

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ  
КЛИНИЧЕСКОЙ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЛИМФОЛОГИИ –  
ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР ИНСТИТУТ ЦИТОЛОГИИ И ГЕНЕТИКИ  
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

На правах рукописи



**Таскаева Юлия Сергеевна**

**АУТОФАГИЯ В КЛЕТКАХ ГЕПАТОЦЕЛЛЮЛЯРНОЙ  
КАРЦИНОМЫ, ИНДУЦИРОВАННАЯ ВВЕДЕНИЕМ  
КАРБОНАТА ЛИТИЯ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

**Научный руководитель:**  
Доктор биологических наук,  
профессор Бгатова Н.П.

Новосибирск 2018

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Гепатоцеллюлярная карцинома.....	11
1.1.1 Эпидемиология.....	11
1.1.2 Статистика заболеваемости и смертности в РФ и НСО.....	11
1.1.3 Факторы риска и защитные факторы.....	13
1.1.4 Скрининг и диагностика.....	13
1.1.5 Методы лечения.....	14
1.1.6 Гетерогенность ГЦК.....	16
1.2 Аутофагия.....	17
1.2.1 Общие сведения.....	17
1.2.2 Макроаутофагия млекопитающих.....	19
1.2.3 Сигнальные пути, регулирующие аутофагию.....	24
1.2.4 Аутофагия и рак.....	26
1.3 Литий: применение в медицине, биологические свойства.....	28
1.3.1 Исторические аспекты применения солей лития в медицине.....	28
1.3.2 Литий в современной медицине .....	29
1.3.3 Биологические свойства: фармакокинетика и фармакодинамика...30	30
1.3.4 Транспорт через биологические мембраны.....	31
1.3.5 Клеточные мишени.....	31
1.3.6 Литий и рак.....	33
1.4. Заключение по литературному обзору.....	35
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	37
ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	45
3.1 Анализ влияния карбоната лития на популяцию клеток Г-29 в эксперименте <i>in vitro</i> .....	45
3.1.1 Оценка влияния карбоната лития на жизнеспособность, клеточный цикл и гибель клеток Г-29.....	45

3.1.2 Ультраструктурная организация клеток Г-29 и изучение морфологии клеток-мишеней карбоната лития.....	47
3.1.3 Влияние карбоната лития на развитие аутофагии <i>in vitro</i> .....	52
3.2 Анализ влияния карбоната лития на популяцию клеток Г-29 в эксперименте <i>in vivo</i> .....	56
3.2.1 Ультраструктурная организация и анализ распределения клеток Г-29 на степени дифференцированности.....	56
3.2.2 Влияние карбоната лития на развитие аутофагии <i>in vivo</i> .....	64
ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	71
ВЫВОДЫ.....	83
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	85
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	88

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Аутофагия – это внутриклеточный механизм изоляции и деградации субклеточных компонентов в лизосомах для снабжения клетки энергией и пластическим материалом (Parzych, K. R., Klionsky, D. J., 2014; Bento, C. F. et al., 2016). Выделяют три типа аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия. Макроаутофагия (далее – аутофагия) – это тип аутофагии, при котором изолируемый материал (груз) секвестрируется сначала в специфические вакуоли, окруженные двойной мембраной – аутофагосомы, затем эти вакуоли сливаются с лизосомами с образованием аутолизосом, где полученный груз деградируется под действием лизосомальных ферментов. При микроаутофагии деградируемый груз попадает непосредственно в лизосому путем инвагинации лизосомальной мембраны, при шаперон-опосредованной аутофагии груз доставляется в лизосому при помощи специфических белков-переносчиков, шаперонов.

Роль аутофагии в канцерогенезе неоднозначна (Пархитько, А. А., Фаворова О. О., Хенске, Э. П., 2013; Ковалева, О. В., Шитова, М. С., Зборовская, И. Б., 2014): с одной стороны, известно, что аутофагия может способствовать выживаемости раковых клеток в условиях стресса или недостатка питательных веществ; с другой стороны, аутофагия может выступать в роли опухолевого супрессора, стимулируя аутофагическую гибель раковых клеток (Zhi, X., Zhong, Q., 2015).

Проблема индукции гибели опухолевых клеток в настоящее время является одним из актуальных направлений в современных медико-биологических исследованиях. Сложность решения данной проблемы определяется гетерогенностью популяции опухолевых клеток, наличием стволовых раковых клеток и клеток, находящихся на разных стадиях клеточного цикла, а также существованием различных сигнальных путей и множества сигнальных молекул, участвующих в регуляции клеточной гибели – апоптоза, аутофагической гибели и некроза (Roy, S., Debnath, J.,

2010; Eskelinen, E. L., 2011). Имеющиеся сведения о взаимосвязи аутофагии и апоптоза также неоднозначны (Рябая, О. О., Егорова, А. В., Степанова, Е. В., 2015): показано, что цитотоксические сигналы могут индуцировать аутофагию в клетках, устойчивых к апоптозу; но развитие аутофагии может и стимулировать апоптоз (Booth, L. A., Tavallai, S., 2014; Mukhopadhyay, S., Panda, P. K., 2014; Cooper, K. F., 2018).

Одной из наиболее агрессивных и устойчивых к лекарственной терапии опухолей человека является гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК) (Germano, D., Daniele, B., 2014; Song, M. J., Bae, S. H., 2014). Терапия ГЦК включает в себя хирургические и нехирургические методы (абляционные методики, химио- и радиоэмболизация, лучевая терапия и системная химиотерапия). Системная терапия рассматривается для пациентов с распространенной формой ГЦК, к которым хирургическое лечение уже не может быть применено (Hartke, J., Johnson, M., Ghabril, M., 2017). ГЦК при этом расценивается как опухоль с минимальной эффективностью системной химиотерапии (Brito, A. F. et al., 2016), что, вероятно, связано с высокой гетерогенностью данного типа опухоли.

Полагают, что развитие ГЦК коррелирует с нарушением регуляции программированной клеточной гибели (Degterev, A., Yuan, J., 2008). Считается, что в клетках ГЦК могут развиваться некроз, апоптоз и аутофагия (Cui, J., Gong, Z., Shen, H. M., 2013). Некроз часто стимулирует местное и системное воспаление. Апоптоз и аутофагия не провоцируют воспаление, поэтому их рассматривают как терапевтические мишени для лечения рака (Zhang, C., Jia, X., 2016).

Роль аутофагии в развитии ГЦК неоднозначна, имеются данные, что ГЦК характеризуется дефицитной аутофагией (Dash, S. et al., 2016). Несмотря на относительную изученность аутофагии, ее функции в развитии и прогрессировании ГЦК до сих пор неизвестны (Liu, L. et al., 2017). Таким образом, стимуляция аутофагии может представлять особый интерес в противоопухолевой фармакотерапии ГЦК. Наиболее известными

индукторами аутофагии являются рапамицин, карбамазепин, вальпроат натрия, верапамил, амиодарон, лоперамид и литий (Sarkar, S. et al., 2009).

В настоящее время показано, что соли лития являются селективными ингибиторами гликоген синтазы киназы-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$  – glycogen synthase kinase 3 $\beta$ ), фермента, который участвует в регуляции клеточной пролиферации, дифференцировки и апоптоза опухолевых клеток (Quiroz, J. A., Gould, T. D., Manji, H. K., 2004). Также выявлена способность лития индуцировать аутофагию путем ингибирования фермента инозитол монофосфатазы (IMPase) (Sarkar, S. et al., 2005; Sade, Y. et al., 2016). По данным литературы карбонат лития, действуя через подавление активности GSK-3 $\beta$  и снижение экспрессии циклина E, способен вызывать остановку пролиферации опухолевых клеток за счет ареста клеточного цикла в фазе G<sub>2</sub>/M (Erdal, E. et al., 2005; Tsui, M. M. et al., 2012), а также индуцировать апоптоз (Li, L. et al., 2015) и влиять на развитие аутофагии в опухолевых клетках (O'Donovan, T. R. et al., 2015).

**Степень разработанности темы исследования.** По данным литературы, ГЦК свойственна дефицитная аутофагия (Dash, S. et al., 2016), тем не менее, роль аутофагии в развитии и прогрессировании ГЦК до сих пор мало изучена (Liu, L. et al., 2017). Показано, что карбонат лития, действуя через подавление активности GSK-3 $\beta$  и снижение экспрессии циклина E, способен вызывать остановку пролиферации опухолевых клеток за счет ареста клеточного цикла в фазе G<sub>2</sub>/M (Erdal, E. et al., 2005; Tsui, M. M. et al., 2012), а также индуцировать апоптоз (Li, L. et al., 2015) и влиять на развитие аутофагии в опухолевых клетках (O'Donovan, T. R. et al., 2015). В связи с тем, что аутофагия может способствовать запуску сигнальных каскадов, ведущих к апоптозу или к аутофагической гибели, важными являются исследования возможности ее стимуляции с целью более эффективного воздействия на механизмы гибели опухолевой клетки.

Исследования влияния солей лития на развитие аутофагии при раке ограничены, также недостаточно изучено влияние лития на развитие

гепатоцеллюлярной карциномы. Актуальными являются исследования эффектов лития на жизнеспособность опухолевых клеток, стимуляцию аутофагии и клеточной гибели в гетерогенной популяции ГЦК; полученные результаты будут способствовать разработке современных комбинированных подходов к химиотерапии ГЦК.

**Цель исследования:**

Выявить влияние карбоната лития на клетки гепатоцеллюлярной карциномы и развитие в них аутофагии в условиях *in vitro* и *in vivo*.

**Задачи исследования:**

1. Провести фенотипирование клеток гетерогенной популяции гепатоцеллюлярной карциномы-29 (Г-29) методом определения ядерно-цитоплазматического соотношения и изучения ультраструктурной организации клеток.

2. С использованием МТТ-теста в эксперименте *in vitro* определить жизнеспособность клеток Г-29 при добавлении различных доз карбоната лития.

3. Методом проточной цитофлюорометрии исследовать клеточную гибель и распределение по стадиям клеточного цикла клеток Г-29 при добавлении 5 мМ карбоната лития.

4. На основании цитологических критериев определить клетки-мишени карбоната лития при его добавлении к клеточной культуре в концентрации 5 мМ.

5. При использовании трансмиссионной электронной микроскопии и иммунофлюоресцентного анализа оценить влияние карбоната лития на ультраструктурную организацию клеток Г-29 и развитие в них аутофагии *in vitro*.

6. При использовании трансмиссионной электронной микроскопии и иммунофлюоресцентного анализа в эксперименте *in vivo* исследовать ультраструктурную организацию клеток Г-29 и оценить развитие в них аутофагии при введении карбоната лития в дозе 20 мМ по периферии опухоли.

### **Научная новизна**

Впервые выполнена цитологическая классификация гетерогенности состава гепатоцеллюлярной карциномы-29 в экспериментах *in vitro*. Обосновано выделение 5 типов опухолевых клеток, соответствующих пяти степеням дифференцированности. Применение цитологических критериев степени дифференцированности клеток позволило определить клетки-мишени карбоната лития *in vitro*. Показано, что изменение соотношения опухолевых клеток происходит преимущественно за счет снижения количества клеток IV и V типов. Выявлено, что культивирование клеток Г-29 в среде с карбонатом лития в концентрации 5 мМ в течение 48 ч приводит к увеличению доли клеток в состоянии апоптоза, повышению количества клеток с LC3 beta-позитивными аутофагическими структурами (LC3 beta – microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3B) и возрастанию количества аутофагосом и аутолизосом.

В эксперименте *in vivo* впервые выявлено, что при развитии Г-29 в мышечной ткани бедра экспериментальных животных сохраняется структурный полиморфизм, определяются 5 (выделенных в процессе работы) цитологических типов опухолевых клеток и преобладают клетки I-III типов (89 %). Введение 20 мМ карбоната лития по периферии опухоли приводит к увеличению объемной плотности зон деструкции внутриклеточных органелл и снижению объемной плотности цистерн гранулярной эндоплазматической сети. Показано, что применение карбоната лития способствует увеличению количества клеток с LC3 beta-позитивными аутофагическими структурами и образованию аутофагосом и аутолизосом в опухолевых клетках.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Результаты исследования дополняют современные представления о способности лития влиять на канцерогенез: снижать жизнеспособность опухолевых клеток и способствовать остановке клеточного цикла в фазе G<sub>2</sub>/M.

Предложенный метод разделения опухолевых клеток на степени дифференцированности на основании цитологических критериев может быть применен в экспериментальном тестировании химиотерапевтических



средств. Способность лития влиять на накопление опухолевых клеток в фазе клеточного цикла G<sub>2</sub>/M может быть использована в практике научных цитологических исследований.

Результаты исследования о влиянии лития на развитие апоптоза и аутофагии в клетках Г-29 могут быть использованы для выявления сигнальных путей, регулирующих взаимосвязь аутофагии и апоптоза. Результаты исследования ультраструктурной организации аутофагических структур и экспрессии маркеров аутофагии могут быть внедрены в учебный процесс кафедр биологии, цитологии и гистологии.

### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Отличия в величинах ядерно-цитоплазматического соотношения и ультраструктурной организации клеток гепатоцеллюлярной карциномы-29 позволяют определить цитологические критерии степени их дифференцированности для выделения 5 типов опухолевых клеток.

2. Карбонат лития дозозависимо подавляет жизнеспособность клеток гепатоцеллюлярной карциномы-29, приводит к накоплению клеток в фазе клеточного цикла G<sub>2</sub>/M, увеличению доли клеток в состоянии апоптоза и стимулирует развитие аутофагии. Клетками-мишенями лития в условиях *in vitro* преимущественно являются высокодифференцированные клетки IV и V типов.

3. Введение карбоната лития экспериментальным животным (*in vivo*) по периферии опухоли приводит к активации процессов внутриклеточной деградации и аутофагии в клетках гепатоцеллюлярной карциномы-29.

### **Апробация работы**

Результаты работы представлены и обсуждены на XIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты» 17-18 марта 2016 г. (г. Москва); The International Symposium Systems Biology and Biomedicine (SBIOMED-2016) 30-31 августа 2016 г. (г. Новосибирск); на Конгрессе молодых ученых «Актуальные вопросы фундаментальной и клинической медицины» 24-25 мая 2018 г. (г. Томск); The International Symposium Systems

Biology and Biomedicine (SBIOMED-2018) 21-22 августа 2018 г. (г. Новосибирск).

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 7 работ, в том числе: 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации материалов диссертационных исследований, 2 статьи в журналах, цитируемых в Scopus.

### **Структура и объем работы**

Диссертация состоит из введения, четырех глав, включающих обзор литературы, описание материалов и методов исследования, изложения полученных результатов и их обсуждения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, содержащего 190 источников. Материалы диссертации изложены на 107 страницах машинописного текста и иллюстрированы одной таблицей и 22 рисунками.

### **Благодарности**

Автор благодарит своего научного руководителя – д.б.н., профессора Н. П. Бгатову за ценные консультации в организации и проведении экспериментов. Кроме того, автор выражает благодарность своим коллегам из лаборатории ультраструктурных исследований НИИКЭЛ, на базе которой проводилась экспериментальная работа: В. В. Макаровой, С. Р. Ноговициной, В. Ф. Детковой, Е. В. Торбеевой, В. Г. Розину, М. И. Ложкину. Автор также выражает особую благодарность научным сотрудникам НИИКЭЛ, к.м.н. А. О. Соловьевой и А. П. Лыкову за помощь в организации и проведении исследований *in vitro*, МТТ-теста, проточной цитофлуориметрии.

## **ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1 Гепатоцеллюлярная карцинома**

#### **1.1.1 Эпидемиология**

Гепатоцеллюлярная карцинома – рак печени, по разным данным, входящий в число пяти наиболее злокачественных новообразований человека, занимает одно из лидирующих мест в структуре смертности от онкологических заболеваний (Montella, L. et al., 2016; Best, J. et al., 2017; Galle, P. R., 2017; Hartke, J., Johnson, M., Ghabril, M., 2017; da Motta Girardi, D. et al., 2018).

Наиболее опасными регионами по заболеваемости являются страны Африки к югу от Сахары, Восточная и юго-Восточная Азия (Balogh, J. et al., 2016; Brito, A. F. et al., 2016; Pascual, S., Herrera, I., Irurzun, J., 2016; Hartke, J., Johnson, M., Ghabril, M., 2017).

Мужчины болеют чаще женщин, по разным данным – в 2-7 раз, в зависимости от региона (Balogh, J. et al., 2016; Brito, A. F. et al., 2016; Pascual, S., Herrera, I., Irurzun, J., 2016; Dimitroulis, D. et al., 2017; Hartke, J., Johnson, M., Ghabril, M., 2017). Такая тенденция может объясняться более частой приверженностью мужчин к вредным привычкам, влияющим на развитие патологии печени (злоупотребление табаком и алкоголем). Гормональный фон также может оказывать влияние на развитие ГЦК: известно, что эстрогены могут обладать противовоспалительной активностью и снижать повреждение печени, а тестостерон может повышать передачу сигналов андрогеновых рецепторов и способствовать пролиферации клеток ГЦК (Balogh, J. et al., 2016; Brito, A. F. et al., 2016; Kohi, M. P., 2016). Средний возраст постановки диагноза – 50-60 лет (Hartke, J., Johnson, M., Ghabril, M., 2017).

#### **1.1.2 Статистика заболеваемости и смертности в РФ и НСО**

В 2016 г. в Российской Федерации выявлено 599 348 злокачественных новообразований. В Сибирском Федеральном Округе (СФО) за период 2006-

2016 г. среднегодовой темп прироста заболеваемости населения злокачественными новообразованиями составил 2,68 % (II место по России) и смертности от них – 0,67 % (II место по России). Абсолютное число впервые в жизни установленного диагноза злокачественного новообразования печени и внутрипеченочных желчных протоков в России составило у мужчин в 2006 г. – 3436, в 2016 г. – 4781; у женщин в 2006 г. – 2747, в 2016 г. – 3539.

Заболеваемость населения СФО злокачественными новообразованиями печени и внутрипеченочных желчных протоков в 2016 г. составила 1410 человек на 100 тыс. населения, что занимает III место по заболеваемости после Центрального и Приволжского Федеральных Округов. Заболеваемость населения Новосибирской области (НСО) злокачественными новообразованиями в 2016 г. составила 458,1 на 100 тыс. населения. Абсолютное число умерших в России от злокачественных новообразований печени и внутрипеченочных желчных протоков у мужчин составило в 2006 г. – 4495, в 2016 г. – 5596; у женщин в 2006 г. – 3545, в 2016 г. – 4213.

Смертность населения СФО от злокачественных новообразований печени и внутрипеченочных желчных протоков в 2016 г. составила 1567 человек на 100 тыс. населения, что занимает III место по смертности после Центрального и Приволжского Федеральных Округов. Все данные представлены Российским Центром информационных технологий и эпидемиологических исследований в области онкологии (Петрова, Г. В. и др., 2018).

По данным Новосибирскстата (территориальный орган Федеральной службы государственной статистики по НСО) смертность от новообразований жителей НСО заняла II место в структуре смертности и составила 4799 человек за январь-октябрь 2017 г. (4696 – 2016 г.), что составило 15,9 % от всех смертей, или 207,3 на 100 тыс. населения в 2017 г. (203,9 в 2016 г.). Суммируя вышесказанное, очевиден рост заболеваемости и смертности от новообразований в РФ и НСО.

### 1.1.3 Факторы риска и защитные факторы

Список факторов, предрасполагающих к развитию гепатоцеллюлярной карциномы, достаточно большой, наиболее частыми являются: инфицирование вирусами гепатита В и С, хроническое злоупотребление алкоголем, курение, интоксикация афлатоксином В, неалкогольный стеатогепатит, сахарный диабет, ожирение, гемохроматоз и другие (Brito, A.F. et al., 2016; Dimitroulis, D. et al., 2017; Wang, K., Sun, D., 2018). 54 % всех случаев ГЦК могут быть связаны с инфицированием вирусом гепатита В, 31 % - вирусом гепатита С, 15 % – с другими причинами (Pascual, S., Herrera, I., Irurzun, J., 2016). По данным литературы потребление трех или более порций алкоголя в день увеличивает риск рака печени на 16 %, а шести или более – на 22 % (Balogh, J. et al., 2016).

Отдельно выделяют так называемые защитные факторы, уменьшающие риск развития ГЦК. Среди них – потребление статинов и бета-блокаторов; приверженность средиземноморской диете с большим содержанием рыбы, овощей, оливкового масла и злаков; а также употребление кофе – по некоторым данным, 2 чашки кофе в день снижают риск развития ГЦК на 43 %, что может быть связано с его антиоксидантной активностью (Pascual, S., Herrera, I., Irurzun, J., 2016).

### 1.1.4 Скрининг и диагностика

Ведущими мировыми организациями в подготовке рекомендаций и руководств для врачей по ведению пациентов с ГЦК являются Американская Ассоциация по изучению болезней печени (AASLD – American Association for the Study of Liver Diseases), Европейская Ассоциация по изучению печени (EASL – European Association for the Study of the Liver) и Европейская Организация по исследованию и лечению рака (EORTC – European Organization for the Research and Treatment of Cancer). AASLD и EASL рекомендуют проводить скрининг всех пациентов с циррозом вне

зависимости от этиологии с использованием ультразвукового исследования печени каждые 6 месяцев (Bellissimo, F. et al., 2015; Galle, P. R., 2017).

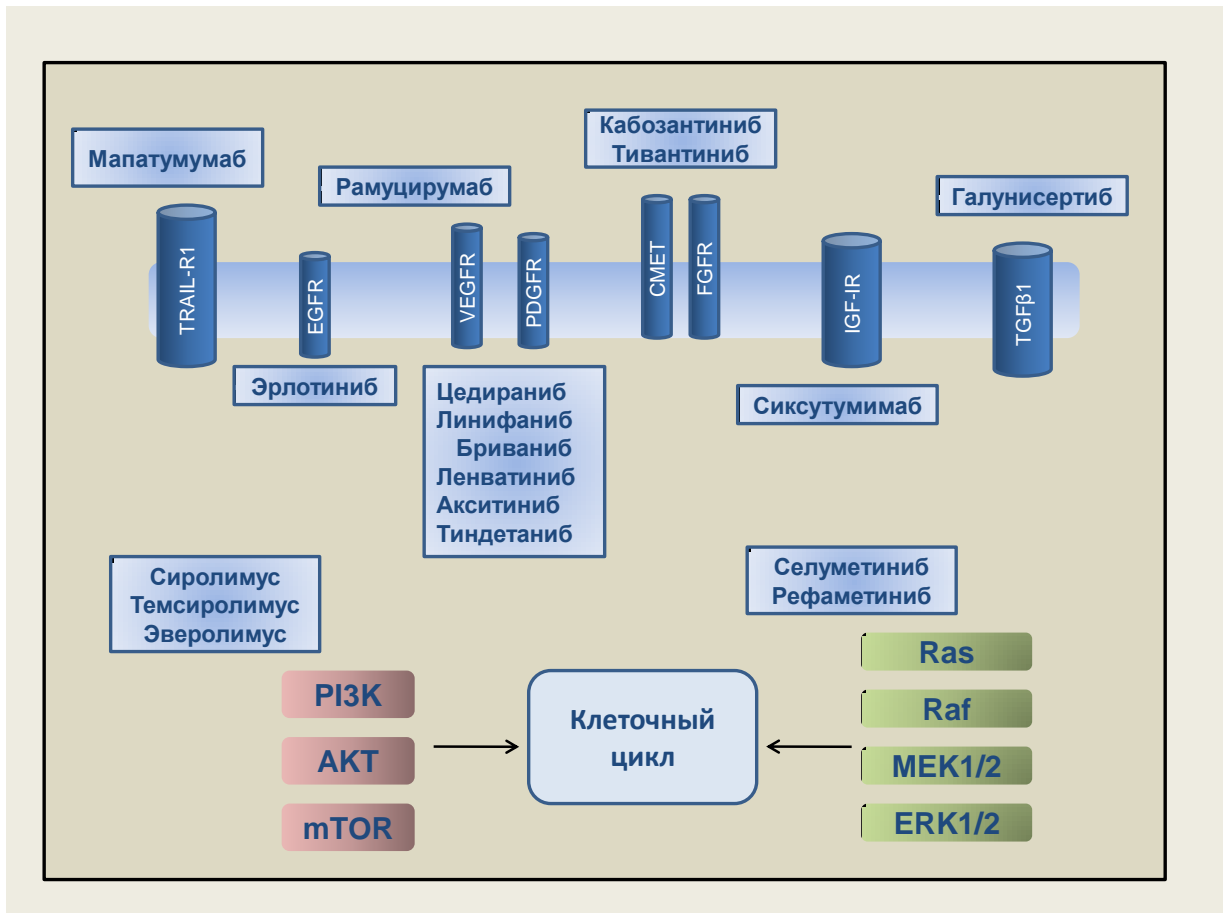
Для постановки диагноза ГЦК требуются неинвазивные методы – ультразвуковое исследование, компьютерная томография, магнитно-резонансная томография, некоторые лабораторные тесты, и крайне редко – биопсия печени (Page, A. J. et al., 2014; Dimitroulis, D. et al., 2017; Ayuso, C. et al., 2018; Tang, A. et al., 2018). Наиболее частыми параметрами для диагноза ГЦК являются размер и локализация первичного очага опухоли, наличие и локализация метастазов, функциональный статус печени и пациента в целом.

Существуют три системы стадирования рака печени: классификация Американского Объединенного Комитета по раку (AJCC – American Joint Committee on Cancer), классификация TNM - характеризующие только опухоль и метастазы; система BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer), которая характеризует опухоль, тяжесть заболевания печени и функциональный статус пациента и рекомендована AASLD для стадирования ГЦК и оценки прогноза (Hartke, J., Johnson, M., Ghabril, M., 2017).

### **1.1.5 Методы лечения**

Среди множества подходов к лечению гепатоцеллюлярной карциномы выделяют хирургические и нехирургические методы (Qi, X. et al., 2016). К хирургическим методам относят резекцию печени, трансплантацию печени, интраоперационную эмболизацию портальной вены с последующей резекцией печени. К нехирургическим методам относятся абляционные методики, химио- и радиоэмболизация, лучевая терапия и системная химиотерапия, на которой следует остановиться более подробно. Системная химиотерапия рассматривается для пациентов с распространенной формой ГЦК, к которым хирургическое лечение уже не может быть применено (Hartke, J., Johnson, M., Ghabril, M., 2017; da Motta Girardi, D. et al., 2018); при этом ГЦК рассматривается как опухоль с минимальной эффективностью

системной химиотерапии (Brito, A.F. et al., 2016), что, вероятно, связано с гетерогенностью данного типа опухоли (da Motta Girardi, D. et al., 2018).



**Рисунок 1.** Адаптировано с Montella, L. et al., 2016. Разрабатываемые лекарственные препараты для таргетной терапии ГЦК и их мишени.

Множество препаратов по отдельности или в составе комбинированной терапии использовалось (или продолжает использоваться) для терапии ГЦК: доксорубицин, цисплатин, 5-фторурацил, паклитаксел и другие; однако в настоящее время единственным препаратом, который показал увеличение выживаемости (хоть и незначительное) у пациентов с ГЦК, является сорафениб – ингибитор тирозин киназы (Balogh, J. et al., 2016; Best, J. et al., 2017; Galle, P. R., 2017; Daher, S. et al., 2018). Сорафениб подавляет пролиферацию и ангиогенез и увеличивает апоптоз опухолевых клеток (Best, J. et al., 2017).

В настоящее время на разных стадиях клинических исследований находятся препараты, потенциально перспективные для терапии ГЦК: регорафениб, цедираниб, линифаниб, рамуцирумаб, бриваниб, ленватиниб, акситиниб, эрлотиниб, селуметиниб и другие (рис. 1) (Montella, L. et al., 2016).

### **1.1.6 Гетерогенность ГЦК**

Гепатоцеллюлярная карцинома является крайне гетерогенным злокачественным новообразованием (Friemel, J. et al., 2015; Chan, S. L. et al., 2016; Hammoud, G. M., Ibdah, J. A., 2016; Lu, L. C. et al., 2016; Mazzanti, R., Arena, U., Tassi, R., 2016; Nault, J. C., Galle, P. R., Marquardt, J. U., 2018).

В настоящее время существуют две основные взаимодополняющие модели (Weiskirchen, R., 2016), раскрывающие природу опухолевой гетерогенности, – модель раковых стволовых клеток и модель клональной эволюции (Nowell, P., 1976), объясняющие происхождение отдельных субпопуляций опухоли.

Модель раковых стволовых клеток строго иерархична и предполагает существование небольшого количества образующих опухоль клеток, способных к самообновлению и дифференцировке в неопухолевые клетки.

Стохастическая модель клональной эволюции основана на происхождении опухоли в результате мутации одной соматической клетки с высоким пролиферативным потенциалом и постепенным накоплением дополнительных мутаций во время повторных делений. В данной модели не существует иерархии: образованные субклоны имеют различный потенциал для роста и деления и будут развиваться по пути самообновления или дифференциации.

Опухолевая гетерогенность может быть нескольких типов – внутриопухолевая (в пределах одного образования, или по типу «узла-в-узле»), межопухолевая (среди разных узлов), а также встречаться в виде



индивидуальной гетерогенности у отдельно рассматриваемых пациентов (Lu, L. C. et al., 2016).

ГЦК также характеризуется наличием морфологической, иммунофенотипической и генетической гетерогенности (Jeng, K. S. et al., 2015; Li, L., Wang, H., 2016). Различные субклоны в пределах одного новообразования существуют в специфическом опухолевом микроокружении, формируя уникальные клональные фенотипы, и, соответственно, могут проявлять различную чувствительность к проводимой терапии и формировать различную устойчивость к лекарственным препаратам (Alizadeh, A. A. et al., 2015; Jeng, K. S. et al., 2015; Cassidy, J. W., Caldas, C., Bruna, A., 2015). Гетерогенность ГЦК может также способствовать неоднозначной роли аутофагии в различных популяциях клеток ГЦК (Lee, Y. J., Jang, B. K., 2015).

## **1.2 Аутофагия**

### **1.2.1 Общие сведения**

Аутофагия – это процесс внутриклеточной деградации цитоплазматических компонентов, необходимый для поддержания клеточного гомеостаза, выживаемости и развития организма (Yin, Z., Pascual, C., Klionsky, D. J., 2016). Открытие лизосом в 1955 г. бельгийским ученым Кристианом де Дювом (Christian de Duve) во время проведения биохимических исследований гомогената печени крыс (de Duve, C. et al., 1955) положило начало эпохе изучения механизмов внутриклеточной деградации белка (Ohsumi, Y., 2014).

Термин «аутофагия» (от греческого «*autóphagos*» – «самопоедание») был также впервые введен де Дювом в 1963 г. для описания способа доставки цитоплазматических компонентов в лизосомы для деградации (Ohsumi, Y., 2014). Исследования аутофагии стали набирать силу в последние 20 лет, и прорывными стали работы Есинори Осуми (Yoshinori Ohsumi) и его коллег,

идентифицировавших и описавших большинство связанных с аутофагией генов и белков (Atg – autophagy-related genes/proteins) у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. В 2016 году Е. Осуми была присуждена Нобелевская премия по физиологии и медицине за открытие механизмов аутофагии (Tooze, S. A., Dikic, I., 2016; Ke, P. Y., 2017).

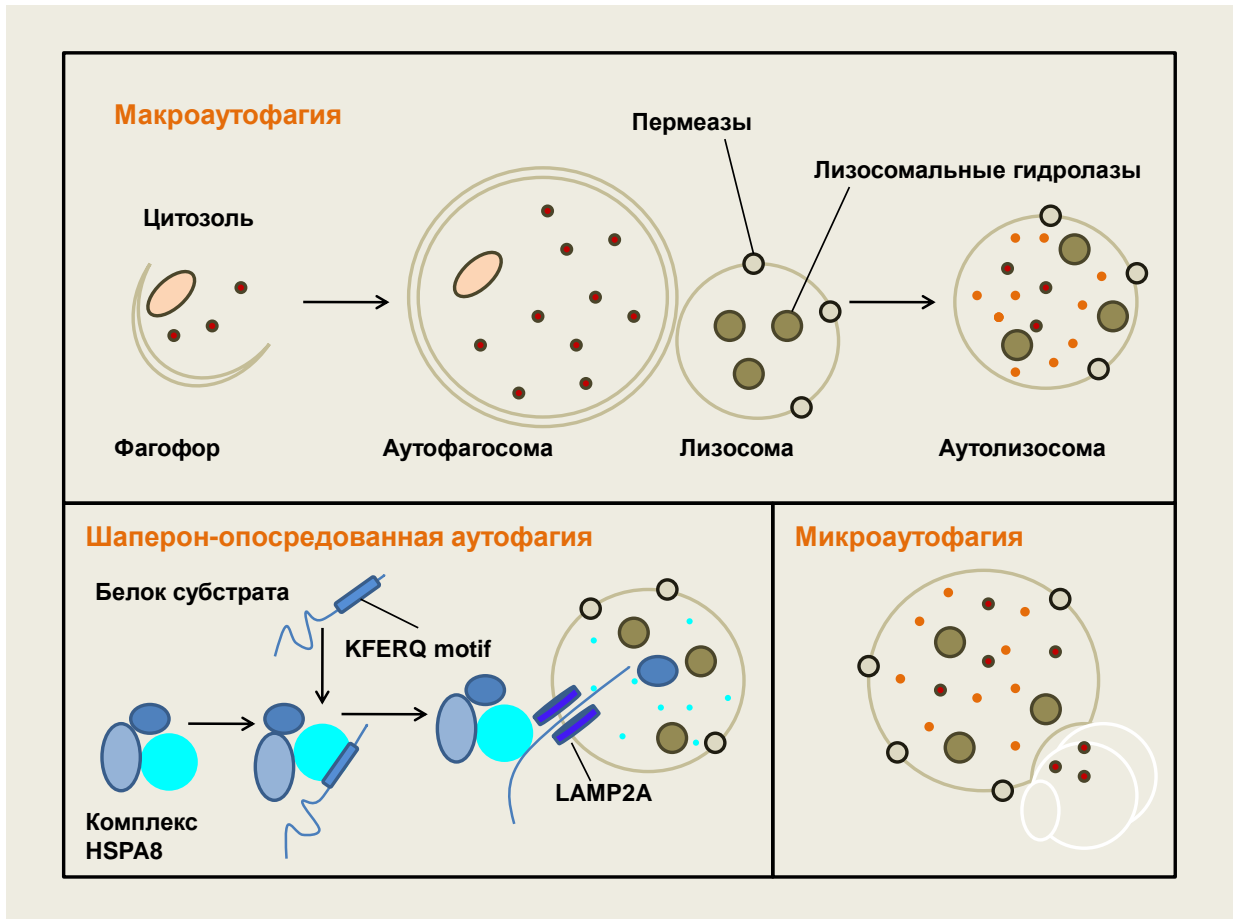
Выделяют три типа аутофагии: макроаутофагия, микроаутофагия и шаперон-опосредованная аутофагия (рис. 2) (Parzych, K. R., Klionsky, D. J., 2014).

При микроаутофагии деградируемый груз попадает непосредственно в лизосому путем инвагинации лизосомальной мембраны.

Шаперон-опосредованная аутофагия характеризуется высокой специфичностью: при этом типе аутофагии субстрат, предназначенный для деградации, содержит специфическую аминокислотную последовательность (KFERQ motif), которая распознается белком-шапероном HSPA8 (heat shock 70 kDa protein 8), и с его помощью груз доставляется в лизосому (Cuervo, A. M., Wong, E., 2014; Parzych, K. R., Klionsky, D. J., 2014).

При макроаутофагии предназначенный для деградации материал (груз) сначала ограничивается изолирующей мембраной (фагофором), которая, расширяясь и удлиняясь, секвестрирует груз с образованием двумембранной структуры - аутофагосомы, последняя затем сливается с лизосомой с образованием аутолизосомы, где полученный груз деградирует под действием лизосомальных ферментов (Yang, Z., Klionsky, D. J., 2009; Bento, C. F. et al., 2016).

В зависимости от типа поглощаемого груза аутофагия может быть селективной (митофагия, пексофагия, ретикулофагия) и неселективной (Chew, L. H., Yip, C. K., 2014).



**Рисунок 2.** Адаптировано с Parzych, K. R., Klionsky, D. J., 2014. Схематическое изображение макроаутофагии, шаперон-опосредованной аутофагии и микроаутофагии.

### 1.2.2 Макроаутофагия млекопитающих

Макроаутофагия (далее – аутофагия) состоит из нескольких последовательно протекающих этапов: инициация и образование фагофора, секвестрация груза, созревание аутофагосомы, слияние ее с лизосомой, деградация содержимого в лизосомах при участии лизосомальных гидролаз, экспорт переработанного груза обратно в цитоплазму для включения в клеточный метаболизм.

Белки, необходимые для образования аутофагосом, подразделяются на шесть функциональных групп и формируют основу механизма аутофагии, называемую «core autophagy machinery»: комплекс инициации аутофагии ULK1(unc-51 like autophagy activating kinase 1), Atg9, комплекс Atg2–Atg18,

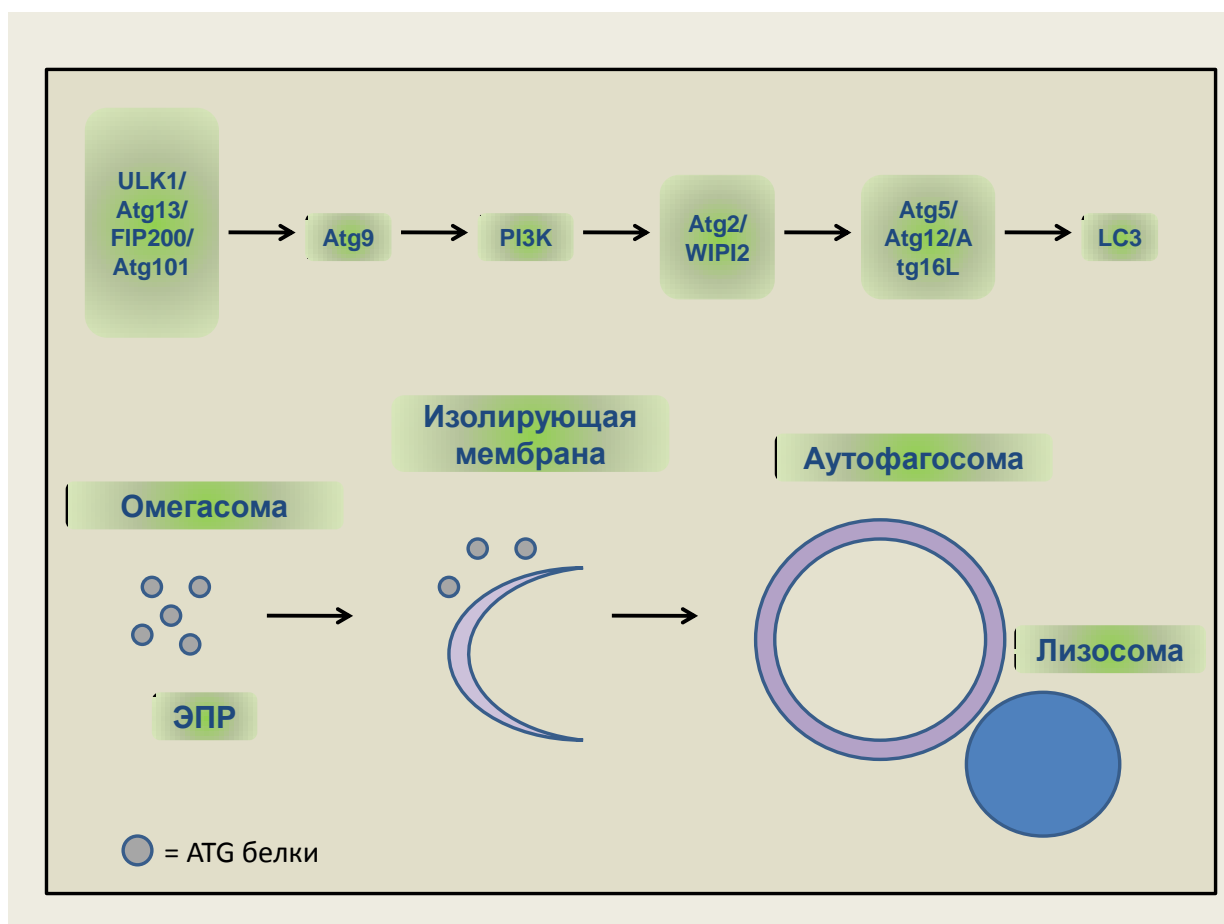
комплекс PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase), системы конъюгации Atg12–Atg5 и LC3–PE (LC3–phosphatidylethanolamine) (Suzuki, H. et al., 2017).

Аутофагия запускается в ответ на различные стрессовые факторы, включая депривацию питательных веществ и изменения в клеточном микроокружении (Suzuki, H. et al., 2017). Комплекс mTORC1 (mammalian target of rapamycin complex 1) является одним из первичных сенсорных сигнальных путей, реагирующих на изменения в поступлении питательных веществ: при снижении поступления нутриентов происходит торможение его негативной регуляции аутофагии, что запускает сборку комплекса ULK1 (Yin, Z., Pascual, C., Klionsky, D. J., 2016).

Иницирующий аутофагию комплекс ULK1 (рис. 3) состоит из четырех компонентов: ULK1/2, FIP200 (RB1-inducible coiled-coil protein 1), Atg13 и Atg101, формирующих изолирующую мембрану (Suzuki, H. et al., 2017). Данный комплекс локализуется в месте формирования фагофора (Dupont, N. et al., 2017), в непосредственной близости от эндоплазматической сети (ЭПС), на участках, называемых омегасомами – субдоменах ЭПС, обогащенных PI3P (phosphatidylinositol 3-phosphate) (Biazik, J. et al, 2015). В то же время существует мнение, что фагофоры в клетках млекопитающих могут возникать *de novo* в любом участке цитоплазмы (Biazik, J. et al, 2015).

Atg9 является трансмембранным белком в везикулах, генерируемых аппаратом Гольджи; взаимодействуя с Atg13, такие Atg9-содержащие везикулы взаимодействуют с комплексом инициации аутофагии (Imai, K. et al., 2016; Noda, T., 2017; Suzuki, H. et al., 2017).

Комплекс Atg2–Atg18 участвует в удлинении и смыкании изолирующей мембраны, и вместе с Atg9 способствует формированию аутофагосомы (Kishi-Itakura, C. et al., 2014; Noda, T., 2017; Suzuki, H. et al., 2017).



**Рисунок 3.** Адаптировано с Davis, S., Wang, J., Ferro-Novick, S. 2017. Схематичное изображение процесса формирования аутофагосом в клетках млекопитающих.

Комплекс PI3K у млекопитающих (class III PI3K complex I) состоит из Vps34 (vacuolar protein sorting 34), Vps15 (vacuolar protein sorting 15), Beclin 1, Atg14 и NRBF2 (nuclear receptor binding factor 2) (Suzuki, H. et al., 2017) и способствует продукции PI3P напрямую из PI (phosphatidylinositol) на участках формирования фагофора (Yin, Z., Pascual, C., Klionsky, D. J., 2016).

PtdIns3P требуется для связывания с белками семейства WIPI (WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein), что также необходимо для образования аутофагосом (Bento, C. F. et al., 2016; Jang, D. J., Lee, J. A., 2016; Nascimbeni, A. C., Codogno, P., Morel, E., 2017).

Семейство белков LC3 включает LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP (gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein), GABARAPL1 и

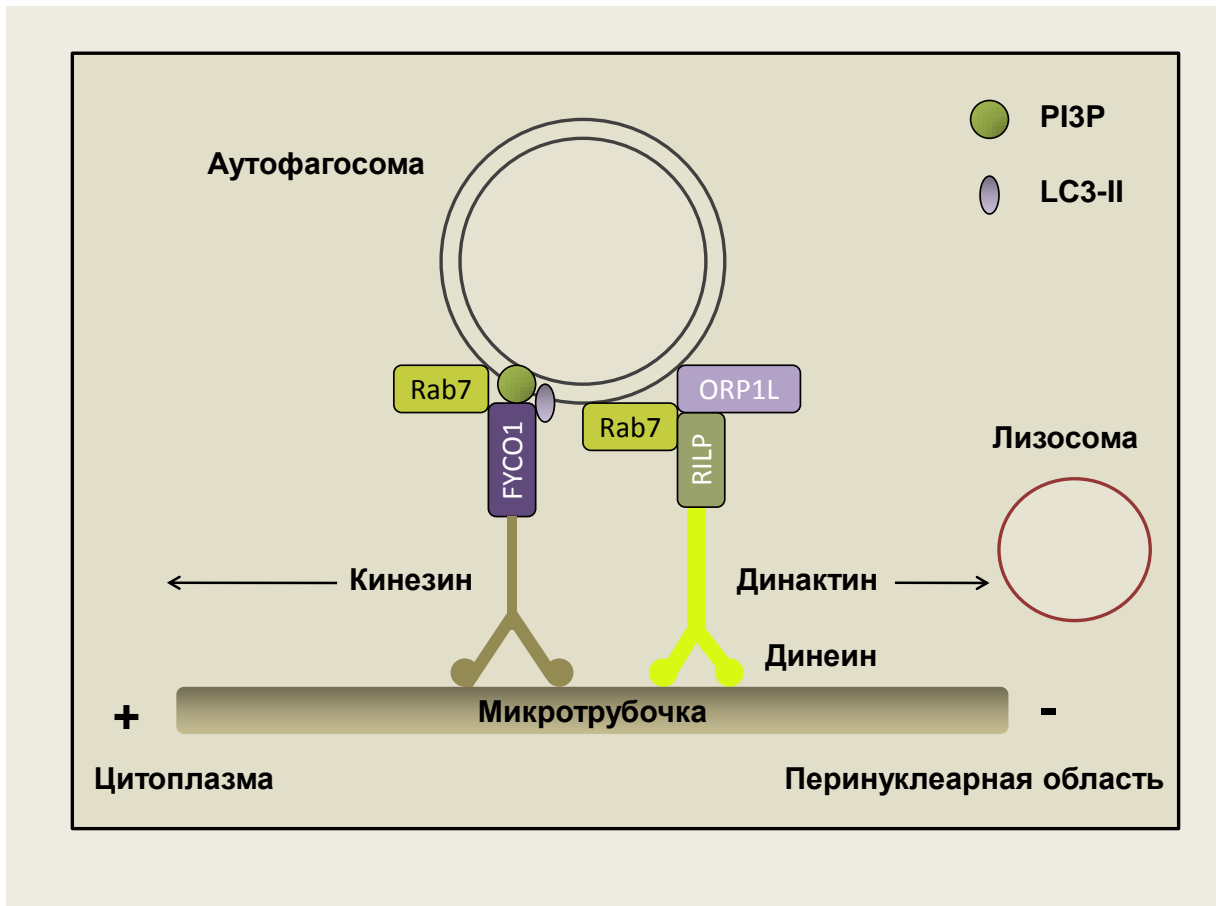
GABARAPL2 (gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein-like 1/2); LC3 являются убиквитино-подобными белками и находятся в цитоплазме в нелипидированной форме (LC3-I) (Yu, L., Chen, Y., Tooze, S. A., 2018; Mercer, T. J., Gubas, A., Tooze, S. A., 2018). Конъюгация LC3 с PE происходит в результате двух убиквитино-подобных каскадов, требующих участия Atg4, Atg7, Atg3 (LC3-PE) и Atg5, Atg10, Atg12, Atg16L (Atg12– Atg5- Atg16L1) (Ohsumi, Y., 2001; Mercer, T. J., Gubas, A., Tooze, S. A., 2018; Zhao, Y. G., Zhang, H., 2018).

Комплекс Atg12– Atg5-Atg16L1 связывается с WIPI2, а также с LC3-PE через взаимодействие Atg12 с Atg3, способствуя образованию липидированного LC3-II; последний локализуется на внешней и внутренней мембране фагофора (Bento, C. F. et al., 2016; Suzuki, H. et al., 2017; Mercer, T. J., Gubas, A., Tooze, S. A., 2018).

Удаление LC3 и PI3P (и, возможно других белков, в том числе Atg4) с поверхности аутофагосом требуется для их созревания; таким образом, накопление ассоциированных с аутофагосомами белков Atg, вероятно, активирует процессы слияния (Reggiori, F., Ungermann, C., 2017). Замыкание фагофора и созревание аутофагосом в настоящее время недостаточно изучены (Reggiori, F., Ungermann, C., 2017). Предполагается, что способность фагофора приобретать сферическую форму, а также последующая деградация внутренней мембраны аутофагосомы при слиянии с лизосомой зависимы от систем конъюгации Atg12–Atg5 и LC3–PE, влияющих на разделение внутренней и наружной мембран аутофагосом (Koyama-Honda, I., Tsuboyama, K., Mizushima, N., 2017).

Аутофагосомы могут сливаться с поздними эндосомами (с образованием амфисом) или лизосомами, что приводит к образованию аутолизосом, в которых происходит деградация секвестрированного груза (Nakamura, S., Yoshimori, T., 2017; Reggiori, F., Ungermann, C., 2017). Механизмы слияния зависят от многочисленных факторов. Поздние эндосомы и лизосомы обнаруживаются в перинуклеарной области (рис. 4), в

то время как аутофагосомы могут быть расположены повсеместно в цитоплазме: после завершения образования аутофагосом они транспортируются в перинуклеарную область с помощью микротрубочек (Monastyrska, I. et al., 2009).



**Рисунок 4.** Адаптировано с Nakamura, S., Yoshimori, T., 2017. Схематическое изображение механизмов слияния аутофагосом с лизосомами.

Динеин-динактиновый моторный комплекс способствует движению аутофагосом в перинуклеарную область; предполагается, что этот процесс осуществляет взаимодействие Rab7 (Ras-related protein 7) с RILP (Rab-interacting lysosomal protein), OSBPL1A (Oxysterol-binding protein-related protein 1) и динеином (и, возможно, другими белками) (Wijdeven, R. H. et al., 2016; Nakamura, S., Yoshimori, T., 2017). Слияние аутофагосом с лизосомами опосредуется белковыми семействами Rab GTPases, SNAREs (soluble N-

ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors) и мембрано-связывающими комплексами (membrane-tethering complexes) (Wang, Y. et al., 2016; Nakamura, S., Yoshimori, T., 2017).

### 1.2.3 Сигнальные пути, регулирующие аутофагию

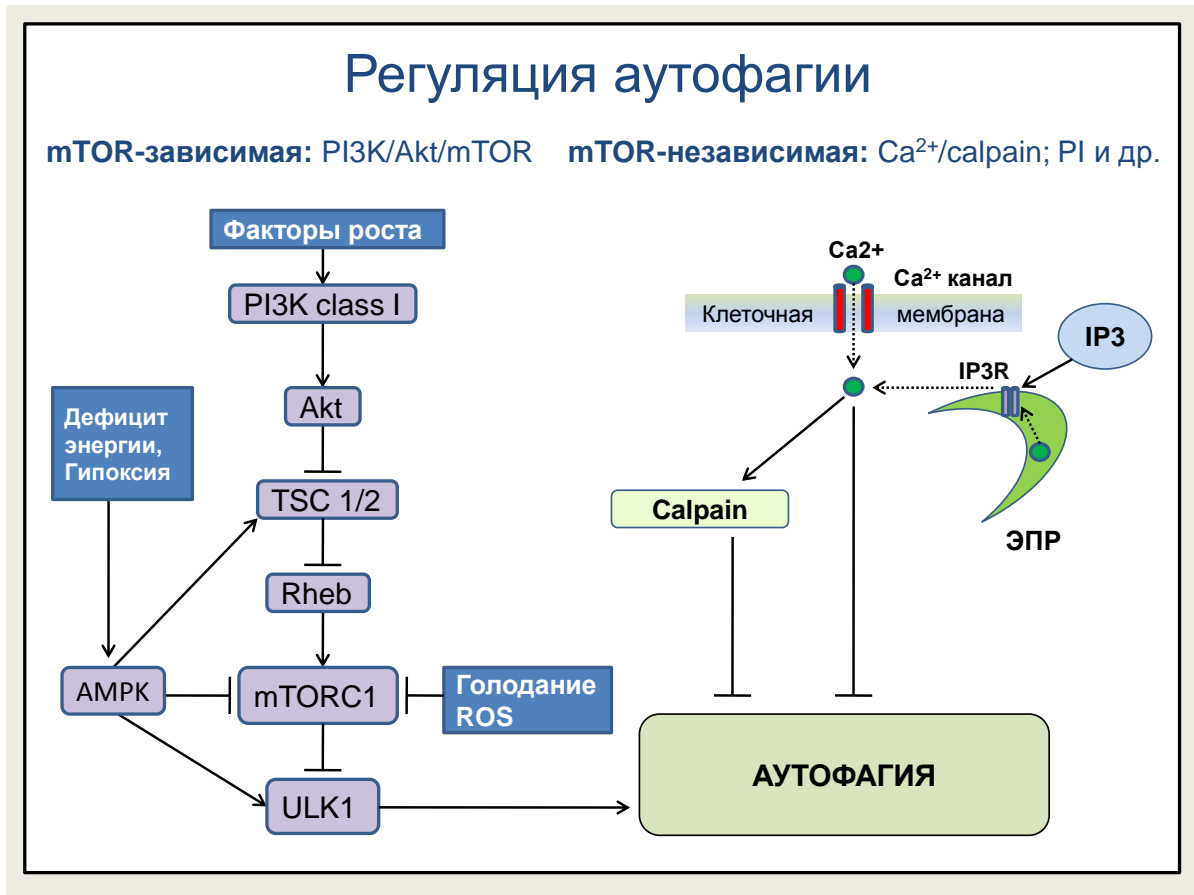
Основной регулятор аутофагии – метаболическое состояние клетки. Семейство PI3K регулирует важнейшие функции клетки, такие как рост, дифференцирование и выживаемость. Снижение факторов роста, уменьшение количества питательных веществ и кислорода могут индуцировать развитие аутофагии в клетке. Аутофагия может запускаться двумя типами сигнальных путей – mTOR-зависимыми и mTOR-независимыми (рис. 5).

К mTOR-зависимым путям относятся сигнальный путь PI3K/Акт/mTOR и сигнальный путь AMPK (5' AMP-activated protein kinase); при этом предполагается, что именно эти пути в основном регулируют аутофагию, индуцированную голоданием, снижением факторов роста, гипоксией и другими внешними факторами. mTOR-независимые сигнальные пути весьма многочисленны и включают  $Ca^{2+}$ -кальпаиновый сигнальный путь, сигнальный путь фосфоинозитола, а также многие другие.

Класс I PI3K активируется рецепторами G-белков и тирозинкиназными рецепторами. Эти ферменты ответственны за производство PI3P, PI(3,4)P<sub>2</sub> (Phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate) и PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) (Okkenhaug, K., 2013).

При достаточном поступлении питательных веществ ферменты этого класса активируют Akt (protein kinase B), что приводит к ингибированию комплекса TSC 1/2 (tuberous sclerosis proteins 1/2) и негативной регуляции белка Rheb (Ras homolog enriched in brain); последнее активирует mTOR и ингибирует сборку комплекса инициации аутофагии (Manning, B. D. et al., 2002; Inoki, K. et al., 2003; Huang, J., Manning, B. D., 2008).





**Рисунок 5.** Адаптировано с Fleming, A. et al., 2011. Схематическое изображение сигнальных путей, регулирующих аутофагию.

Снижение поступления нутриентов и факторов роста через сигнальный каскад PI3K/Акт/mTOR тормозит активность mTOR и запускает аутофагию. Энергетический дефицит стимулирует AMPK фосфорилировать комплекс TSC 1/2 (Inoki, K., Zhu, T., Guan, K. L., 2003), что в конечном итоге также приводит к инициации аутофагии через ингибирование mTOR. Повышение уровней HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) активирует увеличение белка DDIT4 (DNA-damage-inducible transcript 4) и, следовательно, активацию комплекса TSC 1/2, ингибированию mTOR через Rheb и запуску аутофагии (Shoshani, T. et al., 2002; Inoki, K. et al., 2003; DeYoung, M. P. et al., 2008; Sato, T. et al., 2010).

Являясь механизмом внутриклеточной системы деградации органелл, цитоплазмы, белков и макромолекул, базальная аутофагия даже при благоприятных условиях роста имеет решающее значение для поддержания

клеточного гомеостаза и нормального функционирования клетки (Cuervo, A. M., 2004; Ravikumar, B. et al., 2010; Sridhar, S. et al., 2012; Jiang, P., Mizushima, N., 2014; Schneider, J. L., Cuervo, A. M., 2014). Накопление поврежденных белков и дисфункциональных органелл, таких как митохондрии, является одной из причин старения, и удаление таких белков и органелл помогает улучшить клеточную функцию, увеличить продолжительность жизни и избежать гибели клеток.

Аутофагия играет различные роли в процессах воспаления и иммунитета, включая контроль провоспалительного ответа, способствует регуляции развития иммунной системы и участвует в презентации антигена (Fésüs, L., Demény, M. Á., Petrovski, G., 2011; Mehta, P. et al., 2014).

Иммунной функцией аутофагии считается ксенофагия – селективная деградация микробов, включая бактерий, вирусов и простейших. Неудивительно, что дефекты в аутофагических процессах связаны с широким спектром заболеваний, включая нейродегенеративные болезни (Nixon, R. A., 2013; Tan, C. C. et al., 2014; Nah, J., Yuan, J., Jung, Y. K., 2015; Rubinsztein, D. C., Bento, C. F., Deretic, V., 2015; Wong, Y. C., Holzbaur, E. L., 2015; Menzies, F. M. et al., 2017), метаболические изменения (Ren, S. Y., Xu, X., 2015; Rocchi, A., He, C., 2015; Wang, F., Jia, J., Rodrigues, B., 2017; Yang, J. S. et al., 2017; Madhavi, Y. V. et al., 2018) и рак (Brech, A. et al., 2009; Kenific, C. M., Debnath, J., 2015; Liu, J., Debnath, J., 2016).

#### **1.2.4 Аутофагия и рак**

Широко распространено мнение, что аутофагия способствует выживанию опухолевых клеток в условиях стресса. Это подтверждается повышением аутофагии в гипоксических областях опухолей, особенно солидного типа (Ávalos, Y. et al., 2014; Janji, B. et al., 2016). Рециркуляция внутриклеточных компонентов позволяет удовлетворять высокие потребности быстро пролиферирующих раковых клеток. Считается, что аутофагия стимулирует развитие устойчивости к противоопухолевой терапии

(Kimmelman, A. C., White, E., 2017; Lorente, J. et al., 2017). Аутофагия может являться одним из определяющих факторов в прогрессировании рака, тем не менее применение ингибиторов аутофагии не всегда является терапевтически эффективным и однозначным (Pietrocola, F. et al., 2017). На данный момент известно, что аутофагия может обладать и опухоль-супрессирующей ролью, поскольку:

1. селективная деградация митохондрий, или митофагия, позволяет избавиться от основных источников реактивных форм кислорода в условиях окислительного стресса, увеличивающих мутагенез и, соответственно, канцерогенез (Ávalos, Y. et al., 2014);

2. аутофагия поддерживает геномную стабильность путем элиминации потенциально генотоксичных поврежденных или постаревших органелл и белковых агрегатов (Pietrocola, F. et al., 2017);

3. с помощью аутофагии происходит утилизация белка p62 (sequestosome-1) – аутофагического субстрата, накопление которого стимулирует рост опухоли; p62, за счет ингибирования KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1), способствует активности онкогена NRF2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) (White, E., Mehnert, J. M., Chan, C. S., 2015);

4. аутофагия участвует в поддержании противоопухолевого иммунитета, за счет:

а) усиления презентации антигенов МНС (major histocompatibility complex) класса II на опухолевых клетках DAMPs (damage-associated molecular patterns) или других экзогенных антигенов, перерабатываемых в эндолизосомальном отсеке и транслоцируемых на клеточную мембрану;

б) стимуляции иммуногенной клеточной гибели благодаря высвобождению во внеклеточное пространство аутофагосом, нагруженных различными опухолевыми антигенами, белками теплового шока и DAMPs. В результате происходит улучшение инфильтрации опухоли миелоидными и лимфоидными клетками и создание иммуностимулирующего

микроокружения опухоли (Pan, H. et al., 2016; Zhong, Z., Sanchez-Lopez, E., Karin, M., 2016; Hu, L. et al., 2017; Li, C. J. et al., 2017; Pietrocola, F. et al., 2017).

Роль аутофагии в развитии ГЦК неоднозначна. Было показано, что увеличение экспрессии Beclin-1 и LC3 (на более поздней стадии заболевания) коррелирует с повышением общей выживаемости у пациентов (Lee, Y. J., Jang, B. K., 2015), и ГЦК характеризуется дефицитной аутофагией (Dash, S. et al., 2016). Таким образом, несмотря на относительную изученность аутофагии, ее функции в развитии и прогрессировании ГЦК до сих пор неизвестны (Liu, L. et al., 2017).

### **1.3 Литий: применение в медицине, биологические свойства**

#### **1.3.1 Исторические аспекты применения солей лития в медицине**

История применения лития как терапевтического средства ведет свое начало с древнеримского целителя V века Целия Аврелиана, который рекомендовал использование щелочных минеральных вод для лечения маниакально-депрессивных расстройств (Doongaji, D. R., Jathar, V. S., Satoskar, R. S., 1980). В научной медицине литий впервые был применен в XIX веке для лечения подагры, или «мочекислого диатеза», поскольку он способен образовывать наиболее растворимые соли мочевой кислоты. Это заболевание включало в себя симптомы изменения настроения от «подагрической мании» до депрессии; и уже в конце XIX века американец Джон Олде и датчанин Карл Ланге доложили об эффективности лития в терапии рецидивирующих симптомов депрессии (Lenox, R. H., Watson, D. G., 1994).

Эпохальным событием первой половины XX века оказалось открытие Джоном Кейдом лития как препарата для лечения мании (Cade, J. F. J., 1949; Mitchell, P. B., Hadzi-Pavlovic, D., 2000); до этого литий считался лишь потенциальным средством для терапии пациентов с маниакально-депрессивными расстройствами (Lenox, R. H., Watson, D. G., 1994). В

1949 году независимо от исследований Кейда в США был опубликован доклад о применении хлорида лития как заменителя соли и о его токсичности, которая привела к нескольким смертельным исходам пациентов (Corcoran, A. C., Taylor, R. D., Page, I. H., 1949). Это сообщение приостановило использование лития в фармакологии вплоть до 1970 года, пока Управление по санитарному надзору за качеством продуктов и медикаментов США не одобрило применение лития для лечения мании (Mitchell, P. B., Hadzi-Pavlovic, D., 2000); с этого момента началась новая эпоха в изучении и использовании лития в современной фармакологии.

### **1.3.2 Литий в современной медицине**

В настоящее время литий наиболее активно используется в психиатрии для лечения биполярных расстройств – патологии, которая характеризуется сменяющимися циклами депрессии и мании. Около 2 % населения земли страдает от биполярных расстройств, и 10-12 % из них совершают суицид, чтобы избежать эмоциональных перепадов (Mota de Freitas, D., Levenson, B. D., Goossens, J. L., 2016). Клинически различают два типа биполярных расстройств, и на оба литий способен оказывать влияние; несмотря на то, что современные антипсихотические препараты (кветиапин, оланзапин) очень эффективны, литий по-прежнему используется для лечения биполярных расстройств (Mota de Freitas, D., Levenson, B. D., Goossens, J. L., 2016).

Еще одним возможным направлением применения лития в фармакологии может являться терапия болезни Альцгеймера (БА). Литий влияет на патогенез БА: это связано с его ингибирующим действием на GSK-3. По данным литературы данный фермент участвует в гиперфосфорилировании белка тау, ухудшении памяти, увеличении выработки  $\beta$ -амилоида, воспалительных реакциях и других патогенетических механизмах БА (Hooper, C., Killick, R., Lovestone, S., 2008). Литий снижает GSK-3-индуцированное фосфорилирование тау, влияет на образование  $\beta$ -амилоида и его предшественников; на данный момент проводятся

клинические исследования терапии литием пациентов с БА (Mota de Freitas, D., Levenson, B. D., Goossens, J. L., 2016).

### **1.3.3 Биологические свойства: фармакокинетика и фармакодинамика**

Существует несколько солей лития для использования в клинической практике, различающихся по своим фармакокинетическим характеристикам: карбонат лития, хлорид лития, цитрат лития, сульфат лития и другие (Altamura, A. C. et al., 1977; Malhi, G. S. et al., 2012; Oruch, R. et al., 2014).

Поскольку карбонат лития обладает низкой растворимостью, он более медленно всасывается в желудочно-кишечном тракте; пиковая концентрация лития в плазме после перорального применения карбоната лития наступает через 4 ч, в то время как после приема хлорида/сульфата лития – через 1 ч (Altamura, A. C. et al., 1977). Карбонат, хлорид и сульфат лития обладают схожими показателями распределения, биодоступности и полувыведения (Altamura, A. C. et al., 1977; Malhi, G. S. et al., 2012). Кроме того, в настоящее время, коммерчески доступными являются препараты с быстрым (immediate release) и медленным (slow release) высвобождением карбоната лития; при этом препараты с медленным высвобождением позволяют достичь более стабильных концентраций лития в плазме (Malhi, G. S. et al., 2012).

Терапевтические дозы карбоната лития, используемые в клинической практике, составляют 0,4-2 гр/сут для перорального приема у взрослых, позволяя достичь концентрации препарата в сыворотке 0,5-1 ммоль/л; при этом токсичными считаются концентрации в сыворотке на уровне 3-10 ммоль/л (Oruch, R. et al., 2014). Экскреция лития производится преимущественно почками (Grandjean, E. M., Aubry, J. M., 2009).

Побочные эффекты от применения солей лития дозозависимы, и включают в себя: тремор пальцев рук, тошноту, головную боль, нарушения функций щитовидной железы, полиурию и другие (Oruch, R. et al., 2014). Литий может вызывать острую и хроническую (при длительном употреблении) токсичность (Richman, L. S. et al., 2015).

### 1.3.4 Транспорт через биологические мембраны

Литий может входить в клетку несколькими способами, наиболее частый – пассивный транспорт через потенциал-зависимые (voltage-gated class) и потенциал-независимые натриевые каналы (non-voltage-gated epithelial class) (Vosahlikova, M., Svoboda, P., 2016; Jakobsson, E. et al., 2017; Roux, M., Dosseto, A., 2017). Проницаемость потенциал-зависимых натриевых каналов примерно одинакова для ионов  $\text{Na}^+$  и  $\text{Li}^+$  (Vosahlikova, M., Svoboda, P., 2016). При этом ионный радиус негидратированного лития (0,68 Å) близок к размеру негидратированного магния (0,65 Å), что объясняет конкуренцию между этими ионами в  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимых ферментах и опосредует основные биологические эффекты лития (Pasquali, L. et al., 2010; Freland, L., Beaulieu, J. M., 2012; Can, A., Schulze, T. G., Gould, T. D., 2014; Vosahlikova, M., Svoboda, P., 2016).

Основными путями выхода лития из клетки являются  $\text{Na}^+/\text{Li}^+$ -обратный транспорт и натриево-протонная помпа (Jakobsson, E. et al., 2017). По литературным данным, литий способен проникать в митохондрии через  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$ -каналы (Jakobsson, E. et al., 2017).

### 1.3.5 Клеточные мишени

Как было сказано выше, за счет конкурентного замещения ионов  $\text{Mg}^{2+}$  на  $\text{Li}^+$  литий ингибирует  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимые ферменты, включая тирозин киназу, аденилат циклазу, серин/треонин киназы, фосфоглюкомутазу, фосфодиэстеразы и многие другие ферменты (Freland, L., Beaulieu, J. M., 2012; Mota de Freitas, D., Levenson, B. D., Goossens, J. L., 2016; Roux, M., Dosseto, A., 2017). Кроме того, литий способен оказывать влияние на белки митохондриальной дыхательной цепи, ионные каналы (через которые он проходит сквозь биологические мембраны), а также может регулировать экспрессию некоторых генов, например *Bcl-2* (*B-cell lymphoma 2*) (Roux, M., Dosseto, A., 2017). Тем не менее, основные биологические эффекты лития

в клетке связывают со способностью лития ингибировать ферменты GSK-3 и IMPase.

**Аденилатциклаза.** Аденилатциклаза - трансмембранный фермент, катализирующий превращение аденозинтрифосфата (АТФ) в 3'-5'-циклический аденозинмонофосфат (цАМФ) и участвующий во множестве клеточных сигнальных путей; предположительно, литий ингибирует аденилатциклазу за счет конкуренции с  $Mg^{2+}$ , а также за счет ингибирования активирующей фермент субъединицы Gαs (Mota de Freitas, D., Levenson, B. D., Goossens, J. L., 2016).

**Серин/треонин киназы.** Среди семейства серин/треониновых киназ GSK-3 – является одной из наиболее изученных и важнейших мишеней лития. GSK-3 выполняет фосфорилирование сериновых или треониновых остатков своего субстрата, что определяет ее биологическую активность в клетке, при этом считается, что GSK-3 является конститутивно активным ферментом (Mota de Freitas, D., Levenson, B. D., Goossens, J. L., 2016).

**Фосфоглюкомутаза.** Фосфоглюкомутаза участвует в обмене глюкозы, катализируя превращение глюкозо-1-фосфата в глюкозо-6-фосфат, и для активности нуждается в ионе  $Mg^{2+}$ , который может быть вытеснен литием (Roux, M., Dosseto, A., 2017).

**Фосфодиэстеразы.** Литий ингибирует семейство фосфодиэстераз, в том числе IMPase, IPPase (inositol poliphosphatase) и другие ферменты этого семейства (Hallcher, L. M., Sherman, W. R., 1980; Berridge, M. J., Downes, C. P., Hanley, M. R., 1982; Phiel, C. J., Klein, P. S., 2001; Pasquali, L. et al., 2010; Can, A., Schulze, T. G., Gould, T. D., 2014); среди них именно с IMPase связывают основные эффекты лития в клеточном метаболизме инозитола (Toker, L., Agam, G., 2014). Литий ингибирует IMPase также за счет замещения ионов  $Mg^{2+}$  (Mota de Freitas, D., Levenson, B. D., Goossens, J. L., 2016), что приводит к нарушению метаболизма инозитола. IMPase модулирует сигнальный путь фосфатидил инозитола.



### 1.3.6 Литий и рак

Интересное исследование было проведено в Израиле Cohen, Y. и др.: была изучена взаимосвязь между приемом карбоната лития психиатрическими пациентами и риском развития рака (Cohen, Y. et al., 1998). В исследование включили пациентов старше 18 лет, получавших карбонат лития по меньшей мере в течение одного года за период с 1959 по 1985 гг. – всего 609 человек. Исследователи выявили, что риск развития рака среди психиатрических пациентов был ниже, чем в общей популяции, при этом авторы отметили значительную обратную корреляцию между развитием рака и дозой лития. Была показана более низкая частота развития мезенхимальных опухолей по сравнению с эпителиальными у пациентов, получавших литий.

В похожем исследовании в Швеции Martinsson L и др. изучали риск развития рака у пациентов с биполярными расстройствами с/без лечения литием: был выявлен повышенный риск развития респираторного, гастроинтестинального и эндокринного типов рака у пациентов, не получавших литиевую терапию (Martinsson, L. et al., 2016).

Исследование Huang, R. Y. и др. (Тайвань) также выявило более высокий риск развития рака у пациентов с биполярным расстройством, получавших в качестве терапии только антиконвульсанты, по сравнению с пациентами, получавшими литий (Huang, R. Y. et al., 2016). Перечисленные ретроспективные исследования подкрепляют интерес исследователей к потенциальному использованию лития для терапии рака.

Литий как противоопухолевый агент в последние годы изучается в экспериментальных моделях рака различной локализации (табл.1). В этих исследованиях оценивается способность лития индуцировать клеточную гибель, снижать пролиферацию, влиять на клеточный цикл, эпителиально-мезенхимальный переход и стимулировать аутофагию при разных типах рака.

<b>Опухоли головного мозга</b>	Германия/Швеция, 2015; Zinke, J. et al. Великобритания/Испания/США, 2015; Cockle, J. V. et al. Китай, 2016; Fu, Y. et al. Турция, 2016; Elmaci, İ., Altinoz, M. A. Китай, 2017; Han, S. et al. Япония, 2017; Furuta, T. et al.
<b>Шваннома</b>	Китай, 2017; Wang, Y. et al.
<b>Лейкоз</b>	Франция, 2015; Zassadowski, F. et al. Китай, 2015; Li, L. et al. Бразилия, 2018; Peixoto-da-Silva, J. et al.
<b>Рабдомиосаркома</b>	Германия, 2017; Schleicher, S. B. et al.
<b>Рак пищевода</b>	Ирландия, 2015; O'Donovan, T. R. et al. Китай, 2017; Gao, S. et al.
<b>Рак поджелудочной железы</b>	Турция, 2016; Elmaci, İ., Altinoz, M. A. Китай, 2017-1; Wang, X. et al. Китай/США, 2017-2; Wang, X. et al.
<b>Гепатоцеллюлярная карцинома</b>	Турция, 2005; Erdal, E. et al. Франция, 2009; Beurel, E. et al.
<b>Рак толстой кишки</b>	Китай, 2014; Li, H. et al. Хорватия, 2015; Trnski, D. et al. Ирландия, 2015; O'Donovan, T. R. et al. Италия, 2015; Costabile, V. et al. Южная Корея, 2016; Maeng, Y. S. et al. Бразилия, 2016; de Araujo, W. M. et al.

**Таблица 1.** Использование солей лития в экспериментальной терапии рака различной локализации (литературные данные).

В базе данных PubMed за период с 2005 по 2018 гг. было обнаружено всего две работы по использованию лития для экспериментальной терапии

ГЦК. В исследовании Erdal, E. и соавт. литий ингибировал рост клеток гепатоцеллюлярной карциномы, изменял клеточную морфологию (повышение соотношения ядро/цитоплазма; появление многоядерности), способствовал накоплению клеток в фазе G<sub>1</sub>/S клеточного цикла (Erdal, E. et al., 2005).

Beurel, E. и соавт. исследовали влияние лития на TRAIL-индуцированный апоптоз (TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand) в клетках ГЦК (Beurel, E. et al., 2009). Литий повышал уровни каспазы-3, каспазы-8 и p53, стимулируя TRAIL-индуцированный апоптоз в клетках ГЦК, которым предписывается устойчивость к этому механизму клеточной гибели, при этом не было выявлено подобного влияния на первичные гепатоциты (Beurel, E. et al., 2009). Таким образом, исследования лития в контексте ГЦК ограничены, и их целью не являлась оценка аутофагии.

Таким образом, многочисленными исследованиями подтверждена способность лития влиять на различные сигнальные пути, используемые опухолевыми клетками для роста и развития: PI3K/AKT/mTOR, MAPK/ERK, Wnt/ $\beta$ -catenin и другие; в основном, это влияние реализуется за счет способности лития ингибировать GSK-3 $\beta$ , а также другие ферменты и белки, имеющие значение в канцерогенезе.

#### **1.4. Заключение по литературному обзору**

Анализ литературных данных свидетельствует, что гепатоцеллюлярная карцинома является крайне злокачественным новообразованием. Одной из ведущих причин резистентности ГЦК к системной химиотерапии считается гетерогенность данного типа опухоли.

Аутофагия имеет решающее значение для поддержания клеточного гомеостаза и нормального функционирования клетки. Современные литературные данные свидетельствуют о новом понимании роли аутофагии при раке: стимуляция аутофагии может рассматриваться как перспективный подход к подавлению опухолевого роста и метастазирования.

Гепатоцеллюлярная карцинома характеризуется дефицитной аутофагией, однако в настоящее время имеется значительный недостаток в исследованиях роли аутофагии в развитии и прогрессировании ГЦК.

Литий является признанным индуктором аутофагии, кроме того, литий также используется для экспериментальной терапии рака различной локализации, однако его применение при гепатоцеллюлярной карциноме ограничивалось всего несколькими научными группами, и в этих исследованиях не оценивалась способность лития индуцировать аутофагию в опухолевых клетках. Исходя из всего вышесказанного, можно заключить, что исследование индукции аутофагии с помощью лития в клетках ГЦК является актуальным и может быть основой для разработки нового подхода к терапии данной патологии.

## ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Реагенты

Карбонат лития (Новосибирский завод редких металлов, Россия); раствор натрия хлорида 0,9 % (физиологический раствор 0,9 %) (Гематек, Россия); параформальдегид (Sigma-Aldrich, США); сахароза (PanReac AppliChem, США); раствор Хенкса (Биолот, Россия); осмий тетроксид ( $\text{OsO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, США); эпон (Serva, Германия); толуидиновый синий (Fluka, США); цитрат свинца (Fluka, США); PBS (фосфатный солевой буфер в таблетках) (Росмедбио, Россия); Tween 20 (PanReac AppliChem, США); Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США); раствор для демаскировки (antigen retrieval solution, pH 6.0) (Novocastra, Germany); перекись водорода 6 % (Росбиоагрофарм, Россия); нормальная козья сыворотка (Abcam, Великобритания); BSA (бычий сывороточный альбумин) (Биолот, Россия); поликлональные антитела кролика к LC3 beta человека, мыши и крысы (ab48394, Abcam, Великобритания); моноклональные антитела крысы к LAMP1 человека и мыши (ab25245, Abcam, Великобритания); вторичные поликлональные антитела козла к IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor® 488 (ab150077, Abcam, Великобритания); вторичные поликлональные антитела козла к IgG крысы, конъюгированные с Alexa Fluor® 568 (ab175476, Abcam, Великобритания); гематоксилин Майера (Бiovитрум, Россия); монтирующая среда (Abcam, Великобритания); монтирующая среда с DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Abcam, Великобритания); 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (Sigma-Aldrich, США). Для иммунофлюоресцентного окрашивания использовали предметные стекла с полилизинным покрытием (Thermo Fisher Scientific, США); покровные стекла (Бiovитрум, Россия).

### Клеточная линия и животные

Для моделирования опухолевого процесса использовали клеточную линию гепатоцеллюлярной карциномы-29 (Г-29), полученную и

верифицированную сотрудниками Института цитологии и генетики СО РАН и любезно предоставленную для наших исследований (Каледин, В. И. и др., 2009). Клетки Г-29 культивировали в ростовой питательной среде RPMI с содержанием 10 % сыворотки крови плодов коровы в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 °С. Посевная концентрация составляла  $2,0 \times 10^6$  клеток в 1 мл.

Эксперимент выполнен на мышах-самцах линии СВА массой 18-20 г в возрасте 3 месяцев. Животных содержали на стандартной диете со свободным доступом к воде и пище. Все манипуляции с животными осуществлялись под эфирным наркозом и не были связаны с риском причинения им боли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приказ МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 г.; Приказ Министерства высшего и среднего специального образования СССР № 742 от 13 ноября 1984 г.).

### **МТТ-тест**

Цитотоксичность препаратов оценивали с помощью МТТ-теста, позволяющего выявить количество жизнеспособных клеток по изменению оптической плотности раствора (Sylvester, P. W., 2011). Данный метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ клеток восстанавливать МТТ-реагент (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромида до фиолетового кристаллического формаза, растворимого в диметилсульфоксиде. Таким образом, количество образовавшегося формаза прямо пропорционально количеству метаболически активных клеток, а интенсивность окрашивания напрямую отражает их жизнеспособность.

Клетки Г-29 рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты в концентрации  $20-30 \times 10^3$  клеток/лунку, инкубировали в течение 24 ч при 37 °С во влажной среде, содержащей 5 % двуокиси углерода (стандартные условия). Далее в планшеты вносили карбонат лития в широком диапазоне концентраций (от 0,00001 до 20 мМ) и совместно культивировали в течение

24 ч при стандартных условиях. В качестве контроля использовались лунки с клетками Г-29 с питательной средой без добавления препарата. Затем в каждую лунку добавляли МТТ-реагент в конечной концентрации 250 мкг/мл, инкубировали клетки в течение 4 ч, далее добавляли по 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) в каждую лунку. После растворения кристаллов формазана (через 60 мин) снимали значения оптической плотности субстрата в лунках с помощью микропланшетного фотометра Multiskan FC (ThermoScientific, США) при длине волны 620 нм. Процент жизнеспособных опухолевых клеток вычисляли по формуле: (оптическая плотность раствора опыта / оптическая плотность раствора контроля) × 100 %. Метод выполнен с помощью сотрудников лаборатории клеточных технологий НИИКЭЛ (Лыкова А. П.) и лаборатории фармацевтических активных соединений НИИКЭЛ (Соловьевой А. О.).

### **Проточная цитофлюорометрия**

Определение влияния карбоната лития на клеточный цикл клеток линии Г-29 было проведено при помощи проточной цитофлюорометрии с использованием ДНК интеркалирующего флюоресцентного красителя - Пропидий йодида (PI). Метод основан на стехиометрии PI, т. е. он связывается пропорционально количеству ДНК, которое находится в клетках в определенных фазах цикла. При переходе в S-фазу ДНК в клетке становится больше по сравнению с G<sub>1</sub>-фазой, и количество красителя увеличивается пропорционально количеству ДНК. При переходе клетки в G<sub>2</sub>/M-фазу количество ДНК увеличивается вдвое, что приводит к увеличению интенсивности флюоресценции клеток в G<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла.

Клетки Г-29 культивировали в ростовой питательной среде RPMI с содержанием 10 % сыворотки крови плодов коровы в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 °С. Посевная концентрация составляла 2,0 × 10<sup>6</sup> клеток в 1 мл. Карбонат лития добавляли в культуральную среду в концентрации 5 мМ. В качестве

контроля использовались клетки, культивированные в питательной среде без добавления карбоната лития. Клетки культивировали в течение 24 и 48 ч, после чего их осаждали центрифугированием, отмывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и фиксировали ледяным 70 % этанолом. Далее клетки осаждали, добавляли буфер для экстракции ДНК на 30 мин. После экстракции клетки повторно центрифугировали и промывали PBS. Далее добавляли PI в 200 мкл PBS на 30 мин, клетки анализировали на проточном цитофлуорометре CytoFlexS (Beckman Coulter, USA). Метод выполнен с помощью сотрудников лаборатории клеточных технологий НИИКЭЛ (Лыкова А. П.) и лаборатории фармацевтических активных соединений НИИКЭЛ (Соловьевой А. О.).

### **Иммунофлуоресцентное исследование клеточной культуры Г-29 (IF-IC)**

Для иммунофлуоресцентного исследования клетки Г-29 после инкубации с карбонатом лития в дозе 5 мМ в течение 48 ч наносили на полилизинные стекла и фиксировали 10 % раствором формалина в течение 15 мин. После фиксации клетки трижды отмывали раствором PBS, затем покрывали раствором для блокирования неспецифического связывания антител, содержащим PBS/2,5 % бычий сывороточный альбумин (BSA)/0,25 % Тритон X-100, и инкубировали при комнатной температуре в течение 60 мин. Затем клетки гибридизовали с первичными поликлональными антителами к LC3 $\beta$ , LAMP1 в течение ночи при +4 °С и далее с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом, в течение 30 мин при +37 °С. После гибридизации клетки отмывали и заключали в монтирующую среду, содержащую DAPI. Изображения получали на флуоресцентном микроскопе Axio Observer Z1 (Zeiss, Германия).



### **Эксперимент *in vivo***

Клетки Г-29 перевивали мышам-самцам линии СВА в брюшную полость, через 10 суток производили забор асцитической жидкости, и далее вводили  $2 \times 10^6$  клеток в 100 мкл PBS в мышцу правого бедра. Эксперимент включал в себя 3 группы животных (по 5 мышей) с перевитой Г-29. В первую группу вошли мыши с интактной опухолью (контроль), во вторую группу — животные, получавшие инъекции 100 мкл 0,9 % физиологического раствора хлорида натрия (ФР), в третью группу — животные, получавшие инъекции 20 ммоль карбоната лития ( $\text{Li}_2\text{CO}_3$ ) в 100 мкл 0,9 % физиологического раствора хлорида натрия (КЛ). Инъекции препаратов выполнялись внутримышечно по периферии опухоли через день. Забор материала для исследований (мышечная ткань бедра, содержащая опухоль) проводили на 23-и сутки эксперимента в утренние часы. Животных выводили из эксперимента под эфирным наркозом методом кранио-цервикальной дислокации.

### **Световая и трансмиссионная электронная микроскопия**

Для проведения световой и трансмиссионной электронной микроскопии (ТЕМ) биологический аутопсийный материал фиксировали в 4 % растворе параформальдегида, приготовленном на среде Хенкса, дофиксировали в течение 1 ч в 1 % растворе  $\text{OsO}_4$  (осмий тетраоксид) на фосфатном буфере (рН 7.4), дегидратировали в этиловом спирте возрастающей концентрации и заключали в эпон. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм получали на ультрамикротоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия), окрашивали толуидиновым синим, с помощью светового микроскопа LEICA DME (Leica Microsystems, Германия) выбирали образцы для исследования в электронном микроскопе. Из отобранного материала изготавливали ультратонкие срезы толщиной 70-100 нм на ультратоме Leica EM UC7 (Leica Microsystems, Германия), контрастировали насыщенным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца.

Фотографии получали с помощью электронного микроскопа JEM 1400 (JEOL, Япония).

### **Иммунофлюоресцентное исследование на срезах замороженной ткани (IF-F)**

Иммунофлюоресцентное исследование проводили на криосрезах опухолевой ткани. Для приготовления криосрезов опухолевую ткань фиксировали 4 % раствором параформальдегида в течение суток, после фиксации отмывали охлажденным раствором PBS и погружали в раствор 30 % сахарозы на сутки. После этого кусочки ткани помещались в фольгу со средой TissueTek и замораживались при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Срезы из замороженной опухолевой ткани получали на криостате HM 550OP (Zeiss, Германия). Для проведения процедуры окрашивания криосрезы трижды отмывали раствором PBS и инкубировали в растворе, содержащем PBS/1 % бычий сывороточный альбумин/1 % Triton X-100 для блокирования неспецифического связывания. Затем срезы гибридизировали с первичными поликлональными антителами к LC3 $\beta$  (1/200) и LAMP1 (1/200) в течение ночи при  $+4^{\circ}\text{C}$  и, далее, с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с флюорохромом в течение 2 ч при  $+37^{\circ}\text{C}$ . Далее срезы отмывали раствором PBS и заключали в монтирующую среду, содержащую DAPI. Изображения получали на флюоресцентном микроскопе Axio Observer Z1 (Zeiss, Германия).

### **Морфометрия и статистический анализ**

Планирование и проведение морфометрического исследования выполняли в соответствии с принципами морфометрии внутриклеточных компонентов (Шкурупий, В. А., 1989). В эксперименте *in vitro* с помощью световой микроскопии определяли диаметры ядер и цитоплазмы, объемы ядер и цитоплазмы и ядерно-цитоплазматическое соотношение опухолевых клеток Г-29. Всего исследовали 600 клеток. Для исследования аутофагии в

опухоли *in vivo* для каждой группы были независимо отобраны по 100 клеток Г-29, содержащих ядро и имеющих непрерывную четкую клеточную мембрану (всего исследовали 300 клеток).

Морфометрию проводили на цифровых изображениях с увеличением  $\times 8000$  с помощью программного обеспечения Image J (Wayne Rasband, США), используя открытую тестовую систему. Шаг тестовой системы составлял 285 нм. Для каждой клетки считали объемную ( $V_v$ ) плотность ядра и цитоплазмы; объемную плотность ( $V_v$ ) гранулярной эндоплазматической сети и зон деструкции внутриклеточных органелл; объемные ( $V_v$ ) и численные ( $N_A$ ) плотности митохондрий; аутофагических вакуолей и лизосом.

Методика морфометрии аутофагических структур и их интерпретация были выработаны в соответствии с руководством по мониторингу аутофагии (Klionsky, D. J. et al., 2016). Под термином «аутофагосома» понималась структура клетки, содержащая интактную цитоплазму с органеллами или без них, либо структура, участвующая в селективной аутофагии и содержащая в таком случае целевые клеточные компоненты (митохондрии, пероксисомы и т.д.). Аутофагосомы имели два параллельных мембранных слоя с узкой электронно-прозрачной щелью между ними. Термином «аутолизосома» обозначали везикулы, имеющие одну пограничную мембрану и содержащие гетерогенный электронно-плотный цитоплазматический материал на разных стадиях деградации. Мелкие электронно-плотные структуры с относительно гомогенным содержимым идентифицировали как лизосомы. Зонами деструкции внутриклеточных компонентов считали субклеточные электронно-прозрачные участки цитоплазмы, не содержащие органелл. Ядерно-цитоплазматический индекс вычисляли путем деления объемной плотности ядра на объемную плотность цитоплазмы; по величине ядерно-цитоплазматического соотношения клетки были разделены на 5 цитологических типов.

Морфометрию цифровых изображений, полученных в результате иммунофлюоресцентного окрашивания, проводили с помощью программного обеспечения Image J (Wayne Rasband, США), используя закрытую тестовую систему.

Для оценки результатов иммунофлюоресцентного окрашивания клеток Г-29 *in vitro* были выбраны по 10 полей зрения для каждой исследуемой группы (общая тестовая площадь составила 0,005 мм<sup>2</sup> для каждой группы). Было подсчитано количество клеток, содержащих везикулы, позитивные на маркеры LC3 beta- или LAMP1, а также общее количество клеток в каждом поле зрения. Данные представлены как средний процент клеток на группу, имеющих LC3 beta- или LAMP1-позитивные везикулы.

Для оценки результатов иммунофлюоресцентного окрашивания клеток Г-29 *in vivo* были отобраны по 6 полей зрения для каждой исследуемой группы (общая тестовая площадь составила 0,035 мм<sup>2</sup> для каждой группы). Было подсчитано количество клеток, содержащих везикулы, позитивные на маркеры LC3 beta- или LAMP1. Данные представлены как среднее количество клеток на группу, имеющих LC3 beta- или LAMP1-позитивные везикулы.

Среднее значение (M - mean), стандартное отклонение (SD – standard deviation), медиану и интерквартильный размах вычисляли с помощью программного обеспечения Microsoft Excel (Microsoft, США). Ввиду выраженной гетерогенности популяции клеток Г-29 для сравнения независимых выборок применяли непараметрические методы. Достоверность различий между исследуемыми параметрами определяли с помощью программного обеспечения Statistica 6.0 (StatSoft, США) с использованием U-критерия Манна-Уитни, а при сравнении нескольких групп – критерия Крускала-Уоллиса. Уровень значимости достоверности различий был принят 95 % ( $p < 0,05$ ). На графиках для наглядности данные представлены в виде  $M \pm SD$ .

## ГЛАВА III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1 Анализ влияния карбоната лития на популяцию клеток Г-29 в эксперименте *in vitro*

#### 3.1.1 Оценка влияния карбоната лития на жизнеспособность, клеточный цикл и гибель клеток Г-29

С помощью МТТ-теста оценивали жизнеспособность клеток Г-29 при введении различных доз карбоната лития (рис. 6, А). При введении 5 мМ карбоната лития жизнеспособность клеток составляла 76 %; данная концентрация была выбрана для проведения эксперимента *in vitro*, поскольку при введении препарата такой концентрации сохранялось необходимое количество жизнеспособных клеток для проведения морфологического исследования. Введение 20 мМ карбоната лития вызывало гибель приблизительно 65 % клеток. Учитывая возможные системные эффекты лития и влияние микроокружения опухоли, для выполнения эксперимента *in vivo* данная концентрация была признана оптимальной для развития морфологических изменений и аутофагии в клетках Г-29.

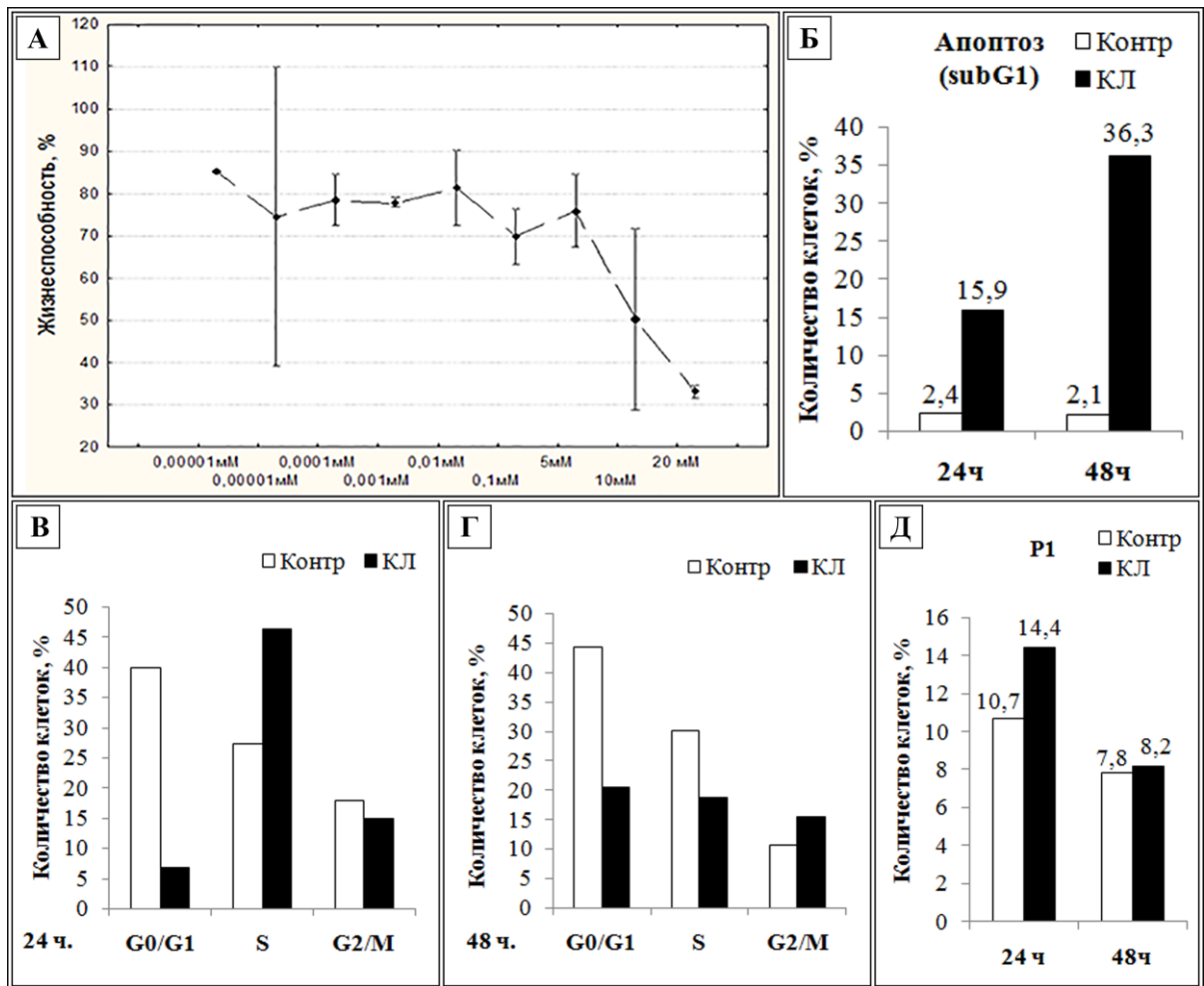
С помощью проточной цитофлуорометрии оценивали влияние карбоната лития на клеточный цикл (рис. 6, В, Г) и гибель (рис. 6, Б) клеток Г-29 при совместном культивировании в течение 24 и 48 ч в сравнении с контрольной группой.

Клетки, находящиеся в стадии  $subG_1$ , расценивались как клетки, находящиеся в апоптозе; их количество увеличивалось после добавления карбоната лития в питательную среду: на 13,5 % через 24 ч, и на 34,2 % через 48 ч (рис. 6, Б).

Количество жизнеспособных клеток после культивирования с карбонатом лития в течение 24 ч снижалось на 25 %; в течение 48 ч – на 41 %. Количество клеток, находящихся в фазе  $G_0/G_1$  клеточного цикла после введения карбоната лития через 24 ч уменьшилось на 33,1 %, в S-фазе – увеличилось на 19 %, в фазе  $G_2/M$  - уменьшилось на 3 %. Количество клеток, находящихся в фазе  $G_0/G_1$  клеточного цикла, после введения карбоната лития

через 48 ч снизилось на 23,9 %, в S-фазе – уменьшилось на 11,4 %, в G<sub>2</sub>/M-фазе - увеличилось на 4,6 %.

Также было подсчитано количество полиплоидных клеток: через 24 ч после инкубации с карбонатом лития их количество увеличилось на 3,7 %, через 48 ч – на 0,4 % (рис. 6, Д).



**Рисунок 6.** МТТ-тест: дозозависимое снижение жизнеспособности клеток Г-29 при введении карбоната лития (А). Исследование апоптоза (Б), распределения клеток Г-29 по фазам клеточного цикла (В, Г) и оценка количества полиплоидных клеток Г-29 (Д) в контрольной группе и после введения 5 мМ карбоната лития через 24 ч и через 48 ч, выполненные с помощью проточной цитофлуорометрии. Контр – контрольная группа, КЛ – карбонат лития. SubG<sub>1</sub> – клетки в состоянии апоптоза. G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>/M – стадии клеточного цикла. P1 – полиплоидные клетки.

Таким образом, введение карбоната лития в культуру клеток Г-29 вызывало дозозависимое снижение их жизнеспособности. Совместное культивирование клеток Г-29 в течение 24 ч способствовало накоплению клеток в S-фазе клеточного цикла и увеличению апоптоза на 13,5 %. Инкубация клеток с карбонатом лития в течение 48 ч приводила к увеличению количества клеток, находящихся в фазе G<sub>2</sub>/M клеточного цикла, и повышению апоптоза на 34,2 %.

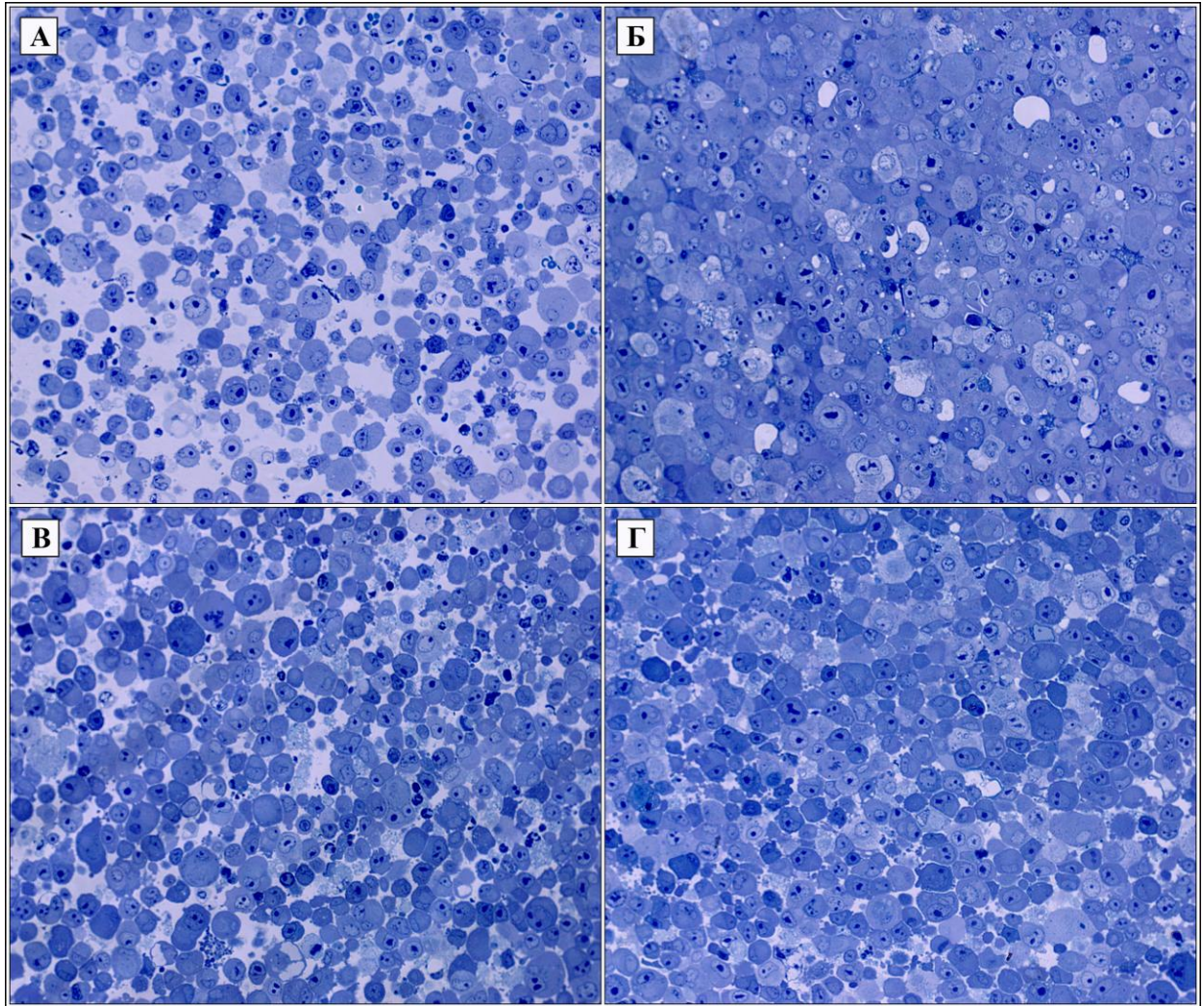
### **3.1.2 Ультраструктурная организация клеток Г-29 и изучение морфологии клеток-мишеней карбоната лития**

При светооптическом исследовании клеточной культуры Г-29 было обнаружено, что клетки различаются по размерам, величине ядра и цитоплазмы (рис. 7). Эти различия были выявлены на разных сроках забора клеток из культуральной среды: 30 мин, 6 ч, 24 ч и 48 ч.

Анализ ядерно-цитоплазматического соотношения и ультраструктурной организации опухолевых клеток выявил гетерогенность популяции Г-29 по данным параметрам. По величине ядерно-цитоплазматического соотношения и по содержанию внутриклеточных органелл опухолевые клетки были разделены на 5 типов (рис. 8). Данные параметры были приняты как критерии для разделения клеточной популяции Г-29 на степени дифференцированности в соответствии с разработанными ранее морфологическими критериями (Бгатова, Н. П. и др., 2015).

Анализ распределения клеток из асцитической жидкости на степени дифференцированности показал, что клетки I степени дифференцированности составляют 6 %, клетки II степени – 20 %, III – 35 %, IV – 29 % и V степени дифференцированности – 10 % популяции опухолевых клеток. Популяция клеток Г-29 отличалась не только размерами и объемной долей цитоплазмы, но и насыщенностью органеллами.





**Рисунок 7.** Гетерогенность клеточной культуры гепатоцеллюлярной карциномы-29, сохраняющаяся на различных сроках культивирования: 30 мин (А); 6 ч (Б); 24 ч (В); 48 ч (Г). Окраска толуидиновым синим. Увеличение  $\times 400$ .

В цитоплазме клеток выделенной первой степени дифференцированности, у которых ядерно-цитоплазматическое соотношение составляло  $0,797 \pm 0,008$ , отмечали одиночные митохондрии, слабо выраженными были цистерны гранулярной эндоплазматической сети (гЭПС), преобладали свободные полисомальные рибосомы.

В цитоплазме клеток второй степени дифференцированности (ядерно-цитоплазматическое соотношение составляло  $0,681 \pm 0,005$ ), наряду с



описанными выше органеллами, выявляли отдельные липидные включения, а значение объемной плотности цистерн гЭПС было увеличено в 2,5 раза.

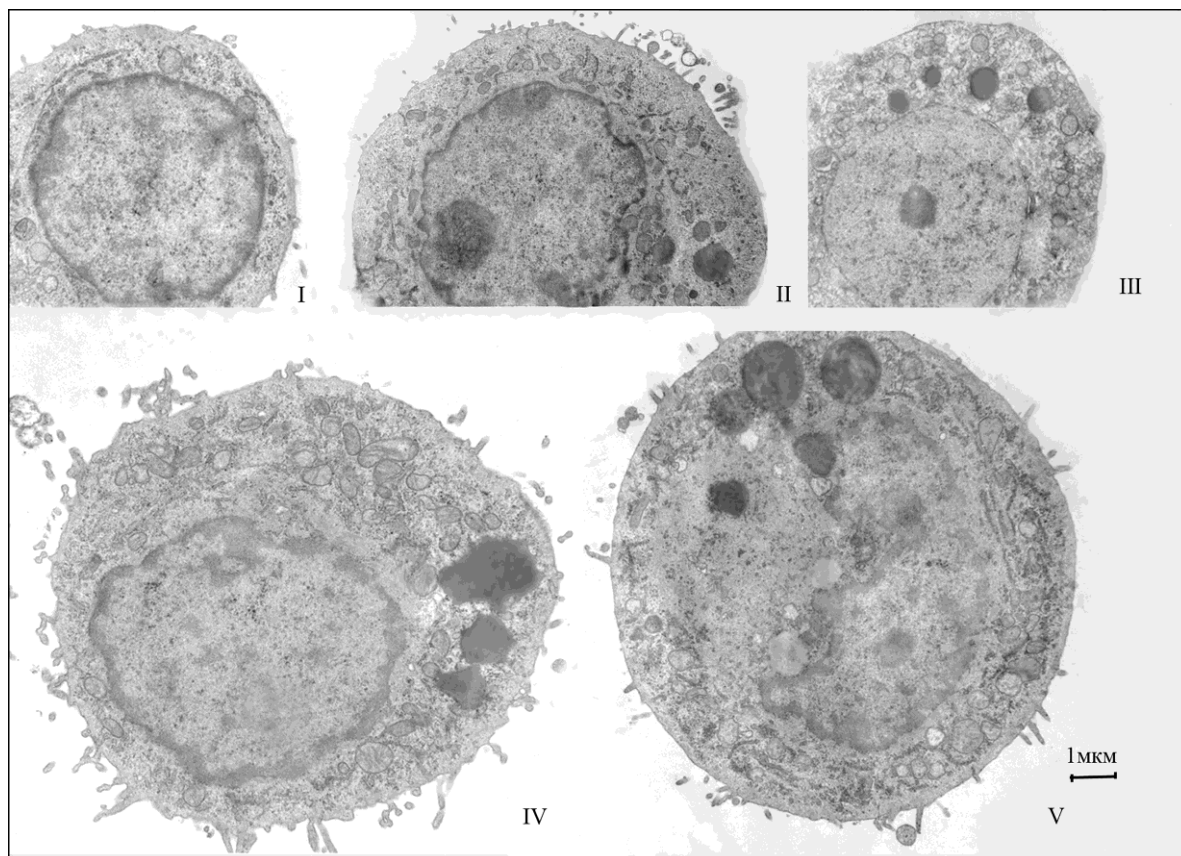
В выделенных клетках III и IV степени дифференцированности (ядерно-цитоплазматическое соотношение составляло, соответственно  $0,596 \pm 0,005$  и  $0,492 \pm 0,004$ ) отмечали возрастание доли цитоплазмы, накопление митохондрий, цистерн гЭПС, прикрепленных и свободных полисомальных комплексов, лизосом и липидных включений. Величина объемной плотности цистерн гЭПС в клетках III и IV степени дифференцированности была больше, чем в клетках I степени в 3 и 4 раза, соответственно.

Клетки V степени дифференцированности с ядерно-цитоплазматическим соотношением  $0,384 \pm 0,006$  отличались значительным объемом цитоплазмы с небольшим содержанием цистерн гЭПС и митохондрий, наличием липидных включений и повышенным количеством свободных полисомальных комплексов.

В эксперименте *in vitro* была выбрана доза карбоната лития – 5 мМ, при которой, как минимум оставалось 76 % жизнеспособных опухолевых клеток; клетки культивировали в течение 48 ч. В качестве контроля были взяты интактные клетки Г-29. Определяли диаметры и объемы ядер и цитоплазмы, а также ядерно-цитоплазматический индекс (ЯЦИ) опухолевых клеток Г-29 в группе контроля и при введении карбоната лития (всего было обчислено 600 клеток). По значению ЯЦИ все они были разделены на 5 степеней дифференцированности в соответствии с выработанными ранее критериями. Для каждой степени были определены средние значения (M) и стандартные отклонения (SD) ЯЦИ. В группе контроля эти значения составили для I степени –  $0,49 \pm 0,08$ ; II –  $0,34 \pm 0,03$ ; III –  $0,25 \pm 0,03$ ; IV –  $0,15 \pm 0,03$ ; V –  $0,07 \pm 0,02$ .

Культивирование опухолевых клеток с карбонатом лития в концентрации 5 мМ в течение 48 ч изменяло соотношение различных типов клеток (рис. 9, А и Б). Суммарно низкодифференцированные клетки I–III

степени дифференцированности в группе контроля составляли 52,8 %, при введении карбоната лития – 69,3 %; дифференцированные клетки IV и V степени в группе контроля составляли 47,1 %, при введении карбоната лития – 30,7 % (рис. 9, В).

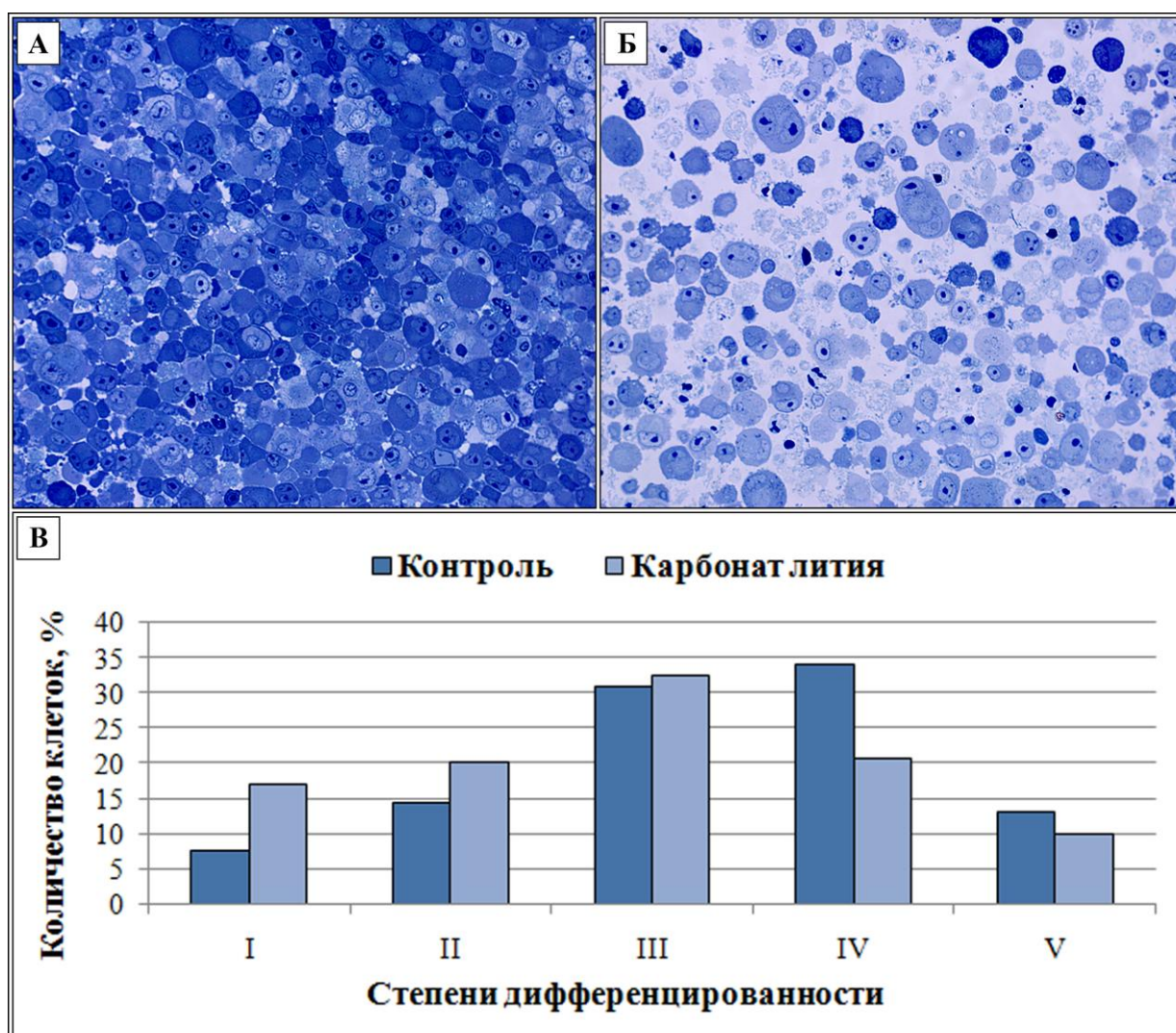


**Рисунок 8.** Гетерогенность популяции опухолевых клеток Г-29. Распределение клеток Г-29 на степени дифференцированности в зависимости от ядерно-цитоплазматического соотношения и концентрации субклеточных компонентов, выполненное с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Увеличение  $\times 4000$ .

Таким образом, гетерогенность клеток Г-29 определяется размерами, объемной долей цитоплазмы и насыщенностью органеллами. Сопоставление этих параметров выявило, что по величинам ядерно-цитоплазматического соотношения клетки Г-29 можно разделить на 5 типов. Все эти параметры

отражают функциональную активность и разные степени дифференцированности и жизнедеятельности клеток.

Анализ распределения клеток Г-29 в контрольной группе *in vitro* показал, что в популяции опухолевых клеток низкодифференцированные клетки I–III степени дифференцированности составляют 52,8 %, а дифференцированные клетки IV и V степени – 47,1 %. Клетками-мишенями карбоната лития преимущественно являются клетки IV и V типов.

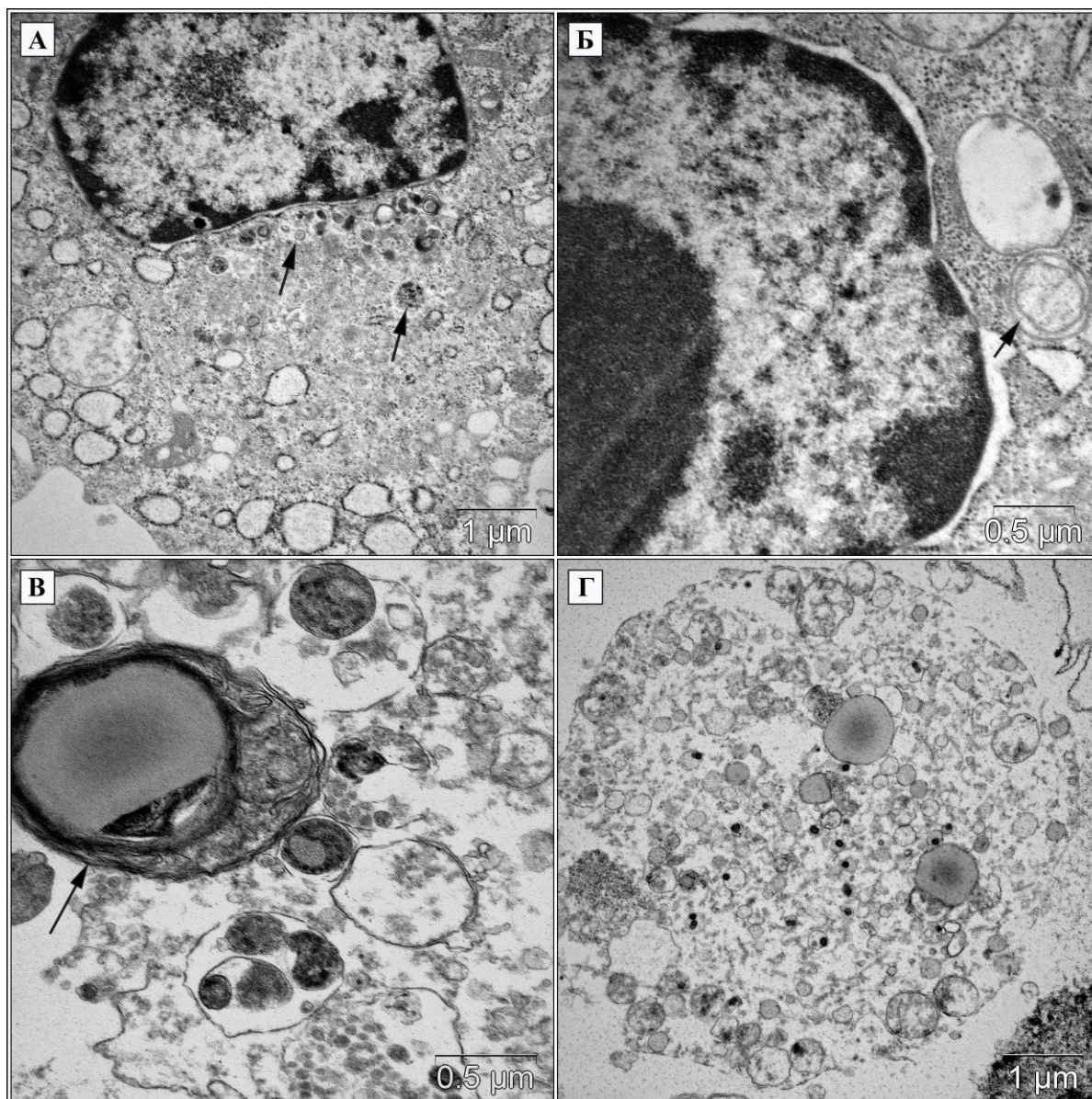


**Рисунок 9.** Морфология клеток Г-29 в контрольной группе (А) и через 48 ч после введения 5 мМ карбоната лития (Б). Распределение клеток Г-29 на степени дифференцированности в зависимости от ядерно-цитоплазматического соотношения (В). Окраска толуидиновым синим. Увеличение  $\times 400$ .



### 3.1.3 Влияние карбоната лития на развитие аутофагии *in vitro*

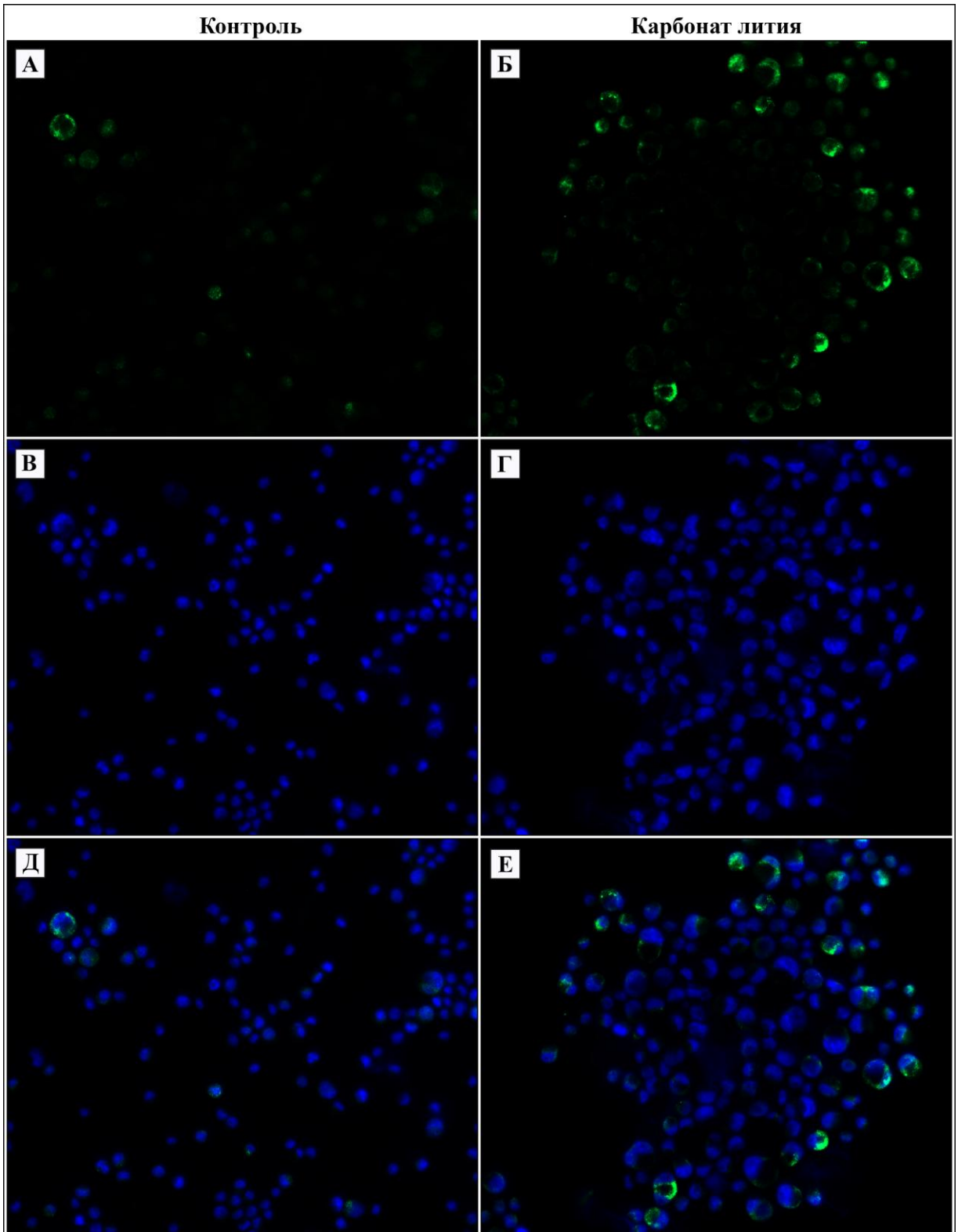
С помощью трансмиссионной электронной микроскопии были выявлены ультраструктурные признаки аутофагии: накопление аутофагосом и аутолизосом, селективная деградация цитоплазматического содержимого и субклеточных компонентов (рис. 10).



**Рисунок 10.** Аутофагия в клетках гепатоцеллюлярной карциномы-29 *in vitro* при введении карбоната лития. **А** – частицы карбоната лития в аутолизосомах (стрелки); **Б** – селективная деградация митохондрии – митофагия (стрелка); **В** – селективная деградация ядра – нуклеофагия (стрелка); **Г** – тотальная деструкция ультраструктур цитоплазмы.

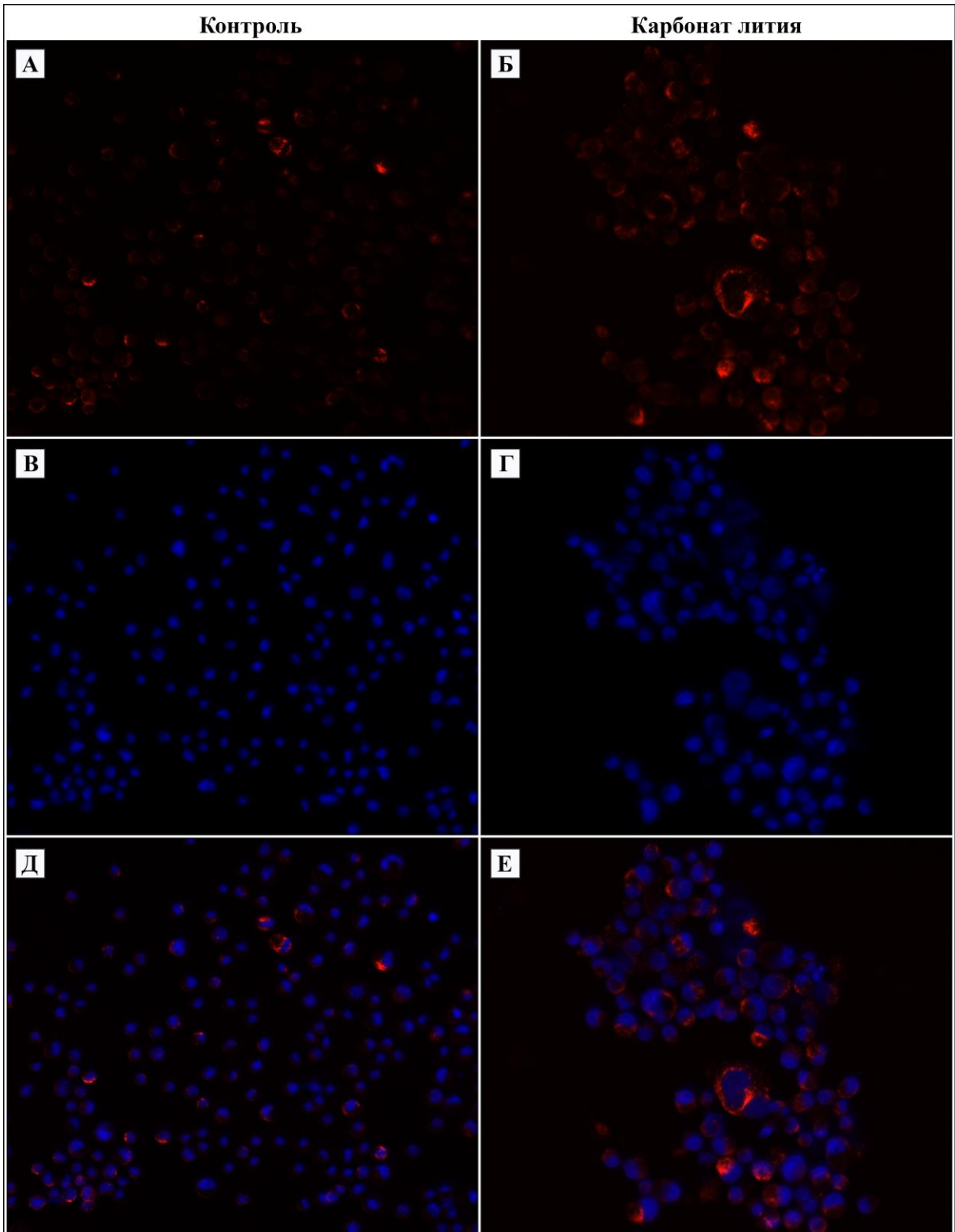
С помощью иммунофлюоресцентного исследования оценивалась способность карбоната лития влиять на экспрессию маркеров аутофагии – LC3 beta (рис. 11) и LAMP1 (рис. 12) в клетках Г-29 *in vitro*. Был подсчитан процент клеток, имеющих LC3 beta-позитивные аутофагические структуры и LAMP1-позитивные структуры (рис. 13). В среднем процент клеток в группе контроля с LC3 beta-позитивными везикулами составлял  $6,08 \pm 5,6$ ; введение карбоната лития достоверно увеличивало количество таких клеток в 3,9 раза. При подсчете процента клеток, имеющих LAMP1-позитивные структуры, достоверных различий выявлено не было.

Изучение клеток Г-29 *in vitro* с помощью трансмиссионной электронной микроскопии выявило развитие аутофагии при введении карбоната лития. Проведенное иммунофлюоресцентное исследование показало повышение экспрессии маркера аутофагии LC3 beta в популяции клеток Г-29. Таким образом, можно сделать вывод, что культивирование клеток Г-29 с карбонатом лития в течение 48 ч способствует развитию аутофагии в опухолевых клетках.

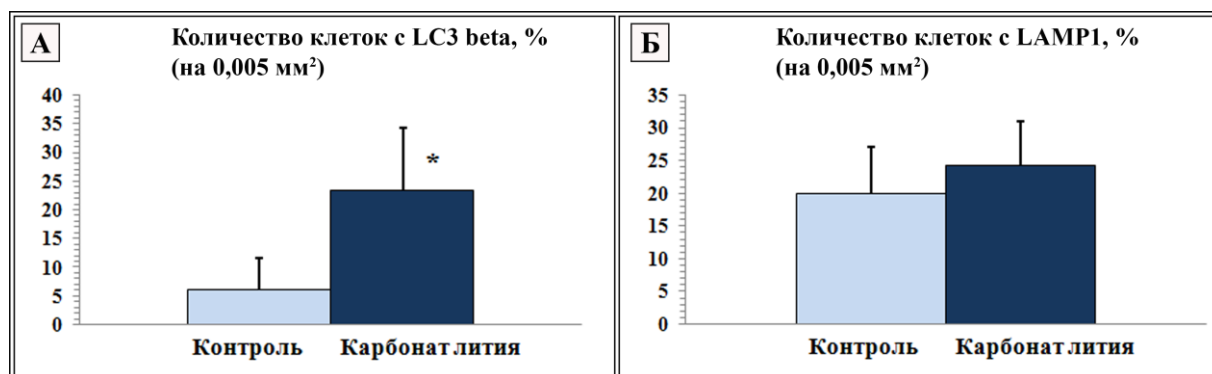


**Рисунок 11.** Иммунофлуоресцентное окрашивание на маркер аутофагии LC3 beta клеточной культуры Г-29 в контрольной группе (слева) и после введения 5 мМ карбоната лития (справа). LC3 beta (зеленый) (А, Б); окраска ядер DAPI (синий) (В, Г), совмещение изображений (Д, Е). Увеличение  $\times 400$ .





**Рисунок 12.** Иммунофлюоресцентное окрашивание на маркер аутофагии LAMP1 клеточной культуры Г-29 в контрольной группе (слева) и после введения 5 мМ карбоната лития (справа). LAMP1 (красный) (А, Б); окраска ядер DAPI (синий) (В, Г), совмещение изображений (Д, Е). Увеличение  $\times 400$ .



**Рисунок 13.** Анализ экспрессии LC3 beta и LAMP1 с помощью иммунофлюоресцентного окрашивания клеточной культуры Г-29. \* $P < 0,05$ .

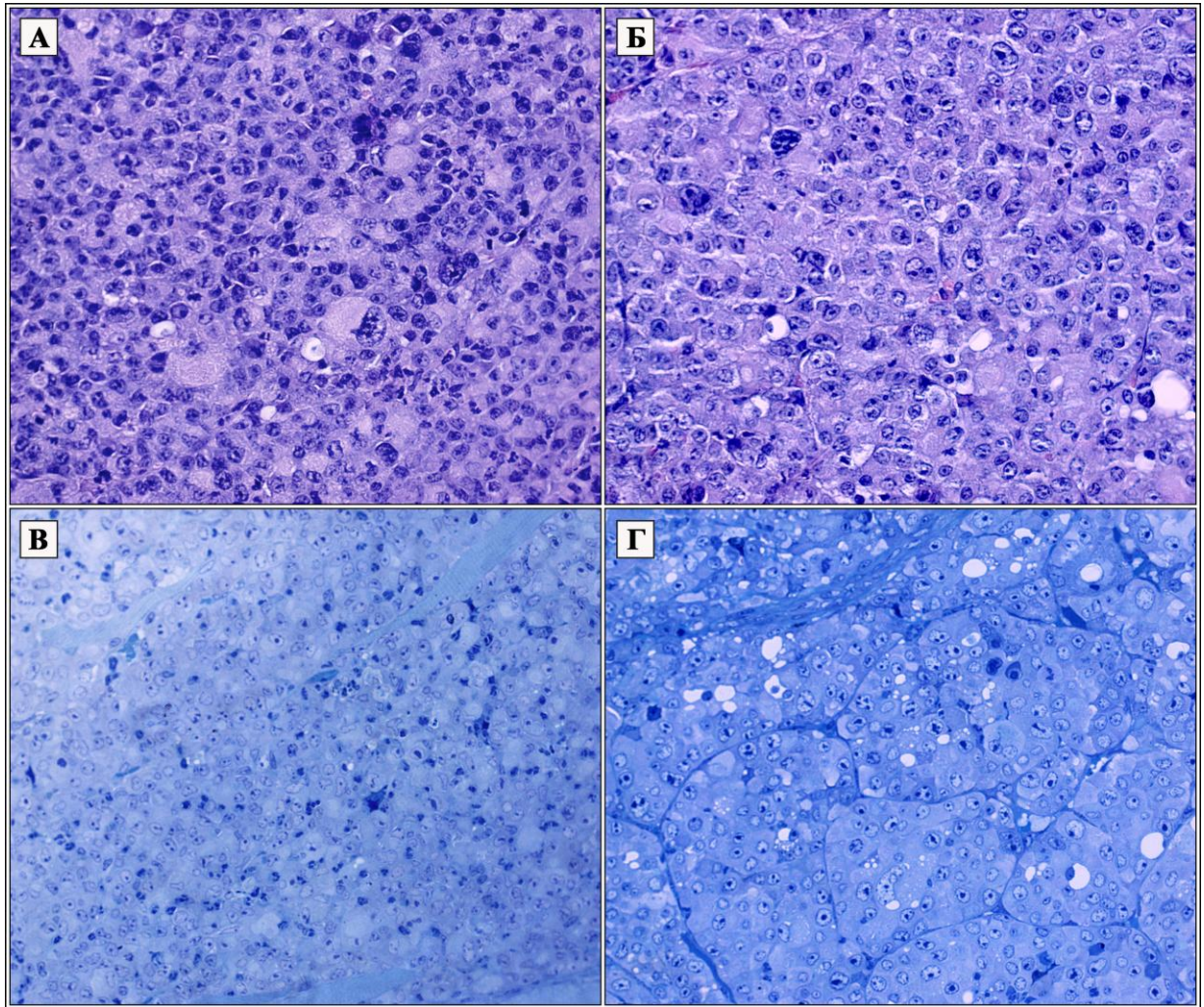
### 3.2 Анализ влияния карбоната лития на популяцию клеток Г-29 в эксперименте *in vivo*

#### 3.2.1 Ультраструктурная организация и анализ распределения клеток Г-29 на степени дифференцированности

Через 23 дня после имплантации клеток Г-29 в область бедра интактным животным опухолевые клетки образовывали подобие печеночных балок, окруженных «синусоидами» (рис. 14, А, В). Опухоли животных, получавших инъекции карбоната лития, не имели балочного строения и обладали менее развитой сосудистой сетью; клетки их имели более крупный размер и деформированные, вакуолизированные ядра (рис. 14, Б, Г).

В контрольной группе опухолевые клетки Г-29 отличались структурным полиморфизмом: размерами ядра и цитоплазмы, ядерно-цитоплазматическим соотношением, концентрацией субклеточных компонентов. Ядра клеток были крупными, имели неправильную форму, часто – изрезанные контуры и неравномерное распределение хроматина, изредка – большие ядрышки округлой формы. Клетки были дистрофичны, содержали преимущественно набухшие, гомогенизированные митохондрии со сглаженными кристами; цистерны гЭПС были немногочисленны, имелось много свободных рибосом (рис. 15).



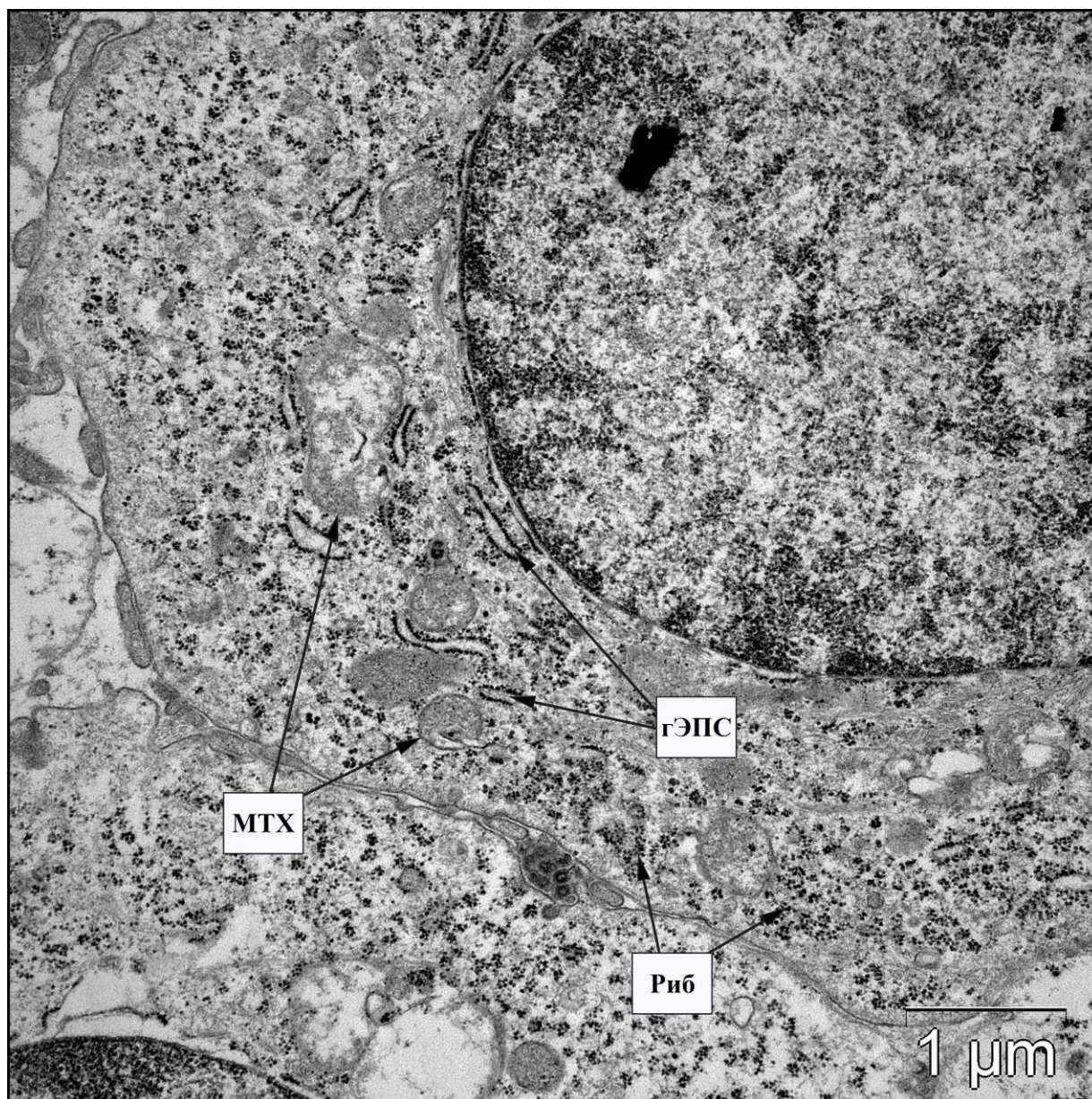


**Рисунок 14.** Морфологические изменения в популяции клеток Г-29 в контрольной группе (слева) и на 23-и сутки после введения 20 мМ карбоната лития по периферии опухоли (справа). Образование «печеночных балок» и пролиферация опухолевых клеток (А, В). Отсутствие «синусоидов» в опухоли и деформация ядер опухолевых клеток после введения карбоната лития (Б, Г). Окраска гематоксилин + эозин (А, Б). Окраска толуидиновым синим (В, Г). Увеличение  $\times 400$ .

Аутофагосомы были крайне немногочисленны и, как правило, содержали в себе фрагменты цитоплазмы (рис. 16, А), аутолизосомы преобладали среди аутофагических структур, имели разнообразное, недифференцируемое содержимое и, часто, крупные размеры (рис. 16, Б, В).

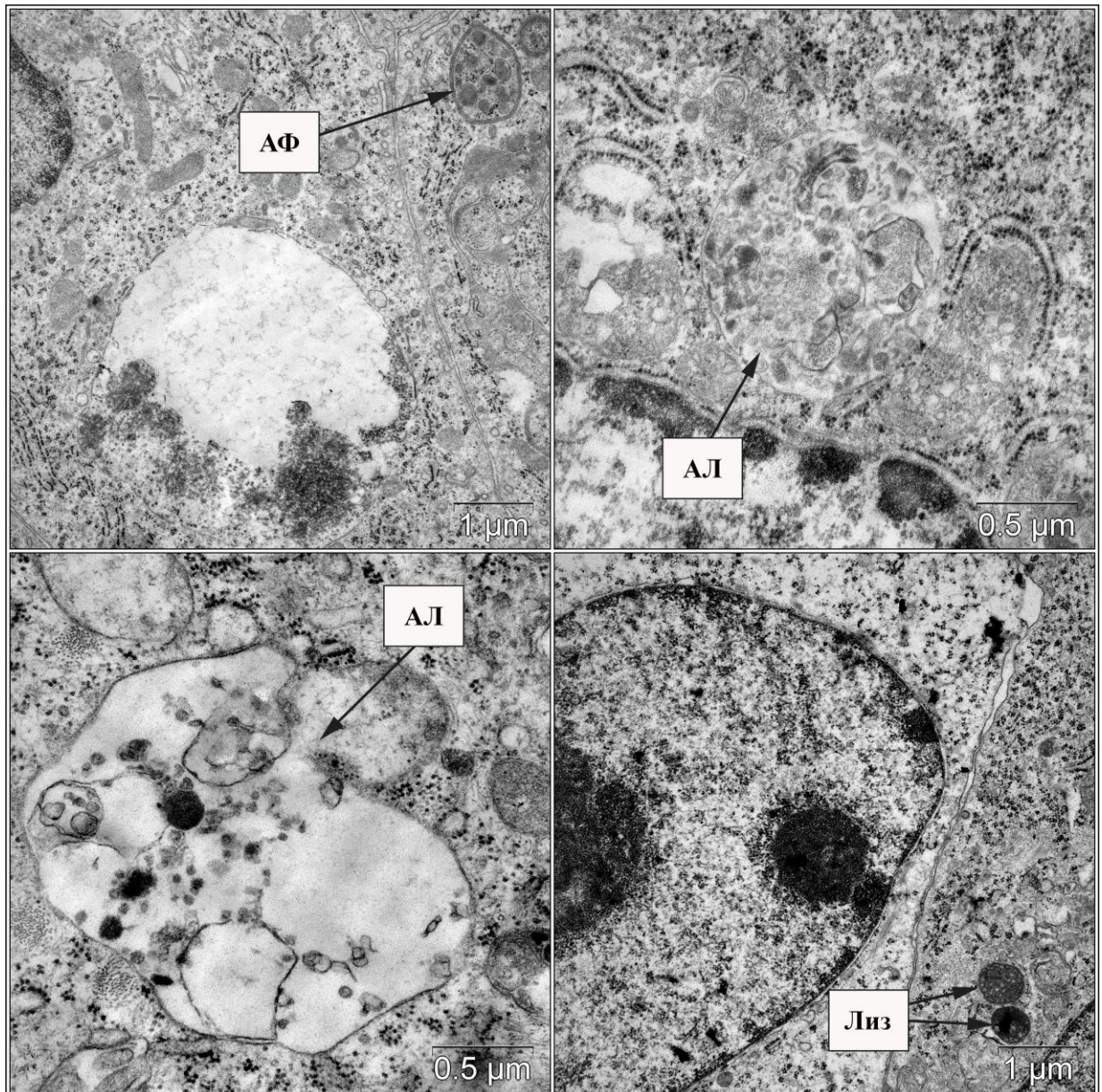


Лизосомы встречались редко, имели гомогенное, умеренное электронно-плотное содержимое (рис. 16, Г).



**Рисунок 15.** Ультраструктурные изменения в популяции клеток Г-29 на 23-и сутки после введения 20 мМ карбоната лития по периферии опухоли. Набухшие, гомогенизированные митохондрии со сглаженными кристами (MTX), немногочисленные цистерны гранулярной эндоплазматической сети (ГЭПС), множество свободных рибосом (Риб).

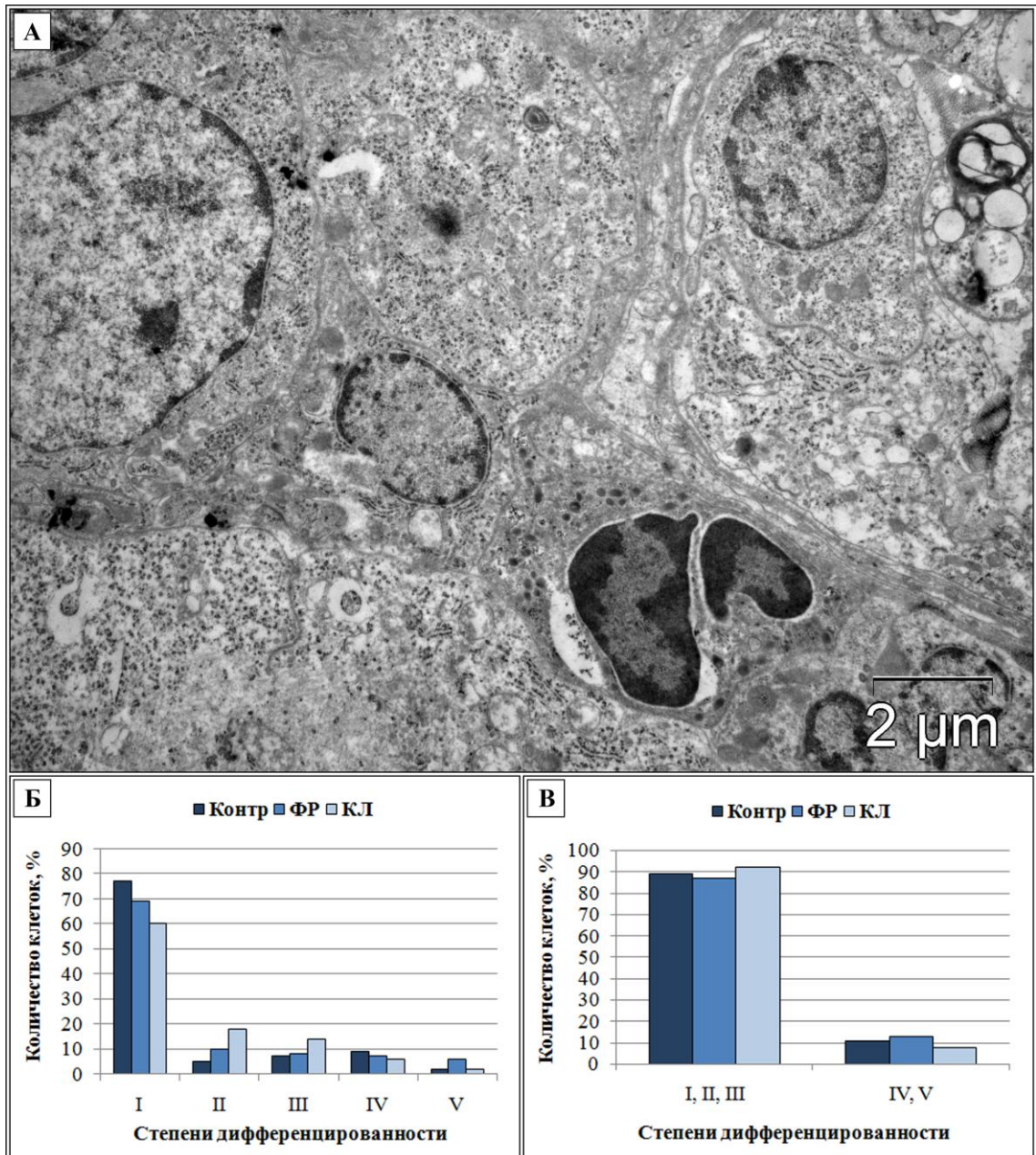




**Рисунок 16.** Ультраструктурные признаки аутофагии в популяции клеток Г-29 на 23-и сутки после введения 20 мМ карбоната лития по периферии опухоли. **АФ** – аутофагосома; **АЛ** – аутолизосома; **Лиз** – лизосома.

Гетерогенная популяция клеток Г-29 (рис. 17, А) по величине ядерно-цитоплазматического соотношения была разделена на 5 типов, соответствующих описанным ранее цитологическим критериям степеней дифференцированности (Бгатова, Н. П. и др., 2015).





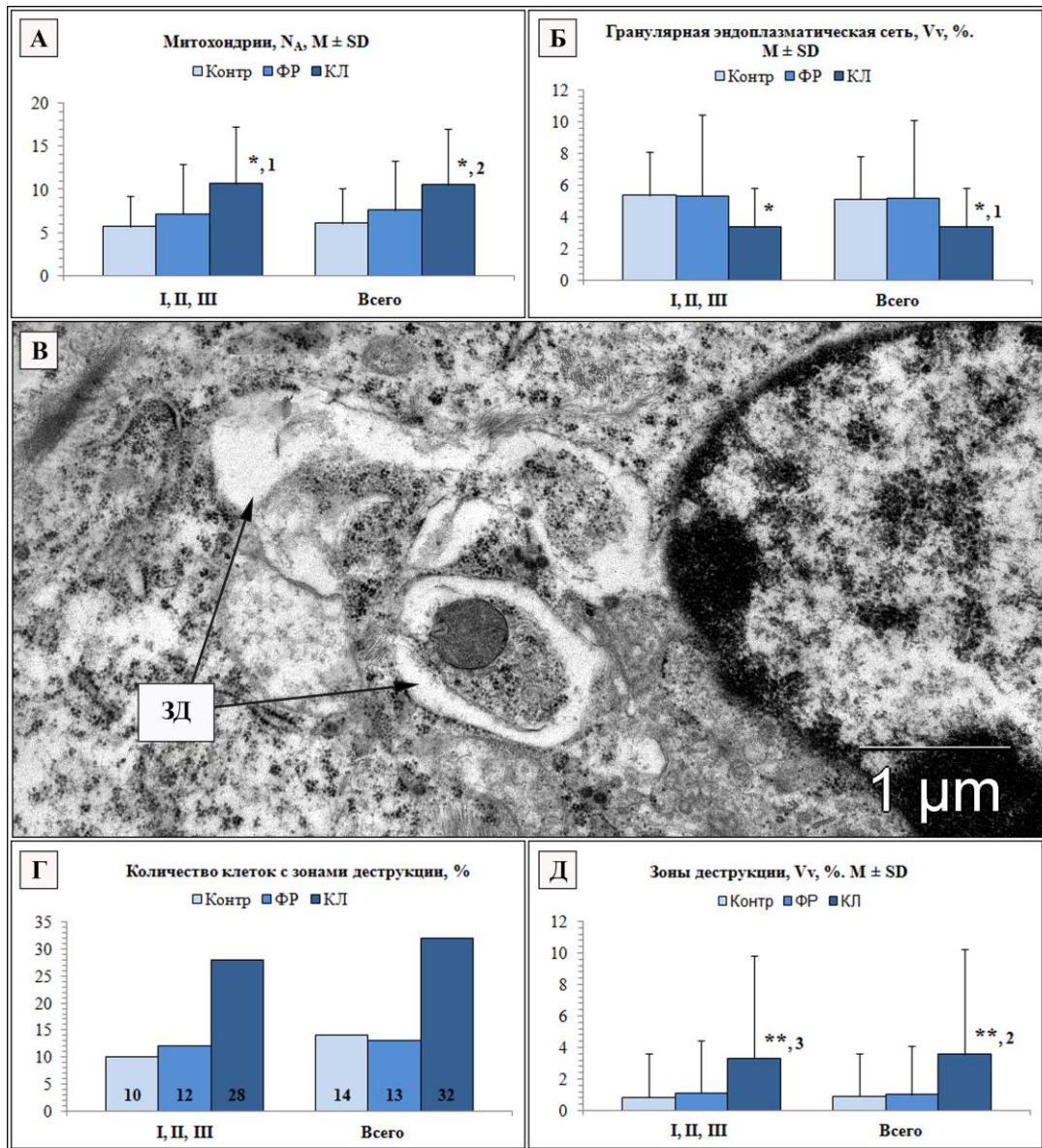
**Рисунок 17.** Гетерогенность популяции клеток Г-29 в контрольной группе *in vivo*, стрелками указаны клетки, имеющие различное ядерно-цитоплазматическое соотношение (А); распределение клеток Г-29 по степеням дифференцированности в зависимости от величины ядерно-цитоплазматического соотношения (Б); суммарное количество низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности и высокодифференцированных клеток IV-V степени дифференцированности (В). **Контр** – контрольная группа; **ФР** – группа, получавшая 0,9 % физиологический раствор хлорида натрия; **КЛ** – группа, получавшая карбонат лития.

Были выявлены низкодифференцированные клетки I, II, III степени дифференцированности (наибольшее значение ЯЦИ, уменьшенный объем цитоплазмы и клеточных органелл) и дифференцированные клетки IV и V степени (увеличенный объем цитоплазмы, митохондрий, липидных включений и цистерн гЭПС).

Значения ЯЦИ составили ( $M \pm SD$ ) для I степени –  $0,77 \pm 0,34$ ; II –  $0,35 \pm 0,03$ ; III –  $0,26 \pm 0,03$ ; IV –  $0,16 \pm 0,03$ ; V –  $0,07 \pm 0,02$ . Клетки Г-29 в группе контроля I степени составляли 77 % от общего числа, в группе ФР – 69 %, в группе КЛ – 60 % (рис. 17, Б). Клетки Г-29 в группе контроля II степени составляли 5 %, в группе ФР – 10 %, в группе КЛ – 18 %. Клетки Г-29 в группе контроля III степени составляли 7 %, в группе ФР – 8 %, в группе КЛ – 14 %. Клетки Г-29 IV степени в группе контроля составляли 9 %, в группе ФР – 7 %, в группе КЛ – 6 %. Клетки Г-29 V степени в группе контроля составляли 2 %, в группе ФР – 6 %, в группе КЛ – 2 %.

Доля пролиферирующих, низкодифференцированных клеток суммарно I, II и III степени дифференцированности составляла 87-92 %, а доля дифференцированных клеток IV и V степени – 8-13 % (рис. 17, В).

В результате морфометрии субклеточных компонентов в клетках гетерогенной популяции Г-29 было выявлено достоверное увеличение численной плотности митохондрий при введении карбоната лития по сравнению с группой контроля в 1,74 раза, по сравнению с группой ФР – в 1,4 раза (рис. 18, А). Также отмечалось достоверное увеличение численной плотности митохондрий среди низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности при введении карбоната лития в 1,85 раз по сравнению с группой контроля, и в 1,48 раз по сравнению с группой ФР (рис. 18, А).



**Рисунок 18.** Ультраструктурные изменения в популяции клеток Г-29 *in vivo*: в контрольной группе (**Контр**); группе, получавшей 0,9 % физиологический раствор хлорида натрия (**ФР**) и при введении 20 мМ карбоната лития по периферии опухоли в течение 23 дней (**КЛ**) среди низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности и в целом по группе. Численная плотность митохондрий (**А**); объемная плотность гранулярной эндоплазматической сети (**Б**); зоны деструкции (ЗД) внутриклеточных органелл (**В**); количество клеток, имеющих ЗД (**Г**); объемная плотность ЗД (**Д**). \* $P < 0,0001$ ; \*\* $P < 0,005$  – по отношению к контрольной группе. <sup>1</sup> $P < 0,0001$ ; <sup>2</sup> $P < 0,005$ ; <sup>3</sup> $P < 0,05$  – по отношению к группе ФР.

Достоверных различий в объемной плотности митохондрий среди исследуемых групп выявлено не было, однако имелась тенденция к ее увеличению (контроль –  $5,7 \pm 3,2$ ; ФР –  $5,5 \pm 3,05$ ; КЛ –  $5,94 \pm 3,48$ ). Среди низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности при введении карбоната лития достоверных различий в объемной плотности митохондрий среди исследуемых групп также выявлено не было; однако имелась тенденция к ее увеличению (контроль –  $5,7 \pm 3,24$ ; ФР –  $5,36 \pm 3,07$ ; КЛ –  $6,01 \pm 3,53$ ).

Объемная плотность цистерн гЭПС при введении карбоната лития была достоверно ниже в 1,5 раза по сравнению с контрольной группой и с группой ФР (рис. 18, Б). Среди низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности при введении карбоната лития также было зафиксировано достоверное снижение гЭПС в 1,6 раз по сравнению с контрольной группой (рис. 18, Б); достоверных различий с группой ФР при этом не было, однако можно отметить тенденцию к снижению данного параметра (ФР –  $5,31 \pm 5,15$ ; КЛ –  $3,37 \pm 2,48$ ). Достоверных различий среди исследуемых параметров в клетках IV и V степени дифференцированности выявлено не было.

Во всех исследуемых группах было подсчитано количество клеток с зонами деструкции (ЗД) внутриклеточных органелл (рис. 18, В), при введении карбоната лития таких клеток оказалось больше в 2,3 раза по сравнению с группой контроля и в 2,5 раза больше, чем в группе ФР (рис. 18, Г). Среди низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности при введении карбоната лития также было зафиксировано повышение количества клеток с ЗД в 2,8 раза по сравнению с группой контроля и в 2,3 раза по сравнению с группой ФР (рис. 18, Г).

Объемная плотность ЗД была достоверно выше при введении карбоната лития: в 4 раза по сравнению с группой контроля и в 3,5 раза по сравнению с группой ФР (рис. 18, Д). Объемная плотность ЗД среди низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности при

введении карбоната лития также достоверно увеличивалась: в 4 раза по сравнению с группой контроля и в 2,9 раз по сравнению с группой ФР (рис. 18, Д).

Достоверных различий среди исследуемых параметров в клетках IV и V степени дифференцированности выявлено не было.

Таким образом, при развитии в *in vivo* в мышечной ткани бедра экспериментальных животных гепатоцеллюлярная карцинома-29 сохраняет морфологическую гетерогенность, в популяции опухоли определяются 5 типов опухолевых клеток. Преобладающими являются клетки I–III типов, которые составляют 89 %.

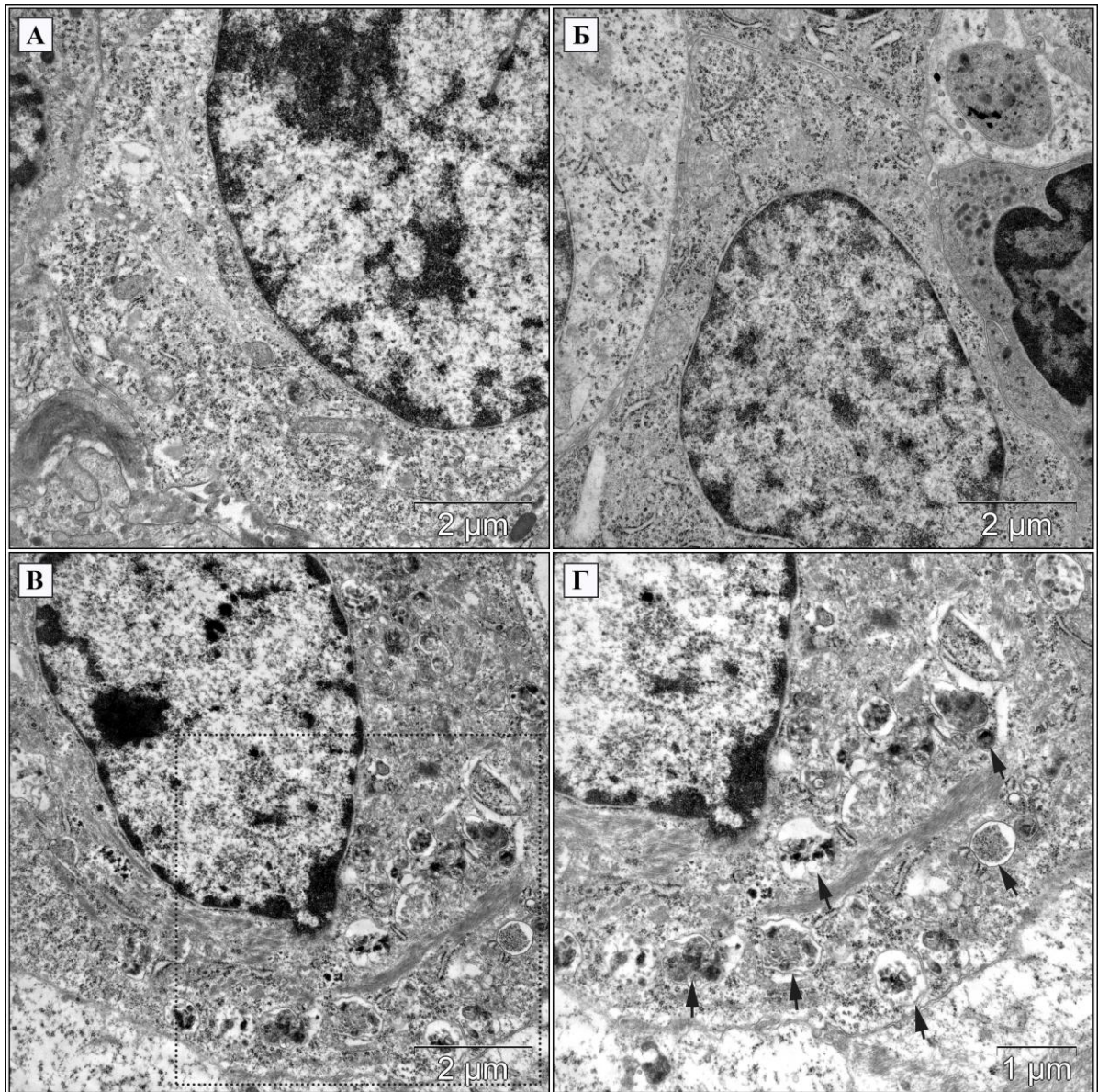
При введении карбоната лития структура формирующейся опухоли отличается меньшей «зрелостью», деформацией ядер опухолевых клеток, дистрофией и набуханием митохондрий в сравнении с контрольной группой и группой мышей, получавших физиологический раствор.

Введение карбоната лития приводило к изменению морфологии клеток Г-29: отмечались различия в ядерно-цитоплазматическом соотношении, появление многоядерных клеток, изменения в структуре субклеточных компонентов. Было выявлено достоверное увеличение численной плотности митохондрий, снижение объемной плотности цистерн гЭПС, повышение объемной плотности ЗД внутриклеточных органелл, в том числе и среди низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности.

### **3.2.2 Влияние карбоната лития на развитие аутофагии *in vivo***

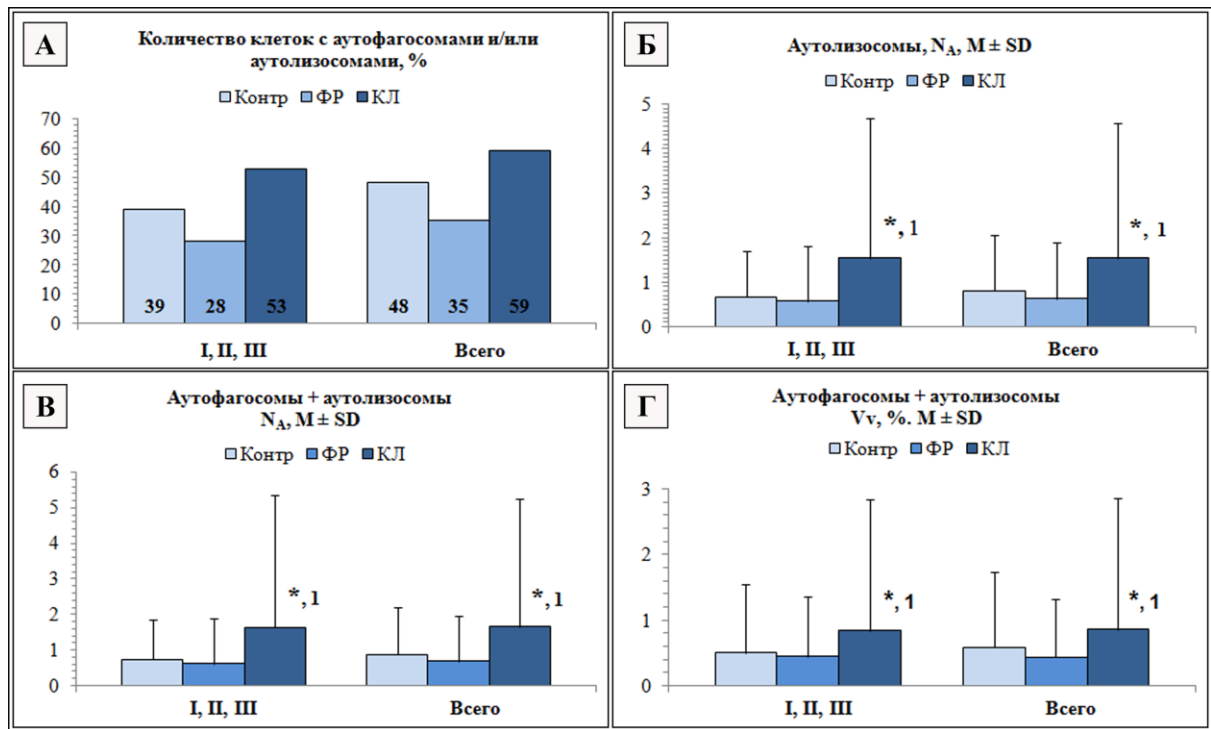
Введение карбоната лития индуцировало развитие аутофагии в клетках Г-29 (рис. 19). Клетки, в которых встречались аутофагосомы и/или аутолизосомы, расценивались как клетки с инициированной аутофагией; в группе введения лития их оказалось 59 %, в группе контроля – 48 %, ФР – 35 % (рис. 20, А).





**Рисунок 19.** Ультраструктура клеток Г-29 *in vivo*: в контрольной группе (А); в группе, получавшей 0,9 % физиологический раствор хлорида натрия (Б) и развитие аутофагии при введении 20 мМ карбоната лития по периферии опухоли в течение 23-х дней (В, выделенная область – Г). Стрелками указаны множественные аутолизосомы, содержащие цитоплазматический материал на различных этапах деградации.

Средние численные и объемные плотности аутофагосом достоверных различий не имели, однако имелась тенденция к их увеличению ( $N_A$ : контроль –  $0,07 \pm 0,29$ ; ФР –  $0,04 \pm 0,2$ ; КЛ –  $0,11 \pm 0,65$ ;  $V_v$ : контроль –  $0,03 \pm 0,15$ ; ФР –  $0,02 \pm 0,13$ ; КЛ –  $0,07 \pm 0,54$ ).



**Рисунок 20.** Морфометрический анализ изображений, полученных с помощью трансмиссионной электронной микроскопии: развитие аутофагии в клетках Г-29 при введении 20 мМ карбоната лития по периферии опухоли в течение 23 дней среди низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности и в целом по группе. Количество клеток с идентифицированной аутофагией (А); численная плотность аутолизосом (Б); суммарная численная плотность аутофагосом и аутолизосом (В); суммарная объемная плотность аутофагосом и аутолизосом (Г). \* $P < 0,05$  – по отношению к контрольной группе. <sup>1</sup> $P < 0,005$  – по отношению к группе ФР. **Контр** – контрольная группа; **ФР** – группа, получавшая 0,9 % физиологический раствор хлорида натрия; **КЛ** – группа, получавшая карбонат лития.

Достоверных различий в средней численной и объемной плотности аутофагосом среди низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности при введении карбоната лития также не было. Однако имелась тенденция к повышению численной плотности аутофагосом среди таких клеток (контроль –  $0,07 \pm 0,29$ ; ФР –  $0,05 \pm 0,21$ ; КЛ –  $0,1 \pm 0,65$ ).

Средняя численная плотность аутолизосом была достоверно выше при введении карбоната лития: в 1,9 раз по сравнению с контрольной группой и в 2,4 раза по сравнению с группой ФР (рис. 20, Б). Среди низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности при введении карбоната лития также было отмечено увеличение численной плотности аутолизосом: в 2,3 раза по сравнению с группой контроля и в 2,6 раз по сравнению с группой ФР (рис. 20, Б).

Средняя суммарная численная плотность аутофагосом и аутолизосом в группе введения карбоната лития была достоверно больше в 1,5 раза по сравнению с группой контроля и в 1,9 раз по сравнению с группой ФР (рис. 20, в). Также отмечалось достоверное увеличение суммарной численной плотности аутофагосом и аутолизосом среди низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности при введении карбоната лития в 1,7 раз по сравнению с группой контроля и в 1,9 раз по сравнению с группой ФР (рис. 20, в).

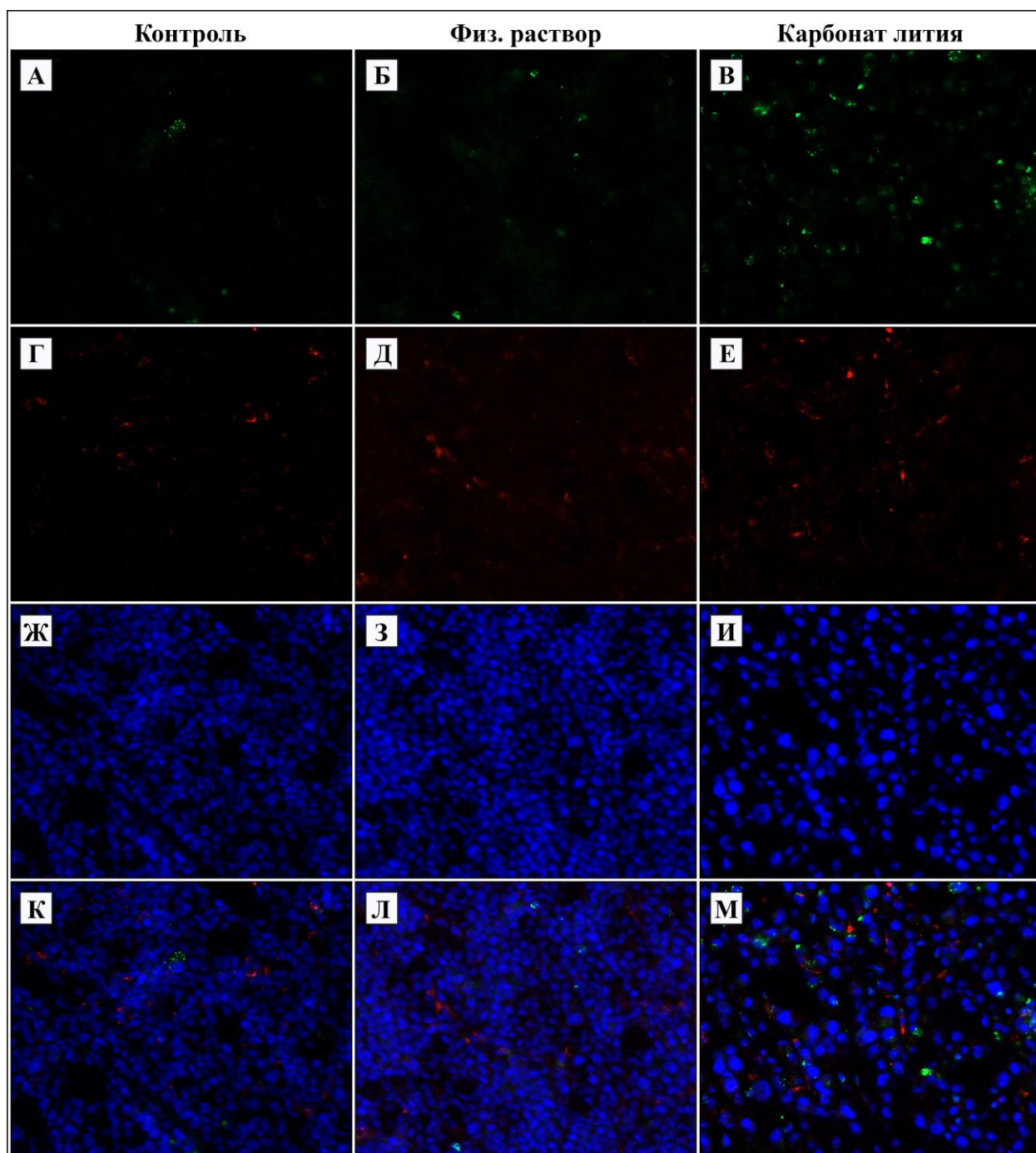
Средняя суммарная объемная плотность аутофагосом и аутолизосом повышалась при введении карбоната лития: в 1,9 раз по сравнению с группой контроля и в 2,4 раза по сравнению с группой ФР (рис. 20, Г). Среди низкодифференцированных клеток I–III степени дифференцированности при введении карбоната лития также было отмечено увеличение суммарной объемной плотности аутофагосом и аутолизосом: в 2,2 раза по сравнению с группой контроля и в 2,6 раз по сравнению с группой ФР (рис. 20, Г).

Средние объемные и численные плотности лизосом достоверных различий не имели.

Достоверных различий среди исследуемых параметров в клетках IV и V степени дифференцированности выявлено не было.

С помощью иммунофлуоресцентного исследования был проведен анализ влияния карбоната лития на экспрессию маркеров аутофагии – LC3 beta и LAMP1 (рис. 21).

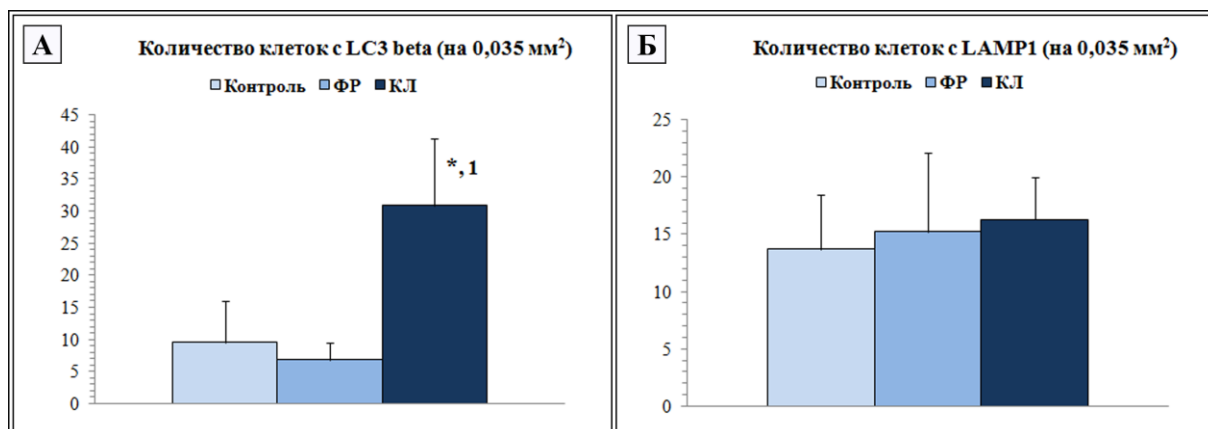




**Рисунок 21.** Экспрессия LC3 beta и LAMP1 в клетках Г-29 в контрольной группе, при введении 0,9 % физиологического раствора хлорида натрия и карбоната лития. А, Б, В – экспрессия LC3 beta; Г, Д, Е – экспрессия LAMP1; Ж, З, И – окраска ядер DAPI; К, Л, М – совмещенные изображения. Увеличение  $\times 400$ .

Было подсчитано количество клеток, имеющих LC3 beta-позитивные аутофагические структуры и LAMP1-позитивные структуры. Среднее

количество клеток в группе контроля с LC3 beta-позитивными аутофагическими структурами составляло  $9,5 \pm 6,42$ ; в группе ФР –  $6,83 \pm 2,64$ ; КЛ –  $30,83 \pm 10,5$ . Таким образом, карбонат лития достоверно увеличивал количество клеток с LC3 beta-позитивными аутофагическими структурами (рис. 22). При подсчете количества клеток с LAMP1-позитивными структурами достоверных различий выявлено не было.



**Рисунок 22.** Анализ развития аутофагии в клетках Г-29 при введении 0,9 % физиологического раствора и карбоната лития. \* $P < 0,05$  – по сравнению с группой контроля; <sup>1</sup> $P < 0,005$  – по сравнению с группой ФР. **Контр** – контрольная группа; **ФР** – группа, получавшая 0,9 % физиологический раствор хлорида натрия; **КЛ** – группа, получавшая карбонат лития.

Таким образом, в эксперименте *in vivo* введение карбоната лития обусловило возрастание содержания аутофагических структур в гетерогенной популяции клеток Г-29: было выявлено достоверное увеличение количества аутолизосом, а также суммарной объемной и численной плотностей аутофагосом и аутолизосом, в том числе и в низкодифференцированных клетках I–III степени дифференцированности.

Развитие аутофагии при введении карбоната лития наблюдалась в 59 % клеток, при этом достоверное увеличение суммарной объемной и численной плотностей аутофагосом и аутолизосом было зафиксировано в низкодифференцированных клетках I–III степени. Введение карбоната лития

по периферии опухоли способствовало повышению экспрессии маркера аутофагии LC3 beta, что также свидетельствует о запуске процесса аутофагии в клетках Г-29.

#### ГЛАВА IV. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гепатоцеллюлярная карцинома является одной из наиболее агрессивных опухолей человека, обладающей резистентностью к проводимой химиотерапии. Полагают, что развитие гепатоцеллюлярной карциномы коррелирует с нарушением регуляции программированной клеточной гибели (Degterev, A., Yuan, J., 2008).

Выделяют несколько вариантов программированной клеточной гибели, которые можно объединить по характеру развития в основные типы: апоптоз, аутофагическую гибель и программированный некроз (Edinger, A. L., Thompson, C. B., 2004).

Считается, что в клетках гепатоцеллюлярной карциномы могут развиваться некроз, апоптоз и аутофагия (Cui, J., Gong, Z., Shen, H. M., 2013). Некроз часто стимулирует местное и системное воспаление. Апоптоз и аутофагия не провоцируют воспаление, поэтому их рассматривают как терапевтические мишени для лечения рака (Zhang, C. et al., 2016).

В регуляции апоптоза участвуют молекулы различных сигнальных путей. Одним из них является сигнальный путь Wnt. Неотъемлемым компонентом Wnt-пути является его негативный регулятор – гликоген-синтаза киназа-3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ) (McCubrey, J. A. et al., 2016). Ингибирование GSK-3 $\beta$  влияет на клеточную пролиферацию и развитие апоптоза при различных типах рака (Wang, J. S. et al., 2008; de Araujo, W. M. et al., 2015). Существуют 5 классов ингибиторов GSK-3 $\beta$ . К одному из них относятся соединения лития (Quiroz, J. A., Gould, T. D., Manji, H. K., 2004).

Литий ингибирует GSK-3 не только за счет конкуренции с ионами Mg<sup>2+</sup>, но и за счет повышения фосфорилирования на сериновом остатке 9 этого фермента (Roux, M., Dosseto, A., 2017). GSK-3 существует в виде двух изоформ – GSK-3 $\alpha$  и GSK-3 $\beta$ , и обе они могут быть ингибированы с помощью лития (Freland, L., Beaulieu, J. M., 2012). Наибольшую функциональную значимость имеет GSK-3 $\beta$ ; согласно литературным данным, этот фермент имеет около 100 молекул, которые могут выступать в

качестве его субстрата, что объясняет повсеместную вовлеченность GSK-3 $\beta$  во множество клеточных сигнальных путей и участие в патогенезе таких распространенных процессов, как рак, нейродегенерация, психические расстройства, диабет и другие (Jakobsson, E. et al., 2017; Roux, M., Dosseto, A., 2017).

GSK-3 $\beta$  встречается в цитоплазме, ядре и митохондриях (Mota de Freitas, D., Leveson, B. D., Goossens, J. L., 2016), при этом известно, что в митохондриях содержится более высокий уровень нефосфорилированной, активной GSK-3 $\beta$  по отношению к цитоплазме; таким образом, митохондрии могут быть особенно чувствительны к литию (Bijur, G. N., Jope, R. S., 2003; Jakobsson, E. et al., 2017). Основные сигнальные пути, в которые вовлечена GSK-3 $\beta$ : PI3K/Akt/mTORC1, Ras/Raf/MEK/ERK, Wnt/beta-catenin, Hedgehog, Notch и другие (McCubrey, J. A. et al., 2014; Mancinelli, R. et al., 2017).

Показано, что карбонат лития, действуя через подавление активности GSK-3 $\beta$  и снижение экспрессии циклина E, может вызывать остановку пролиферации за счет ареста клеточного цикла в фазе G<sub>2</sub>/M опухолевых клеток (Erdal, E. et al., 2005; Tsui, M. M. et al., 2012), а также индуцировать апоптоз опухолевых клеток (Li, L. et al., 2015).

Полученные нами данные свидетельствуют, что введение карбоната лития в культуру клеток Г-29 вызывает дозозависимое снижение их жизнеспособности. Культивирование клеток Г-29 в среде с карбонатом лития в концентрации 5 мМ в течение 24 ч способствует накоплению клеток в S-фазе клеточного цикла и увеличению апоптоза на 13,5 %; в течение 48 ч – увеличению количества клеток, находящихся в фазе G<sub>2</sub>/M клеточного цикла и повышению апоптоза на 34,2 %. Полученные результаты соответствуют литературным данным, описывающим способность лития влиять на жизнеспособность опухолевых клеток и модулировать клеточный цикл.

Zinke, J. и соавт. на модели медуллобластомы у мышей показали, что литий за счет ингибирования GSK-3 $\beta$  стабилизирует  $\beta$ -катенин, ингибирует



сигнальный путь Hedgehog и, тем самым, способствует остановке клеточного цикла в фазе G<sub>2</sub>/M и задержке развития опухоли (Zinke, J. et al., 2015).

Cockle, J. V. и соавт. выявили снижение способности клеток глиомы к миграции при введении лития за счет ингибирования GSK-3 $\beta$  и стабилизации  $\beta$ -катенина (Cockle, J. V. et al., 2015).

Fu, Y. и соавт. показали снижение пролиферации и миграции клеток глиомы при введении лития со специфическим пептидом токсина скорпиона (Fu, Y. et al., 2016).

Elmaci, İ. и Altinoz, M. A. оценивали использование комбинации лития, пиоглитазона и метформина в терапии глиобластомы и рака поджелудочной железы: авторы сделали вывод, что ингибирование GSK-3 $\beta$  литием может повысить эффективность лечения этих типов рака (Elmaci, İ., Altinoz, M. A., 2016).

Han, S. и соавт. на модели глиобластомы показали, что литий в комбинации с темозоломидом снижал пролиферацию и рост опухоли, а также увеличивал апоптоз в опухолевых клетках; полученные результаты авторами были связаны с активацией сигнального пути NFAT1/FasL (nuclear factor of activated T-cells/ Fas ligand) за счет ингибирования GSK-3 $\beta$  литием (Han, S. et al., 2017).

Furuta, T. и соавт. также на модели глиобластомы показали снижение пролиферации и инвазии опухолевых клеток при применении лекарственной комбинации из лития, вальпроата, циметидина, оланзапина и темозоломида за счет ингибирования GSK-3 $\beta$  (Furuta, T. et al., 2017).

Wang, Y. и соавт. на клетках шванномы выявили снижение пролиферации и индукцию некроптоза при введении лития (Wang, Y. et al., 2017). В этом исследовании литий снижал экспрессию основного индуктора некроза TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor-  $\alpha$ ), увеличивал образование реактивных форм кислорода и модулировал сигнальный путь PI3K/AKT/mTOR за счет повышения фосфорилирования GSK-3 $\beta$  и AKT, что в совокупности играло важную роль в индуцированном литием некроптозе (Wang, Y. et al., 2017).

Zassadowski, F. и соавт. на модели острого промиелоцитарного лейкоза продемонстрировали антипролиферативный и про-апоптотический потенциал лития; повышение фосфорилирования ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) и, возможно, ингибирование GSK-3 $\beta$  вызывали модуляцию сигнального пути MEK/ERK (mitogen-activated protein kinase kinase/ extracellular signal-regulated kinases), с чем и были связаны полученные эффекты лития (Zassadowski, F. et al., 2015).

Li, L. и соавт. в клетках острого промиелоцитарного лейкоза показали при введении лития остановку клеточного цикла в фазе G<sub>2</sub>/M и повышение апоптоза, а также увеличение фосфорилирования GSK-3 $\beta$  и ингибирование Akt1 (Li, L. et al., 2015).

Peixoto-da-Silva, J. и соавт. в модели хронического миелоцитарного лейкоза выявили, что комбинация лития с нилотинибом индуцирует апоптоз и аутофагию в опухолевых клетках (Peixoto-da-Silva, J. et al., 2018).

Schleicher, S. B. и соавт. исследовали клеточную модель рабдомиосаркомы и показали, что литий в комбинации с триоксидом мышьяка повышал активацию каспазы 3/7 и снижал экспрессию белка Gli1, что приводило к индукции апоптоза в опухолевых клетках (Schleicher, S. B. et al., 2017).

Gao, S. и соавт. также на модели рака пищевода показали, что литий подавляет жизнеспособность клеток и их миграцию за счет ингибирования GSK-3 $\beta$  и снижения фосфорилирования STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) (Gao, S. et al., 2017).

Wang, X. и соавт. в модели рака поджелудочной железы показали снижение Gli1 и ингибирование сигнального пути Hedgehog при помощи лития (Wang, X. et al., 2017-1).

Wang, X. и соавт. продемонстрировали, что литий ингибирует пролиферацию, жизнеспособность и индуцирует апоптоз в клетках рака поджелудочной железы за счет ингибирования аденилат циклазы и сигнального пути cAMP/PKA (Wang, X. et al., 2017-2).

Li, H. и соавт. изучали влияние лития на клетки колоректального рака и выявили, что литий вызывал снижение пролиферации, повышал апоптоз и генерацию реактивных форм кислорода, что могло быть связано со способностью лития ингибировать GSK-3 $\beta$ , модулировать сигнальный путь NF- $\kappa$ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) за счет опосредованного NF- $\kappa$ B снижения экспрессии Bcl-2 и сурвивина, однако молекулярный механизм GSK-3 $\beta$  в регуляции передачи сигналов NF- $\kappa$ B исследован не был (Li, H. et al., 2014).

O'Donovan, T. R. и соавт. в моделях колоректального рака *in vivo* показали, что литий в комбинации с оксалиплатином снижал объем опухолевой массы, а в комбинации с 5-фторурацилом повышал общую среднюю выживаемость животных (O'Donovan, T. R. et al., 2015).

Costabile, V. и соавт. выявили обратный мезенхимально-эпителиальный переход на основании того, что литий снижал экспрессию маркеров эпителиально-мезенхимального перехода Twist1 (Twist-related protein 1), Snail, COX2 (cyclooxygenase 2), CD44, повышая при этом экспрессию E-кадгерина (Costabile, V. et al., 2015). Авторы связали такие результаты с ингибированием GSK-3 $\beta$  и модуляцией сигнальных путей Wnt/beta-catenin и NF- $\kappa$ B (Costabile, V. et al., 2015).

Maeng, Y. S. и соавт. в модели рака толстой кишки показали, что литий снижал лимфангиогенез и лимфатическое метастазирование опухоли, а также подавлял экспрессию TGFBIp (transforming growth factor-beta-induced protein) в опухолевых клетках; полученные результаты были связаны с ингибированием GSK-3 $\beta$  и ингибированием сигнального пути TGF $\beta$ -Smad (Maeng, Y. S. et al., 2016).

В исследовании de Araujo, W. M. и соавт. литий снижал пролиферацию клеток рака толстой кишки за счет остановки клеточного цикла в фазе G<sub>2</sub>/M и в концентрации 50 мМ вызывал апоптоз; однако, авторы сделали вывод, что данные эффекты не были связаны с ингибированием GSK-3 $\beta$  (de Araujo, W. M. et al., 2016).

Erdal, E. и соавт. изучали влияние лития на модели гепатоцеллюлярной карциномы; было выявлено, что хлорид лития ингибировал рост клеток гепатоцеллюлярной карциномы, изменял клеточную морфологию (повышение соотношения ядро/цитоплазма; появление многоядерности), способствовал накоплению клеток в фазе G<sub>1</sub>/S клеточного цикла (Erdal, E. et al., 2005). Авторами было отмечено, что гетерогенность клеточной ДНК и кластеризация клеток затрудняли точность их распределения на фазы клеточного цикла; при этом литий снижал уровни циклина E (белок, ответственный за переход от фазы G<sub>1</sub> к S в клеточном цикле; авторами была подчеркнута его ключевая роль в гепатоцеллюлярном канцерогенезе) в некоторых клеточных линиях ГЦК. Авторы связали это с ингибированием литием белка Akt и, таким образом, модуляцией сигнального пути PI3K/Akt. Интересно, что литий показал ингибирование роста (>70 %) девяти из 12 тестируемых клеточных линий ГЦК (Erdal, E. et al., 2005).

Beurel, E. и соавт. исследовали влияние лития на TRAIL-индуцированный апоптоз (TRAIL - TNF-related apoptosis-inducing ligand) в клетках ГЦК (Beurel, E. et al., 2009). Литий повышал уровни каспазы-3, каспазы-8 и p53, стимулируя TRAIL-индуцированный апоптоз в клетках ГЦК, которым предписывается устойчивость к этому механизму клеточной гибели, при этом не было выявлено подобного влияния на первичные гепатоциты (Beurel, E. et al., 2009). Таким образом, исследования лития в контексте ГЦК ограничены, и их целью не являлась оценка аутофагии.

Экспериментальная гепатоцеллюлярная карцинома-29 является гетерогенной по клеточному составу опухолью и обладает высокой пролиферативной активностью. Клеточная гибель при введении карбоната лития происходит на фоне быстрой пролиферации уцелевших клеток. Однако структура формирующейся в этом случае опухоли отличается меньшей «зрелостью», деформацией ядер опухолевых клеток, дистрофией и набуханием митохондрий в сравнении с контрольной группой и группой мышей, получавших физиологический раствор. Было выявлено, что введение

карбоната лития влияло на морфологию клеток Г-29: отмечались изменение ядерно-цитоплазматического соотношения, появление многоядерных клеток, изменения в структуре субклеточных компонентов.

Полученные результаты согласуются с данными исследования влияния хлорида лития в концентрации 20 мМ через 48 и 72 ч после воздействия, в котором также было показано, что литий изменял морфологию клеток ГЦК: наблюдались увеличение ядерно-цитоплазматического соотношения и появление многоядерных клеток (Erdal, E. et al., 2005). Авторы этого исследования сделали вывод, что данные изменения были специфичными для лития, поскольку в контрольной группе, обработанной раствором хлорида натрия, таких изменений выявлено не было.

При введении карбоната лития *in vivo* были зафиксированы изменения в численной плотности митохондрий и объемной плотности цистерн гЭПС. Известно, что митохондриальный биогенез сопровождается образованием новых митохондрий и активируется при повышенных энергетических потребностях клетки (Gomes, L. C., Scorrano, L., 2013; de Oliveira, M. R. et al., 2016); таким образом, выявленное увеличение числа митохондрий позволяет предположить активно идущий процесс биогенеза данных органелл.

Отмеченное нами снижение объемной плотности гЭПС, вероятнее всего, происходит за счет ретикулофагии – селективной деградации ЭПС. Значительное повышение количества клеток с зонами деструкции и увеличение объемной плотности таких зон также демонстрирует активизацию процессов внутриклеточной деградации цитоплазматического материала. Наличие таких изменений в низкодифференцированных клетках I–III степени дифференцированности, в частности, свидетельствует об избирательном действии карбоната лития на активно пролиферирующие клетки.

Гепатоцеллюлярная карцинома является гетерогенным злокачественным новообразованием (Friemel, J. et al., 2015; Chan, S. L. et al., 2016); гетерогенность клеток этого типа рака может способствовать

неоднозначной роли аутофагии в различных популяциях клеток ГЦК (Lee, Y. J., Jang, B. K., 2015).

Известно, что литий способен модулировать аутофагию в раковых клетках (O'Donovan, T. R. et al., 2015). В целом, аутофагия может регулироваться mTOR-зависимыми и mTOR-независимыми сигнальными путями; mTOR-независимая сигнализация включает AMPK, JNK1, IP3R и другие пути (Motoi, Y. et al., 2014). Литий индуцирует аутофагию за счет модуляции сигнального пути PI (phosphatidylinositol) независимо от сигнализации PI3K/АКТ/mTOR.

Литий ингибирует семейство фосфодиэстераз, в том числе IMPase, IPPase (inositol poliphosphatase) и другие ферменты этого семейства (Hallcher, L. M., Sherman, W. R., 1980; Berridge, M. J., Downes, C. P., Hanley, M. R., 1982; Phiel, C. J., Klein, P. S., 2001; Pasquali, L. et al., 2010; Can, A., Schulze, T. G., Gould, T. D., 2014); среди них именно с IMPase связывают основные эффекты лития в клеточном метаболизме инозитола (Toker, L., Agam, G., 2014). Литий ингибирует IMPase за счет замещения ионов  $Mg^{2+}$  (Mota de Freitas, D., Leverson, B. D., Goossens, J. L., 2016), что приводит к нарушению метаболизма инозитола. IMPase модулирует сигнальный путь PI.

Ингибирование литием IMPase, приводящее к истощению свободного инозитола и снижению уровней IP3 (inositol 1,4,5-trisphosphate), было выявлено Sarkar, S. и соавт. (Sarkar, S. et al., 2005). Однако позже Sade, Y. и соавт. показали, что именно повышение, а не снижение уровня IP3 индуцирует развитие аутофагии; авторы сделали вывод, что накопление IP3 может вызывать десенситизацию и снижение количества IP3R (inositol trisphosphate receptor) – рецепторов, лигандом которых является IP3 (Sade, Y. et al., 2016).

IP3R способны связывать Beclin 1 и Vcl-2, формируя специфический комплекс, состоящий из IP3R, Beclin 1 и Vcl-2; высвобождение Beclin 1 из этого комплекса стимулирует развитие аутофагии (Vicencio, J. M. et al., 2009). Таким образом, опосредуемое литием снижение количества IP3R

может способствовать аутофагии, однако точную молекулярную основу этого взаимодействия еще предстоит выяснить.

Литий также ингибирует GSK-3 $\beta$ , повышая уровни Bif-1 (bax interacting factor 1), и аутофагию; однако предполагается, что именно ингибирование IMPase играет главную роль в способности лития индуцировать аутофагию (Motoi, Y. et al., 2014).

Предварительная оценка *in vitro* с помощью трансмиссионной электронной микроскопии клеток Г-29 выявила развитие аутофагии при введении карбоната лития. Проведение иммунофлюоресцентного исследования выявило повышение экспрессии маркера аутофагии LC3 beta в популяции клеток Г-29. Таким образом, можно сделать вывод, что культивирование клеток Г-29 с карбонатом лития в течение 48 ч способствует стимуляции аутофагии в опухолевых клетках.

В эксперименте *in vivo* введение карбоната лития приводило к возрастанию аутофагических структур в гетерогенной популяции клеток Г-29: было выявлено достоверное увеличение количества аутолизосом, а также суммарной объемной и численной плотностей аутофагосом и аутолизосом, в том числе и в низкодифференцированных клетках I–III степени дифференцированности.

Развитие аутофагии при введении карбоната лития наблюдалась в 59 % клеток, при этом достоверное увеличение суммарной объемной и численной плотностей аутофагосом и аутолизосом было зафиксировано в низкодифференцированных клетках I–III степени. Введение карбоната лития по периферии опухоли способствовало повышению экспрессии маркера аутофагии LC3 beta, что также свидетельствует о запуске процесса аутофагии в клетках Г-29.

Полученные результаты соответствуют данным других исследований, изучавших влияние лития на развитие аутофагии в опухолевых клетках различного типа.

O'Donovan, T. R. и соавт. выявили, что литий модулирует развитие аутофагии в клетках рака пищевода и способствует клеточной гибели в комбинации с цисплатином и 5-фторурацилом (O'Donovan, T. R. et al., 2015).

В клетках рака толстой кишки хлорид лития в концентрации 30 мМ стимулировал увеличение уровней LC3 II, развитие аутофагии и апоптоза, таким образом повышая гибель опухолевых клеток (Trnski, D. et al., 2015). Полученные результаты были связаны авторами с ингибированием GSK-3 $\beta$  и подавлением сигнального пути Hedgehog, который также может регулировать аутофагию через Gli1 или Gli2; авторами был сделан вывод, что литий запускал аутофагическую клеточную гибель, поскольку наблюдалось снижение пролиферации, кроме того, было предположено, что аутофагия обеспечивала клетки энергией для выполнения апоптоза, что также стимулировало клеточную гибель (Trnski, D. et al., 2015).

Комбинированное применение нилотиниба и лития вызывало апоптоз в клетках хронического миелоидного лейкоза, повышение уровней LC3 II и аутофагию, что указывает на участие нескольких механизмов клеточной гибели при введении лития (Peixoto-da-Silva, J. et al., 2018).

В нашем исследовании также было выявлено, что при введении карбоната лития средние объемные и численные плотности лизосом по сравнению с группами контроля достоверных различий не имели, кроме того, не было выявлено достоверного увеличения экспрессии LAMP1 *in vitro* и *in vivo*.

В исследовании O'Donovan, T. R. и соавт. было отмечено, что при введении 10, 20 и 30 мМ лития через 24 и 48 ч после воздействия снижались уровни LAMP1 и 2 (O'Donovan, T. R. et al., 2015). Авторы предположили, что литий вызывает скомпрометированный аутофагический поток (поскольку при добавлении хлорокина не наблюдалось увеличения накопления аутофагосом, которое бы свидетельствовало о блокировании аутофагии), и литий может нарушать целостность лизосом (O'Donovan, T. R. et al., 2015). Предполагается, что дефицит белков LAMP1 и 2 является показателем



нарушения целостности лизосом и пермеабилзация лизосомальной мембраны может способствовать клеточной гибели (Repnik, U., Hafner Česen, M., Turk, B., 2014).

Известно, что аутофагия способствует выживаемости опухолевых клеток при стрессе и снижении уровня питательных веществ (Ávalos, Y. et al., 2014; Janji, B. et al., 2016), однако при определенных условиях она также может способствовать клеточной гибели (Eisenberg-Lerner, A. et al, 2009).

Результаты данного исследования показали, что карбонат лития вызывает аутофагию в клетках Г-29 *in vitro* и *in vivo*, и, в данном случае, аутофагия в опухолевых клетках служит механизмом гибели, а не выживания, поскольку наблюдается возрастание зон деструкции внутриклеточных органелл, дозозависимое снижение жизнеспособности и повышение апоптоза в опухолевых клетках.

Аутофагическая клеточная гибель (или тип II клеточной гибели) – отдельный механизм клеточной гибели, отличающийся от апоптоза и некроза молекулярными и морфологическими изменениями (Thorburn A., 2008). В литературе описаны множественные молекулярные взаимодействия между аутофагией и апоптозом, важнейшими из них являются механизмы, связанные с комплексом Bcl-2/Bcl-1 и JNK1-опосредованным фосфорилированием Bcl-2 и другие (Nikoletopoulou, V. et al., 2013; Booth LA, 2014; Mukhopadhyay, S. et al., 2014; Zhao, G. X. et al., 2015).

Предполагается, что в живых системах апоптоз и аутофагическая клеточная гибель могут запускаться одновременно, и наблюдаемые изменения, более характерные для того или иного типа клеточной гибели, будут зависеть от конкретного момента наблюдения (Thorburn A., 2008; Eisenberg-Lerner, A. et al., 2009; Eisenberg-Lerner, A., Kimchi, A., 2009 ).

Карбонат лития в эксперименте *in vitro* в настоящем исследовании значительно повышал количество апоптотических клеток через 48 ч после введения; однако в опухолевых клетках также имелись и признаки

аутофагии. В эксперименте *in vivo* также была выявлена стимуляция аутофагии при введении карбоната лития в дозе 20 мМ.

Таким образом, развитие аутофагии при введении карбоната лития в опухолевых клетках Г-29 происходит в совокупности с апоптотическими изменениями, что в конечном итоге способствует стимуляции клеточной гибели. Данные свойства карбоната лития могут быть использованы для разработки модифицированной стратегии комбинирования лекарственных препаратов для химиотерапии ГЦК: комбинированное применение карбоната лития и цитостатиков позволит одновременно задействовать различные клеточные сигнальные пути для повышения апоптоза, аутофагии и аутофагической клеточной гибели. Интеграция различных механизмов клеточной гибели также может способствовать снижению вторичных мутаций в опухоли и предотвратить развитие резистентности к химиотерапии (Yoshida, G. J., 2017).

## ВЫВОДЫ

1. Экспериментальная перевиваемая клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы-29 *in vitro* гетерогенна по клеточному составу. Клетки различаются размерами, ядерно-цитоплазматическим соотношением и концентрацией органелл. По величине ядерно-цитоплазматического соотношения и ультраструктурной организации выделены 5 типов клеток гепатоцеллюлярной карциномы-29, соответствующих степеням дифференцированности. Низкодифференцированные клетки I–III типа составляют 52,8 %, а высокодифференцированные клетки IV и V типов – 47,2 %.

2. Карбонат лития дозозависимо снижает жизнеспособность клеток гепатоцеллюлярной карциномы-29 в эксперименте *in vitro*. Доза карбоната лития 20 мМ вызывает гибель 75 % клеток опухоли; 10 мМ – 50 %; 5 мМ – 25 %.

3. Культивирование в течение 48 ч клеток гепатоцеллюлярной карциномы-29 в среде с карбонатом лития в концентрации 5 мМ приводит к их накоплению в G<sub>2</sub>/M фазе клеточного цикла, повышению количества клеток в состоянии апоптоза и с LC3 beta-позитивными аутофагическими структурами. Клетками-мишенями карбоната лития преимущественно являются высокодифференцированные клетки IV и V типов.

4. При развитии гепатоцеллюлярной карциномы-29 в условиях *in vivo* в мышечной ткани бедра экспериментальных животных сохраняется структурный полиморфизм и выявляются 5 типов опухолевых клеток. Среди них – преобладают низкодифференцированные клетки I–III типов (89 %).

5. Введение по периферии опухоли карбоната лития в дозе 20 мМ приводит к развитию дистрофических изменений в цитоплазме всех типов опухолевых клеток. Среди них – значительна доля клеток с локусами деструктивных изменений в цитоплазме.

6. Применение карбоната лития повышает количество клеток с LC3 beta-позитивными аутофагическими структурами и образование аутофагосом

и аутолизосом в опухолевых клетках, что свидетельствует о стимуляции аутофагии.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

**АТФ** – аденозинтрифосфат

**БА** – болезнь Альцгеймера

**ГЦК** – гепатоцеллюлярная карцинома

**гЭПС** – гранулярная эндоплазматическая сеть

**ДМСО** – диметилсульфоксид

**ЗД** – зоны деструкции

**КЛ** – карбонат лития

**НСО** – Новосибирская область

**СФО** – Сибирский федеральный округ

**ФР** – физиологический раствор хлорида натрия

**цАМФ** – 3'-5'-циклический аденозинмонофосфат

**ЯЦИ** – ядерно-цитоплазматический индекс

**AASLD** (American Association for the Study of Liver Diseases) – Американская Ассоциация по изучению болезней печени

**AJCC** (American Joint Committee on Cancer) – Американский Объединенный Комитет по раку

**Akt** (protein kinase B) – протеинкиназа B

**АМПК** (5' AMP-activated protein kinase) – 5' АМФ-активируемая протеинкиназа

**Atg** (autophagy-related genes/proteins) – гены/белки, связанные с аутофагией

**BCLC** (Barcelona Clinic Liver Cancer) – Барселонская клиническая классификация гепатоцеллюлярного рака

**COX2** (cyclooxygenase 2) – циклооксигеназа 2

**DAMPs** (damage-associated molecular patterns) – молекулярные паттерны, ассоциируемые с повреждением

**DAPI** (4',6-diamidino-2-phenylindole) – 4',6-диамидино-2-фенилиндол

**EASL** (European Association for the Study of the Liver) – Европейская Ассоциация по изучению печени

- EORTC** (European Organization for the Research and Treatment of Cancer) – Европейская Организация по исследованию и лечению рака
- ERK 1/2** (extracellular signal-regulated kinases 1/2) – киназа, регулируемая внеклеточными сигналами 1/2
- GSK-3** (glycogen synthase kinase 3) – гликоген синтаза киназа 3
- HSPA8** (heat shock 70 kDa protein 8) – белок теплового шока 8
- IMPase** (inositol monophosphatase) – инозитол монофосфатаза
- IP3** (inositol 1,4,5-trisphosphate) – инозитол 1,4,5-трифосфат
- IP3R** (inositol trisphosphate receptor) – рецептор для инозитол 1,4,5-трифосфата
- IPPase** (inositol poliphosphatase) – инозитол полифосфатаза
- LAMP1** (Lysosomal-associated membrane protein 1) – мембранный белок, ассоциированный с лизосомами 1
- M** (mean) – среднее значение
- MAP** (microtubule-associated protein) – белок, ассоциированный с микротрубочками
- MEK** (mitogen-activated protein kinase kinase) – киназа митоген-активируемой протеинкиназы
- MHC** (major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости
- mTOR** (mammalian target of rapamycin) – мишень млекопитающих для рапамицина
- PE** (phosphatidylethanolamine) – фосфатидилэтанолламин
- PI** (phosphatidylinositol) – фосфатидилинозитол
- PI3K** (phosphatidylinositol 3-kinase) – фосфатидилинозитол 3-киназа
- PI3P** (phosphatidylinositol-3-phosphate) – фосфатидилинозитол-3-фосфат
- PI(3,4)P<sub>2</sub>** (phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate) – фосфатидилинозитол (3,4)-бифосфат
- PI(3,4,5)P<sub>3</sub>** (phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate) – фосфатидилинозитол (3,4,5)-трифосфат

**SD** (standard deviation) – стандартное отклонение

**TEM** (transmission electron microscopy) – трансмиссионная электронная микроскопия

**TNF- $\alpha$**  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) – фактор некроза опухоли- $\alpha$



**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Бгатова, Н. П. Морфологические критерии стадий дифференцировки клеток экспериментальной гепатокарциномы для оценки противоопухолевых средств. / Н. П. Бгатова, Л. В. Омелянчук, А. А. Пожидаева, В. Ф. Семешин, А. П. Лыков, О. В. Повещенко, О. П. Макарова, Л. Н. Рачковская, Ю. И. Бородин, В. И. Коненков // Бюл. exper. биол. – 2015. – Т. 160. – № 7. – С. 126–132.
2. Каледин, В. И. Гепатокарцинома-29 – метастазирующая перевиваемая опухоль мышей, вызывающая кахексию. / В. И. Каледин, Н. А. Жукова, В. П. Николин, Н. А. Попова, М. Д. Беляев, Н. В. Багинская, Е. А. Литвинова, Т. Г. Толстикова, Е. Л. Лушникова, Д. Е. Семенов // Бюл. exper. биол. – 2009. – Т. 148. – № 12. – С. 664–669.
3. Ковалева, О. В. Аутофагия: клеточная гибель или способ выживания? / О. В. Ковалева, М. С. Шитова, И. Б. Зборовская // Клиническая онкогематология. Фундаментальные исследования и клиническая практика – 2014. – Т. 7. – № 2. – С. 103–113.
4. Пархитько, А. А. Аутофагия: механизмы, регуляция и роль в развитии опухолей обзор. / А. А. Пархитько, О. О. Фаворова, Э. П. Хенске // Биохимия – 2013. – Т. 78. – № 4. – С. 466–480.
5. Петрова, Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность) / Г. В. Петрова, О. П. Грецова, А. О. Шахзадова, М. Ю. Простов, Ю. И. Простов; под ред. А. Д. Каприна, В. В. Старинского, Г. В. Петровой. – М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, – 2018. – 250с.
6. Рябая, О. О. Роль аутофагии в механизмах гибели опухолевых клеток. / О. О. Рябая, А. В. Егорова, Е. В. Степанова // Успехи современной биологии – 2015. – Т. 135. – № 2. – С. 177–188.
7. Шкурупий, В. А. Ультраструктура клеток печени при стрессе. / В. А. Шкурупий // Институт физиологии СО АМН СССР; отв. ред. академик АМН СССР Ю. И. Бородин. – Новосибирск. – 1989.

8. Alizadeh, A. A. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. / A. A. Alizadeh, V. Aranda, A. Bardelli, C. Blanpain, C. Bock, C. Borowski et al. // *Nat. Med.* – 2015. – № 21. – Vol. 8. – P. 846–53.
9. Altamura, A. C. Plasma and intracellular kinetics of lithium after oral administration of various lithium salts. / A. C. Altamura, R. Gomeni, E. Sacchetti, E. Smeraldi // *Eur. J. Clin. Pharmacol.* – 1977. – № 12. – Vol. 1. – P. 59–63.
10. Ávalos, Y. Tumor suppression and promotion by autophagy. / Y. Ávalos, J. Canales, R. Bravo-Sagua, A. Criollo, S. Lavandero, A. F. Quest // *Biomed. Res. Int.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 603980.
11. Ayuso, C. Diagnosis and staging of hepatocellular carcinoma (HCC): current guidelines. / C. Ayuso, J. Rimola, R. Vilana, M. Burrel, A. Darnell, A. García-Criado, L. Bianchi, E. Belmonte, C. Caparroz, M. Barrufet, J. Bruix, C. Brú // *Eur. J. Radiol.* – 2018. – № 101. – P. 72–81.
12. Balogh, J. Hepatocellular carcinoma: a review. / J. Balogh, D. 3rd Victor, E. H. Asham, S. G. Burroughs, M. Boktour, A. Saharia et al. // *J. Hepatocell. Carcinoma* – 2016. – № 3. – P. 41–53.
13. Bellissimo, F. Diagnostic and therapeutic management of hepatocellular carcinoma. / F. Bellissimo, M. R. Pinzone, B. Cacopardo, G. Nunnari // *World J. Gastroenterol.* – 2015. – № 21. – Vol. 42. – P. 12003–21.
14. Bento, C. F. Mammalian autophagy: how does it work? / C. F. Bento, M. Renna, G. Ghislat, C. Puri, A. Ashkenazi, M. Vicinanza, F. M. Menzies, D. C. Rubinsztein // *Annu. Rev. Biochem.* – 2016. – Vol. 85. – P. 685–713.
15. Berridge, M. J. Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidylinositol responses in brain and salivary glands. / M. J. Berridge, C. P. Downes, M. R. Hanley // *Biochem. J.* – 1982. – № 206. – Vol. 3. – P. 587–95.
16. Best, J. Novel implications in the treatment of hepatocellular carcinoma. / J. Best, C. Schotten, J. M. Theysohn, A. Wetter, S. Müller, S. Radünz, M. Schulze, A. Canbay, A. Dechêne, G. Gerken // *Ann. Gastroenterol.* – 2017. – № 30. – Vol.1. – P. 23–32.

17. Beurel, E. Glycogen synthase kinase-3 inhibitors augment TRAIL-induced apoptotic death in human hepatoma cells. / E. Beurel, M. J. Blivet-Van Eggelpoël, M. Kornprobst, S. Moritz, R. Delelo, F. Paye, C. Housset, C. Desbois-Mouthon // *Biochem. Pharmacol.* – 2009. – № 77. – Vol. 1. – P. 54–65.
18. Biazik, J. Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. / J. Biazik, P. Ylä-Anttila, H. Vihinen, E. Jokitalo, E. L. Eskelinen // *Autophagy* – 2015. – № 11. – Vol. 3. – P. 439–51.
19. Bijur, G. N. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. / G. N. Bijur, R. S. Jope // *Neuroreport* – 2003. – № 14. – Vol. 18. – P. 2415–9.
20. Booth, L. A. The role of cell signalling in the crosstalk between autophagy and apoptosis. / L. A. Booth, S. Tavallai, H. A. Hamed, N. Cruickshanks, P. Dent // *Cell Signal.* – 2014. – Vol. 3. – P. 549–55.
21. Brech, A. Autophagy in tumour suppression and promotion. / A. Brech, T. Ahlquist, R. A. Lothe, H. Stenmark // *Mol. Oncol.* – 2009. – № 3. – Vol. 4. – P. 366–75.
22. Brito, A. F. Targeting hepatocellular carcinoma: what did we discover so far? / A. F. Brito, A. M. Abrantes, J. G. Tralhão, M. F. Botelho // *Oncol Rev.* – 2016. – № 10. – Vol. 2. – P. 302.
23. Cade, J. F. J. Lithium salts in the treatment of psychotic excitement. / J. F. J. Cade // *Medical Journal of Australia* – 1949. – № 2. – Vol. 10. – P. 349–52.
24. Can, A. Molecular actions and clinical pharmacogenetics of lithium therapy. / A. Can, T. G. Schulze, T. D. Gould // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 2014. – Vol. 123. – P. 3–16.
25. Cassidy, J. W. Maintaining tumor heterogeneity in patient-derived tumor xenografts. / J. W. Cassidy, C. Caldas, A. Bruna // *Cancer Res.* – 2015. – № 75. – Vol. 15. – P. 2963–8.
26. Chan, S. L. Personalized therapy for hepatocellular carcinoma: where are we now? / S. L. Chan, A. M. Wong, K. Lee, N. Wong, A. K. Chan // *Cancer Treat. Rev.* – 2016. – № 45. – P. 77–86.

27. Chew, L. H. Structural biology of the macroautophagy machinery. / L. H. Chew, C. K. Yip // *Front. Biol. (Beijing)* – 2014. – № 9. – Vol. 1. – P. 18–34.
28. Cockle, J. V. Cell migration in paediatric glioma; characterisation and potential therapeutic targeting. / J. V. Cockle, S. Picton, J. Levesley, E. Ilett, A. M. Carcaboso, S. Short et al. // *Br. J. Cancer* – 2015. – № 112. – Vol. 4. – P. 693–703.
29. Cohen, Y. Cancer morbidity in psychiatric patients: influence of lithium carbonate treatment. / Y. Cohen, A. Chetrit, Y. Cohen, P. Sirota, B. Modan // *Med. Oncol.* – 1998. – № 15. – Vol. 1. – P. 32–6.
30. Cooper, K. F. Till death do us part: the marriage of autophagy and apoptosis. // K. F. Cooper // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2018.
31. Corcoran, A. C. Lithium poisoning from the use of salt substitutes. / A. C. Corcoran, R. D. Taylor, I. H. Page // *Journal of the American Medical Association* – 1949. – № 139. – Vol. 11. – P. 685–8.
32. Costabile, V. Lithium chloride induces mesenchymal-to-epithelial reverting transition in primary colon cancer cell cultures. / V. Costabile, F. Duraturo, P. Delrio, D. Rega, U. Pace, R. Liccardo et al. // *Int. J. Oncol.* – 2015. – № 46. – Vol. 5. – P. 1913–23.
33. Cuervo, A. M. Autophagy: in sickness and in health. / A. M. Cuervo // *Trends Cell Biol.* – 2004. – № 14. – Vol. 2. – P. 70–7.
34. Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. / A. M. Cuervo, E. Wong // *Cell Res.* – 2014. – № 24. – Vol. 1. – P. 92–104.
35. Cui, J. The role of autophagy in liver cancer: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. / J. Cui, Z. Gong, H. M. Shen // *Biochim. Biophys. Acta* – 2013. – № 1836. – Vol. 1. – P. 15–26.
36. da Motta Girardi, D. Hepatocellular carcinoma: review of targeted and immune therapies. / D. da Motta Girardi, T. S. Correa, M. Crosara Teixeira, G. Dos Santos Fernandes // *J. Gastrointest. Cancer* – 2018.
37. Daher, S. Current and future treatment of hepatocellular carcinoma: an updated comprehensive review. / S. Daher, M. Massarwa, A. A. Benson, T. Khoury // *J. Clin. Transl. Hepatol.* – 2018. – № 6. – Vol. 1. – P. 69–78.

38. Dash, S. Autophagy in hepatocellular carcinomas: from pathophysiology to therapeutic response. / S. Dash, S. Chava, P. K. Chandra, Y. Aydin, L. A. Balart, T. Wu // *Hepat. Med.* – 2016. – № 8. – P. 9–20.
39. Davis, S. Crosstalk between the secretory and autophagy pathways regulates autophagosome formation. / S. Davis, J. Wang, S. Ferro-Novick // *Dev. Cell.* – 2017. – № 41. – Vol. 1. – P. 23–32.
40. de Araujo, W. M. PTEN overexpression cooperates with lithium to reduce the malignancy and to increase cell death by apoptosis via PI3K/AKT suppression in colorectal cancer cells. / W. M. de Araujo, B. K. Robbs, L. G. Bastos, W. F. de Souza, F. C. Vidal, J. P. Viola, J. A. Morgado-Diaz // *J. Cell Biochem.* – 2016. – № 117. – Vol. 2. – P. 458–69.
41. de Duve, C. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. / C. de Duve, B. C. Pressman, R. Gianetto, R. Wattiaux, F. Appelmans // *Biochem. J.* – 1955. – Vol. 60. – P. 604–617.
42. de Oliveira, M. R. Curcumin, mitochondrial biogenesis, and mitophagy: Exploring recent data and indicating future needs. / M. R. de Oliveira, F. R. Jardim, W. N. Setzer, S. M. Nabavi, S. F. Nabavi // *Biotechnol. Adv.* – 2016. – № 34. – Vol. 5. – P. 813–826.
43. Degtarev, A. Expansion and evolution of cell death programmes. / A. Degtarev, J. Yuan // *Nature Reviews Molecular Cell Biology* – 2008. – № 9. – P. 378–390.
44. DeYoung, M. P. Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. / M. P. DeYoung, P. Horak, A. Sofer, D. Sgroi, L. W. Ellisen // *Genes. Dev.* – 2008. – № 22. – Vol. 2. – P. 239–51.
45. Dimitroulis, D. From diagnosis to treatment of hepatocellular carcinoma: An epidemic problem for both developed and developing world. / D. Dimitroulis, C. Damaskos, S. Valsami, S. Davakis, N. Garmpis, E. Spartalis et al. // *World J. Gastroenterol.* – 2017. – № 23. – Vol. 29. – P. 5282–5294.

46. Doongaji, D. R. Manic depressive psychosis in India and the possible role of lithium as a natural prophylactic. I--Hypothesis. / D. R. Doongaji, V. S. Jathar, R. S. Satoskar // *J. Postgrad. Med.* – 1980. – № 26. – Vol. 1. – P. 34–8.
47. Dupont, N. Molecular mechanisms of noncanonical autophagy. / N. Dupont, A. C. Nascimbeni, E. Morel, P. Codogno // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* – 2017. – Vol. 328. – P. 1–23.
48. Edinger, A. L. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. / A. L. Edinger, C. B. Thompson // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2004. – № 16. – Vol. 6. – P. 663–669.
49. Eisenberg-Lerner, A. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. / A. Eisenberg-Lerner, S. Bialik, H. U. Simon, A. Kimchi // *Cell Death Differ.* – 2009. – № 16. – Vol. 7. – P. 966–75.
50. Eisenberg-Lerner, A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. / A. Eisenberg-Lerner, A. Kimchi // *Apoptosis* – 2009. – № 14. – Vol. 4. – P. 376–91.
51. Elmaci, İ. A metabolic inhibitory cocktail for grave cancers: metformin, pioglitazone and lithium combination in treatment of pancreatic cancer and glioblastoma multiforme. / İ. Elmaci, M. A. Altinoz // *Biochem. Genet.* – 2016. – № 54. – Vol. 5. – P. 573–618.
52. Erdal, E. Lithium-mediated downregulation of PKB/Akt and cyclin E with growth inhibition in hepatocellular carcinoma cells. / E. Erdal, N. Ozturk, T. Cagatay, E. Eksioğlu-Demiralp, M. Ozturk // *Int. J. Cancer* – 2005. – № 115. – Vol. 6. – P. 903–10.
53. Eskelinen, E. L. The dual role of autophagy in cancer. / E. L. Eskelinen // *Curr. Opin. Pharmacol.* – 2011. – № 11. – Vol. 4. – P. 294–300.
54. Fésüs, L. Autophagy shapes inflammation. / L. Fésüs, M. Á. Demény, G. Petrovski // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2011. – № 14. – Vol. 11. – P. 2233–43.
55. Fleming, A. Chemical modulators of autophagy as biological probes and potential therapeutics. / A. Fleming, T. Noda, T. Yoshimori, D. C. Rubinsztein // *Nat. Chem. Biol.* – 2011. – № 7. – Vol. 1. – P. 9–17.

56. Friemel, J. Intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma. / J. Friemel, M. Rechsteiner, L. Frick, F. Böhm, K. Struckmann, M. Egger, H. Moch, M. Heikenwalder, A. Weber // *Clin. Cancer Res.* – 2015. – № 21. – Vol. 8. – P. 1951–61.
57. Freland, L. Inhibition of GSK3 by lithium, from single molecules to signaling networks. / L. Freland, J. M. Beaulieu // *Front. Mol. Neurosci.* – 2012. – Vol. 5. – P. 14.
58. Fu, Y. Combination of lithium chloride and pEGFP-N1-BmK CT effectively decreases proliferation and migration of C6 glioma cells. / Y. Fu, Y. Jiao, S. Zheng, A. Liang, F. Hu // *Cytotechnology* – 2016. – № 68. – Vol. 2. – P. 197–202.
59. Furuta, T. Biological basis and clinical study of glycogen synthase kinase-3 $\beta$ -targeted therapy by drug repositioning for glioblastoma. / T. Furuta, H. Sabit, Y. Dong, K. Miyashita, M. Kinoshita, N. Uchiyama et al. // *Oncotarget* – 2017. – № 8. – Vol. 14. – P. 22811–22824.
60. Galle, P. R. Treating hepatobiliary cancers: the oncology way. / P. R. Galle // *Dig. Dis.* – 2017. – № 35. – Vol. 4. – P. 384–386.
61. Gao, S. Inhibition of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ) suppresses the progression of esophageal squamous cell carcinoma by modifying STAT3 activity. / S. Gao, S. Li, X. Duan, Z. Gu, Z. Ma, X. Yuan et al. // *Mol. Carcinog.* – 2017. – № 56. – Vol. 10. – P. 2301–2316.
62. Germano, D. Systemic therapy of hepatocellular carcinoma: current status and future perspectives. / D. Germano, B. Daniele // *World J. Gastroenterol.* – 2014. – № 20. – Vol. 12. – P. 3087–99.
63. Gomes, L. C. Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. / L. C. Gomes, L. Scorrano // *Biochim. Biophys. Acta* – 2013. – № 1833. – Vol. 1. – P. 205–12.
64. Grandjean, E. M. Lithium: updated human knowledge using an evidence-based approach. Part II: Clinical pharmacology and therapeutic monitoring. / E. M. Grandjean, J. M. Aubry // *CNS Drugs* – 2009. – № 23. – Vol. 4. – P. 331–49.



65. Hallcher, L. M. The effects of lithium ion and other agents on the activity of myo-inositol-1-phosphatase from bovine brain. / L. M. Hallcher, W. R. Sherman // *J. Biol. Chem.* – 1980. – № 255. – Vol. 22. – P. 10896–901.
66. Hammoud, G. M. Are we getting closer to understanding intratumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma? / G. M. Hammoud, J. A. Ibdah // *Hepatobiliary Surg. Nutr.* – 2016. – № 5. – Vol. 2. – P. 188–90.
67. Han, S. Lithium enhances the antitumour effect of temozolomide against TP53 wild-type glioblastoma cells via NFAT1/FasL signalling. / S. Han, L. Meng, Y. Jiang, W. Cheng, X. Tie, J. Xia, A. Wu // *Br. J. Cancer* – 2017. – № 116. – Vol. 10. – P. 1302–1311.
68. Hartke, J. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. / J. Hartke, M. Johnson, M. Ghabril // *Semin. Diagn. Pathol.* – 2017. – № 34. – Vol. 2. – P. 153–159.
69. Hernández, F. Tauopathies. / F. Hernández, J. Avila // *Cell Mol. Life Sci.* – 2007. – № 64. – Vol. 17. – P. 2219–33.
70. Hooper, C. The GSK3 hypothesis of Alzheimer's disease. / C. Hooper, R. Killick, S. Lovestone // *J. Neurochem.* – 2008. – № 104. – Vol. 6. – P. 1433–9.
71. Hu, L. Targeting autophagy for oncolytic immunotherapy. / L. Hu, K. Jiang, C. Ding, S. Meng // *Biomedicines* – 2017. – № 5. – Vol. 1.
72. Huang, J. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. / J. Huang, B. D. Manning // *Biochem. J.* – 2008. – № 412. – Vol. 2. – P. 179–90.
73. Huang, R. Y. Use of lithium and cancer risk in patients with bipolar disorder: population-based cohort study. / R. Y. Huang, K. P. Hsieh, W. W. Huang, Y. H. Yang // *Br. J. Psychiatry* – 2016. – № 209. – Vol. 5. – P. 393–399.
74. Imai, K. Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. / K. Imai, F. Hao, N. Fujita, Y. Tsuji, Y. Oe, Y. Araki, M. Hamasaki, T. Noda, T. Yoshimori // *J. Cell Sci.* – 2016. – № 129. – Vol. 20. – P. 3781–3791.

75. Inoki, K. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. / K. Inoki, T. Zhu, K. L. Guan // *Cell* – 2003. – № 115. – Vol. 5. – P. 577–90.
76. Inoki, K. Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. / K. Inoki, Y. Li, T. Xu, K. L. Guan // *Genes. Dev.* – 2003. – № 17. – Vol. 15. – P. 1829–34.
77. Jakobsson, E. Towards a unified understanding of lithium action in basic biology and its significance for applied biology. / E. Jakobsson, O. Argüello-Miranda, S. W. Chiu, Z. Fazal, J. Kruczek, S. Nunez-Corrales et al. // *J. Membr. Biol.* – 2017. – № 250. – Vol. 6. – P. 587–604.
78. Jang, D. J. The roles of phosphoinositides in mammalian autophagy. / D. J. Jang, J. A. Lee // *Arch. Pharm. Res.* – 2016. – № 39. – Vol. 8. – P. 1129–36.
79. Janji, B. The multifaceted role of autophagy in tumor evasion from immune surveillance. / B. Janji, E. Viry, E. Moussay, J. Paggetti, T. Arakelian, T. Mgrditchian et al. // *Oncotarget* – 2016. – № 7. – Vol. 14. – P. 17591–607.
80. Jeng, K. S. Heterogeneity of hepatocellular carcinoma contributes to cancer progression. / K. S. Jeng, C. F. Chang, W. J. Jeng, I. S. Sheen, C. J. Jeng // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2015. – № 94. – Vol. 3. – P. 337–47.
81. Jiang, P. Autophagy and human diseases. / P. Jiang, N. Mizushima // *Cell Res.* – 2014. – № 24. – Vol. 1. – P. 69–79.
82. Ke, P. Y. Honoring cell self-digestion: Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine. / P. Y. Ke // *Biomed. J.* – 2017. – № 40. – Vol. 1. – P. 5–8.
83. Kenific, C. M. Cellular and metabolic functions for autophagy in cancer cells. / C. M. Kenific, J. Debnath // *Trends Cell Biol.* – 2015. – № 25. – Vol. 1. – P. 37–45.
84. Kimmelman, A. C. Autophagy and tumor metabolism. / A. C. Kimmelman, E. White // *Cell Metab.* – 2017. – № 25. – Vol. 5. – P. 1037–1043.

85. Kishi-Itakura, C. Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells. / C. Kishi-Itakura, I. Koyama-Honda, E. Itakura, N. J. Mizushima // *J. Cell Sci.* – 2014. – № 127. – P. 4089–102.
86. Klionsky, D. J. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). / D. J. Klionsky, K. Abdelmohsen, A. Abe, M. J. Abedin, H. Abeliovich, A. Acevedo Arozena et al. // *Autophagy* – 2016. – № 12. – Vol. 1. – P. 1–222.
87. Kohi, M. P. Gender-related differences in hepatocellular carcinoma: does sex matter? / M. P. Kohi // *J. Vasc. Interv. Radiol.* – 2016. – № 27. – Vol. 9. – P. 1338–1341.
88. Koyama-Honda, I. ATG conjugation-dependent degradation of the inner autophagosomal membrane is a key step for autophagosome maturation. / I. Koyama-Honda, K. Tsuboyama, N. Mizushima // *Autophagy* – 2017. – № 13. – Vol. 7. – P. 1252–1253.
89. Lee, Y. J. The role of autophagy in hepatocellular carcinoma. / Y. J. Lee, B. K. Jang // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – № 16. – Vol. 11. – P. 26629–43.
90. Lenox, R. H. Lithium and the brain: a psychopharmacological strategy to a molecular basis for manic depressive illness. / R. H. Lenox, D. G. Watson // *Clin. Chem.* – 1994. – № 40. – Vol. 2. – P. 309–14.
91. Li, C. J. New insights into the role of autophagy in tumor immune microenvironment. / C. J. Li, W. T. Liao, M. Y. Wu, P. Y. Chu // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – № 18. – Vol. 7.
92. Li, H. Lithium chloride suppresses colorectal cancer cell survival and proliferation through ROS/GSK-3 $\beta$ /NF- $\kappa$ B signaling pathway. / H. Li, K. Huang, X. Liu, J. Liu, X. Lu, K. Tao et al. // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2014. – Vol. 2014. – P. 241864.
93. Li, L. Lithium chloride promotes apoptosis in human leukemia NB4 cells by inhibiting glycogen synthase kinase-3 beta. / L. Li, H. Song, L. Zhong, R. Yang, X. Q. Yang, K. L. Jiang, B. Z. Liu // *Int. J. Med. Sci.* – 2015. – № 12. – Vol. 10. – P. 805–10.

94. Li, L. Heterogeneity of liver cancer and personalized therapy. / L. Li, H. Wang // *Cancer Lett.* – 2016. – № 379. – Vol. 2. – P. 191–7.
- Liu, J. The evolving, multifaceted roles of autophagy in cancer. / J. Liu, J. Debnath // *Adv. Cancer Res.* – 2016. – Vol. 130. – P. 1–53.
95. Liu, L. The role of autophagy in hepatocellular carcinoma: friend or foe. / L. Liu, J. Z. Liao, X. X. He, P. Y. Li // *Oncotarget* – 2017. – № 8. – Vol. 34. – P. 57707–57722.
96. Lorente, J. The interplay between autophagy and tumorigenesis: exploiting autophagy as a means of anticancer therapy. / J. Lorente, C. Velandia, J. A. Leal, Y. Garcia-Mayea, A. Lyakhovich, H. Kondoh, M. E. LLeonart // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* – 2018. – № 93. – Vol. 1. – P. 152–165.
97. Lu, L. C. Tumor heterogeneity in hepatocellular carcinoma: facing the challenges. / L. C. Lu, C. H. Hsu, C. Hsu, A. L. Cheng // *Liver Cancer* – 2016. – № 5. – Vol. 2. – P. 128–38.
98. Madhavi, Y. V. Targeting AMPK in diabetes and diabetic complications: energy homeostasis, autophagy and mitochondrial health. / Y. V. Madhavi, N. Gaikwad, V. G. Yerra, A. K. Kalvala, S. Nanduri, A. Kumar // *Curr. Med. Chem.* – 2018.
99. Maeng, Y. S. Lithium inhibits tumor lymphangiogenesis and metastasis through the inhibition of TGFBIp expression in cancer cells. / Y. S. Maeng, R. Lee, B. Lee, S. I. Choi, E. K. Kim // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 20739.
100. Malhi, G. S. The science and practice of lithium therapy. / G. S. Malhi, M. Tanious, P. Das, M. Berk // *Aust. N. Z. J. Psychiatry* – 2012. – № 46. – Vol. 3. – P. 192–211.
101. Mancinelli, R. Multifaceted Roles of GSK-3 in Cancer and Autophagy-Related Diseases. / R. Mancinelli, G. Carpino, S. Petrunaro, C. L. Mammola, L. Tomaipitnca, A. Filippini et al. // *Oxid. Med. Cell Longev.* – 2017. – Vol. 2017. – P. 4629495.
102. Manning, B. D. Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-

- kinase/akt pathway. / B. D. Manning, A. R. Tee, M. N. Logsdon, J. Blenis, L. C. Cantley // *Mol. Cell* – 2002. – № 10. – Vol. 1. – P. 151–62.
103. Martinsson, L. Lithium treatment and cancer incidence in bipolar disorder. / L. Martinsson, J. Westman, J. Hällgren, U. Ösby, L. Backlund // *Bipolar. Disord.* – 2016. – № 18. – Vol. 1. – P. 33–40.
104. Mazzanti, R. Hepatocellular carcinoma: Where are we? / R. Mazzanti, U. Arena, R. Tassi // *World J. Exp. Med.* – 2016. – № 6. – Vol. 1. – P. 21–36.
105. McCubrey, J. A. GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. / J. A. McCubrey, L. S. Steelman, F. E. Bertrand, N. M. Davis, M. Sokolosky, S. L. Abrams et al. // *Oncotarget* – 2014. – № 5. – Vol. 10. – P. 2881–911.
106. McCubrey, J. A. Effects of mutations in Wnt/ $\beta$ -catenin, hedgehog, Notch and PI3K pathways on GSK-3 activity-Diverse effects on cell growth, metabolism and cancer. / J. A. McCubrey, D. Rakus, A. Gizak, L. S. Steelman, S. L. Abrams, K. Lertpiriyapong et al. // *Biochim. Biophys. Acta* – 2016. – № 1863. – Vol. 12. – P. 2942–2976.
107. Mehta, P. Noncanonical autophagy: one small step for LC3, one giant leap for immunity. / P. Mehta, J. Henault, R. Kolbeck, M. A. Sanjuan // *Curr. Opin. Immunol.* – 2014. – Vol. 26. – P. 69–75.
108. Menzies, F. M. Autophagy and neurodegeneration: pathogenic mechanisms and therapeutic opportunities. / F. M. Menzies, A. Fleming, A. Caricasole, C. F. Bento, S. P. Andrews, A. Ashkenazi et al. // *Neuron*. – 2017. – № 93. – Vol. 5. – P. 1015–1034.
109. Mercer, T. J. A molecular perspective of mammalian autophagosome biogenesis. / T. J. Mercer, A. Gubas, S. A. Tooze // *J. Biol. Chem.* – 2018. – № 293. – Vol. 15. – P. 5386–5395
110. Mitchell, P. B. Lithium treatment for bipolar disorder. / P. B. Mitchell, D. Hadzi-Pavlovic // *Bull. World Health Org.* – 2000. – № 78. – Vol. 4. – P. 515–7.

111. Monastyrska, I. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy. / I. Monastyrska, E. Rieter, D. J. Klionsky, F. Reggiori // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* – 2009. – № 84. – Vol. 3. – P. 431–48.
112. Montella, L. Hepatocellular carcinoma: will novel targeted drugs really impact the next future? / L. Montella, G. Palmieri, R. Addeo, S. Del Prete // *World. J. Gastroenterol.* – 2016. – № 22. – Vol. 27. – P. 6114–26.
113. Mota de Freitas, D. Lithium in Medicine: Mechanisms of Action. / D. Mota de Freitas, B. D. Levenson, J. L. Goossens // *Met. Ions Life Sci.* – 2016. – Vol. 16. – P. 557–84.
114. Motoi, Y. Lithium and autophagy. / Y. Motoi, K. Shimada, K. Ishiguro, N. Hattori // *ACS Chem. Neurosci.* – 2014. – № 5. – Vol. 6. – P. 434–42.
115. Mukhopadhyay, S. Autophagy and apoptosis: where do they meet? // S. Mukhopadhyay, P. K. Panda, N. Sinha, D. N. Das, S. K. Bhutia // *Apoptosis* – 2014. – № 19. – Vol. 4. – P. 555–66.
116. Nah, J. Autophagy in neurodegenerative diseases: from mechanism to therapeutic approach. / J. Nah, J. Yuan, Y. K. Jung // *Mol. Cells* – 2015. – № 38. – Vol. 5. – P. 381–9.
117. Nakamura, S. New insights into autophagosome-lysosome fusion. / S. Nakamura, T. Yoshimori // *J. Cell Sci.* – 2017. – № 130. – Vol. 7. – P. 1209–1216.
118. Nascimbeni, A. C. Phosphatidylinositol-3-phosphate in the regulation of autophagy membrane dynamics. / A. C. Nascimbeni, P. Codogno, E. Morel // *FEBS J.* – 2017. – № 284. – Vol. 9. – P. 1267–1278.
119. Nault, J. C. The role of molecular enrichment on future therapies in hepatocellular carcinoma. / J. C. Nault, P. R. Galle, J. U. Marquardt // *J. Hepatol.* – 2018. – № 69. – Vol. 1. – P. 237–247.
120. Nikolettou, V. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. / V. Nikolettou, M. Markaki, K. Palikaras, N. Tavernarakis // *Biochim. Biophys. Acta* – 2013. – № 1833. – Vol. 12. – P. 3448–3459.
121. Nixon, R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. / R. A. Nixon // *Nat. Med.* – 2013. – № 19. – Vol. 8. – P. 983–97.

122. Noda, T. Autophagy in the context of the cellular membrane-trafficking system: the enigma of Atg9 vesicles. / T. Noda // *Biochem. Soc. Trans.* – 2017. – № 45. – Vol. 6. – P. 1323–1331.
123. Nowell, P. C. The clonal evolution of tumor cell populations. / P. C. Nowell // *Science* – 1976. – № 194. – Vol. 4260. – P. 23–8.
124. O'Donovan, T. R. Lithium modulates autophagy in esophageal and colorectal cancer cells and enhances the efficacy of therapeutic agents in vitro and in vivo. / T. R. O'Donovan, S. Rajendran, S. O'Reilly, G. C. O'Sullivan, S. L. McKenna // *PLoS One* – 2015. – № 10. – Vol. 8.
125. Ohsumi, Y. Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. / Y. Ohsumi // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2001. – № 2. – Vol. 3. – P. 211–6.
126. Ohsumi, Y. Historical landmarks of autophagy research. / Y. Ohsumi // *Cell Res.* – 2014. – № 24. – Vol. 1. – P. 9–23.
127. Okkenhaug, K. Signaling by the phosphoinositide 3-kinase family in immune cells. / K. Okkenhaug // *Annu. Rev. Immunol.* – 2013. – Vol. 31. – P. 675–704.
128. Oruch, R. Lithium: a review of pharmacology, clinical uses, and toxicity. / R. Oruch, M. A. Elderbi, H. A. Khattab, I. F. Pryme, A. Lund // *Eur. J. Pharmacol.* – 2014. – Vol. 740. – P. 464–73.
129. Page, A. J. Hepatocellular carcinoma: diagnosis, management, and prognosis. / A. J. Page, D. C. Cosgrove, B. Philosophe, T. M. Pawlik // *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* – 2014. – № 23. – Vol. 2. – P. 289–311.
130. Pan, H. Autophagy-associated immune responses and cancer immunotherapy. / H. Pan, L. Chen, Y. Xu, W. Han, F. Lou, W. Fei, S. Liu, Z. Jing, X. Sui // *Oncotarget* – 2016. – № 7. – Vol. 16. – P. 21235–46.
131. Parzych, K. R. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. / K. R. Parzych, D. J. Klionsky // *Antioxid. Redox. Signal.* – 2014. – № 20. – Vol. 3. – P. 460–73.
132. Pascual, S. New advances in hepatocellular carcinoma. / S. Pascual, I. Herrera, J. Irurzun // *World J. Hepatol.* – 2016. – № 8. – Vol. 9. – P. 421–38.



133. Pasquali, L. Intracellular pathways underlying the effects of lithium. / L. Pasquali, C. L. Busceti, F. Fulceri, A. Paparelli, F. Fornai // *Behav. Pharmacol.* – 2010. – № 21. – Vol. 5–6. – P. 473–92.
134. Peixoto-da-Silva, J. Lithium, a classic drug in psychiatry, improves nilotinib-mediated antileukemic effects. / J. Peixoto-da-Silva, A. K. Calgarotto, K. R. Rocha, C. Palmeira-Dos-Santos, S. S. Smaili, G. J. S. Pereira et al. // *Biomed. Pharmacother.* – 2018. – Vol. 99. – P. 237–244.
135. Phiel, C. J. Molecular targets of lithium action. / C. J. Phiel, P. S. Klein // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2001. – Vol. 41. – P. 789–813.
136. Pietrocola, F. Autophagy in natural and therapy-driven anticancer immunosurveillance. / F. Pietrocola, J. M. Bravo-San Pedro, L. Galluzzi, G. Kroemer // *Autophagy* – 2017. – № 13. – Vol. 12. – P. 2163–2170.
137. Qi, X. Management of hepatocellular carcinoma: an overview of major findings from meta-analyses. / X. Qi, Y. Zhao, H. Li, X. Guo, G. Han // *Oncotarget* – 2016. – № 7. – Vol. 23. – P. 34703–51.
138. Quiroz, J. A. Molecular effects of lithium. / J. A. Quiroz, T. D. Gould, H. K. Manji // *Mol. Interv.* – 2004. – № 4. – Vol. 5. – P. 259–272.
139. Ravikumar, B. Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology. / B. Ravikumar, S. Sarkar, J. E. Davies, M. Futter, M. Garcia-Arencibia, Z. W. Green-Thompson et al. // *Physiol. Rev.* – 2010. – № 90. – Vol. 4. – P. 1383–435.
140. Reggiori, F. Autophagosome Maturation and Fusion. / F. Reggiori, C. Ungermann // *J. Mol. Biol.* – 2017. – № 429. – Vol. 4. – P. 486–496.
141. Ren, S. Y. Role of autophagy in metabolic syndrome-associated heart disease. / S. Y. Ren, X. Xu // *Biochim. Biophys. Acta* – 2015. – № 1852. – Vol. 2. – P. 225–31.
142. Repnik, U. Lysosomal membrane permeabilization in cell death: concepts and challenges. / U. Repnik, M. Hafner Česen, B. Turk // *Mitochondrion* – 2014. – Vol. 19. – P. 49-57.

143. Richman, L. S. Artificial lithium toxicity: a case report and review of the literature. / L. S. Richman, A. L. Dzierba, K. A. Connolly, P. M. Bryan, S. Chandra // *J. Pharm. Pract.* – 2015. – № 28. – Vol. 5. – P. 479–81.
144. Rocchi, A. Emerging roles of autophagy in metabolism and metabolic disorders. / A. Rocchi, C. He // *Front. Biol. (Beijing)* – 2015. – № 10. – Vol. 2. – P. 154–164.
145. Roux, M. From direct to indirect lithium targets: a comprehensive review of omics data. / M. Roux, A. Dosseto // *Metallomics* – 2017. – № 9. – Vol. 10. – P. 1326–1351.
146. Roy, S. Autophagy and tumorigenesis. / S. Roy, J. Debnath // *Semin. Immunopathol.* – 2010. – № 32. – Vol. 4. – P. 383–96.
147. Rubinsztein, D. C. Therapeutic targeting of autophagy in neurodegenerative and infectious diseases. / D. C. Rubinsztein, C. F. Bento, V. Deretic // *J. Exp. Med.* – 2015. – № 212. – Vol. 7. – P. 979–90.
148. Sade, Y. IP3 accumulation and/or inositol depletion: two downstream lithium's effects that may mediate its behavioral and cellular changes. / Y. Sade, L. Toker, N. Z. Kara, H. Einat, S. Rapoport, D. Moechars, G. T. Berry, Y. Bersudsky, G. Agam // *Transl. Psychiatry* – 2016. – № 6. – Vol. 12.
149. Sarkar, S. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. / S. Sarkar, R. A. Floto, Z. Berger, S. Imarisio, A. Cordenier, M. Pasco, L. J. Cook, D. C. Rubinsztein // *J. Cell Biol.* – 2005. – № 170. – Vol. 7. – P. 1101–11.
150. Sarkar, S. Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies. / S. Sarkar, B. Ravikumar, R. A. Floto, D. C. Rubinsztein // *Cell Death Differ.* – 2009. – № 16. – Vol. 1. – P. 46–56.
151. Sato, T. Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. / T. Sato, A. Nakashima, L. Guo, K. Coffman, F. Tamanoi // *Oncogene* – 2010. – № 29. – Vol. 18. – P. 2746–52.

152. Schleicher, S. B. Combined application of arsenic trioxide and lithium chloride augments viability reduction and apoptosis induction in human rhabdomyosarcoma cell lines. / S. B. Schleicher, J. J. Zaborski, R. Riester, N. Zenkner, R. Handgretinger, T. Kluba et al. // *PLoS One* – 2017. – № 12. – Vol. 6.
153. Schneider, J. L. Autophagy and human disease: emerging themes. / J. L. Schneider, A. M. Cuervo // *Curr. Opin. Genet. Dev.* – 2014. – Vol. 26. – P. 16–23.
154. Shoshani, T. Identification of a novel hypoxia-inducible factor 1-responsive gene, RTP801, involved in apoptosis. / T. Shoshani, A. Faerman, I. Mett, E. Zelin, T. Tenne, S. Gorodin, Y. Moshel et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2002. – № 22. – Vol. 7. – P. 2283–93.
155. Song, M. J. Newer treatments for advanced hepatocellular carcinoma. / M. J. Song, S. H. Bae // *Korean J. Intern. Med.* – 2014. – № 29. – Vol. 2. – P. 149–55.
156. Sridhar, S. Autophagy and disease: always two sides to a problem. / S. Sridhar, Y. Botbol, F. Macian, A. M. Cuervo // *J. Pathol.* – 2012. – № 226. – Vol. 2. – P. 255–73.
157. Suzuki, H. Structural biology of the core autophagy machinery. / H. Suzuki, T. Osawa, Y. Fujioka, N. N. Noda // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2017. – Vol. 43. – P. 10–17.
158. Sylvester, P. W. Optimization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability. / P. W. Sylvester // *Methods. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 716. – P. 157–168.
159. Tan, C. C. Autophagy in aging and neurodegenerative diseases: implications for pathogenesis and therapy. / C. C. Tan, J. T. Yu, M. S. Tan, T. Jiang, X. C. Zhu, L. Tan // *Neurobiol. Aging* – 2014. – № 35. – Vol. 5. – P. 941–57.
160. Tang, A. Hepatocellular carcinoma imaging systems: why they exist, how they have evolved, and how they differ. / A. Tang, I. Cruite, D. G. Mitchell, C. B. Sirlin // *Abdom. Radiol. (NY)* – 2018. – № 43. – Vol. 1. – P. 3–12.
161. Thorburn, A. Apoptosis and autophagy: regulatory connections between two supposedly different processes. / A. Thorburn // *Apoptosis* – 2008. – № 13. – Vol. 1. – P. 1–9.

162. Toker, L. Lithium, inositol and mitochondria. / L. Toker, G. Agam // ACS Chem. Neurosci. – 2014. – № 5. – Vol. 6. – P. 411–2.
163. Tooze, S. A. Autophagy captures the Nobel Prize. / S. A. Tooze, I. Dikic // Cell – 2016. – № 167. – Vol. 6. – P. 1433–1435.
164. Trnski, D. GSK3 $\beta$  and Gli3 play a role in activation of Hedgehog-Gli pathway in human colon cancer - Targeting GSK3 $\beta$  downregulates the signaling pathway and reduces cell proliferation. / D. Trnski, M. Sabol, A. Gojević, M. Martinić, P. Ozretić, V. Musani et al. // Biochim. Biophys. Acta – 2015. – № 1852. – Vol. 12. – P. 2574–84.
165. Tsui, M. M. Selective G2/M arrest in a p53 (Val135)-transformed cell line induced by lithium is mediated through an intricate network of MAPK and  $\beta$ -catenin signaling pathways. / M. M. Tsui, W. C. Tai, W. Y. Wong, W. L. Hsiao // Life Sci. – 2012. – № 24. – Vol. 9-10. – P. 312–321.
166. Vicencio, J. M. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulate autophagy through its interaction with Beclin 1. / J. M. Vicencio, C. Ortiz, A. Criollo, A. W. Jones, O. Kepp, L. Galluzzi et al. // Cell Death Differ. – 2009. – № 16. – Vol. 7. – P. 1006–17.
167. Vosahlikova, M. Lithium – therapeutic tool endowed with multiple beneficiary effects caused by multiple mechanisms. / M. Vosahlikova, P. Svoboda // Acta Neurobiol. Exp. (Wars) – 2016. – № 76. – Vol. 1. – P. 1–19.
168. Wang, F. Autophagy, metabolic disease, and pathogenesis of heart dysfunction. / F. Wang, J. Jia, B. Rodrigues // Can. J. Cardiol. – 2017. – № 33. – Vol. 7. – P. 850–859.
169. Wang, J. S. Lithium inhibits proliferation of human esophageal cancer cell line Eca-109 by inducing a G2/M cell cycle arrest. / J. S. Wang, C. L. Wang, J. F. Wen, Y. J. Wang, Y. B. Hu, H. Z. Ren // World J. Gastroenterol. – 2008. – № 7. – Vol. 25. – P. 3982–3989.
170. Wang, K. Cancer stem cells of hepatocellular carcinoma. / K. Wang, D. Sun // Oncotarget – 2018. – № 9. – Vol. 33. – P. 23306–23314.

171. Wang, X. Lithium suppresses Hedgehog signaling via promoting ITCH E3 ligase activity and Gli1-SUFU interaction in PDA cells. / X. Wang, Z. Fang, A. Wang, C. Luo, X. Cheng, M. Lu // *Front. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 820.
172. Wang, X. Lithium and an EPAC-specific inhibitor ESI-09 synergistically suppress pancreatic cancer cell proliferation and survival. / X. Wang, C. Luo, X. Cheng, M. Lu // *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* – 2017. – № 49. – Vol. 7. – P. 573–580.
173. Wang, Y. SNARE-mediated membrane fusion in autophagy. / Y. Wang, L. Li, C. Hou, Y. Lai, J. Long, J. Liu et al. // *Semin. Cell Dev. Biol.* – 2016. – Vol. 60. – P. 97–104.
174. Wang, Y. LiCl treatment induces programmed cell death of schwannoma cells through AKT- and MTOR-mediated necroptosis. / Y. Wang, Q. Zhang, B. Wang, P. Li, P. Liu // *Neurochem. Res.* – 2017. – № 42. – Vol. 8. – P. 2363–2371.
175. Weiskirchen, R. Intratumor heterogeneity, variability and plasticity: questioning the current concepts in classification and treatment of hepatocellular carcinoma. / R. Weiskirchen // *Hepatobiliary Surg. Nutr.* – 2016. – № 5. – Vol. 2. – P. 183–7.
176. White, E. Autophagy, metabolism, and cancer. / E. White, J. M. Mehnert, C. S. Chan // *Clin. Cancer Res.* – 2015. – № 21. – Vol. 22. – P. 5037–46.
177. Wijdeven, R. H. Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway. / R. H. Wijdeven, H. Janssen, L. Nahidiazar, L. Janssen, K. Jalink, I. Berlin, J. Neefjes // *Nat. Commun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 11808.
178. Wong, Y. C. Autophagosome dynamics in neurodegeneration at a glance. / Y. C. Wong, E. L. Holzbaur // *J. Cell Sci.* – 2015. – № 128. – Vol. 7. – P. 1259–67.
179. Yang, J. S. Autophagy and its link to type II diabetes mellitus. / J. S. Yang, C. C. Lu, S. C. Kuo, Y. M. Hsu, S. C. Tsai, S. Y. Chen et al. // *Biomedicine (Taipei)* – 2017. – № 7. – Vol. 2. – P. 8.
180. Yang, Z. An overview of the molecular mechanism of autophagy. / Z. Yang, D. J. Klionsky // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* – 2009. – Vol. 335. – P. 1–32.

181. Yin, Z. Autophagy: machinery and regulation. / Z. Yin, C. Pascual, D. J. Klionsky // *Microb. Cell* – 2016. – № 3. – Vol. 12. – P. 588–596.
182. Yoshida, G. J. Therapeutic strategies of drug repositioning targeting autophagy to induce cancer cell death: from pathophysiology to treatment. / G. J. Yoshida // *J. Hematol. Oncol.* – 2017. – № 10. – Vol. 1. – P. 67.
183. Yu, L. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms. / L. Yu, Y. Chen, S. A. Tooze // *Autophagy* – 2018. – № 14. – Vol. 2. – P. 207–215.
184. Zassadowski, F. Lithium chloride antileukemic activity in is GSK-3 and MEK/ERK dependent. / F. Zassadowski, K. Pokorna, N. Ferre, F. Guidez, L. Llopis, O. Chourbagi et al. // *Leukemia* – 2015. – № 29. – Vol. 12. – P. 2277–84.
185. Zhang, C. Polyphyllin VII induces an autophagic cell death by activation of the JNK pathway and inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway in HepG2 cells. / C. Zhang, X. Jia, K. Wang, J. Bao, P. Li, M. Chen et al. // *PLoS One* – 2016. – № 11. – Vol. 1.
186. Zhao, G. X. The critical molecular interconnections in regulating apoptosis and autophagy. / G. X. Zhao, H. Pan, D.Y. Ouyang, X. H. He // *Ann. Med.* – 2015. – № 47. – Vol. 4. – P. 305–15.
187. Zhao, Y. G. Formation and maturation of autophagosomes in higher eukaryotes: a social network. / Y. G. Zhao, H. Zhang // *Curr. Opin. Cell Biol.* – 2018. – Vol. 53. – P. 29–36.
188. Zhi, X. Autophagy in cancer. / X. Zhi, Q. Zhong // *F1000Prime Rep.* – 2015. – Vol. 7. – P. 18.
189. Zhong, Z. Autophagy, inflammation, and immunity: a troika governing cancer and its treatment. / Z. Zhong, E. Sanchez-Lopez, M. Karin // *Cell* – 2016. – № 166. – Vol. 2. – P. 288–298.
190. Zinke, J.  $\beta$ -Catenin-Gli1 interaction regulates proliferation and tumor growth in medulloblastoma. / J. Zinke, F. T. Schneider, P. N. Harter, S. Thom, N. Ziegler, R. Toftgård et al. // *Mol. Cancer* – 2015. – Vol. 14. – P. 17.