

## ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

DOI: 10.23868/202011006

**РОЛЬ АУТОФАГИИ В ОТВЕТЕ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИАЛЬНОГО РАКА ЯИЧНИКА НА ВОЗДЕЙСТВИЕ ЦИСПЛАТИНОМ И РАЗВИТИЕ ЦИСПЛАТИНОВОЙ УСТОЙЧИВОСТИ**А.М. Мазитова, Ю.А. Топчу, Л.А. Мингазова, Э.М. Биктагирова,  
З.И. Абрамова, Р.Т. Габбасов

Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, Россия

Поступила: 18.11.2019  
Принята к печати: 14.07.2020  
Опубликована on-line: 02.12.2020**ROLE OF AUTOPHAGY IN RESPONSE OF EPITHELIAL OVARIAN CANCER CELLS TO CISPLATIN TREATMENT AND CISPLATIN RESISTANCE**A.M. Mazitova\*, Ju.A. Topchu\*, L.A. Mingazova, E.M. Biktagirova, Z.I. Abramova, R.T. Gabbasov  
Kazan (Volga region) Federal University, Kazan, Russia

e-mail: rtgabbasov@gmail.com

При заболевании раком яичника доказана обратная корреляция между выживаемостью пациента и степенью метастазирования. Одним из основных методов лечения рака яичника является химиотерапия на основе платиновых препаратов, в число которых входит цисплатин. Однако у большинства пациентов с раком яичника развивается устойчивость к цисплатину. Целью работы было исследование роли макроаутофагии в ответе клеток эпителиального рака яичника линии Caov-3 на воздействие цисплатином, а также в развитии цисплатиновой устойчивости *in vitro*.

Уровень аутофагии оценивали методом иммуноблотинга путём детекции количества маркеров аутофагии LC3-I и LC3-II. Было показано, что воздействие цисплатином индуцирует аутофагию в клетках эпителиального рака яичника линии Caov-3 *in vitro*, а также увеличивает скорость клеточной миграции на двумерном субстрате. Добавление в среду фармакологического ингибитора аутофагии вортманнина привело к понижению цисплатин-индуцированной миграции клеток Caov-3. В клетках с развившейся цисплатиновой устойчивостью наблюдалось повышение базового уровня маркеров аутофагии.

Полученные данные указывают на роль аутофагии в развитии устойчивости клеток эпителиального рака яичника к платиносодержащим препаратам, а также на возможное участие цисплатин-индуцированной аутофагии в метастазировании опухолей яичника.

**Ключевые слова:** рак яичника, аутофагия, клеточная миграция, лекарственная устойчивость.

**Введение**

Заболеваемость раком яичников (РЯ) в 2018 г. превысила 295 000 случаев, летальный исход был зафиксирован у более 184 000 женщин в мире [1]. Относительная 5-летняя выживаемость при РЯ в мире не превышает 40% [2]. Это связано с затруднённой ранней диагностикой и невысокой эффективностью стандартного лечения: максимального хирургического удаления опухоли и химиотерапии, в первую очередь препаратами платины, в число которых входит цисплатин [3]. Более 90% случаев РЯ являются эпителиальными [2]. Несмотря на то, что поначалу клетки эпителиального рака яичника (ЭРЯ), как правило, проявляют чувствительность к цисплатину, в большинстве случаев опухоли рецидивируют в цисплатин-устойчивую форму [3].

Выживаемость при ЭРЯ напрямую связана со степенью метастазирования опухоли. Пятилетняя выживаемость пациенток без метастазов (менее 1/5 диагностированных случаев) составляет до 90% [4], с множественными метастазами в брюшной полости — менее 20% [5].

Термином «аутофагия» называют совокупность внутриклеточных молекулярных процессов, при которых повреждённые или неиспользуемые внутриклеточные компоненты окружаются фагосомой с двойной мембраной и подвергаются лизосомальной деградации. Аутофагия может приводить к одной из форм программируемой

Ovarian cancer survival rate is inversely associated with the extent of tumor metastasis. One of the main treatment approaches against ovarian cancer is employment of platinum based therapies, including cisplatin. Majority of ovarian cancer patients develop cisplatin resistance. We aimed to investigate roles for macroautophagy in response of epithelial ovarian cancer cells to cisplatin, including changes in cell motility, as well as in development of cisplatin resistance.

Cisplatin treatment induced autophagy in Caov-3 cells *in vitro*, as well as resulted in increased cell motility. Pharmacologic inhibition of autophagy by wortmannin eliminated the effect of cisplatin on cell motility. We further selected Caov-3 cells with acquired cisplatin resistance and observed elevated baseline expression of autophagy markers in the resistant cells.

Our data indicate a role for autophagy in development of cisplatin resistance by the EOC cells, as well as a potential role for cisplatin-induced autophagy in ovarian tumor metastasis.

**Keywords:** ovarian cancer, autophagy, cell motility, drug resistance.

клеточной гибели [6]. Описаны три типа аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия [6]. В настоящей работе под термином «аутофагия» мы подразумеваем макроаутофагию. В физиологических условиях аутофагия способствует выживанию клетки во время стрессов, таких как недостаток кислорода или питательных веществ. В процессе злокачественной трансформации клетки аутофагия поначалу играет цитопротекторную роль, в частности, нейтрализует активные формы кислорода, которые способны привести к повреждениям ДНК. По мере дальнейшей малигнизации трансформированные клетки, вероятно, используют аутофагию для адаптации к агрессивным условиям, к которым, кроме гипоксии и метаболического стресса, можно отнести и действие химиотерапевтических препаратов [7]. Показано, что индукция аутофагии может способствовать метастазированию различных солидных опухолей [8].

Повышение уровня аутофагии в ответ на культивирование в среде с содержанием цисплатина было показано на ряде раковых клеточных линий [9–11]. Для цисплатин-устойчивых раковых клеток, в том числе и рака яичника, было описано повышение базового уровня аутофагии [12, 13]. Следует отметить, что многие работы, рассматривающие взаимосвязь между аутофагией и цисплатиновой устойчивостью при ЭРЯ, выполнены на клеточных линиях SKOV3 и A2780 [12,

14, 15], молекулярный профиль которых недостаточно соответствует молекулярным особенностям клеток эпителиального рака яичников [16].

Целью работы было исследование роли макроаутофагии в ответе клеток эпителиального рака яичника линии Саov-3, в том числе изменение скорости их миграции, на воздействие цисплатином, а также в развитии цисплатиновой устойчивости *in vitro*.

## Материал и методы

### Дизайн эксперимента

Эксперименты были выполнены на клеточной линии высокоагрессивного ЭРЯ человека Саov-3. Роль аутофагии в ответе клеток на воздействие цисплатином оценивали по эффекту цисплатина (2,5; 5,0; 10,0 мкМ) на синтез маркеров аутофагии LC3-I и LC3-II методом иммуноблоттинга. Влияние цисплатин-индуцированной аутофагии на клеточную миграцию определяли по скорости миграции клеток в царапину, нанесенную в клеточном монослое. Для исследования роли аутофагии в развитии лекарственной устойчивости была получена сублиния Саov-3, резистентная к цисплатину, устойчивость клеток к цисплатину анализировали по показателю кратности резистентности.

### Клеточная линия

Перед началом работы была проведена верификация клеток линии Саov-3 по амплификации коротких tandemных повторов (GORDIZ, Россия). Клетки Саov-3 культивировали в питательной среде DMEM, содержащей 4,5 г/л глюкозы, 10% фетальной бычьей сыворотки и по 1% пенициллина, стрептомицина и L-глутамина, в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при стандартных условиях (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C). Для культуральной работы использовали реактивы фирмы Панэко (Россия).

### Иммуноблоттинг

Клетки культивировали до образования субконфлюэнтного монослоя (80–90%), лизировали в течение 30 мин. на льду в буфере RIPA (25 мМ Трис-HCl, pH 7,6; 150 мМ NaCl; 1% NP-40; 1% дезоксихолат натрия; 0,1% SDS), содержащем ингибиторы фосфатаз и протеаз (Thermo Fisher Scientific, США), лизат центрифугировали в течение 30 мин. при 15000 об/мин. и +4 °C, супернатант переносили в чистые пробирки. Общую концентрацию белка измеряли колориметрическим методом с использованием набора Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) и универсального планшетного ридера (TecanInfinite F PLEX, Швейцария) при длине волны 560 нм. Пробы для электрофореза готовили в буфере Laemmli: 0,278 М Трис-HCl, pH 6,8; 4,4% SDS; 40% глицерин; 1,43 М бета-меркаптоэтанол; 0,02% бромфенолового синь. Образцы прогревали 5 мин. при +95 °C. Белки разделяли в 15% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях при напряжении 120 V. Перенос на PVDF-мембрану производили в течение 2 ч. в буфере для переноса (25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 20% (v/v) метанол) при напряжении 100 V. После окончания переноса мембрану блокировали в 3% сухом обезжиренном молоке в TBST-буфере (50 мМ Трис; 150 мМ NaCl, pH 7,5; 0,1% Твин 20) в течение 1 ч. при комнатной температуре, инкубировали в растворе первичных антител (разведение согласно протоколу фирмы-производителя) в течение ночи при +4 °C, трижды промывали в буфере TBST, инкубировали в течение 1 ч. при комнатной температуре в растворе вторичных

антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, трижды промывали в TBST и проявляли с помощью системы гель-документирования ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, США) с применением хемиллюминесцентного субстрата Clarity ECL Substrate (Bio-Rad). Для проведения иммуноблоттинга использовали антитела, связывающиеся с обеими формами белка LC3 (LC3-I и LC3-II) (#4108, Cell Signaling, США). Загрузочный контроль, GAPDH, выявляли при помощи соответствующих антител (#PA1-987, Thermo Fisher Scientific, США).

### Анализ миграции клеток

Клетки высевали в 6-луночный планшет в культуральной среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки. При достижении субконфлюэнтности 85–90% на монослой наносили скарификацию (дефект) стерильным 10 мкл наконечником для автоматической пипетки. Лунки промывали PBS, добавляли цисплатин или вортманнин (6 мкМ и 100 нМ, соответственно) или оба вещества, разведённые в среде DMEM. Клетки инкубировали 24 ч. в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (5%, 37 °C). В начале и в конце эксперимента лунки фотографировали в пяти случайно выбранных полях зрения при помощи микроскопа EVOS FLoId Cell Imaging Station (Thermo Fisher Scientific, США). Скорость клеточной миграции оценивали по усредненному показателю пройденного расстояния в пикселях.

### Получение клеток Саov-3, устойчивых к цисплатину

Клетки Саov-3 высевали в количестве  $3 \times 10^5$  на лунку в 2 мл питательной среды DMEM в 6-луночные планшеты, культивировали до образования субконфлюэнтного монослоя (70–80%), добавляли цисплатин в концентрации 0,5 мкМ, инкубировали в течение 72 ч., меняли среду с цисплатином на среду без цисплатина и инкубировали еще 72 ч. При жизнеспособности клеток более 50% и отсутствии очевидных морфологических изменений, культивирование клеток в среде с содержанием цисплатина повторяли. В следующем цикле концентрацию цисплатина увеличивали в 1,5 раза. В таком режиме клетки культивировали в течение 6 мес., после чего определяли их жизнеспособность. Контролем служили клетки родительской линии, которые культивировали в тех же условиях. Устойчивость клеток к цисплатину проверяли по показателю кратности резистентности — соотношению показателя полумаксимального ингибирования IC50 устойчивой линии к IC50 родительской линии.

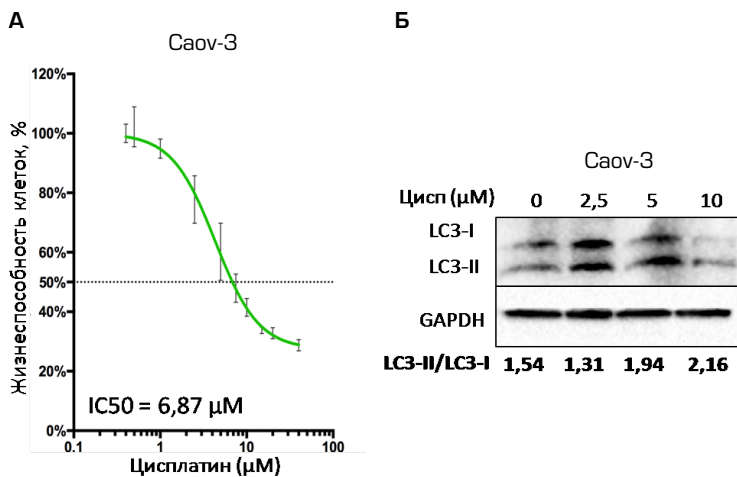
### Статистический анализ

Статистический анализ данных клеточной миграции проводили при помощи компьютерной программы Graph Pad Prism 6. Использовали непараметрический ANOVA тест (критерий Краскела-Уоллеса). Статистически значимыми считали результаты со значением  $p < 0,05$ .

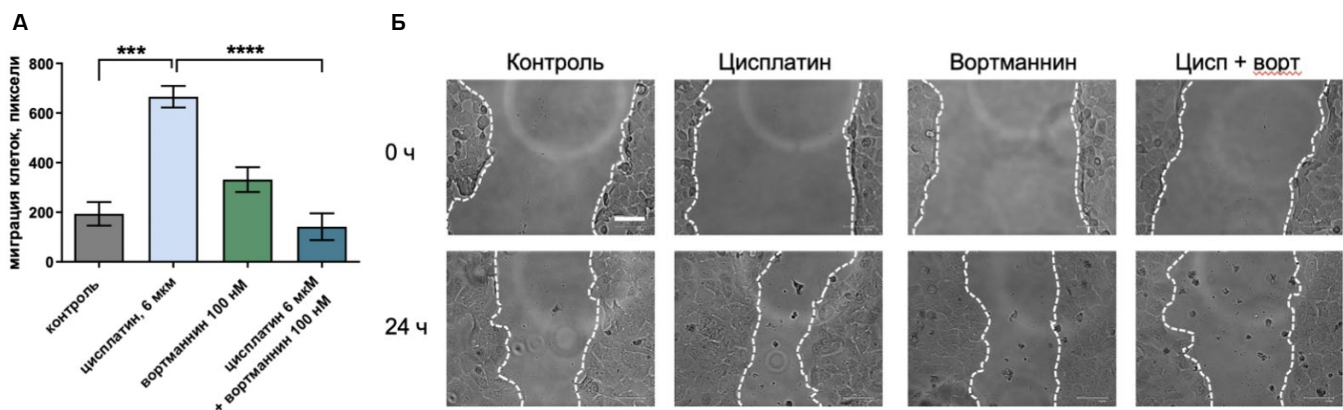
## Результаты и обсуждение

### Эффект цисплатина на индукцию аутофагии в клетках ЭРЯ

Уровень аутофагии оценивали методом иммуноблоттинга путём детекции количества белка LC3, который присутствует в клетке в двух формах: свободной — LC3-I и связанной с мембраной фагофоры — LC3-II.



**Рис. 1.** Индукция аутофагии в клетках ЭРЯ цисплатином: А — IC50 цисплатина для клеточной линии Caov-3, инкубирование в среде с различными концентрациями цисплатина в течение 72 ч., значение среднего со стандартным отклонением; Б — индукция аутофагии в клетках Caov-3 цисплатином, инкубирование в среде с цисплатином в течение 12 ч., соотношения значений уровня синтеза LC3-II/LC3-I для данной концентрации представлены под фотографиями иммуноблотов



**Рис. 2.** Результат оценки миграционной активности клеток ЭРЯ на двумерном субстрате при культивировании в среде с цисплатином: А — квантификация миграции клеток Caov-3, значение среднего из трёх независимых экспериментов со стандартным отклонением; Б — примеры микрофотографий дефекта монослоя в начале и в конце эксперимента; фронт мигрирующих клеток отмечен белым пунктиром; шкала — 125 мкм; \*\*\* —  $p < 0,001$ , \*\*\*\* —  $p < 0,0001$

LC3-I и LC3-II используются как маркеры аутофагии, уровень белка LC3-II пропорционален количеству аутофагосом в клетке, повышение соотношения количества связанной формы белка LC3-II к цитозольной форме LC3-I говорит об активации аутофагии [17].

Литературные данные подтверждают индукцию аутофагии под действием различных классов лекарственных препаратов [18], в том числе цисплатина [9, 10, 13]. Предполагают, что в присутствии цитотоксичных препаратов аутофагия может играть цитопротекторную роль и повышать жизнеспособность клеток [19]. Индукция аутофагии цисплатином была показана на клеточных линиях нескольких видов рака, в том числе ЭРЯ [12, 13]. В нашем исследовании концентрация IC50 цисплатина для клеточной линии Caov-3 равнялась 6,87 μM (рис. 1А). Оценка изменения уровня маркеров аутофагии при инкубации клеток данной линии в среде, содержащей различные концентрации цисплатина (меньше, приблизительно равной и больше, чем IC50; см. рис. 1Б), выявила дозозависимое повышение соотношения LC3-II/LC3-I в клетках линии Caov-3 после инкубации в течение 12 ч., что свидетельствует об индукции аутофагии и согласуется с более ранними публикациями [20, 21].

### Влияние цисплатин-индуцированной аутофагии на подвижность клеток ЭРЯ

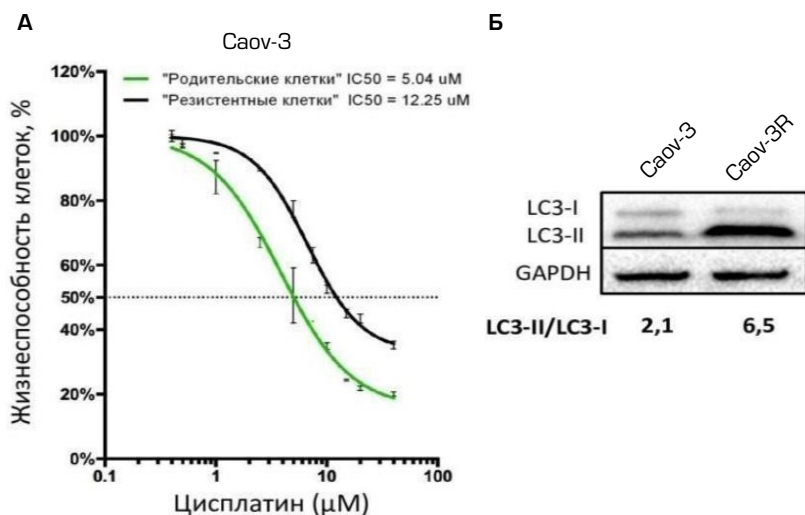
При определении влияния индуцированной цисплатином аутофагии на клеточную миграцию был проведен классический анализ миграции клеток в механически

нанесенный дефект монослоя. Для проверки участия в данном процессе аутофагии в эксперимент был включен фармакологический ингибитор аутофагии вортманнин — ингибитор PI3K, блокирующий секвестрацию — начальный этап аутофагии [22].

Через 24 ч. инкубации клеток в среде с цисплатином было выявлено, что скорость миграции клеток увеличилась по сравнению с контролем (рис. 2А; примеры микрофотографий дефекта монослоя — рис. 2Б). Инкубирование клеток в среде, содержащей только ингибитор аутофагии вортманнин, не привело к статистически значимым изменениям в миграции клеток Caov-3 по сравнению с контролем (инкубация клеток в среде без цисплатина и вортманнина). При культивировании клеток в среде, содержащей цисплатин и вортманнин, было отмечено значительное снижение миграционной способности клеток по сравнению с клетками, которые подвергались воздействию только цисплатина. Полученные результаты подтверждают, что аутофагия участвует в ответе клеток ЭРЯ на воздействие цисплатином, в том числе может влиять на миграцию, индуцированную данным препаратом, и позволяют предположить, что аутофагия, индуцированная цисплатином, может способствовать метастазированию ЭРЯ.

### Оценка уровня аутофагии в клетках ЭРЯ, устойчивых к цисплатину

В полученных клетках Caov-3R, устойчивых (resistant — устойчивые) к цисплатину, концентрация IC50 цисплатина в 2,43 раза превысила



**Рис. 3.** Уровень синтеза маркеров аутофагии в клетках ЭРЯ с развитой устойчивостью к цисплатину: А — IC<sub>50</sub> в клетках родительской линии Caov-3 (5,04 мкМ) и клетках резистентной линии Caov-3R (12,25 мкМ); средние значения, полученные в трёх независимых экспериментах, со стандартными отклонениями; Б — повышение соотношения уровня синтеза LC3-II/LC3-I в цисплатин-резистентных клетках ЭРЯ

IC<sub>50</sub> родительской линии и составила через 72 ч. инкубирования 12,25 мкМ в опыте и 5,04 мкМ в контроле (рис. 3А). В резистентных клетках было обнаружено троекратное повышение базового уровня синтеза LC3-II относительно LC3-I (рис. 3Б). Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными [12, 13] и подтверждают участие аутофагии в развитии устойчивости клеток ЭРЯ к цисплатину.

### Заключение

В отличие от некоторых ранее опубликованных работ, настоящее исследование проведено на клеточной линии Caov-3, отражающей молекулярные особенности клеток ЭРЯ [16]. Показана прямая корреляция между цисплатин-индуцированной аутофагией и миграцией клеток ЭРЯ *in vitro*. Важным результатом является получение резистентной клеточной линии, на которой можно будет изучать молекулярные механизмы влияния аутофагии

на функциональные особенности клеток ЭРЯ при воздействии цисплатином.

### Благодарности

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-315-00317. Авторы выражают признательность к.б.н. И.Г. Серебряйскому за комментарии на этапе планирования работы и обсуждение полученных результатов, к.б.н. А.А. Киселёвой за конструктивную критику полученных результатов, их оформление, коррекцию текста рукописи и Т.М. Габбасову за коррекцию текста рукописи.

### Вклад авторов

Дизайн экспериментов: РГ, ЗА; проведение экспериментов: АМ, ЮТ, ЛМ, ЭБ; анализ данных: РГ, АМ, ЮТ; подготовка рисунков: АМ, ЮТ, РГ, ЛМ; работа над текстом: РГ, ЗА. А. Мазитова и Ю. Топчу внесли в работу равный вклад.

### ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]:

- Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *A Cancer J. Clinicians* 2018; 68(IV): 387–506.
- Reid B.M., Permut J.B., Sellers T.A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol. & Med.* 2017; 14(1): 9–32.
- Cortez A.J., Tudrej P., Kujava K.M. et al. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2018; 81(1): 17–38.
- Bast R.C., Jr, Hennessy B., Mills G.B. The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature reviews Cancer* 2009; 9(6): 415–28.
- Freedman R.S., Deavers M., Liu J. et al. Peritoneal inflammation — A microenvironment for Epithelial Ovarian Cancer (EOC). *J. Transl. Med.* 2004; 2(1): 23.
- Рябая О.О., Егорова А.В., Степанова Е.В. Роль аутофагии в механизмах гибели опухолевых клеток. *Успехи современной биологии* 2015; 135(II2): 177–88. [Ryabaya O.O., Egorova A.V., Stepanova E.V. The Role of Autophagy in Mechanisms of Tumor Cell Death. *Advances in Modern Biology* 2015; 135(II2): 177–88].
- Peracchio C., Alabiso O., Valente G. et al. Involvement of autophagy in ovarian cancer: a working hypothesis. *J. Ovarian Res.* 2012; 5: 22.
- Mowers E., Sharifi M., Macleod K. Autophagy in cancer metastasis. *Oncogene* 2017; 36: 1619–30.
- Takahashi A., Kimura T., Takabatake Y. et al. Autophagy guards against cisplatin-induced acute kidney injury. *Am.J. Pathol.* 2012; 180: 517–25.
- Chen J., Zhang L., Zhou H. et al. Inhibition of autophagy promotes cisplatin-induced apoptotic cell death through Atg5 and Beclin 1 in A549 human lung cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 2018; 17(V): 6859–65.
- Fan Z., Huangfu X., Liu Z. Effect of autophagy on cisplatin caused bladder cancer cell apoptosis. *Panminerva Med.* 2016; 59: 1–8.
- Bao L., Jaramillo M.C., Zhang Z. Induction of autophagy contributes to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. *Mol. Med. Rep.* 2014; 11(1): 91–8.
- Wang J., Wu G.S. Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *J. Biol. Chem.* 2014; 289: 17163–73.
- Zhu J., Zheng Y., Zhang H. et al. Low concentration of chloroquine enhanced efficacy of cisplatin in the treatment of human ovarian cancer dependent on autophagy. *Am.J. Transl. Res.* 2017; 9(IX): 4046–58.
- He J., Yu J.J., Xu Q. Down regulation of ATG14 by EGR1-MIR152 sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis by inhibiting cyto-protective autophagy. *Autophagy* 2015; 11(III): 373–84.
- Dorncke S., Sinha R., Levine D.A. et al. Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles. *Nat. Commun.* 2013; 4: 2126.
- Klionsky D.J., Abdelmohsen K., Abe A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 2016; 12: 1–222.
- Han W., Pan H., Chen Y. et al. EGFR Tyrosine Kinase Inhibitors Activate Autophagy as a Cytoprotective Response in Human Lung Cancer Cells. *PLoS One* 2011; 6: 18691.
- Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* 2011; 333: 1109–12.
- Wu T., Liang X., Wang M.C. et al. Autophagy facilitates lung adenocarcinoma resistance to cisplatin. *Drug Des. Devel. Ther.* 2015; 9: 6421–31.
- Chen X., Zhang L., Ding S. et al. Cisplatin combination drugs induce autophagy in HeLa cells and interact with HSA via electrostatic binding. *RSC Adv.* 2017; 7: 22270–9.
- Yang Y.P., Hu L.F., Zheng H.F. et al. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta pharmacol. Sinica* 2013; 34(5): 625–35.