

УДК 577.2

# Сочетание доксорубина в низкой дозе и SLURP-1 усиливает их противоопухолевый эффект и ассоциируется со снижением экспрессии EGFR

О. В. Шлепова<sup>1</sup>, М. Л. Бычков<sup>1</sup>, В. О. Шипунова<sup>1,2</sup>, Е. И. Шрамова<sup>1</sup>, М. А. Шулепко<sup>3</sup>, Т. Я. Горностаева<sup>1,2</sup>, Е. А. Киселева<sup>1,2</sup>, И. Д. Кукушкин<sup>1,2</sup>, В. А. Казаков<sup>4</sup>, Е. А. Туховская<sup>4</sup>, И. А. Дьяченко<sup>4</sup>, А. Н. Мурашев<sup>4</sup>, З. О. Шенкарев<sup>1,2</sup>, С. М. Деев<sup>1,5,6</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,7</sup>, Е. Н. Люкманова<sup>1,2,3,7\*</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

<sup>2</sup>Московский центр перспективных исследований, Москва, 123592 Россия

<sup>3</sup>Биологический факультет, Шэньчжэньский МГУ-ППИ Университет, провинция Гуандун, Шэньчжэнь, 518172 Китай

<sup>4</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пущино, 142290 Россия

<sup>5</sup>Институт фундаментальной медицины и биологии, Казанский федеральный университет, Казань, 420008 Россия

<sup>6</sup>Национальный исследовательский Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева, Саранск, 430005 Россия

<sup>7</sup>Междисциплинарная научно-образовательная школа «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология», биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

\*E-mail: lyukmanova\_ekaterina@smbu.edu.cn

Поступила в редакцию 30.09.2024

Принята к печати 15.11.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27526

**РЕФЕРАТ** Злокачественные опухоли кожи, такие как плоскоклеточная карцинома (SCC), характеризуются высокой скоростью роста, метастазированием и часто встречающейся химиорезистентностью. Курение считается одним из факторов риска развития SCC, а никотиновый ацетилхолиновый рецептор типа  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ -nAChR) – перспективной мишенью для терапии SCC. Секретируемый белок SLURP-1 человека является ауто/паракринным регулятором эпителиального гомеостаза и селективным отрицательным аллостерическим модулятором  $\alpha 7$ -nAChR. Недавно мы продемонстрировали высокую эффективность терапии на основе рекомбинантного SLURP-1 для контроля роста и метастазирования клеток SCC *in vivo*. Противоопухолевый эффект SLURP-1 был опосредован взаимодействием как с  $\alpha 7$ -nAChR, так и с рецептором эпидермального фактора роста (EGFR). Цитотоксический антибиотик доксорубин используется для лечения SCC, однако его применение ограничено из-за высокой токсичности. Нами изучено использование повышенной дозы SLURP-1 и комбинации SLURP-1 с низкой дозой доксорубина для лечения SCC у мышей, которым ксенотрансплантировали клетки эпидермоидной карциномы A431. Увеличение дозы SLURP-1 не привело к существенному повышению эффективности терапии. Однако комбинация с доксорубином усиливала противоопухолевую активность SLURP-1 и значительно подавляла метастазирование. Эффект от комбинированной терапии сопровождался снижением экспрессии EGFR в опухолях. Показано прямое ингибирование активации EGFR белком SLURP-1. Токсичность комбинированной терапии не выявлена. Полученные нами данные свидетельствуют о перспективности применения SLURP-1 в комбинации с химиотерапией в низких дозах при SCC и требуют дальнейшего изучения.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** рак, химиотерапия, SLURP-1, Lu6/uPAR,  $\alpha 7$ -nAChR, EGFR.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АКТ – протеинкиназа B; EGF – эпидермальный фактор роста; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; PI3K – фосфоинозитид-3-киназа; cSCC – плоскоклеточная карцинома кожи; STAT3 – сигнальный белок и активатор транскрипции 3.

## ВВЕДЕНИЕ

Частота возникновения рака кожи, в том числе плоскоклеточного (cSCC), и смертность, связанная с ним, растут во всем мире [1]. Основные проблемы в лечении cSCC – невозможность полного хирургического удаления опухоли, метастазирование и развитие резистентности к химиотерапевтическим препаратам [1–4]. Курение является одним из факторов риска развития cSCC [5], а никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR), активируемые при употреблении табака, считаются перспективными терапевтическими мишенями при cSCC. Известно, что nAChR типа  $\alpha 7$  ( $\alpha 7$ -nAChR) является проонкогенным рецептором [6–9], экспрессия которого в опухолевых клетках повышена по сравнению с нормальными [10] и коррелирует с плохим прогнозом выживания пациентов [11, 12]. Активация  $\alpha 7$ -nAChR способствует пролиферации, ангиогенезу, миграции и инвазии клеток карциномы и глиомы [8, 12–19]. В раковых клетках  $\alpha 7$ -nAChR может образовывать гетеромерные комплексы с другим проонкогенным рецептором – рецептором эпидермального фактора роста (EGFR) [20–23]. Более того, активация  $\alpha 7$ -nAChR никотином способствует химиорезистентности и метастазированию SCC через трансактивацию EGFR [24].

Некоторые эндогенные белки семейства Lu6/uPAR [25] модулируют активность  $\alpha 7$ -nAChR и могут рассматриваться как прототипы селективных и нетоксичных противоопухолевых препаратов. Одним из таких модуляторов является секретиремый белок SLURP-1 эпителия человека [26], который регулирует гомеостаз клеток эпителия [27]. Экспрессия SLURP-1 снижена в первичной и метастатической меланоме по сравнению с нормальными клетками [28, 29], а повышенный уровень SLURP-1 в плазме крови коррелирует с лучшим прогнозом выживаемости при раке поджелудочной железы [30]. Рекombinantный аналог SLURP-1 ингибирует рост раковых клеток *in vitro* и *in vivo* [21, 22, 30–35], а также отменяет индуцированную никотином пролиферацию клеток аденокарциномы легкого [36]. Противоопухолевый эффект SLURP-1 в модели SCC *in vivo* опосредован взаимодействием как с  $\alpha 7$ -nAChR, так и с EGFR [22].

Ранее предложили использовать в терапии SCC доксорубин (ДНК-интеркалирующий антрацикли-

новый антибиотик, опосредованно ингибирующий сигнализацию EGFR [37, 38]), который демонстрирует комплексный антипролиферативный эффект [39, 40]. Однако его применение сильно ограничено высокой токсичностью [41]. Снижение дозы доксорубина может стать хорошей стратегией, позволяющей избежать побочных эффектов.

В данной работе мы исследовали возможность использования комбинации SLURP-1 и доксорубина в низких дозах для контроля роста и метастазирования клеток SCC *in vivo*. Помимо высокой эффективности предложенной терапии, наблюдали снижение экспрессии EGFR в опухолях мышей, получавших SLURP-1 в комбинации с доксорубином. Полученные данные свидетельствуют о высоком противоопухолевом потенциале предложенного подхода.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материалы и животные

Рекombinantный SLURP-1 получен в клетках *E. coli* как описано ранее [31, 42].

В работе использовали доксорубин производства компании TEVA (Израиль).

Животных содержали в стандартных условиях питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, аккредитованного на международном уровне AAALACi. Все исследования проводили в соответствии с этическими рекомендациями Rus-LASA, одобренными комиссией по контролю за содержанием и использованием животных ИБХ РАН (протокол № 318/2021).

### Культивирование клеток и анализ миграции в модели «заживление раны» *in vitro*

Клетки эпидермоидной карциномы человека A431 (ATCC, США) выращивали (37°C, 5% CO<sub>2</sub>) в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Thermo Fisher Scientific, США), сокращенно «полная среда». Клетки пересеивали 2 раза в неделю.

Миграцию клеток оценивали с помощью «скретч»-анализа как описано ранее [21, 43]. На полученных с помощью CloneSelect Imager (Molecular Devices, США) изображениях количественно оценивали площадь царапины, занятую клетками, с помощью

ImageJ (NIH, США). Данные нормировали на среднюю площадь, занятую клетками, в контрольных лунках. Полученные данные аппроксимировали с помощью уравнения Хилла.

### Модель ксенотрансплантации опухоли, стратегия лечения и прижизненная биолюминесцентная визуализация

Для получения люминесцирующих клеток A431/NanoLuc родительские клетки A431 трансфицировали плазмидой NanoLuc, как описано в [44], с использованием реагента для трансфекции FuGENE HD (Promega, США).

Самцам мышей BALB/c Nu/Nu (22–25 г) подкожно вводили  $10^7$  клеток A431/NanoLuc, разведенных в 100 мкл 30% матригеля (Corning, США) в полной среде. На 3-й день после инъекции клеток мышей делили на пять групп (исходно  $n = 8-10$ , табл. S1) и вводили внутривенно ежедневно в течение 10 последующих дней по 100 мкл 0.9% раствора NaCl (физ. раствор), содержащего: 1) без добавок – контроль, 2) 100 мкг SLURP-1 (5 мг/кг), 3) 10 мкг SLURP-1 (0.5 мг/кг), 4) 50 мкг доксорубина (2.5 мг/кг), 5) 5 мкг доксорубина (0.25 мг/кг) с 10 мкг SLURP-1 (0.5 мг/кг) (рис. 1A). Некоторые животные погибли во время эксперимента (табл. S1 и рис. S1) и были исключены из анализа.

Объем первичной опухоли измеряли штангенциркулем и рассчитывали с помощью формулы:

$$V = 0.52 \times A \times B^2$$

( $A$  – наибольший диаметр,  $B$  – наименьший диаметр).

На 3-й, 13-й и 23-й дни после подкожной инъекции клеток опухоль визуализировали с помощью компьютерной томографии IVIS Spectrum (Perkin Elmer, США) как описано ранее [22]. Изображения биолюминесценции получали с помощью камеры IS1803N7357 iKon (Andor, Великобритания), интенсивность биолюминесценции представляли в фотонах в секунду на см<sup>2</sup> встерадиан (ф/с/см<sup>2</sup>/ср) и анализировали с помощью программы Living Image 4.5.5.19626 (Xenogen, США).

На 24-й день после инъекции клеток мышей умерщвляли путем дислокации шейных позвонков, опухоли отделяли и замораживали при  $-150^{\circ}\text{C}$  для дальнейшего анализа. Легкие, печень, почки, селезенку и сердце извлекали и помещали в 4% раствор параформальдегида (Applichem, Испания).

### Вестерн-блоттинг

Для анализа влияния SLURP-1 и доксорубина на экспрессию EGFR образец опухоли (0.05 мг)

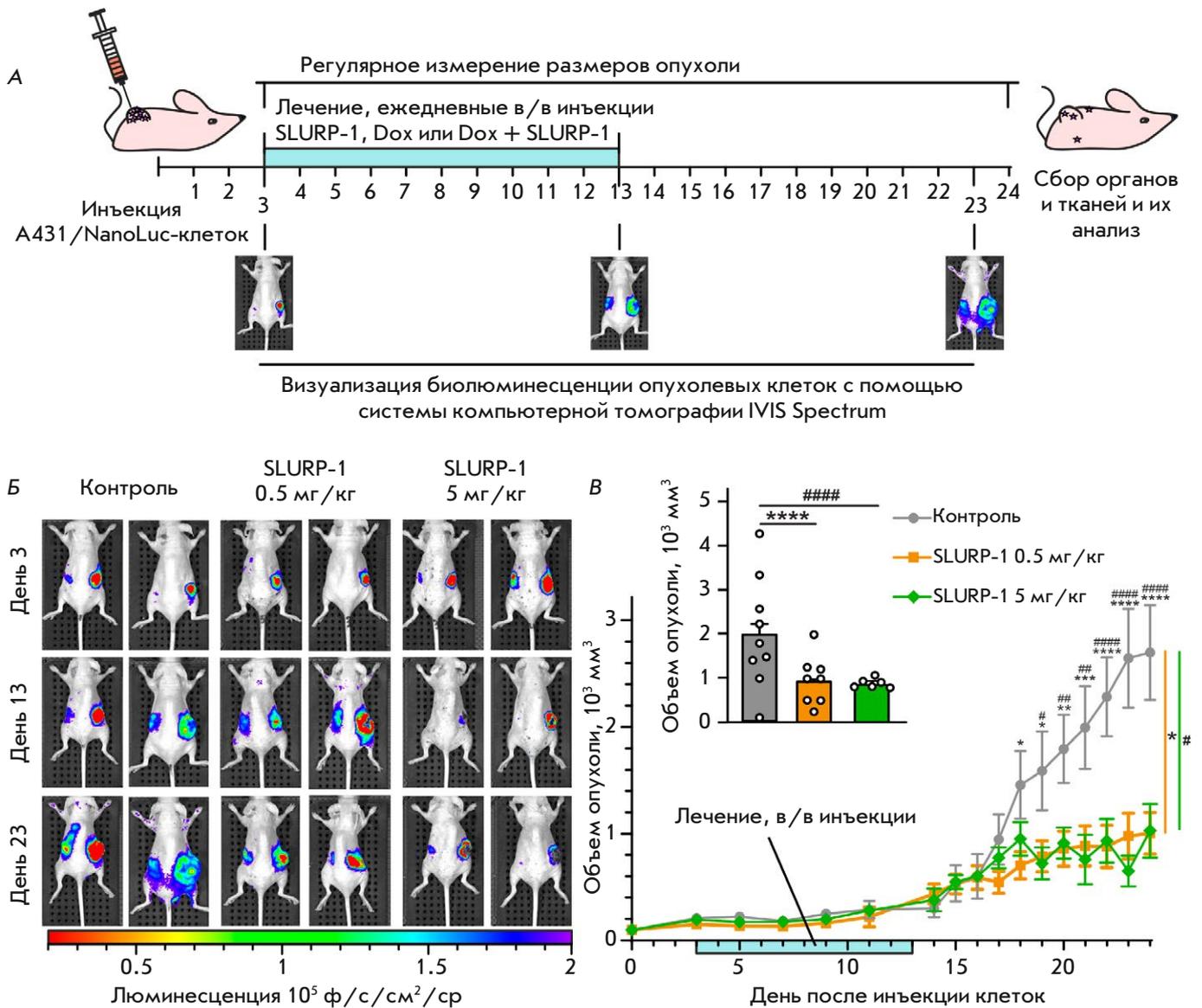
гомогенизировали, солюбилизировали в 2% Triton X-100 и разводили в невосстанавливающем буфере для ПЛАГ. Вестерн-блоттинг проводили с использованием первичных антител (sc-120, Santa Cruz, США, 1:1000) и вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP) (715-035-150, Jackson ImmunoResearch, США, 1:5000). Сигнал детектировали с помощью субстрата ECL (Bio-Rad, США) с использованием гель-документирующей системы ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, США). Данные анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ 1.53t (NIH, США).

### Клеточный иммуноферментный анализ

Изучали влияние SLURP-1 на активацию EGFR. Клетки A431 высевали в 96-луночные планшеты ( $1 \times 10^4$  клеток/лунку), через 24 ч среду в лунках заменяли на бессывороточную среду, а еще через 24 ч – на среду, содержащую SLURP-1 в различных концентрациях. Через 30 мин добавляли 25 нМ эпидермального фактора роста (EGF) к клеткам и инкубировали еще 3 ч. Далее клетки фиксировали 4% раствором параформальдегида в фосфатно-солевом буфере (PBS), блокировали 2% бычьим сывороточным альбумином (BSA) и 0.1% Triton X-100 в PBS, инкубировали с первичными антителами против фосфо-EGFR (Y1173) (ABIN343717, antibodies-online, 1:1000) и вторичными антителами (715-035-150, Jackson ImmunoResearch, 1:5000), добавляли по 50 мкл раствора тетраметилбензидина (ТМБ), останавливали реакцию 2 М раствором H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и определяли абсорбцию в лунках при 450 нм с помощью планшетного ридера AMR-100 (Allsheng, Китай).

### Гистохимия

Для гистохимического анализа образцы легких, печени, почек, селезенки и сердца от трех случайно выбранных мышей из каждой группы, получавших физиологический раствор (контроль), SLURP-1 (5 мг/кг), доксорубин (2.5 мг/кг) или SLURP-1 (0.5 мг/кг) + доксорубин (0.25 мг/кг), фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, промывали в проточной водопроводной воде, обезжировали в этаноле восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4–5 мкм, окрашенные гематоксилином и эозином, изучали с помощью световой микроскопии на микроскопе AxioScope.A1 (Carl Zeiss, Германия). Микрофотографии гистологических препаратов получали с помощью камеры высокого разрешения AxioCam 305 color (Carl Zeiss) и программного обеспечения ZEN 2.6 lite (Carl Zeiss) при увеличении  $\times 200$ .

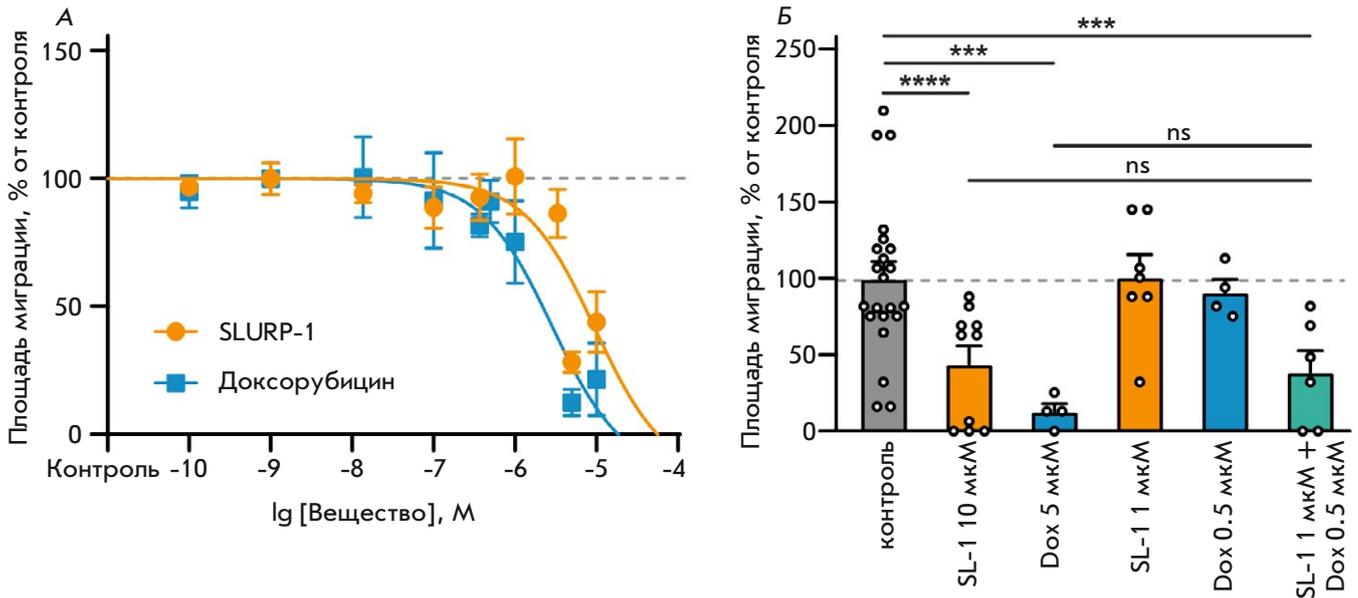


**Рис. 1.** Влияние различных доз SLURP-1 на рост опухоли в ксенографтной мышинной модели.

**А** – схема введения препаратов и измерения роста опухоли.

**Б** – репрезентативные изображения билюминесценции опухоли (клетки A431/NanoLuc) до аппликации SLURP-1 (3-й день после инъекции клеток, 1-й день терапии), после аппликации (13-й день после инъекции клеток, следующий день после окончания 10-дневной терапии) и перед эвтаназией (23-й день после инъекции клеток). Все изображения мышей см. на рис. S1.

**В** – измерение объема первичной опухоли с помощью штангенциркуля. Данные представлены в мм<sup>3</sup> ± SEM. \*( $p < 0.05$ ), \*\*( $p < 0.01$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ) и \*\*\*\*( $p < 0.0001$ ) указывают на значимые различия между контрольной и 0.5 мг/кг SLURP-1 группами, а #( $p < 0.05$ ), ##( $p < 0.01$ ) и ####( $p < 0.0001$ ) указывают на значимые различия между контрольной и 5 мг/кг SLURP-1 группами по данным двухфакторного теста ANOVA с последующим апостериорным тестом Даннета. Дни аппликации отмечены светло-голубой полосой; (B, вставка). Средний объем первичной опухоли, измеренный штангенциркулем, у каждой мыши за последние 5 дней (20–24 дни после приживления опухоли). Данные представлены в мм<sup>3</sup> ± SEM. \*\*\*\*( $p < 0.0001$ ) и ####( $p < 0.0001$ ) указывают на значимые различия между группами в соответствии с однофакторным тестом ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки



**Рис. 2.** Влияние различных доз SLURP-1 и доксорубицина на миграцию клеток A431. А – влияние SLURP-1 и доксорубицина на миграцию клеток. Данные представлены как среднее значение поверхности царапины, занятой мигрирующими клетками (% от контроля),  $\pm$  SEM,  $n = 3-22$ . Полученные данные были аппроксимированы с помощью уравнения Хилла. Контрольный уровень (100%) показан пунктирной линией. Б – влияние SLURP-1 (SL-1) и доксорубицина (Dox), а также их комбинации на миграцию клеток. Данные представлены как среднее значение поверхности царапины, занятой мигрирующими клетками (% от контроля),  $\pm$  SEM,  $n = 3-22$ ; контрольный уровень (100%) показан пунктирной линией. \*\*\*( $p < 0.001$ ) и \*\*\*\*( $p < 0.0001$ ) указывают на значимое отличие от контрольной группы (100%, необработанные клетки) по результатам однофакторного теста ANOVA с последующим апостериорным тестом Даннета, «n.s.» – отсутствие значимых различий между группами

**Статистический анализ**

Данные представлены как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего (SEM). Количество образцов ( $n$ ) указано в подписях к рисункам. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9.5.0 (Graphpad software, США). Данные анализировали на предмет соответствия нормальному распределению с помощью теста Шапиро–Уилка. Для непараметрических данных вместо однофакторного теста ANOVA использовали тест Краскела–Уоллиса. Анализ проводили с использованием непарного  $t$ -теста, теста Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна, однофакторного теста ANOVA с апостериорным тестом Даннета или Тьюки, однофакторного теста Welch ANOVA с апостериорным тестом Даннета и двухфакторного теста ANOVA с апостериорным тестом Даннета как указано в подписях к рисункам. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ**

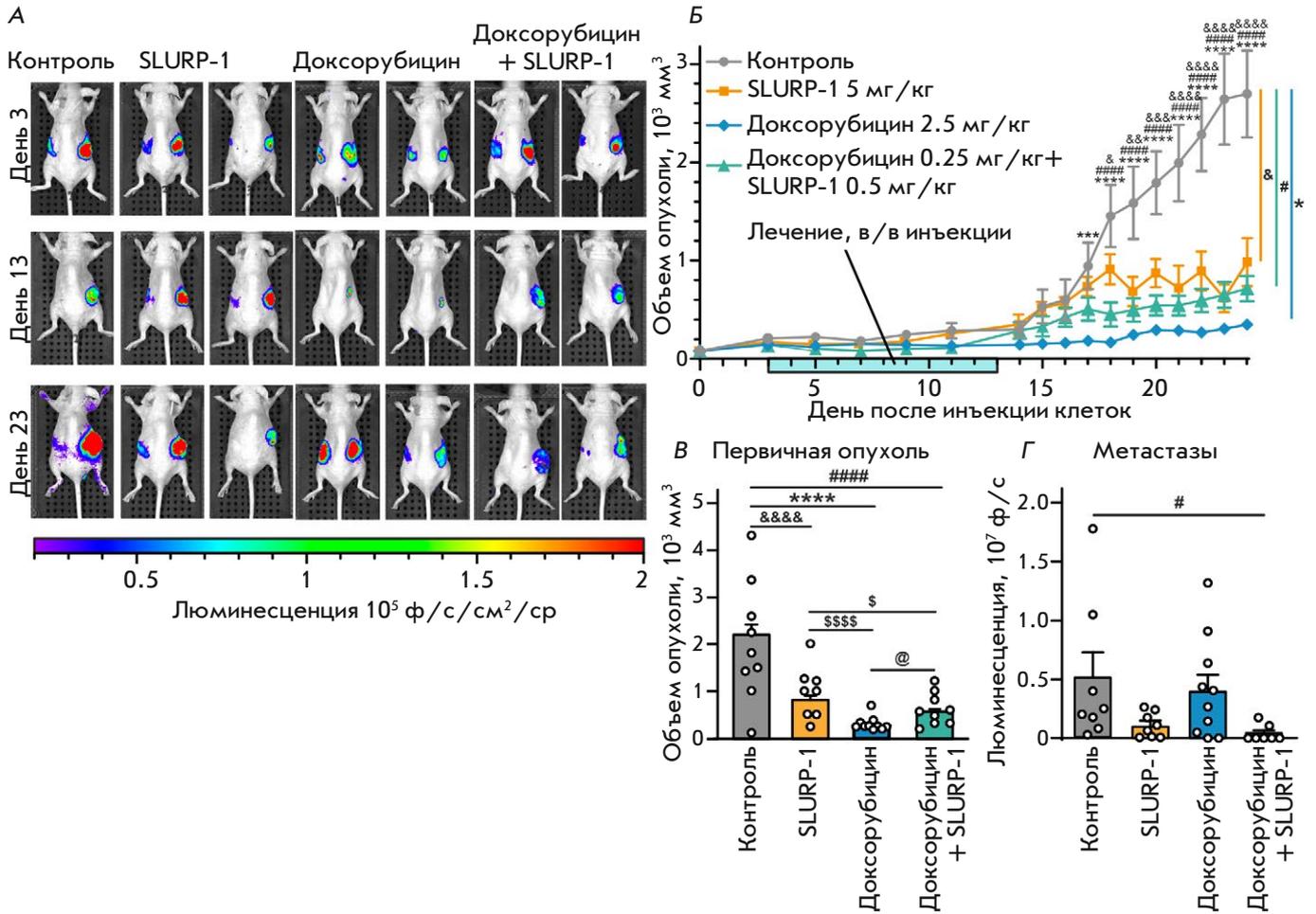
**Увеличение дозы SLURP-1 не повышает его терапевтическую эффективность *in vivo***

Мы сравнили действие двух доз белка SLURP-1 *in vivo*: 0.5 мг/кг, использованную ранее [22], и в 10

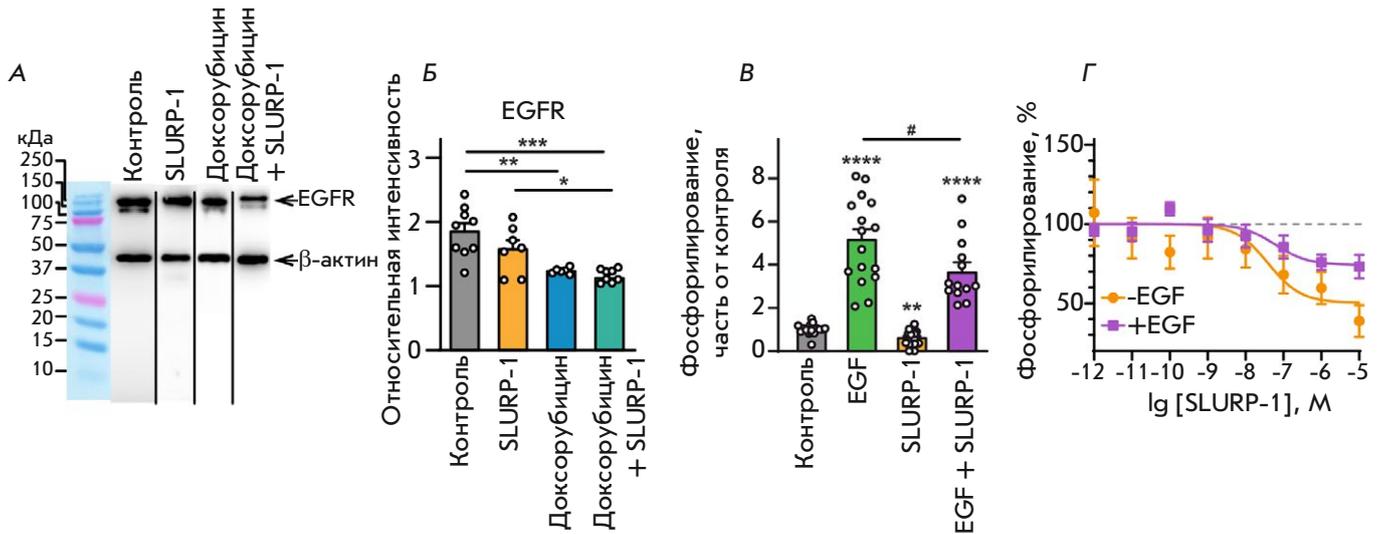
раз большую – 5 мг/кг, на мышей с ксенотрансплантированной эпидермоидной карциномой человека [22]. Удивительно, но эффект более высокой дозы SLURP-1 не отличался от эффекта более низкой дозы (рис. 1B,B). Аппликация SLURP-1 в обеих дозах (0.5 и 5 мг/кг) подавляла рост первичной опухоли (рис. 1A–B, S1) с одинаковой эффективностью и приводила к трехкратному уменьшению объема первичной опухоли по сравнению с контролем (рис. 1B, вставка). Таким образом, показан эффект насыщения SLURP-1, который не может быть усилен увеличением дозы.

**Низкие дозы SLURP-1 и доксорубицина демонстрируют аддитивный эффект на миграцию клеток A431 *in vitro***

Ранее, используя мультиклеточные сфероиды, полученные из клеток A549 и A431, мы наблюдали аддитивный антипролиферативный эффект доксорубицина (широко распространенного химиотерапевтического препарата [45]) и SLURP-1 *in vitro* [46]. В данной работе мы наблюдали сильное дозозависимое снижение миграции клеток A431 после 24 ч инкубации с SLURP-1 или доксорубицином (рис. 2A,B, табл. S2). Следует отметить, что 10 мкМ



**Рис. 3.** Влияние SLURP-1, доксорубицина и их комбинации на рост и метастазирование опухоли в модели ксено-трансплантации мышам клеток A431/NanoLuc. **А** — репрезентативные изображения биолуминесценции опухоли (клетки A431/NanoLuc) до аппликации SLURP-1 и доксорубицина (3-й день после инъекции клеток, 1-й день терапии), после аппликации (13-й день после инъекции клеток, следующий день после окончания 10-дневной терапии) и перед эвтаназией (23-й день после инъекции клеток). Все изображения мышей см. на рис. S1. **Б** — измерение объема первичной опухоли с помощью штангенциркуля. Данные представлены в мм<sup>3</sup> ± SEM. \*\*\* ( $p < 0.001$ ) и \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) указывают на значимые различия между контрольной и 2.5 мг/кг доксорубицин группами, #### ( $p < 0.0001$ ) указывает на значимое различие между контрольной и 0.5 мг/кг SLURP-1 + 0.25 мг/кг доксорубицин группами, а & ( $p < 0.05$ ), && ( $p < 0.01$ ), &&& ( $p < 0.001$ ) и &&&& ( $p < 0.0001$ ) указывают на значимые различия между контрольной и 5 мг/кг SLURP-1 группами согласно двухфакторному тесту ANOVA с последующим апостериорным тестом Даннета. Дни аппликации веществ отмечены светло-голубой полосой. **В** — среднее значение объема первичной опухоли, измеренное штангенциркулем у каждой мыши за последние 5 дней (20–24 день после инъекции клеток). Данные представлены в мм<sup>3</sup> ± SEM. \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) указывает на значимое различие между контрольной и (2.5 мг/кг доксорубицин) группами, #### ( $p < 0.0001$ ) — значимое различие между контрольной и 0.5 мг/кг SLURP-1 + 0.25 мг/кг доксорубицин группами, &&&& ( $p < 0.001$ ) указывает на значимое различие между контрольной и 5 мг/кг SLURP-1 группами, \$ ( $p < 0.05$ ) указывает на значимое отличие от группы (5 мг/кг SLURP-1), а @ ( $p < 0.05$ ) — на значимое различие между группами 2.5 мг/кг доксорубицин и 0.5 мг/кг SLURP-1 + 0.25 мг/кг доксорубицин в соответствии с однофакторным тестом ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки. **Г** — общая люминесценция, измеренная в областях вне первичной опухоли. Данные представлены в виде фотонов в секунду (ф/с) ± SEM. # ( $p < 0.05$ ) указывает на значимое отличие от контрольной группы (физ. раствор) согласно тесту Краскела–Уоллиса с последующим апостериорным тестом Данна



**Рис. 4.** Влияние SLURP-1 на экспрессию и активацию EGFR (аутофосфорилирование по Y1173). **А** – репрезентативные мембраны, с вестернблот-анализом экспрессии EGFR в опухолях после аппликации физ. раствора (контроль), SLURP-1 (5 мг/кг), доксорубицина (2.5 мг/кг) или SLURP-1 (0.5 мг/кг) + доксорубицин (0.25 мг/кг). Целые мембраны показаны на рис. S2. Представленные образцы получены на разных мембранах параллельно. **Б** – уровень экспрессии EGFR, нормированный на уровень экспрессии β-актина. Данные представлены как относительная интенсивность ± SEM ( $n = 6-9$ ). \* ( $p < 0.05$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) и \*\*\* ( $p < 0.001$ ) указывают на значимые различия между группами по данным однофакторного теста ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки. **В** – влияние 1 мкМ SLURP-1, 25 нМ EGF и их смеси на активацию EGFR в клетках A431. Данные представлены в кратном отношении к контролю (необработанные клетки) ± SEM ( $n = 13-17$ ). \*\* ( $p < 0.01$ ) и \*\*\*\* ( $p < 0.0001$ ) указывают на значительные отличия от контроля по данным однофакторного теста Welch ANOVA с апостериорным тестом Даннета. # ( $p < 0.05$ ) указывает на значительные различия между группами по результатам непарного *t*-теста. **Г** – влияние различных концентраций SLURP-1 на активацию EGFR в отсутствие и в присутствии EGF ( $n = 10-14$ ). Данные представлены в % от контроля ± SEM. Полученные данные аппроксимированы с помощью уравнения Хилла

SLURP-1 эквивалентны дозе 5 мг/кг, использованной *in vivo*, а 5 мкМ доксорубицина – 2.5 мг/кг (что соответствует кумулятивной дозе 25 мг/кг (75 мг/м<sup>2</sup>), рекомендуемой для одного цикла терапии солидных опухолей (60 мг/м<sup>2</sup>) [47]). Комбинация сниженных в 10 раз концентраций SLURP-1 и доксорубицина (1 и 0.5 мкМ соответственно) приводила к достоверному ингибированию миграции клеток, сравнимому с эффектами 10 мкМ SLURP-1 или 5 мкМ доксорубицина по отдельности (рис. 1Б). Таким образом, комбинация низких доз SLURP-1 и доксорубицина оказывает аддитивный эффект на миграцию клеток A431.

**Комбинация с доксорубицином в низкой дозе повышает противоопухолевую активность SLURP-1 *in vivo***

Далее мы показали, что комбинация 0.5 мг/кг SLURP-1 (1 мкМ *in vitro*) с 0.25 мг/кг доксорубицина (0.5 мкМ *in vitro*) снижает рост первичной опухоли *in vivo* более эффективно, чем только высокая доза SLURP-1 (рис. 3А,Б,В). Кроме того, применение SLURP-1 совместно с низкой дозой доксоруби-

цина значительно подавляло и метастазирование, в то время как SLURP-1 (5 мг/кг) и доксорубицин (2.5 мг/кг) в высоких дозах не влияли значимо на метастазирование (рис. 3А,Б,Г и рис. S1). Таким образом, SLURP-1 является перспективным противоопухолевым препаратом для комбинированной терапии, при которой доза токсичного химиотерапевтического препарата может быть снижена.

**Комбинация SLURP-1 с доксорубицином подавляет экспрессию EGFR в опухолях *in vivo***

EGFR, наиболее известный проонкогенный рецептор [23], сверхэкспрессируется в клетках эпидермоидной карциномы A431 [48]. Нами показано, что терапия только доксорубицином (2.5 мг/кг) или SLURP-1 совместно с доксорубицином (0.25 мг/кг доксорубицина + 0.5 мг/кг SLURP-1) приводит к значительному снижению экспрессии EGFR в ксенотрансплантационных опухолях A431 (рис. 4А,Б).

**SLURP-1 влияет на активацию EGFR**

SLURP-1 уменьшал аутофосфорилирование EGFR по сайту Y1173 в клетках A431. Кроме того,

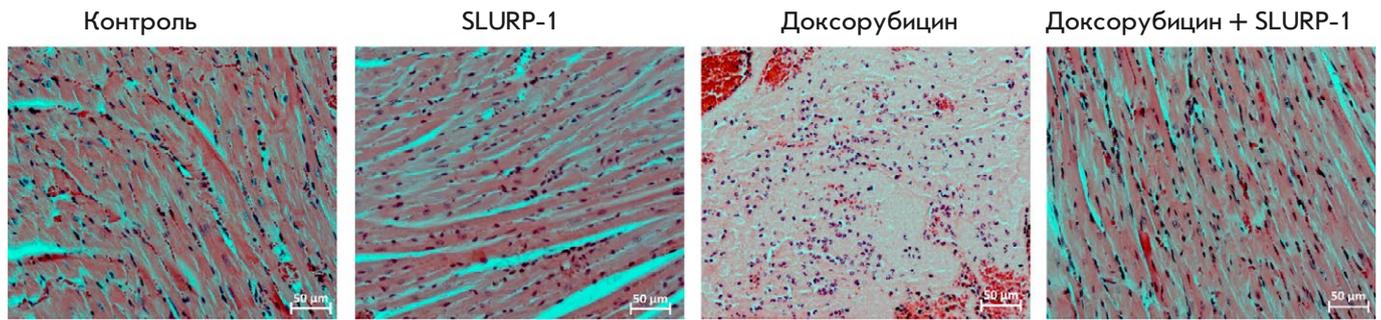


Рис. 5. Кардиотоксичность аппликации SLURP-1 и доксорубина. Фрагменты сердца мышей, получавших физ. раствор (контроль), SLURP-1 (5 мг/кг), доксорубин (2.5 мг/кг) или SLURP-1 (0.5 мг/кг) + доксорубин (0.25 мг/кг). В сердце мыши из группы доксорубина выявлен обширный очаг некроза кардиомиоцитов с нейтрофильной инфильтрацией. Окраска гематоксилином и эозином, увеличение  $\times 200$

в присутствии SLURP-1 наблюдалось снижение EGF-индуцированного фосфорилирования EGFR (рис. 4B,Г, табл. S3). Эти эффекты демонстрировали концентрационную зависимость со схожими  $EC_{50}$  ( $\sim 40 \pm 11$  и  $60 \pm 17$  нМ соответственно) и с отличающимися максимальными эффектами ( $50 \pm 9$  и  $74 \pm 5\%$  соответственно). Схожая эффективность ингибирования активации EGFR при измененной амплитуде эффекта (рис. 4Г, табл. S3) указывает на разные сайты связывания EGF и SLURP-1 на поверхности молекулы EGFR.

#### Комбинация SLURP-1 и доксорубина не проявляет токсичности *in vivo*

Для изучения потенциальной токсичности исследуемых препаратов проанализировали патологические изменения в органах мышей (по три мыши из каждой группы). В легких, печени, селезенке, почках и печени животных всех групп не обнаружили каких-либо значимых отклонений, которые могли бы свидетельствовать о токсичности (рис. S3). В то же время в образцах сердца двух животных, получавших высокую дозу доксорубина (2.5 мг/кг), нашли очаги некроза кардиомиоцитов (рис. 5). Таким образом, можно сделать вывод, что комбинированная терапия низкими дозами SLURP-1 и доксорубина более безопасна, чем только высокие дозы доксорубина.

#### ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на серьезные побочные эффекты, химиотерапия по-прежнему остается основным методом терапии опухолей [49]. Один из самых широко используемых химиотерапевтических препаратов, доксорубин, проявляет высокую противоопухолевую эффективность, но при этом обладает серьезной токсичностью [40, 50], возрастающей с увеличением кумулятивной дозы и возраста пациента,

что ограничивает его применение [41, 50–54]. В ряде исследований предложено комбинировать химиотерапию с другими методами для снижения дозы химиопрепарата и уменьшения его побочных эффектов [55, 56]. Ингибирование  $\alpha 7$ -nAChR может снизить прогрессию опухоли, метастазирование, химиорезистентность и побочные эффекты химиотерапии [19, 25, 57–61]. Секретируемый белок человека SLURP-1 ингибирует  $\alpha 7$ -nAChR [26] и проявляет противоопухолевую активность *in vivo* [22]. Нами предложены два подхода к повышению эффективности терапии на основе SLURP-1: (1) увеличение дозы SLURP-1 в качестве монотерапии и (2) применение SLURP-1 совместно с доксорубином.

В соответствии с данными, полученными нами ранее, SLURP-1 подавлял рост опухоли *in vivo*, при этом увеличение дозы SLURP-1 в 10 раз не повышало его эффективность (рис. 1). Используя второй подход, мы выявили аддитивный эффект SLURP-1 и доксорубина в низких концентрациях на миграцию клеток *in vitro* (рис. 2B) и противоопухолевый и антиметастатический эффекты *in vivo* (рис. 3B,Г). Проведенные ранее тесты на иммуногенность и токсичность показали высокую безопасность внутривенного введения SLURP-1 [22]. При этом отмечена высокая кардиотоксичность доксорубина в обычно используемых в клинике концентрациях у мышей (рис. 5) [47]. В то же время доксорубин в сниженной в 10 раз дозе в комбинации с SLURP-1 не вызывал развитие кардиотоксических эффектов (рис. 5). Таким образом, применение доксорубина в низких дозах в комбинации с SLURP-1 или другими ингибиторами  $\alpha 7$ -nAChR можно рассматривать как хороший выбор для противоопухолевой терапии.

Точные молекулярные механизмы, лежащие в основе совместного действия SLURP-1 и доксорубина на рост опухоли A431, еще не установ-

лены. Одним из объяснений может быть совместная инактивация EGFR, сверхэкспрессированного в клетках A431 [62]. Действительно, и сам доксорубин, и в комбинации с SLURP-1 подавляет экспрессию этого рецептора в опухолях (рис. 4А,Б). EGFR опосредует рост, миграцию и выживание опухолевых клеток [63]. SLURP-1 отменяет EGF-индуцированную активацию рецептора (рис. 4В,Г), а доксорубин также влияет на сигнальные пути, запускаемые EGFR [38]. С другой стороны, общий эффект SLURP-1 и доксорубина может быть результатом ингибирования взаимодополняющих внутриклеточных сигнальных каскадов. Известно, что сверхэкспрессия Src [64], активация путей STAT3 [65] и PI3K/AKT [66] приводят к стимуляции активации и экспрессии EGFR в опухолевых клетках. В свою очередь, инкубация с SLURP-1 приводит к ингибированию этих сигнальных путей в клетках A431 [22]. С другой стороны, противоопухолевый эффект доксорубина опосредован реорганизацией липидных рафтов через EGFR/Src-сигнализацию [38]. Таким образом, усиленный эффект комбинации SLURP-1 и доксорубина может

быть результатом синергического действия каждого соединения на сигнальные пути, регулирующие экспрессию и активацию EGFR.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Комбинация с доксорубином в низкой дозе усиливает противоопухолевую активность SLURP-1 и значительно подавляет метастазирование опухоли. Усиление эффекта может быть связано с понижением уровня экспрессии и активации EGFR в опухолях под действием обоих препаратов. Таким образом, комбинированная терапия опухолей, в частности сССС, с помощью SLURP-1 и низких доз химиотерапевтических агентов выглядит перспективной и требует дальнейшего изучения. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
Министерства науки и высшего образования  
Российской Федерации (№ 075-15-2024-536).*

*Приложения доступны на сайте  
<https://doi.org/10.32607/actanaturae27526>.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Khan N.H., Mir M., Qian L., Baloch M., Ali Khan M.F., Rehman A.-U., Ngowi E.E., Wu D.-D., Ji X.-Y. // *J. Adv. Res.* 2022. V. 36. P. 223–247.
- Burns C., Kubicki S., Nguyen Q.-B., Aboul-Fettouh N., Wilmas K.M., Chen O.M., Doan H.Q., Silapunt S., Migden M.R. // *Cancers.* 2022. V. 14. № 15. P. 3653.
- Winge M.C.G., Kellman L.N., Guo K., Tang J.Y., Swetter S.M., Aasi S.Z., Sarin K.Y., Chang A.L.S., Khavari P.A. // *Nat. Rev. Cancer.* 2023. V. 23. № 7. P. 430–449.
- Sharma A., Sharma U., Jagannathan N.R., Ray R., Rajeswari M.R. // *Cancer Invest.* 2019. V. 37. № 8. P. 339–354.
- Arafa A., Mostafa A., Navarini A.A., Dong J.-Y. // *Cancer Causes Control CCC.* 2020. V. 31. № 8. P. 787–794.
- Grando S.A. // *Nat. Rev. Cancer.* 2014. V. 14. № 6. P. 419–429.
- Schaal C., Chellappan S.P. // *Mol. Cancer Res.* 2014. V. 12. № 1. P. 14–23.
- Wang S., Hu Y. // *Oncol. Lett.* 2018. V. 16. № 2. P. 1375–1382.
- Hollenhorst M.I., Krasteva-Christ G. // *Mol. Basel Switz.* 2021. V. 26. № 20. P. 6097.
- Li L., Chen H., Chang H. // *J. Clin. Med.* 2019. V. 8. № 9. P. 1391.
- Bordas A., Cedillo J.L., Arnalich F., Esteban-Rodriguez I., Guerra-Pastrián L., de Castro J., Martín-Sánchez C., Atienza G., Fernández-Capitan C., Rios J.J., et al. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 40. P. 67878–67890.
- Cheng W.-L., Chen K.-Y., Lee K.-Y., Feng P.-H., Wu S.-M. // *J. Cancer.* 2020. V. 11. № 5. P. 1125–1140.
- Dasgupta P., Rizwani W., Pillai S., Kinkade R., Kovacs M., Rastogi S., Banerjee S., Carless M., Kim E., Coppola D., et al. // *Int. J. Cancer.* 2009. V. 124. № 1. P. 36–45.
- Li C.-L., Lin Y.-K., Chen H.-A., Huang C.-Y., Huang M.-T., Chang Y.-J. // *J. Clin. Med.* 2019. V. 8. № 9. P. 1391.
- Tu C.-C., Huang C.-Y., Cheng W.-L., Hung C.-S., Uyanga B., Wei P.-L., Chang Y.-J. // *Tumor Biol.* 2016. V. 37. № 4. P. 4421–4428.
- Davis R., Rizwani W., Banerjee S., Kovacs M., Haura E., Coppola D., Chellappan S. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 10. P. e7524.
- Pucci S., Fasoli F., Moretti M., Benfante R., Di Lascio S., Viani P., Daga A., Gordon T.J., McIntosh M., Zoli M., et al. // *Pharmacol. Res.* 2021. V. 163. P. 105336.
- Schaal C., Padmanabhan J., Chellappan S. // *Cancers.* 2015. V. 7. № 3. P. 1447–1471.
- Afrashteh Nour M., Hajiasgharzadeh K., Kheradmand F., Asadzadeh Z., Bolandi N., Baradaran B. // *Life Sci.* 2021. V. 278. P. 119557.
- Chernyavsky A.I., Shchepotin I.B., Grando S.A. // *Int. Immunopharmacol.* 2015. V. 29. № 1. P. 36–44.
- Bychkov M.L., Shulepko M.A., Shlepova O.V., Kulbatskii D.S., Chulina I.A., Paramonov A.S., Baidakova L.K., Azev V.N., Koshelev S.G., Kirpichnikov M.P., et al. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 739391.
- Shlepova O.V., Shulepko M.A., Shipunova V.O., Bychkov M.L., Kukushkin I.D., Chulina I.A., Azev V.N., Shramova E.I., Kazakov V.A., Ismailova A.M., et al. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2023. V. 11. P. 1256716.
- Sigismund S., Avanzato D., Lanzetti L. // *Mol. Oncol.* 2018. V. 12. № 1. P. 3–20.
- Shimizu R., Ibaragi S., Eguchi T., Kuwajima D., Kodama S., Nishioka T., Okui T., Obata K., Takabatake K., Kawai H., et al. // *Int. J. Oncol.* 2019. V. 54. № 1. P. 283–294.
- Vasilyeva N.A., Loktyushov E.V., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Lyukmanova E.N. // *Biochem. (Moscow).* 2017. V. 82. № 13. P. 1702–1715.
- Lyukmanova E., Shulepko M., Kudryavtsev D., Bychkov M., Kulbatskii D.S., Kasheverov I., Astapova M., Feofanov A., Thomsen M., Mikkelsen J., et al. // *PLoS One.* 2016. V. 11.

- № 2. P. e0149733.
27. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // *Life Sci.* 2007. V. 80. № 24–25. P. 2243–2247.
28. Bergqvist C., Kadara H., Hamie L., Nemer G., Safi R., Karouni M., Marrouche N., Abbas O., Hasbani D.J., Kibbi A.G., et al. // *Int. J. Dermatol.* 2018. V. 57. № 2. P. 162–170.
29. Arousse A., Mokni S., H'mida Ben Brahim D., Bdioui A., Aounallah A., Gammoudi R., Saidi W., Boussofara L., Ghariani N., Denguezli M., et al. // *Int. J. Dermatol.* 2019. V. 58. № 8. P. 966–968.
30. Throm V.M., Männle D., Giese T., Bauer A.S., Gaida M.M., Kopitz J., Bruckner T., Plaschke K., Grekova S.P., Felix K., et al. // *Oncotarget.* 2018. V. 9. № 14. P. 11734–11751.
31. Lyukmanova E.N., Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shenkarev Z.O., Paramonov A.S., Chugunov A.O., Arseniev A.S., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Acta Naturae.* 2014. V. 6. № 4. P. 60–66.
32. Lyukmanova E., Bychkov M., Sharonov G., Efremenko A., Shulepko M., Kulbatskii D., Shenkarev Z., Feofanov A., Dolgikh D., Kirpichnikov M. // *Br. J. Pharmacol.* 2018. V. 175. № 11. P. 1973–1986.
33. Bychkov M.L., Shulepko M.A., Shlepova O.V., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2019. V. 489. № 1. P. 392–395.
34. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 493. № 1. P. 211–214.
35. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2023. V. 49. № 4. P. 403–410.
36. Shulepko M.A., Bychkov M.L., Shlepova O.V., Shenkarev Z.O., Kirpichnikov M.P., Lyukmanova E.N. // *Int. Immunopharmacol.* 2020. V. 82. P. 106303.
37. Tortora G., Gelardi T., Ciardiello F., Bianco R. // *Int. J. Biol. Markers.* 2007. V. 22. № 1 Suppl 4. P. S47–52.
38. Yun U.-J., Lee J.-H., Shim J., Yoon K., Goh S.-H., Yi E.H., Ye S.-K., Lee J.-S., Lee H., Park J., et al. // *Lab. Invest.* 2019. V. 99. № 8. P. 1157–1172.
39. Mendez B.M., Thornton J.F. // *Plast. Reconstr. Surg.* 2018. V. 142. № 3. P. 373e–387e.
40. van der Zanden S.Y., Qiao X., Neefjes J. // *FEBS J.* 2021. V. 288. № 21. P. 6095–6111.
41. Swain S.M., Whaley F.S., Ewer M.S. // *Cancer.* 2003. V. 97. № 11. P. 2869–2879.
42. Shulepko M., Lyukmanova E., Paramonov A., Lobas A., Shenkarev Z., Kasheverov I., Dolgikh D., Tsetlin V., Arseniev A., Kirpichnikov M. // *Biochem. (Moscow).* 2013. V. 78. № 2. P. 204–211.
43. Varankar S.S., Bapat S.A. // *Front. Oncol.* 2018. V. 8. P. 633.
44. Shipunova V.O., Komedchikova E.N., Kotelnikova P.A., Zelepukin I.V., Schulga A.A., Proshkina G.M., Shramova E.I., Kutscher H.L., Telegin G.B., Kabashin A.V., et al. // *ACS Nano.* 2020. V. 14. № 10. P. 12781–12795.
45. Sritharan S., Sivalingam N. // *Life Sci.* 2021. V. 278. P. 119527.
46. Bychkov M.L., Shulepko M.A., Shlepova O.V., Lyukmanova E.N., Kirpichnikov M.P. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2019. V. 489. № 1. P. 392–395.
47. Johnson-Arbor K., Dubey R. Doxorubicin // *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2023.*
48. Cuan X., Yang X., Zhu W., Zhao Y., Luo R., Huang Y., Wang X., Sheng J. // *BMC Pharmacol. Toxicol.* 2023. V. 24. № 1. P. 29.
49. Miller K.D., Nogueira L., Devasia T., Mariotto A.B., Yabroff K.R., Jemal A., Kramer J., Siegel R.L. // *CA. Cancer J. Clin.* 2022. V. 72. № 5. P. 409–436.
50. Kamińska K., Cudnoch-Jędrzejewska A. // *Neurotox. Res.* 2023. V. 41. № 5. P. 383–397.
51. Tian Z., Yang Y., Yang Y., Zhang F., Li P., Wang J., Yang J., Zhang P., Yao W., Wang X. // *BMC Cancer.* 2020. V. 20. № 1. P. 1139.
52. Upshaw J.N. // *Curr. Oncol. Rep.* 2020. V. 22. № 7. P. 72.
53. El-Agamy S.E., Abdel-Aziz A.K., Esmat A., Azab S.S. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2019. V. 84. № 1. P. 1–14.
54. Du J., Zhang A., Li J., Liu X., Wu S., Wang B., Wang Y., Jia H. // *Front. Oncol.* 2021. V. 11. P. 673340.
55. Qin S.-Y., Cheng Y.-J., Lei Q., Zhang A.-Q., Zhang X.-Z. // *Biomaterials.* 2018. V. 171. P. 178–197.
56. Bello L., Carrabba G., Giussani C., Lucini V., Cerutti F., Scaglione F., Landré J., Pluderi M., Tomei G., Villani R., et al. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. № 20. P. 7501–7506.
57. Yan Y., Su C., Hang M., Huang H., Zhao Y., Shao X., Bu X. // *Virology.* 2017. V. 14. № 1. P. 190.
58. Bu X., Zhang A., Chen Z., Zhang X., Zhang R., Yin C., Zhang J., Zhang Y., Yan Y. // *BMC Cancer.* 2019. V. 19. № 1. P. 976.
59. Brown K.C., Lau J.K., Dom A.M., Witte T.R., Luo H., Crabtree C.M., Shah Y.H., Shiflett B.S., Marcelo A.J., Proper N.A., et al. // *Angiogenesis.* 2012. V. 15. № 1. P. 99–114.
60. Grozio A., Paleari L., Catassi A., Servent D., Cilli M., Piccardi F., Paganuzzi M., Cesario A., Granone P., Mourier G., et al. // *Int. J. Cancer.* 2008. V. 122. № 8. P. 1911–1915.
61. Shulepko M.A., Kulbatskii D.S., Bychkov M.L., Lyukmanova E.N. // *Rus. J. Bioorg. Chem.* 2019. V. 45. № 2. P. 66–75.
62. Xu Y.H., Richert N., Ito S., Merlino G.T., Pastan I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. № 23. P. 7308–7312.
63. Uribe M.L., Marrocco I., Yarden Y. // *Cancers.* 2021. V. 13. № 11. P. 2748.
64. Bao J., Gur G., Yarden Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 5. P. 2438–2443.
65. Zhao C., Yang L., Zhou F., Yu Y., Du X., Xiang Y., Li C., Huang X., Xie C., Liu Z., et al. // *Oncogene.* 2020. V. 39. № 20. P. 3997–4013.
66. Wang D., Su L., Huang D., Zhang H., Shin D.M., Chen Z.G. // *Mol. Cancer.* 2011. V. 10. P. 116.