-S. et al. Epithelial-mesenchymal transition: potential regulator of ABC transporters in tumor progression // *J. Cancer.* 2017. Vol. 8, № 12. P. 2319–2327.
116. Wu Y. et al. UBE2C Induces Cisplatin Resistance via ZEB1/2-Dependent Upregulation of ABCG2 and ERCC1 in NSCLC Cells // *J. Oncol.* 2019. Vol. 2019. P. 8607859.
117. Zhang X. et al. ZEB1 confers chemotherapeutic resistance to breast cancer by activating ATM // *Cell Death Dis.* 2018. Vol. 9, № 2. P. 57.
118. Viswanathan V.S. et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway // *Nature.* 2017. Vol. 547, № 7664. P. 453–457.
119. Gubelmann C. et al. Identification of the transcription factor ZEB1 as a central component of the adipogenic gene regulatory network // *Elife.* 2014. Vol. 3. P. e03346.
120. Hausser J. et al. Tumor diversity and the trade-off between universal cancer tasks // *Nat. Commun.* 2019. Vol. 10, № 1. P. 5423.
121. Celià-Terrassa T. et al. Epithelial-mesenchymal transition can suppress major attributes of human epithelial tumor-initiating cells // *J. Clin. Invest.* 2012. Vol. 122, № 5. P. 1849–1868.
122. Tsuji T. et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth // *Cancer Res.* 2008. Vol. 68, № 24. P. 10377–10386.
123. Hoek K.S. et al. In vivo switching of human melanoma cells between proliferative and invasive states // *Cancer Res.* 2008. Vol. 68, № 3. P. 650–656.
124. Dominiak A. et al. Communication in the Cancer Microenvironment as a Target for Therapeutic Interventions // *Cancers.* 2020. Vol. 12, № 5.

125. Shi S. et al. Research of the mechanism on miRNA193 in exosomes promotes cisplatin resistance in esophageal cancer cells // *PLoS One*. 2020. Vol. 15, № 5. P. e0225290.
126. Crow J. et al. Exosomes as mediators of platinum resistance in ovarian cancer // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 7. P. 11917–11936.
127. Zhang F.-F. et al. Microvesicles mediate transfer of P-glycoprotein to paclitaxel-sensitive A2780 human ovarian cancer cells, conferring paclitaxel-resistance // *Eur. J. Pharmacol.* 2014. Vol. 738. P. 83–90.
128. Chen W.-X. et al. Exosomes from drug-resistant breast cancer cells transmit chemoresistance by a horizontal transfer of microRNAs // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, № 4. P. e95240.
129. Wei Y. et al. Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells // *Breast Cancer Res. Treat.* 2014. Vol. 147, № 2. P. 423–431.
130. Lv M.-M. et al. Exosomes mediate drug resistance transfer in MCF-7 breast cancer cells and a probable mechanism is delivery of P-glycoprotein // *Tumour Biol.* 2014. Vol. 35, № 11. P. 10773–10779.
131. Ning K. et al. UCH-L1-containing exosomes mediate chemotherapeutic resistance transfer in breast cancer // *J. Surg. Oncol.* 2017. Vol. 115, № 8. P. 932–940.
132. Yu D.-D. et al. Exosomes from adriamycin-resistant breast cancer cells transmit drug resistance partly by delivering miR-222 // *Tumour Biol.* 2016. Vol. 37, № 3. P. 3227–3235.
133. Santos J.C. et al. Exosome-mediated breast cancer chemoresistance via miR-155 transfer // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 829.
134. Wei F. et al. Exosomes derived from gemcitabine-resistant cells transfer malignant phenotypic traits via delivery of miRNA-222-3p // *Mol. Cancer.* 2017. Vol. 16, № 1. P. 132.
135. Bebawy M. et al. Membrane microparticles mediate transfer of P-glycoprotein to drug sensitive cancer cells // *Leukemia*. 2009. Vol. 23, № 9. P. 1643–1649.
136. Bouvy C. et al. Transfer of multidrug resistance among acute myeloid leukemia cells via extracellular vesicles and their microRNA cargo // *Leuk. Res.* 2017. Vol. 62. P. 70–76.
137. Zhang Q. et al. Exosomal transfer of p-STAT3 promotes acquired 5-FU resistance in colorectal cancer cells // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2019. Vol. 38, № 1. P. 320.
138. Corcoran C. et al. Docetaxel-resistance in prostate cancer: evaluating associated phenotypic changes and potential for resistance transfer via exosomes // *PLoS One*. 2012. Vol. 7, № 12. P. e50999.
139. Torreggiani E. et al. Multimodal transfer of MDR by exosomes in human osteosarcoma // *Int. J. Oncol.* 2016. Vol. 49, № 1. P. 189–196.
140. Qu L. et al. Exosome-Transmitted IncARSR Promotes Sunitinib Resistance in Renal Cancer by

- Acting as a Competing Endogenous RNA // *Cancer Cell*. 2016. Vol. 29, № 5. P. 653–668.
141. Vella L.J. et al. Intercellular Resistance to BRAF Inhibition Can Be Mediated by Extracellular Vesicle-Associated PDGFR β // *Neoplasia*. 2017. Vol. 19, № 11. P. 932–940.
142. Cesi G. et al. A new ALK isoform transported by extracellular vesicles confers drug resistance to melanoma cells // *Mol. Cancer*. 2018. Vol. 17, № 1. P. 145.
143. Fan J. et al. Chemoresistance Transmission via Exosome-Mediated EphA2 Transfer in Pancreatic Cancer // *Theranostics*. 2018. Vol. 8, № 21. P. 5986–5994.
144. Peak T.C. et al. Syntaxin 6-mediated exosome secretion regulates enzalutamide resistance in prostate cancer // *Mol. Carcinog*. 2020. Vol. 59, № 1. P. 62–72.
145. Watson D.C. et al. GAP43-dependent mitochondria transfer from astrocytes enhances glioblastoma tumorigenicity // *Nat Cancer*. 2023.
146. Burt R. et al. Activated stromal cells transfer mitochondria to rescue acute lymphoblastic leukemia cells from oxidative stress // *Blood*. 2019. Vol. 134, № 17. P. 1415–1429.
147. Sahinbegovic H. et al. Intercellular Mitochondrial Transfer in the Tumor Microenvironment // *Cancers*. 2020. Vol. 12, № 7.
148. Desir S. et al. Tunneling nanotube formation is stimulated by hypoxia in ovarian cancer cells // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 28. P. 43150–43161.
149. Lu J. et al. Tunneling nanotubes promote intercellular mitochondria transfer followed by increased invasiveness in bladder cancer cells // *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 9. P. 15539–15552.
150. Hekmatshoar Y. et al. The role of metabolism and tunneling nanotube-mediated intercellular mitochondria exchange in cancer drug resistance // *Biochem. J*. 2018. Vol. 475, № 14. P. 2305–2328.
151. Jiang M.-J. et al. Dying tumor cell-derived exosomal miR-194-5p potentiates survival and repopulation of tumor repopulating cells upon radiotherapy in pancreatic cancer // *Mol. Cancer*. 2020. Vol. 19, № 1. P. 68.
152. Samuel P. et al. Cisplatin induces the release of extracellular vesicles from ovarian cancer cells that can induce invasiveness and drug resistance in bystander cells // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci*. 2018. Vol. 373, № 1737.
153. Xiao X. et al. Exosomes: decreased sensitivity of lung cancer A549 cells to cisplatin // *PLoS One*. 2014. Vol. 9, № 2. P. e89534.
154. Takahashi K. et al. Involvement of extracellular vesicle long noncoding RNA (linc-VLDLR) in tumor cell responses to chemotherapy // *Mol. Cancer Res*. 2014. Vol. 12, № 10. P. 1377–1387.
155. Patel G.K. et al. Exosomes confer chemoresistance to pancreatic cancer cells by promoting ROS detoxification and miR-155-mediated suppression of key gemcitabine-metabolising enzyme, DCK

- // Br. J. Cancer. 2017. Vol. 116, № 5. P. 609–619.
156. Mikamori M. et al. MicroRNA-155 Controls Exosome Synthesis and Promotes Gemcitabine Resistance in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma // Sci. Rep. 2017. Vol. 7. P. 42339.
157. Kreger B.T. et al. The Enrichment of Survivin in Exosomes from Breast Cancer Cells Treated with Paclitaxel Promotes Cell Survival and Chemoresistance // Cancers . 2016. Vol. 8, № 12.
158. Aldonza M.B.D., Hong J.-Y., Lee S.K. Paclitaxel-resistant cancer cell-derived secretomes elicit ABCB1-associated docetaxel cross-resistance and escape from apoptosis through FOXO3a-driven glycolytic regulation // Exp. Mol. Med. 2017. Vol. 49, № 1. P. e286.
159. Khan S. et al. Survivin is released from cancer cells via exosomes // Apoptosis. 2011. Vol. 16, № 1. P. 1–12.
160. Wang X. et al. Chemotherapeutic drugs stimulate the release and recycling of extracellular vesicles to assist cancer cells in developing an urgent chemoresistance // Mol. Cancer. 2019. Vol. 18, № 1. P. 182.
161. Huang C.-Y. et al. HMGB1 promotes ERK-mediated mitochondrial Drp1 phosphorylation for chemoresistance through RAGE in colorectal cancer // Cell Death Dis. 2018. Vol. 9, № 10. P. 1004.
162. He S. et al. HMGB1 released by irradiated tumor cells promotes living tumor cell proliferation via paracrine effect // Cell Death Dis. 2018. Vol. 9, № 6. P. 648.
163. Tanzer M.C. et al. Quantitative and Dynamic Catalogs of Proteins Released during Apoptotic and Necroptotic Cell Death // Cell Rep. 2020. Vol. 30, № 4. P. 1260–1270.e5.
164. Matri M. et al. A Transient Pseudosenescent Secretome Promotes Tumor Growth after Antiangiogenic Therapy Withdrawal // Cell Rep. 2018. Vol. 25, № 13. P. 3706–3720.e8.
165. Ohanna M. et al. Secretome from senescent melanoma engages the STAT3 pathway to favor reprogramming of naive melanoma towards a tumor-initiating cell phenotype // Oncotarget. 2013. Vol. 4, № 12. P. 2212–2224.
166. Ohanna M. et al. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor- κ B-associated secretome (PNAS) // Genes Dev. 2011. Vol. 25, № 12. P. 1245–1261.
167. Sun X. et al. Senescence-associated secretory factors induced by cisplatin in melanoma cells promote non-senescent melanoma cell growth through activation of the ERK1/2-RSK1 pathway // Cell Death Dis. 2018. Vol. 9, № 3. P. 260.
168. Canino C. et al. SASP mediates chemoresistance and tumor-initiating-activity of mesothelioma cells // Oncogene. 2012. Vol. 31, № 26. P. 3148–3163.
169. Barker H.E. et al. The tumour microenvironment after radiotherapy: mechanisms of resistance and recurrence // Nat. Rev. Cancer. 2015. Vol. 15, № 7. P. 409–425.

170. Saleh R., Elkord E. Acquired resistance to cancer immunotherapy: Role of tumor-mediated immunosuppression // *Semin. Cancer Biol.* 2020. Vol. 65. P. 13–27.
171. Wu J. et al. Association between tumor-stroma ratio and prognosis in solid tumor patients: a systematic review and meta-analysis // *Oncotarget.* 2016. Vol. 7, № 42. P. 68954–68965.
172. Kramer C.J.H. et al. The prognostic value of tumour-stroma ratio in primary breast cancer with special attention to triple-negative tumours: a review // *Breast Cancer Res. Treat.* 2019. Vol. 173, № 1. P. 55–64.
173. Jiang M.-J. et al. Dark Side of Cytotoxic Therapy: Chemoradiation-Induced Cell Death and Tumor Repopulation // *Trends Cancer Res.* 2020. Vol. 6, № 5. P. 419–431.
174. Wang D. et al. Colorectal cancer cell-derived CCL20 recruits regulatory T cells to promote chemoresistance via FOXO1/CEBPB/NF- κ B signaling // *J Immunother Cancer.* 2019. Vol. 7, № 1. P. 215.
175. Rodriguez Y.I. et al. Sphingosine-1 Phosphate: A New Modulator of Immune Plasticity in the Tumor Microenvironment // *Front. Oncol.* 2016. Vol. 6. P. 218.
176. Mizuno R., Kawada K., Sakai Y. Prostaglandin E2/EP Signaling in the Tumor Microenvironment of Colorectal Cancer // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. Vol. 20, № 24.
177. Sahai E. et al. A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts // *Nat. Rev. Cancer.* 2020. Vol. 20, № 3. P. 174–186.
178. Fang Y. et al. Exosomal miRNA-106b from cancer-associated fibroblast promotes gemcitabine resistance in pancreatic cancer // *Exp. Cell Res.* 2019. Vol. 383, № 1. P. 111543.
179. Zhang H. et al. CAF secreted miR-522 suppresses ferroptosis and promotes acquired chemo-resistance in gastric cancer // *Mol. Cancer.* 2020. Vol. 19, № 1. P. 43.
180. Tao L. et al. Cancer-associated fibroblasts treated with cisplatin facilitates chemoresistance of lung adenocarcinoma through IL-11/IL-11R/STAT3 signaling pathway // *Sci. Rep.* 2016. Vol. 6. P. 38408.
181. Che Y. et al. Cisplatin-activated PAI-1 secretion in the cancer-associated fibroblasts with paracrine effects promoting esophageal squamous cell carcinoma progression and causing chemoresistance // *Cell Death Dis.* 2018. Vol. 9, № 7. P. 759.
182. Huber R.M. et al. DNA damage induces GDNF secretion in the tumor microenvironment with paracrine effects promoting prostate cancer treatment resistance // *Oncotarget.* 2015. Vol. 6, № 4. P. 2134–2147.
183. Hughes R. et al. Perivascular M2 Macrophages Stimulate Tumor Relapse after Chemotherapy // *Cancer Res.* 2015. Vol. 75, № 17. P. 3479–3491.
184. Yin Y. et al. The Immune-microenvironment Confers Chemoresistance of Colorectal Cancer

- through Macrophage-Derived IL6 // *Clin. Cancer Res.* 2017. Vol. 23, № 23. P. 7375–7387.
185. Yuan S. et al. Tumor-associated macrophage-derived exosomes promote EGFR-TKI resistance in non-small cell lung cancer by regulating the AKT, ERK1/2 and STAT3 signaling pathways // *Oncol Lett.* 2022. Vol. 24, № 4. P. 356.
186. Chuang H.-Y. et al. Preclinical Evidence of STAT3 Inhibitor Pacritinib Overcoming Temozolomide Resistance via Downregulating miR-21-Enriched Exosomes from M2 Glioblastoma-Associated Macrophages // *J Clin Med.* 2019. Vol. 8, № 7.
187. Wang H. et al. Exosomes Derived From Macrophages Enhance Aerobic Glycolysis and Chemoresistance in Lung Cancer by Stabilizing c-Myc via the Inhibition of NEDD4L // *Front Cell Dev Biol.* 2020. Vol. 8. P. 620603.
188. Yi Y. et al. Cancer-associated fibroblasts promote epithelial-mesenchymal transition and EGFR-TKI resistance of non-small cell lung cancers via HGF/IGF-1/ANXA2 signaling // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2018. Vol. 1864, № 3. P. 793–803.
189. Ma J. et al. Cancer-Associated Fibroblasts Promote the Chemo-resistance in Gastric Cancer through Secreting IL-11 Targeting JAK/STAT3/Bcl2 Pathway // *Cancer Res Treat.* 2019. Vol. 51, № 1. P. 194–210.
190. Shintani Y. et al. IL-6 Secreted from Cancer-Associated Fibroblasts Mediates Chemoresistance in NSCLC by Increasing Epithelial-Mesenchymal Transition Signaling // *J. Thorac. Oncol.* 2016. Vol. 11, № 9. P. 1482–1492.
191. Qiao Y. et al. IL6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes chemoresistance via CXCR7 in esophageal squamous cell carcinoma // *Oncogene.* 2018. Vol. 37, № 7. P. 873–883.
192. Zhai J. et al. Cancer-associated fibroblasts-derived IL-8 mediates resistance to cisplatin in human gastric cancer // *Cancer Lett.* 2019. Vol. 454. P. 37–43.
193. Zhang H. et al. Cancer-associated fibroblasts mediated chemoresistance by a FOXO1/TGFβ1 signaling loop in esophageal squamous cell carcinoma // *Mol. Carcinog.* 2017. Vol. 56, № 3. P. 1150–1163.
194. Au Yeung C.L. et al. Exosomal transfer of stroma-derived miR21 confers paclitaxel resistance in ovarian cancer cells through targeting APAF1 // *Nat. Commun.* 2016. Vol. 7. P. 11150.
195. Hu J.L. et al. CAFs secreted exosomes promote metastasis and chemotherapy resistance by enhancing cell stemness and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer // *Mol. Cancer.* 2019. Vol. 18, № 1. P. 91.
196. Ji R. et al. Exosomes derived from human mesenchymal stem cells confer drug resistance in gastric cancer // *Cell Cycle.* 2015. Vol. 14, № 15. P. 2473–2483.
197. Bliss S.A. et al. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Stimulate Cycling Quiescence and

- Early Breast Cancer Dormancy in Bone Marrow // *Cancer Res.* 2016. Vol. 76, № 19. P. 5832–5844.
198. Timaner M. et al. Therapy-Educated Mesenchymal Stem Cells Enrich for Tumor-Initiating Cells // *Cancer Res.* 2018. Vol. 78, № 5. P. 1253–1265.
199. Jia Z. et al. Adipose Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomal microRNA-1236 Reduces Resistance of Breast Cancer Cells to Cisplatin by Suppressing SLC9A1 and the Wnt/ β -Catenin Signaling // *Cancer Manag Res.* 2020. Vol. 12. P. 8733–8744.
200. Rojas V. et al. Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17, № 12.
201. Adam R.A., Adam Y.G. Malignant ascites: past, present, and future // *J. Am. Coll. Surg.* 2004. Vol. 198, № 6. P. 999–1011.
202. Kim S., Kim B., Song Y.S. Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer // *Cancer Sci.* 2016. Vol. 107, № 9. P. 1173–1178.
203. Shender V.O. et al. Proteome-metabolome profiling of ovarian cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication // *Mol. Cell. Proteomics.* 2014. Vol. 13, № 12. P. 3558–3571.
204. Finkernagel F. et al. Dual-platform affinity proteomics identifies links between the recurrence of ovarian carcinoma and proteins released into the tumor microenvironment // *Theranostics.* 2019. Vol. 9, № 22. P. 6601–6617.
205. Carroll M.J. et al. A Subset of Secreted Proteins in Ascites Can Predict Platinum-Free Interval in Ovarian Cancer // *Cancers* . 2022. Vol. 14, № 17.
206. Werner B. et al. Cell-free DNA is abundant in ascites and represents a liquid biopsy of ovarian cancer // *Gynecol. Oncol.* 2021. Vol. 162, № 3. P. 720–727.
207. Han M.-R. et al. Clinical Implications of Circulating Tumor DNA from Ascites and Serial Plasma in Ovarian Cancer // *Cancer Res. Treat.* 2020. Vol. 52, № 3. P. 779–788.
208. Cai J. et al. Exosomes in ovarian cancer ascites promote epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells by delivery of miR-6780b-5p // *Cell Death Dis.* 2021. Vol. 12, № 2. P. 210.
209. Wang W. et al. Integrated analysis of ascites and plasma extracellular vesicles identifies a miRNA-based diagnostic signature in ovarian cancer // *Cancer Lett.* 2022. Vol. 542. P. 215735.
210. Choi P.-W., Ng S.-W. The Functions of MicroRNA-200 Family in Ovarian Cancer: Beyond Epithelial-Mesenchymal Transition // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18, № 6.
211. Závěský L. et al. Ascites-Derived Extracellular microRNAs as Potential Biomarkers for Ovarian Cancer // *Reprod. Sci.* 2019. Vol. 26, № 4. P. 510–522.
212. Chen X. et al. Exosomes derived from hypoxic epithelial ovarian cancer deliver microRNA-940 to

- induce macrophage M2 polarization // *Oncol. Rep.* 2017. Vol. 38, № 1. P. 522–528.
213. Liu M. et al. Clinical Significance of Screening Differential Metabolites in Ovarian Cancer Tissue and Ascites by LC/MS // *Front. Pharmacol.* 2021. Vol. 12. P. 701487.
214. Gong Y. et al. Metabolic factors contribute to T-cell inhibition in the ovarian cancer ascites // *Int. J. Cancer.* 2020. Vol. 147, № 7. P. 1768–1777.
215. Xu Y. et al. Characterization of an ovarian cancer activating factor in ascites from ovarian cancer patients // *Clin. Cancer Res.* 1995. Vol. 1, № 10. P. 1223–1232.
216. Ojasalu K. et al. The lysophosphatidic acid-regulated signal transduction network in ovarian cancer cells and its role in actomyosin dynamics, cell migration and entosis // *Theranostics.* 2023. Vol. 13, № 6. P. 1921–1948.
217. Fang X. et al. Mechanisms for lysophosphatidic acid-induced cytokine production in ovarian cancer cells // *J. Biol. Chem.* 2004. Vol. 279, № 10. P. 9653–9661.
218. Huang X. et al. Preclinical detection of lysophosphatidic acid: A new window for ovarian cancer diagnostics // *Talanta.* 2022. Vol. 247. P. 123561.
219. Schwartz B.M. et al. Lysophospholipids increase interleukin-8 expression in ovarian cancer cells // *Gynecol. Oncol.* 2001. Vol. 81, № 2. P. 291–300.
220. Smicun Y. et al. S1P regulation of ovarian carcinoma invasiveness // *Gynecol. Oncol.* 2006. Vol. 103, № 3. P. 952–959.
221. Margioulas-Siarkou C. et al. Neoadjuvant chemotherapy in advanced-stage ovarian cancer - state of the art // *Prz Menopauzalny.* 2022. Vol. 21, № 4. P. 272–275.
222. Nikolaidi A. et al. Neoadjuvant treatment in ovarian cancer: New perspectives, new challenges // *Front. Oncol.* 2022. Vol. 12. P. 820128.
223. Pandey M. et al. Role of neoadjuvant chemotherapy on advanced epithelial ovarian cancer // *Nep. J. Cancer. Nepal Journals Online (JOL),* 2023. Vol. 7, № 1. P. 126–133.
224. Hirte H. et al. Neoadjuvant and Adjuvant Systemic Therapy for Newly Diagnosed Stage II-IV Epithelial Ovary, Fallopian Tube, or Primary Peritoneal Carcinoma: A Practice Guideline // *Curr. Oncol.* 2022. Vol. 29, № 1. P. 231–242.
225. Morand S. et al. Ovarian Cancer Immunotherapy and Personalized Medicine // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 12.
226. Matulonis U.A. et al. Ovarian cancer // *Nat Rev Dis Primers.* 2016. Vol. 2. P. 16061.
227. Patro R. et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression // *Nat. Methods.* 2017. Vol. 14, № 4. P. 417–419.
228. Sonesson C., Love M.I., Robinson M.D. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences // *F1000Res.* 2015. Vol. 4. P. 1521.

229. Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2 // *Genome Biol.* 2014. Vol. 15, № 12. P. 550.
230. STRING: functional protein association networks [Electronic resource]. URL: <https://string-db.org/cgi/input> (accessed: 23.10.2024).
231. Rappsilber J., Mann M., Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips // *Nat. Protoc.* 2007. Vol. 2, № 8. P. 1896–1906.
232. Шендер, В.О. Использование омиксных технологий для изучения особенностей коммуникации между клетками злокачественных опухолей: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.10: – Москва, 2018 – 142 с.
233. Matera A.G., Wang Z. A day in the life of the spliceosome // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. Vol. 15, № 2. P. 108–121.
234. Ivanova O.M. et al. Non-canonical functions of spliceosome components in cancer progression // *Cell Death Dis.* 2023. Vol. 14, № 2. P. 77.
235. Kim S. et al. Evaluating Tumor Evolution via Genomic Profiling of Individual Tumor Spheroids in a Malignant Ascites // *Sci. Rep.* 2018. Vol. 8, № 1. P. 12724.
236. Xiong X. et al. CXCL8 in Tumor Biology and Its Implications for Clinical Translation // *Front Mol Biosci.* 2022. Vol. 9. P. 723846.
237. Zhu Z. et al. CYP1B1 enhances the resistance of epithelial ovarian cancer cells to paclitaxel in vivo and in vitro // *Int. J. Mol. Med.* 2015. Vol. 35, № 2. P. 340–348.
238. Zhou L. et al. Design and synthesis of α -naphthoflavone chimera derivatives able to eliminate cytochrome P450 (CYP)1B1-mediated drug resistance via targeted CYP1B1 degradation // *Eur. J. Med. Chem.* 2020. Vol. 189. P. 112028.
239. Cheng H. et al. LncRNA UCA1 Enhances Cisplatin Resistance by Regulating CYP1B1-mediated Apoptosis via miR-513a-3p in Human Gastric Cancer // *Cancer Manag. Res.* 2021. Vol. 13. P. 367–377.
240. McFadyen M.C. et al. Cytochrome P450 CYP1B1 protein expression: a novel mechanism of anticancer drug resistance // *Biochem. Pharmacol.* 2001. Vol. 62, № 2. P. 207–212.
241. Cheng J.-C., Chang H.-M., Leung P.C.K. Egr-1 mediates epidermal growth factor-induced downregulation of E-cadherin expression via Slug in human ovarian cancer cells // *Oncogene.* 2013. Vol. 32, № 8. P. 1041–1049.
242. Wang C. et al. Targeting epiregulin in the treatment-damaged tumor microenvironment restrains therapeutic resistance // *Oncogene.* 2022. Vol. 41, № 45. P. 4941–4959.
243. Zhao D., Wang X., Zhang W. GDF15 predict platinum response during first-line chemotherapy

- and can act as a complementary diagnostic serum biomarker with CA125 in epithelial ovarian cancer // *BMC Cancer*. 2018. Vol. 18, № 1. P. 328.
244. Wang S.-F. et al. Growth differentiation factor 15 induces cisplatin resistance through upregulation of xCT expression and glutathione synthesis in gastric cancer // *Cancer Sci*. 2023. Vol. 114, № 8. P. 3301–3317.
245. He Y. et al. Growth differentiation factor 15 is required for triple-negative breast cancer cell growth and chemoresistance // *Anticancer Drugs*. 2023. Vol. 34, № 3. P. 351–360.
246. Haake M. et al. Tumor-derived GDF-15 blocks LFA-1 dependent T cell recruitment and suppresses responses to anti-PD-1 treatment // *Nat. Commun*. 2023. Vol. 14, № 1. P. 4253.
247. Avery J.T., Zhang R., Boohaker R.J. GLI1: A Therapeutic Target for Cancer // *Front. Oncol*. 2021. Vol. 11. P. 673154.
248. Campos Gudiño R., McManus K.J., Hombach-Klonisch S. Aberrant HMGA2 Expression Sustains Genome Instability That Promotes Metastasis and Therapeutic Resistance in Colorectal Cancer // *Cancers* . 2023. Vol. 15, № 6.
249. Natarajan S. et al. HMGA2 inhibits apoptosis through interaction with ATR-CHK1 signaling complex in human cancer cells // *Neoplasia*. 2013. Vol. 15, № 3. P. 263–280.
250. Shnaider P.V. et al. Expression level of CD117 (KIT) on ovarian cancer extracellular vesicles correlates with tumor aggressiveness // *Front Cell Dev Biol*. 2023. Vol. 11. P. 1057484.
251. Lin T.-Y. et al. Role of the NLRP3 Inflammasome: Insights Into Cancer Hallmarks // *Front. Immunol*. 2020. Vol. 11. P. 610492.
252. Wu D.-M. et al. The PAX6-ZEB2 axis promotes metastasis and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer through PI3K/AKT signaling // *Cell Death Dis*. 2019. Vol. 10, № 5. P. 349.
253. Zhang Y. et al. Oncogenic PAX6 elicits CDK4/6 inhibitor resistance by epigenetically inactivating the LATS2-Hippo signaling pathway // *Clin. Transl. Med*. 2021. Vol. 11, № 8. P. e503.
254. Chen G. et al. PLAU Promotes Cell Proliferation and Epithelial-Mesenchymal Transition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma // *Front. Genet*. 2021. Vol. 12. P. 651882.
255. Hosen S.M.Z. et al. Metastatic phenotype and immunosuppressive tumour microenvironment in pancreatic ductal adenocarcinoma: Key role of the urokinase plasminogen activator (PLAU) // *Front. Immunol*. 2022. Vol. 13. P. 1060957.
256. Gao Y. et al. PLAU is associated with cell migration and invasion and is regulated by transcription factor YY1 in cervical cancer // *Oncol. Rep*. 2023. Vol. 49, № 2.
257. Tan J. et al. Proteomics analysis uncovers plasminogen activator PLAU as a target of the STING pathway for suppression of cancer cell migration and invasion // *J. Biol. Chem*. 2023. Vol. 299, № 1. P. 102779.

258. Zheng Y. et al. PLAU promotes growth and attenuates cisplatin chemosensitivity in ARID1A-depleted non-small cell lung cancer through interaction with TM4SF1 // *Biol. Direct.* 2024. Vol. 19, № 1. P. 7.
259. Yang Z. et al. SOX11: friend or foe in tumor prevention and carcinogenesis? // *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2019. Vol. 11. P. 1758835919853449.
260. Zhang Y. et al. Overexpression of WNT5B promotes COLO 205 cell migration and invasion through the JNK signaling pathway // *Oncol. Rep.* 2016. Vol. 36, № 1. P. 23–30.
261. Zheng X.-L., Yu H.-G. Wnt6 contributes tumorigenesis and development of colon cancer via its effects on cell proliferation, apoptosis, cell-cycle and migration // *Oncol. Lett.* 2018. Vol. 16, № 1. P. 1163–1172.
262. Lehrich B.M., Liang Y., Fiandaca M.S. Foetal bovine serum influence on in vitro extracellular vesicle analyses // *J Extracell Vesicles.* 2021. Vol. 10, № 3. P. e12061.
263. Cheng Z. et al. Differential dynamics of the mammalian mRNA and protein expression response to misfolding stress // *Mol. Syst. Biol.* 2016. Vol. 12, № 1. P. 855.
264. Zheng D. et al. Emerging roles of Aurora-A kinase in cancer therapy resistance // *Acta Pharm Sin B.* 2023. Vol. 13, № 7. P. 2826–2843.
265. Shah E.T. et al. Inhibition of Aurora B kinase (AURKB) enhances the effectiveness of 5-fluorouracil chemotherapy against colorectal cancer cells // *Br J Cancer.* 2024. Vol. 130, № 7. P. 1196–1205.
266. Ma H.T., Poon R.Y.C. Aurora kinases and DNA damage response // *Mutat Res.* 2020. Vol. 821. P. 111716.
267. Gelot C. et al. Polθ is phosphorylated by PLK1 to repair double-strand breaks in mitosis // *Nature.* 2023. Vol. 621, № 7978. P. 415–422.
268. Kciuk M. et al. Cyclin-dependent kinases in DNA damage response // *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2022. Vol. 1877, № 3. P. 188716.
269. Liao H. et al. CDK1 promotes nascent DNA synthesis and induces resistance of cancer cells to DNA-damaging therapeutic agents // *Oncotarget.* 2017. Vol. 8, № 53. P. 90662–90673.
270. Liu Q. et al. To control or to be controlled? Dual roles of CDK2 in DNA damage and DNA damage response // *DNA Repair (Amst).* 2020. Vol. 85. P. 102702.
271. Shibata A., Jeggo P.A. ATM's Role in the Repair of DNA Double-Strand Breaks // *Genes (Basel).* 2021. Vol. 12, № 9.
272. Salguero I. et al. MDC1 PST-repeat region promotes histone H2AX-independent chromatin association and DNA damage tolerance // *Nat. Commun. Springer Science and Business Media LLC,* 2019. Vol. 10, № 1. P. 5191.

273. Ali R. et al. Ligase 1 is a predictor of platinum resistance and its blockade is synthetically lethal in XRCC1 deficient epithelial ovarian cancers // *Theranostics*. 2021. Vol. 11, № 17. P. 8350–8361.
274. Park H.J. et al. FoxM1, a critical regulator of oxidative stress during oncogenesis // *EMBO J*. 2009. Vol. 28, № 19. P. 2908–2918.
275. Chen X. et al. The forkhead transcription factor FOXM1 controls cell cycle-dependent gene expression through an atypical chromatin binding mechanism // *Mol. Cell. Biol. Informa UK Limited*, 2013. Vol. 33, № 2. P. 227–236.
276. Zona S. et al. FOXM1: an emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. Vol. 1839, № 11. P. 1316–1322.
277. Liao J. et al. FoxM1 Regulates Proliferation and Apoptosis of Human Neuroblastoma Cell through PI3K/AKT Pathway // *Fetal Pediatr. Pathol*. 2022. Vol. 41, № 3. P. 355–370.
278. Kwok J.M.-M. et al. FOXM1 confers acquired cisplatin resistance in breast cancer cells // *Mol Cancer Res*. 2010. Vol. 8, № 1. P. 24–34.
279. Kudo N. et al. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 1999. Vol. 96, № 16. P. 9112–9117.
280. Strous G.J. et al. Differential effects of brefeldin A on transport of secretory and lysosomal proteins // *J. Biol. Chem*. 1993. Vol. 268, № 4. P. 2341–2347.
281. Anczukow O. et al. Steering research on mRNA splicing in cancer towards clinical translation // *Nat Rev Cancer*. 2024.
282. Gao X. et al. Low RNA stability signifies strong expression regulatability of tumor suppressors // *Nucleic Acids Res*. 2023. Vol. 51, № 21. P. 11534–11548.
283. Rácz G.A. et al. Identification of new reference genes with stable expression patterns for gene expression studies using human cancer and normal cell lines // *Sci. Rep*. 2021. Vol. 11, № 1. P. 19459.
284. Rizi A.K. et al. Stability of Imbalanced Triangles in Gene Regulatory Networks of Cancerous and Normal Cells // *Front. Physiol*. 2020. Vol. 11. P. 573732.
285. Obata H. et al. Dynamic imaging analysis reveals Auger electron-emitting radio-cisplatin induces DNA damage depending on the cell cycle // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2022. Vol. 637. P. 286–293.
286. Fragkos M., Choleza M., Papadopoulou P. The Role of γ H2AX in Replication Stress-induced Carcinogenesis: Possible Links and Recent Developments // *Cancer Diagn Progn*. 2023. Vol. 3, № 6. P. 639–648.
287. Fousek-Schuller V.J., Borgstahl G.E.O. The Intriguing Mystery of RPA Phosphorylation in DNA

- Double-Strand Break Repair // *Genes* . 2024. Vol. 15, № 2.
288. Pommier Y. et al. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2) // *DNA Repair* . 2014. Vol. 19. P. 114–129.
289. Kiss R.C., Xia F., Acklin S. Targeting DNA Damage Response and Repair to Enhance Therapeutic Index in Cisplatin-Based Cancer Treatment // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. Vol. 22, № 15.
290. Lord C.J., Ashworth A. RAD51, BRCA2 and DNA repair: a partial resolution // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. Vol. 14, № 6. P. 461–462.