



УДК 57.042.2

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ГИБРИДНОГО DR5-СПЕЦИФИЧЕСКОГО ВАРИАНТА ЦИТОКИНА TRAIL С ОЛАПАРИБОМ НА ЛИНИЯХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С РАЗЛИЧНЫМ МУТАЦИОННЫМ СТАТУСОМ ГЕНОВ *BRCA*

© 2025 г. А. В. Яголович^{*, #}, А. А. Исакова^{*, **}, Е. В. Куковьякина^{**, Д. А. Долгих^{*, **}, М. П. Кирпичников^{*, **}, М. Э. Гаспарян^{**}}

^{*} Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Россия, 119234 Москва, Ленинские горы, 1/12

^{**} ФГБУН ГНЦ “Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова” РАН, Россия, 117997 Москва, улица Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 20.11.2024 г.

После доработки 08.12.2024 г.

Принята к публикации 08.12.2024 г.

Индукция гибели опухолевых клеток путем активации сигнального пути цитокина TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) – перспективная стратегия противоопухолевой терапии. Ранее нами была разработан гибридный белок SRH-DR5-B-iRGD на основе DR5 (death receptor 5)-селективного варианта цитокина TRAIL DR5-B с антиангиогенными пептидами. Пептид SRH специфично связывается с рецептором VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) и блокирует его VEGF-опосредованную активацию; пептид iRGD связывается с интегрином $\alpha\beta 3$ и рецептором NRP-1 (нейропилином-1). Известно, что все перечисленные мишени гиперэкспрессированы на поверхности опухолевых клеток. В данной работе исследована цитотоксическая активность гибридного белка SRH-DR5-B-iRGD в сравнении с DR5-B *in vitro* на линиях клеток аденокарциномы яичника и молочной железы с различным мутационным статусом генов *BRCA* в комбинации с таргетным ингибитором поли(АДФ-рибоза)-полимераз (PARP) олапарибом. Олапариб синергично усиливал цитотоксичность белков на основе TRAIL независимо от наличия у клеток мутаций в генах *BRCA*, причем этот эффект был более выражен для SRH-DR5-B-iRGD. Таким образом, комбинированное действие SRH-DR5-B-iRGD с олапарибом можно рассматривать в качестве нового подхода к терапии аденокарциномы яичника и молочной железы независимо от наличия мутаций в генах *BRCA*.

Ключевые слова: TRAIL, DR5, VEGFR2, интегрин $\alpha\beta 3$, рак яичника, рак молочной железы, *BRCA*, PARP, олапариб

DOI: 10.31857/S0132342325030034, **EDN:** KQAJWF

ВВЕДЕНИЕ

Не менее чем в половине случаев злокачественного рака яичников (РЯ) и молочной железы (РМЖ) выявляется геномная нестабильность из-за мутаций генов, участвующих в гомологичной

рекомбинации. В частности, в 10–15% случаев выявляются мутации генов *BRCA1/2* – опухолевых супрессоров, участвующих в репарации двунитевых разрывов ДНК [1]. Подобный мутационный статус обуславливает последующую стратегию

Сокращения: DR5 – рецептор смерти 5; PARP1/2 – поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1/2; TRAIL – лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с фактором некроза опухоли; VEGFR2 – рецептор сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) 2; РЯ – рак яичников; РМЖ – рак молочной железы.

[#] Автор для связи: (тел.: +7 (926) 378-01-55; эл. почта: yagolovichav@my.msu.ru).

лечения [2]. Высокой эффективностью в *BRCA*-мутированных опухолях обладают таргетные ингибиторы поли(АДФ-рибоза)-полимераз (PARP), среди которых один из первых – олапариб. Механизм действия олапариба основан на остановке репарации однонитевых разрывов ДНК, что приводит к накоплению однонитевых и двунитевых разрывов, геномной нестабильности и гибели клетки [3].

Однако ввиду недостаточной клинической эффективности ингибиторов PARP актуален поиск новых мишеней и препаратов для терапевтического воздействия. В частности, в качестве новых противоопухолевых агентов при раке яичников (РЯ) и молочной железы (РМЖ) исследуются агонисты рецепторов смерти цитокина TRAIL [4–7]. Например, моноклональное антитело – агонист рецептора смерти DR5 – показало высокую активность в комбинации с цисплатином на линии аденокарциномы яичников A2780 [8]. Также цисплатин в комбинации с TRAIL усиливал гибель клеток рака молочной железы [9], в том числе стволовых клеток трижды негативного рака молочной железы [10].

Для усиления действия ингибиторов PARP изучаются комбинации с другими терапевтическими агентами [11]. Известно, что олапариб вызывает увеличение экспрессии рецепторов смерти DR4 и DR5 в клетках острого миелоидного лейкоза [12]. Недавно было показано, что агонисты рецепторов TRAIL усиливают действие ингибиторов PARP при раке поджелудочной железы независимо от статуса мутации *BRCA2* [13]. Также ингибирование пути VEGF повышало эффективность ингибитора PARP при РЯ независимо от статуса *BRCA* [14].

Недавно нами был разработан гибридный белок SRH-DR5-B-iRGD на основе DR5-селективного варианта цитокина TRAIL DR5-B [15], в котором пептид SRH специфично связывается с рецептором VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) и блокирует его VEGF-опосредованную активацию, тогда как пептид iRGD связывается с интегрином $\alpha\beta 3$ и рецептором нейропилином-1. Повышенная противоопухолевая активность SRH-DR5-B-iRGD была показана на моделях глиобластомы *in vitro* и *in vivo* [16].

Цель данной работы заключалась в получении новых данных о цитотоксической активности гибридного белка SRH-DR5-B-iRGD в сравнении с DR5-B при комбинированном действии с олапа-

рибом на клеточных линиях РЯ и РМЖ с различным мутационным статусом генов *BRCA*.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнительный анализ уровня экспрессии генов, кодирующих рецепторы – мишени гибридного белка SRH-DR5-B-iRGD, – в нормальных и опухолевых образцах РЯ и РМЖ. На первом этапе работы был исследован уровень экспрессии генов – мишеней гибридного белка SRH-DR5-B-iRGD в клетках РЯ по сравнению с нормальными тканями с помощью онлайн-инструмента TNMplot (<https://tnmplot.com/analysis/>) [17]. Была оценена экспрессия генов, кодирующих как рецепторы – мишени DR5 (*TNFRSF10B*), VEGFR2 (*KDR*), интегрин $\alpha\beta 3$ (*ITGA2B*) и *NRP1* (*NRP1*), так и природные эндогенные лиганды этих рецепторов – TRAIL (*TNFSF10*) и VEGFA (*VEGFA*). Использовали два альтернативных подхода: прямое сравнение опухолевых и нормальных образцов (усредненных по всем нормальным тканям организма) (рис. 1а) либо сравнение парных образцов опухолевых и локально расположенных смежных нормальных тканей (рис. 1б, в). Экспрессия генов *TNFRSF10B*, *KDR*, *ITGA2B* и *NRP1* не отличалась значительно в клетках РЯ по сравнению с усредненным уровнем экспрессии по всем нормальным тканям организма (рис. 1а). Однако важно отметить, что экспрессия тех же генов рецепторов *TNFRSF10B*, *ITGA2B* и *KDR* была существенно повышена в образцах опухоли по сравнению с окружающими их нормальными тканями (рис. 1б). При этом экспрессия генов лигандов *TNFSF10* и *VEGFA* была повышена в опухолевых образцах РЯ во всех случаях (рис. 1а, б).

Аналогичный анализ образцов РМЖ показал отсутствие значимых различий между экспрессией генов – рецепторов *TNFRSF10B*, *KDR*, *ITGA2B*, *NRP1* и лигандов *TNFSF10* и *VEGFA* как при прямом сравнении опухолевых и нормальных образцов, усредненных по всем нормальным тканям организма (рис. 2а), так и при сравнении парных образцов опухолевых и локально расположенных смежных нормальных тканей (рис. 2б, в).

Корреляционный анализ экспрессии генов *TNFRSF10B*, *KDR*, *ITGA2B* и *NRP1* с генами *BRCA1* и *BRCA2* в образцах РЯ и РМЖ. Учитывая высокую значимость мутаций в генах *BRCA1/2*

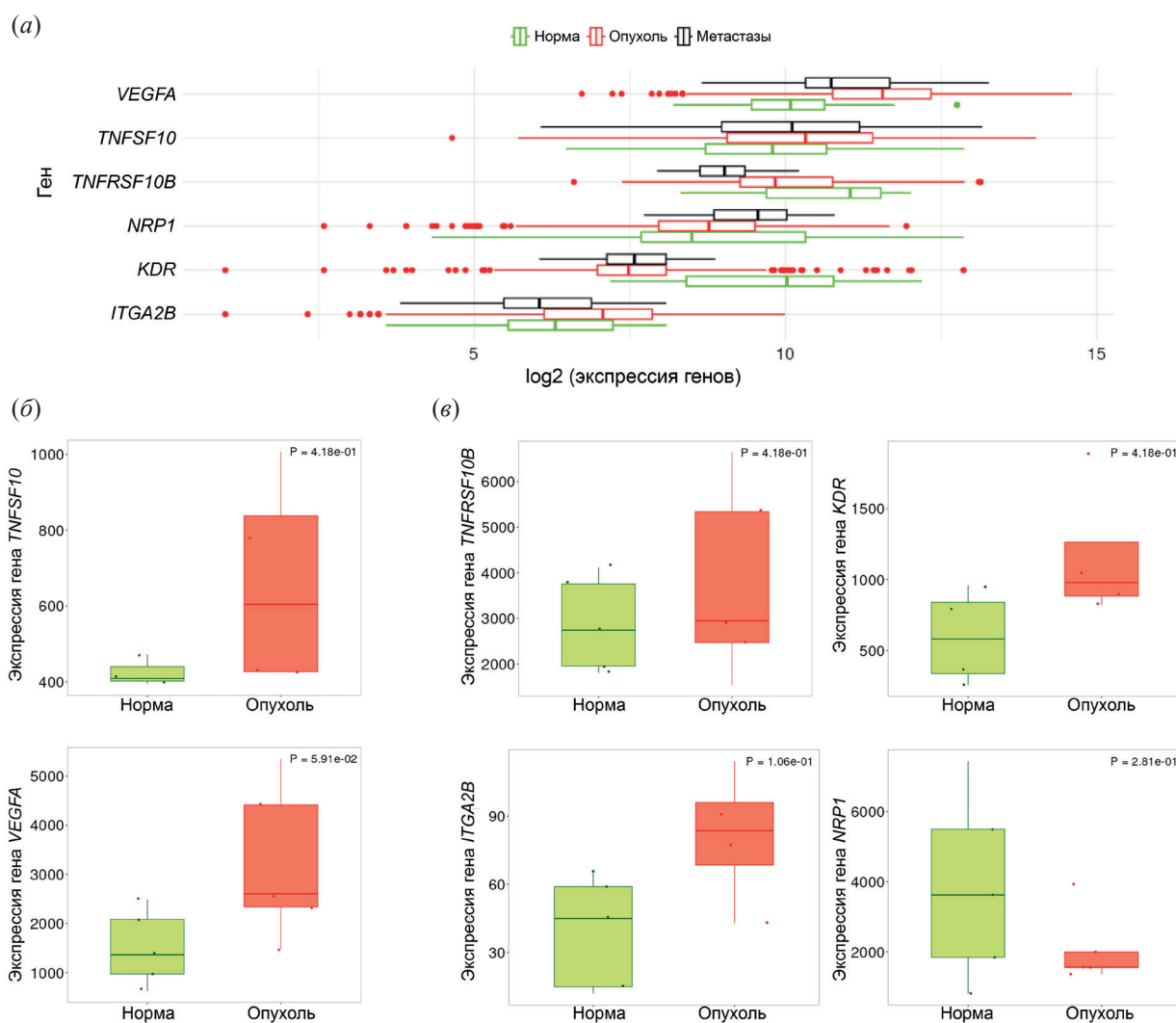


Рис. 1. Сравнение экспрессии генов, кодирующих лиганды TRAIL (*TNFSF10*), VEGFA (*VEGFA*) и рецепторы DR5 (*TNFRSF10B*), VEGFR2 (*KDR*), интегрин $\alpha v\beta 3$ (*ITGA2B*) и NRP1 (*NRP1*): (а) – в образцах рака яичника (РЯ) и нормальных образцах, усредненных по всем нормальным тканям организма, с помощью *U*-критерия Манна–Уитни; (б, в) – сравнение парных образцов опухолевых (РЯ) и локально расположенных смежных нормальных тканей с помощью парного статистического теста Уилкоксона.

при РЯ и РМЖ, был проведен корреляционный анализ экспрессии генов *BRCA1* и *BRCA2* с экспрессией генов рецепторов *TNFRSF10B*, *KDR*, *ITGA2B* и *NRP1* на опухолевых образцах РЯ (рис. 3) и РМЖ (рис. 4) с помощью онлайн-инструмента TNMplot (<https://tnmplot.com/analysis/>). В образцах РЯ была выявлена положительная корреляция экспрессии *BRCA1* и *BRCA2* с *TNFRSF10B* ($R = 0.16$) (рис. 3а), *KDR* ($R = 0.12$ и $R = 0.1$ соответственно) (рис. 3б), *ITGA2B* ($R = 0.26$ и $R = 0.09$ соответственно) (рис. 3в) и *NRP1* ($R = 0.11$

и $R = 0.08$ соответственно) (рис. 3г). В образцах РМЖ существенная положительная корреляция была выявлена только между экспрессией генов *BRCA1* и *BRCA2* с *ITGA2B* ($R = 0.19$ и $R = 0.14$ соответственно) (рис. 4в).

Цитотоксическая активность олапариба в комбинации с лигандами DR5-B и SRH-DR5-B-iRGD на клеточных линиях РЯ и РМЖ с различным мутационным статусом генов *BRCA*. Для оценки цитотоксичности олапариба были выбраны клеточные линии РЯ

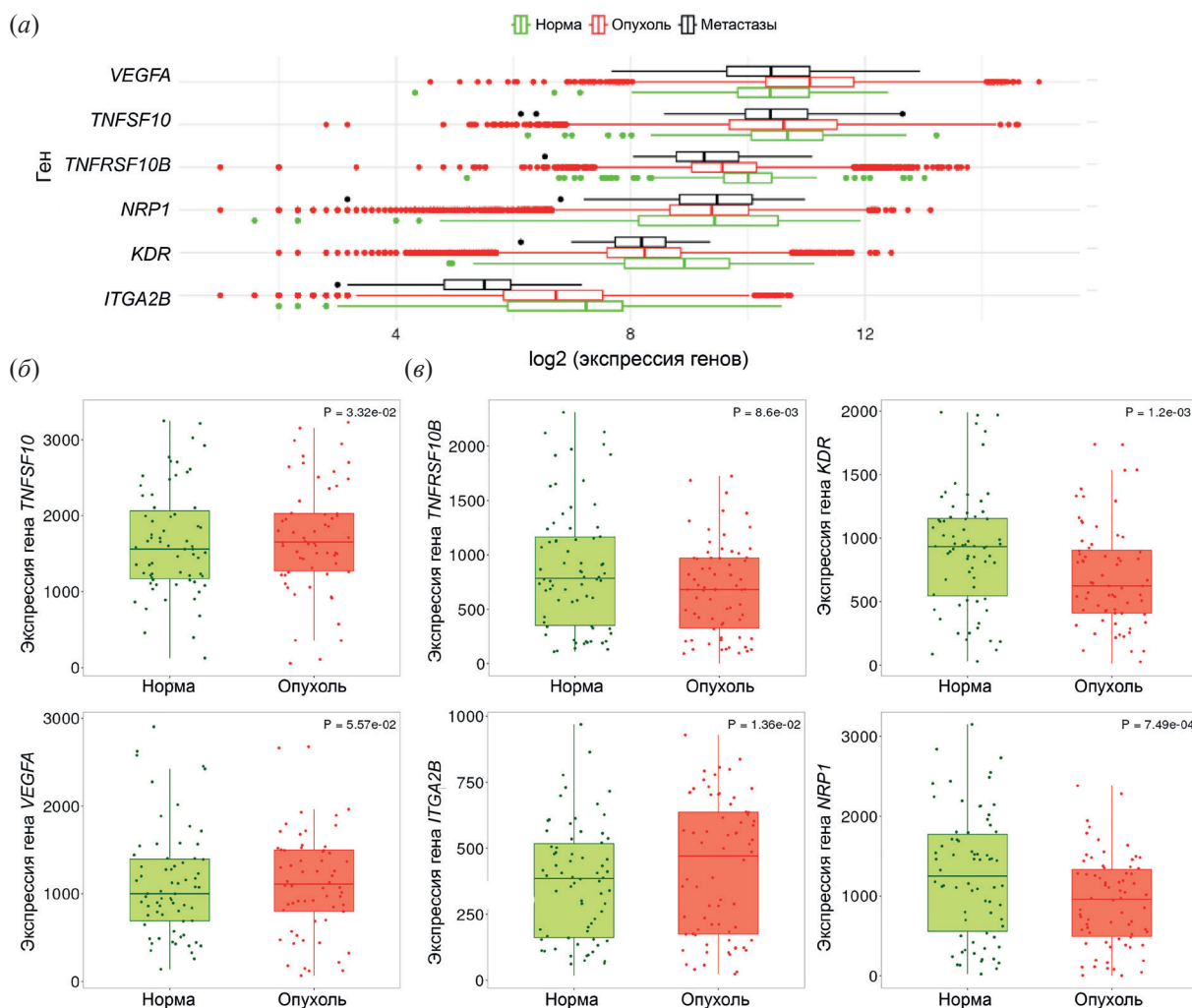


Рис. 2. Сравнение экспрессии генов, кодирующих лиганды TRAIL (*TNFSF10*), VEGFA (*VEGFA*) и рецепторы DR5 (*TNFRSF10B*), VEGFR2 (*KDR*), интегрин $\alpha\beta 3$ (*ITGA2B*) и NRP1 (*NRP1*): (а) – в образцах рака молочной железы (ПМЖ) и нормальных образцах, усредненных по всем нормальным тканям организма, с помощью U-критерия Манна–Уитни; (б, в) – сравнение парных образцов опухолевых (ПМЖ) и локально расположенных смежных нормальных тканей с помощью парного статистического теста Уилкоксона.

A2780 и OVCAR3, не содержащие мутаций в генах *BRCA1/2* [18], UWB1.289 с делецией гена *BRCA1* [19], а также линия ПМЖ MDA-MB-436 с мутацией в гене *BRCA1* [20]. Олапариб в различных разведениях комбинировали с лигандами DR5-В либо SRH-DR5-В-iRGD в фиксированной концентрации 5 нМ, обладающей максимальным цитотоксическим эффектом, как было показано ранее [21]. Примечательно, что олапариб индуцировал клеточную гибель во всех трех клеточных линиях независимо от наличия мутаций в генах *BRCA1/2*. При этом, ожидаемо, на линиях UWB1.289 и MDA-MB-436 с мутацией в гене *BRCA1* олапариб обладал максимальной

цитотоксичностью. Максимальное значение клеточной гибели под действием олапариба составило 65.5 ± 0.4 , 41.3 ± 2.8 , 79.3 ± 4.8 и $76.6 \pm 0.5\%$ на линиях A2780, OVCAR3, UWB1.289 и MDA-MB-436 соответственно (рис. 5). При этом добавление 5 нМ лигандов DR5-В либо SRH-DR5-В-iRGD повышало уровень клеточной гибели во всех клеточных линиях, кроме A2780, где наблюдался только эффект олапариба (рис. 3а).

Цитотоксичность лигандов DR5-В и SRH-DR5-В-iRGD в комбинации с олапарибом на клеточных линиях РЯ и ПМЖ с различным мутационным статусом генов *BRCA*. Полученные

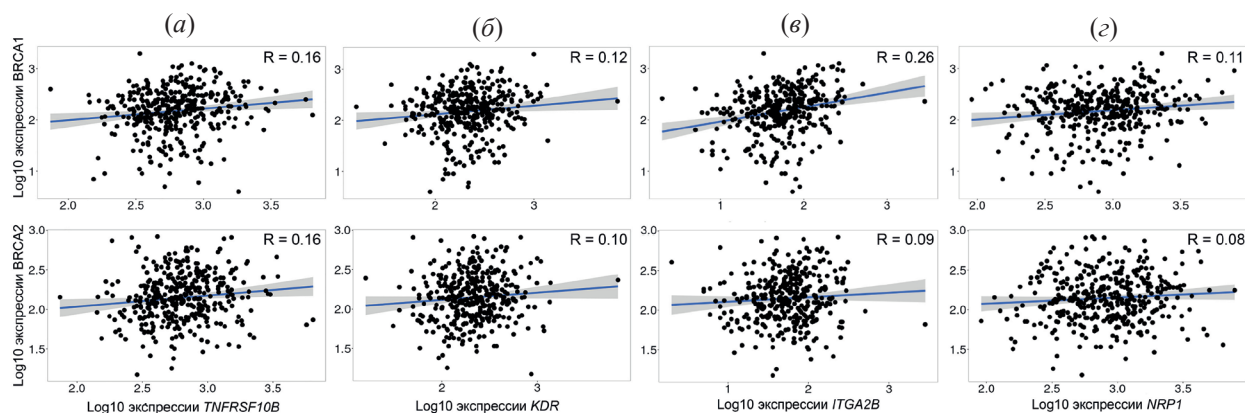


Рис. 3. Корреляция экспрессии генов *BRCA1* и *BRCA2* с экспрессией генов *TNFRSF10B* (а), *KDR* (б), *ITGA2B* (в) и *NRP1* (г) на опухолевых образцах РЯ по данным РНК-секвенирования, исследованная с помощью онлайн-инструмента TNMplot (<https://tnmplot.com/analysis/>).

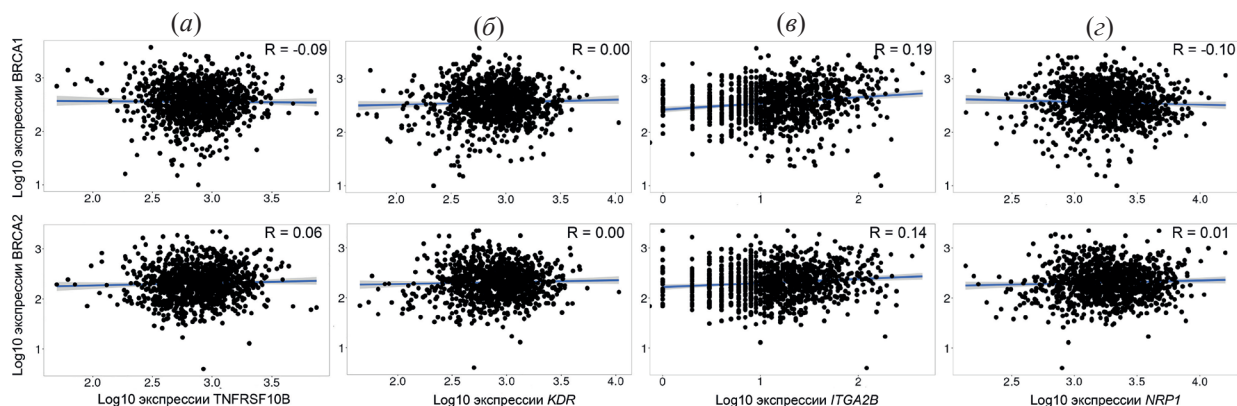


Рис. 4. Корреляция экспрессии генов *BRCA1* и *BRCA2* с экспрессией генов *TNFRSF10B* (а), *KDR* (б), *ITGA2B* (в) и *NRP1* (г) на опухолевых образцах РМЖ по данным РНК-секвенирования, исследованная с помощью онлайн-инструмента TNMplot (<https://tnmplot.com/analysis/>).

результаты были подтверждены при сравнительном исследовании цитотоксичности лигандов DR5-B и SRH-DR5-B-iRGD в комбинации с олапарибом (в токсической концентрации олапариба 20 мкМ для клеток OVCAR3, UWB1.289 и A2780 и 1 мкМ для MDA-MB-436). Белки DR5-B и SRH-DR5-B-iRGD показали выраженный цитотоксический эффект на линиях OVCAR3, UWB1.289 и MDA-MB-436, при этом SRH-DR5-B-iRGD был в среднем на 10–15% эффективнее, чем DR5-B, благодаря дополнительной аффинности к рецепторам VEGFR2 и интегрину $\alpha\beta 3$ [16] (рис. 6, табл. 1). Клеточная линия A2780 была резистентна к обоим лигандам. Добавление олапариба усиливало цитотоксичность как DR5-B, так и SRH-DR5-B-iRGD на всех клеточных линиях, однако полумаксимальная ингибирующая концентрация (IC_{50}) последнего была

в 6–10 раз ниже по сравнению с DR5-B (рис. 6, табл. 1).

Расчет комбинационного индекса (CI) с помощью программного обеспечения CampuSyn [22] выявил значения $CI < 1$ для исследованного диапазона концентраций лигандов (табл. 2), что свидетельствует о синергичном эффекте с олапарибом. Наиболее ярко ($CI < 0.5$) синергизм был выражен при совместном действии DR5-B и олапариба на клеточных линиях OVCAR3 и MDA-MB-436 и при совместном действии SRH-DR5-B-iRGD и олапариба на клеточных линиях OVCAR3, UWB1.289 и MDA-MB-436 (табл. 2). Таким образом, синергичное действие данных препаратов определяется не наличием мутации в гене *BRCA1*, а исходной чувствительностью клеток к лигандам DR5-B либо SRH-DR5-B-iRGD.

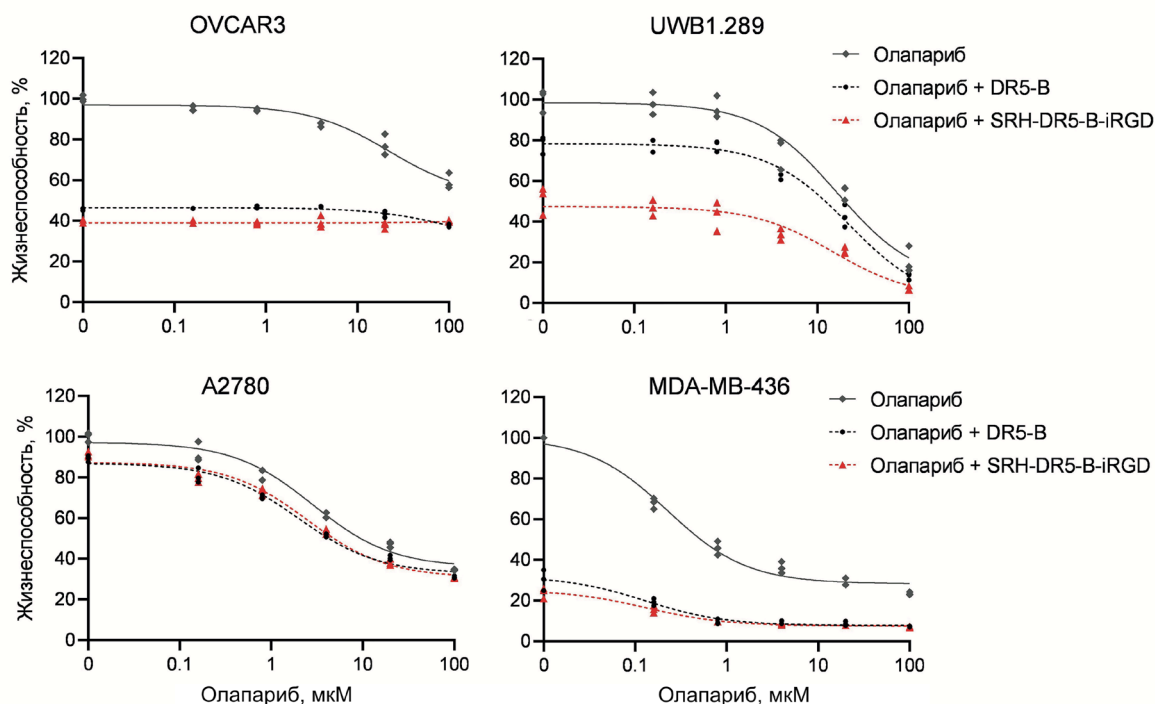


Рис. 5. Цитотоксическая активность олапариба в комбинации с лигандами DR5-B либо SRH-DR5-B-iRGD (токсическая концентрация 5 нМ). Клетки A2780, OVCAR3, UWB1.289 (РЯ) либо MDA-MB-436 (ПМЖ) инкубировали в течение 48 ч и анализировали жизнеспособность с помощью МТТ-теста.

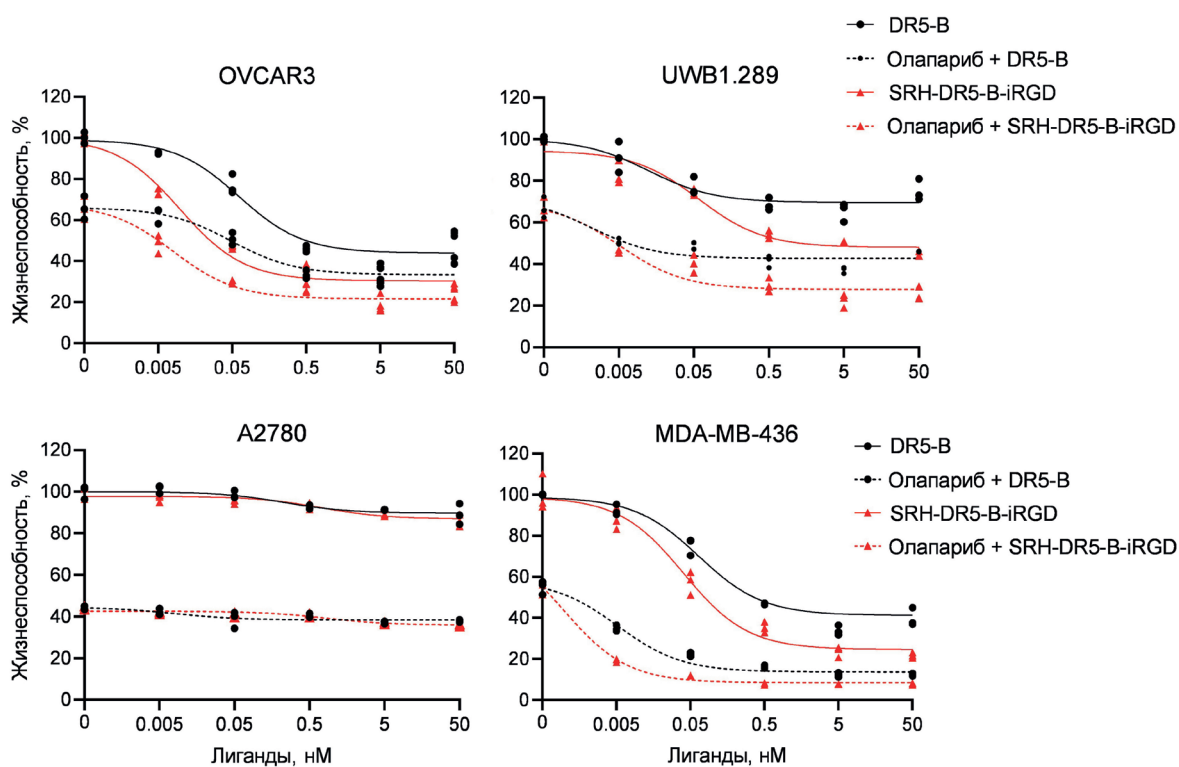


Рис. 6. Цитотоксическая активность лигандов DR5-B и SRH-DR5-B-iRGD в комбинации с олапарибом (токсическая концентрация 20 мкМ для клеток OVCAR3, UWB1.289 и A2780 и 1 мкМ для MDA-MB-436). Клетки A2780, OVCAR3, UWB1.289 (РЯ) либо MDA-MB-436 (ПМЖ) инкубировали в течение 48 ч и анализировали жизнеспособность с помощью МТТ-теста.

Таблица 1. Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) и максимальной клеточной гибели (%) под действием белков DR5-B и SRH-DR5-B-iRGD в комбинации с олапарибом на клеточных линиях A2780, OVCAR3, UWB1.289 (РЯ) либо MDA-MB-436 (ПМЖ)

Клеточная линия	Показатель	DR5-B	DR5-B + олапариб	SRH-DR5-B-iRGD	SRH-DR5-B-iRGD + олапариб
A2780	Клеточная гибель, %	8.8 ± 1.2	62.8 ± 0.4	10.5 ± 1.3	63.2 ± 0.5
	IC_{50} , нМ	>1000	>1000	>1000	>1000
OVCAR3	Клеточная гибель, %	62.6 ± 1.17	70.6 ± 1.1	72.5 ± 2.1	83.0 ± 0.8
	IC_{50} , нМ	0.062 ± 0.019	0.049 ± 0.020	0.010 ± 0.002	0.008 ± 0.002
UWB1.289	Клеточная гибель, %	34.7 ± 3.4	62.8 ± 1.1	49.4 ± 0.3	77.4 ± 2.4
	IC_{50} , нМ	0.058 ± 0.018	0.005 ± 0.002	0.013 ± 0.007	0.002 ± 0.001
MDA-MB-436	Клеточная гибель, %	33.8 ± 1.8	87.8 ± 0.6	78.2 ± 0.9	92.1 ± 0.3
	IC_{50} , нМ	0.065 ± 0.018	0.005 ± 0.001	0.041 ± 0.007	0.001 ± 0.0002

Таблица 2. Значения комбинационного индекса (CI) при комбинированном воздействии лигандов DR5-B и SRH-DR5-B-iRGD с олапарибом (20 мкМ для клеток OVCAR3, UWB1.289 и A2780 и 1 мкМ для MDA-MB-436), рассчитанного с помощью программного обеспечения CampuSyn

Концентрация лигандов, нМ	CI			
	OVCAR3	A2780	UWB1.289	MDA-MB 436
DR5-B				
0.05	0.1126	0.5209	0.7251	0.0045
0.5	0.0323	0.6164	0.5286	0.0009
5.0	0.0614	0.4436	0.4284	0.0012
SRH-DR5-B-iRGD				
0.05	0.0184	0.6639	0.4975	0.0003
0.5	0.0144	0.6107	0.2949	0.0007
5.0	0.0048	0.4270	0.1909	0.0011

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Биоинформатический анализ. Анализ уровня экспрессии генов в опухолевых клетках по сравнению с нормальными тканями проводили с помощью онлайн-инструмента TNMplot (<https://tnmplot.com/analysis/>), предназначенного для сравнения экспрессии генов в нормальных и опухолевых тканях на основе баз данных Gene Expression Omnibus (NCBI-GEO), The Cancer Genome Atlas (TCGA), Therapeutic Applicable Research to Generate Effective Treatments (TARGET) и The Genotype-Tissue Expression (GTEx) [17]. В работе применяли два подхода, доступных в TNMplot. Прямое сравнение опухолевых и

нормальных образцов (усредненных по всем нормальным тканям организма) проводили с помощью *U*-критерия Манна–Уитни, сравнение парных образцов опухолевых и локально расположенных смежных нормальных тканей – с использованием парного статистического теста Уилкоксона, как описано в работе [17].

Корреляционный анализ экспрессии генов в опухолевых образцах осуществляли с помощью онлайн-инструмента TNMplot (<https://tnmplot.com/analysis/>) по данным РНК-секвенирования из баз данных Gene Expression Omnibus (NCBI-GEO) и The Cancer Genome Atlas (TCGA) [17] с подсчетом коэффициента ранговой корреляции Спирмена (*R*).

Получение гибридных белков DR5-B и SRH-DR5-B-iRGD. Рекомбинантные белки DR5-B и SRH-DR5-B-iRGD были экспрессированы в *E. coli* (штамм SHuffle B) и очищены, как описано ранее [16]. Вкратце, клетки трансформировали плазмидами pET32a/dr5-b или pET32a/srh-dr5-b-irgd, после чего клеточные культуры выращивали при 28°C в течение 20 ч. После разрушения клеток с помощью French Press (Spectronic Instruments Inc., США) белки очищали от других компонентов растворимой клеточной фракции с помощью иммобилизованной металл-аффинной хроматографии на агарозе Ni-NTA (Qiagen, США). Окончательную очистку проводили на сорбенте SP Sepharose (GE Healthcare, Швеция). Очищенные белковые растворы диализовали против 150 mM NaCl в течение 24 ч при 4°C, стерилизовали фильтрацией, лиофилизировали и хранили при –80°C.

Культивирование клеточных линий. Линии клеток A2780, OVCAR3 и UWB1.289 культивировали в ростовой среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия) с добавлением 1 mM L-глутамина (ПанЭко, Россия), клетки MDA-MB-436 выращивали в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 2 mM L-глутамина. Все среды обогащали 10%-ной фетальной бычьей сывороткой (HyClone, США), а также включали антибиотики пенициллин (100 мкг/мл) и стрептомицин (100 мкг/мл). Клетки культивировали в инкубаторе (37°C, 5% CO₂). Клетки открепляли при помощи раствора 0.25%-ного трипсина-ЭДТА (ПанЭко, Россия). Пересевали клетки при достижении конfluence 70–80% (1 раз в 3–4 дня).

Анализ клеточной жизнеспособности. Клетки засеивали в 96-луночные культуральные планшеты с обработанной поверхностью (SPL Lifesciences, Южная Корея) в количестве 7×10^3 клеток на лунку в полной ростовой среде. Через 24 ч в лунки вносили олапариб (Macklin, Китай), DR5-B либо SRH-DR5-B-iRGD в указанных концентрациях и инкубировали в течение 48 ч. Олапариб предварительно растворяли в DMSO до концентрации 10 mM и добавляли к клеткам таким образом, чтобы конечное содержание DMSO в лунке не превышало 0.5% и не оказывало цитотоксического эффекта. Затем к клеткам добавляли 0.05% МТТ (тиазолил синий тетразолий бромид), инкубировали 4 ч, после чего образо-

вавшиеся кристаллы растворяли в DMSO (100 мкл на лунку).

Оптическую плотность измеряли при 570 нм с использованием планшетного спектрофотометра iMark (Bio-Rad, США). Жизнеспособность оценивали как % к контролю:

$$(\text{OD}_{\text{образец}} - \text{OD}_{\text{фон}}) / (\text{OD}_{\text{контроль}} - \text{OD}_{\text{фон}}) \times 100\%.$$

Статистический анализ. Данные характеризовались нормальным распределением и представляли собой средние значения $\pm$ стандартное отклонение трехкратных измерений. Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC₅₀) рассчитывали с использованием GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software Inc., США). Значения клеточной гибели вычисляли по формуле:

$$100\% - (\text{OD}_{\text{образец}} - \text{OD}_{\text{фон}}) / (\text{OD}_{\text{контроль}} - \text{OD}_{\text{фон}}) \times 100\%.$$

Показатель комбинационного индекса (CI), применяемый для оценки взаимодействия препаратов при их совместном использовании, рассчитывали с помощью программного обеспечения CampuSyn (Biosoft, Великобритания) [22]. Анализ проводили при условии использования диапазона концентраций 0.005–50 nM DR5-B либо SRH-DR5-B-iRGD и постоянной концентрации олапариба.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлена повышенная цитотоксичность гибридного белка SRH-DR5-B-iRGD по сравнению с DR5-B на клеточных линиях РЯ OVCAR3 и UWB1.289 и РМЖ MDA-MB-436. Показано синергичное действие ингибитора поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) олапариба как с DR5-B, так и с SRH-DR5-B-iRGD на линиях с различным мутационным статусом гена *BRCA1*. При этом степень синергизма зависела не от наличия мутации в гене *BRCA1*, а от исходной чувствительности клеток к лигандам DR5-B и SRH-DR5-B-iRGD. Поскольку гибридный белок SRH-DR5-B-iRGD обладал высокой цитотоксичностью на исследованных линиях либо в монорежиме, либо в комбинации с олапарибом, он может рассматриваться в качестве перспективного препарата для терапии РЯ и РМЖ независимо от наличия мутации в гене *BRCA1*.

Полученные данные могут лечь в основу дальнейших исследований противоопухолевого действия гибридного белка SRH-DR5-B-iRGD *in vivo*.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 24-14-00250 (<https://rscf.ru/project/24-14-00250/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ВКЛАД АВТОРОВ

Концептуализация – АВЯ, МЭГ; экспериментальные работы – ААИ, ЕВК; написание статьи – АВЯ, МЭГ; анализ данных – АВЯ, ААИ, МЭГ; администрирование проекта – ДАД, МПК.

Все авторы дали одобрение на окончательный вариант рукописи.

ДОСТУПНОСТЬ ДАННЫХ

Данные, подтверждающие выводы настоящего исследования, можно получить у корреспондирующего автора по обоснованному запросу.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sokolenko A.P., Sokolova T.N., Ni V.I., Preobrazhenskaya E.V., Iyevleva A.G., Aleksakhina S.N., Romanko A.A., Bessonov A.A., Gorodnova T.V., Anisimova E.I., Savonevich E.L., Bizin I.V., Stepanov I.A., Krivorotko P.V., Berlev I.V., Belyaev A.M., Togo A.V., Imyaninov E.N. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2020. V. 184. P. 229–235.
<https://doi.org/10.1007/s10549-020-05827-8>
2. Arcieri M., Tius V., Andreetta C., Restaino S., Biasioli A., Poletto E., Damante G., Ercoli A., Driul L., Fagotti A., Lorusso D., Scambia G., Vizzielli G. // *Front. Oncol.* 2024. V. 14. P. 1335196.
<https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1335196>
3. Jiang X., Li X., Li W., Bai H., Zhang Z. // *J. Cell. Mol. Med.* 2019. V. 23. P. 2303–2313.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.14133>
4. Khaider N.G., Lane D., Matte I., Rancourt C., Piché A. // *Am. J. Cancer Res.* 2012. V. 2. P. 75–92.
5. Mandal R., Raab M., Matthess Y., Becker S., Knecht R., Streibhardt K. // *Molecular Oncology.* 2014. V. 8. P. 232–249.
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2013.11.003>
6. Cuello M., Ettenberg S.A., Clark A.S., Keane M.M., Posner R.H., Nau M.M., Dennis P.A., Lipkowitz S. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 4892–4900.
7. Kim D.-Y., Kim M.-J., Kim H.-B., Lee J.-W., Bae J.-H., Kim D.-W., Kang C.-D., Kim S.-H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. V. 1812. P. 796–805.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.04.004>
8. Jiang Q., Zhu H., Liang B., Huang Y., Li C. // *Mol. Med. Rep.* 2012. V. 6. P. 316–320.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2012.902>
9. Gasparian M.E., Bychkov M.L., Yagolovich A.V., Kirpichnikov M.P., Dolgikh D.A. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2017. V. 477. P. 385–388.
<https://doi.org/10.1134/S1607672917060114>
10. Yin S., Xu L., Bandyopadhyay S., Sethi S., Reddy K.B. // *Int. J. Oncol.* 2011. V. 39. P. 891–898.
<https://doi.org/10.3892/ijo.2011.1085>
11. Zhou L., Wan Y., Zhang L., Meng H., Yuan L., Zhou S., Cheng W., Jiang Y. // *Biomed. Pharmacother.* 2024. V. 175. P. 116733.
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116733>
12. Faraoni I., Aloisio F., De Gabrieli A., Consalvo M.I., Lavorgna S., Voso M.T., Lo-Coco F., Graziani G. // *Cancer Lett.* 2018. V. 423. P. 127–138.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.03.008>
13. Ben Khaled N., Hammer K., Ye L., Alnatsha A., Widholz S.A., Piseddu I., Sirtl S., Schneider J., Munker S., Mahajan U.M., Montero J.J., Griger J., Mayerle J., Reiter F.P., De Toni E.N. // *Cancers.* 2022. V. 14. P. 5240.
<https://doi.org/10.3390/cancers14215240>
14. Bizzaro F., Fusco Nerini I., Taylor M.A., Anastasia A., Russo M., Damia G., Guffanti F., Guana F., Ostano P., Minoli L., Hattersley M., Arnold S., Ramos-Montoya A., Williamson S.C., Galbiati A., Urosevic J., Leo E., Cavallaro U., Ghilardi C., Barry S.T., Bani M.R., Giavazzi R. // *J. Hematol. Oncol.* 2021. V. 14. P. 186.
<https://doi.org/10.1186/s13045-021-01196-x>
15. Gasparian M.E., Chernyak B.V., Dolgikh D.A., Yagolovich A.V., Popova E.N., Sycheva A.M., Moshkovskii S.A., Kirpichnikov M.P. // *Apoptosis.* 2009. V. 14. P. 778–787.
<https://doi.org/10.1007/s10495-009-0349-3>
16. Isakova A.A., Artykov A.A., Plotnikova E.A., Trunova G.V., Khokhlova V.A., Pankratov A.A., Shuvalova M.L., Mazur D.V., Antipova N.V., Shakhparonov M.I., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P., Gasparian M.E., Yagolovich A.V. // *Int. J. Biol. Macromol.* 2024. V. 255. P. 128096.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.128096>

17. Bartha Á., Györffy B. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 2622.
<https://doi.org/10.3390/ijms22052622>
18. Beaufort C.M., Helmijr J.C., Piskorz A.M., Hoogstraat M., Ruigrok-Ritstier K., Besselink N., Murtaza M., Van IJcken W.F., Heine A.A., Smid M., Koudijs M.J., Brenton J.D., Berns E.M., Helleman J. // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e103988.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103988>
19. DelloRusso C., Welsh P.L., Wang W., Garcia R.L., King M.-C., Swisher E.M. // *Mol. Cancer Res.* 2007. V. 5. P. 35–45.
<https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-06-0234>
20. Elstrodt F., Hollestelle A., Nagel J.H.A., Gorin M., Wasielewski M., Van Den Ouweland A., Merajver S.D., Ethier S.P., Schutte M. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 41–45.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2853>
21. Gasparian M.E., Bychkov M.L., Yagolovich A.V., Dolgikh D.A., Kirpichnikov M.P. // *Biochem. (Moscow)*. 2015. V. 80. P. 1080–1091.
<https://doi.org/10.1134/S0006297915080143>
22. Chou T.-C. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. P. 440–446.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1947>

Combined Effects of Cytokine Trail-Based DR5-Specific Fusion Protein with Olaparib on Tumor Cell Lines with Different *BRCA* Mutation Status

A. V. Yagolovich^{*, #}, A. A. Isakova^{*, **}, E. V. Kukovyakina^{**}, D. A. Dolgikh ^{*, **},
M. P. Kirpichnikov^{*, **}, and M. E. Gasparian^{**}

[#] Phone: +7 (926) 378-01-55; e-mail: yagolovichav@my.msu.ru

^{*} Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

^{**} Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

Tumor cell death induction via activation of TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) cytokine signaling pathway is a promising strategy for anticancer therapy. Previously, we developed a fusion protein SRH-DR5-B-iRGD based on the DR5 (death receptor 5)-specific cytokine TRAIL variant DR5-B with antiangiogenic peptides. The SRH peptide specifically binds to the VEGFR2 (vascular endothelial growth factor receptor 2) receptor and blocks its VEGF-mediated activation; the iRGD peptide binds to integrin $\alpha\beta 3$ and the NRP-1 (neuropilin-1) receptor. All of these targets are known to be overexpressed on the surface of tumor cells. In the current study, we investigated the cytotoxic activity of the SRH-DR5-B-iRGD fusion protein in comparison with DR5-B *in vitro* in ovarian and breast adenocarcinoma cell lines with different *BRCA* mutation status in combination with a targeted poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor olaparib. Olaparib synergistically enhanced the cytotoxicity of TRAIL-based proteins regardless of the presence of *BRCA* mutations in the cells, and this effect was more pronounced for SRH-DR5-B-iRGD. Thus, the combination of SRH-DR5-B-iRGD with olaparib can be considered as a new approach to treatment of ovarian and breast adenocarcinomas regardless of the presence of *BRCA* mutations.

Keywords: TRAIL, DR5, VEGFR2, integrin $\alpha\beta 3$, ovarian cancer, breast cancer, *BRCA*, PARP, olaparib