

ВЛИЯНИЕ ХЛОРОХИНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ АПОПТОЗА И АУТОФАГИИ В КЛЕТКАХ MOLT-3 И IMR-32

© 2025 г. Е. С. Прокопенко^{1,2}, Т. В. Соколова¹, О. В. Надей¹, А. Д. Трубникова¹,
Н. И. Агалакова^{1,*}

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

²Санкт-Петербургский государственный университет,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: nagalak@mail.ru

Поступила в редакцию 27.10.2024 г.

После доработки 20.11.2024 г.

Принята к публикации 20.11.2024 г.

Целью исследования было сравнить влияние хлорохина (CQ) на экспрессию генов апоптоза и аутофагии в клетках двух опухолевых линий – лейкемии MOLT-3 и нейробластомы IMR-32, культивируемых в полных ростовых и бессывороточных средах RPMI-1640 и DMEM соответственно в течение 24 и 48 ч. Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ, экспрессию генов – методом ПЦР в реальном времени. Для теста МТТ клетки инкубировали с 10–100 мкМ CQ. Для изучения экспрессии генов апоптоза (*CASP3*, *BAX*, *BCL2*) и аутофагии (*ULK1*, *BECN1*, *MAP1LC3B*) использовали 30 и 50 мкМ CQ, которые оказывали значительный ингибирующий эффект на жизнеспособность клеток обеих линий, но не приводили к их полной гибели. Чувствительность клеток обеих линий к CQ была выше в бессывороточной среде, однако экспрессия генов апоптоза и аутофагии в них сильно различалась. В клетках MOLT-3 уровень мРНК проапоптотических генов *CASP3* и *BAX* увеличивался после 24 ч инкубации в бессывороточной среде, в то время как в клетках IMR-32 повышение экспрессии этих генов наблюдалось только после 48 ч в присутствии более высокой концентрации CQ. В клетках обеих линий после 24-часовой обработки CQ увеличивалась экспрессия антиапоптотического гена *BCL2*. В клетках MOLT-3 в условиях недостатка питательных веществ наблюдались различные комбинации стимуляции генов всех трех этапов аутофагии *ULK1*, *BECN1* и *MAP1LC3B*, но ни одна из схем обработки не оказала влияния на экспрессию генов *ULK1* и *MAP1LC3B* в клетках IMR-32. Таким образом, 24-часовая обработка CQ в условиях сывороточного голодания является более оптимальной для модулирования аутофагии в клетках MOLT-3. В клетках IMR-32 CQ не оказывает значительного влияния на экспрессию генов аутофагии, а снижение их жизнеспособности связано с активацией других механизмов.

Ключевые слова: MOLT-3, IMR-32, жизнеспособность клеток, гены апоптоза, гены аутофагии

DOI: 10.31857/S0869813925020115, **EDN:** UIEOFT

ВВЕДЕНИЕ

Одной из основных проблем терапии онкологических заболеваний является появление фенотипов опухолей, устойчивых к химиотерапевтическим препаратам, что приводит к образованию метастазов и снижает эффективность лечения [1, 2]. Однако механизмы, лежащие в основе резистентности опухолей к цитотоксическим соединениям, до сих пор не понятны. Поэтому важнейшим направлением современной клинической онкологии является изучение путей взаимодействия между гибелью раковых клеток и механизмами их выживания для поиска новых препаратов, действующих на различные внутриклеточные мишени.

Одним из соединений, которое в последнее время тестируется как компонент комбинированной терапии онкологических заболеваний, является хлорохин (CQ). Противоопухолевое действие CQ и его аналога гидроксихлорохина наблюдалось в экспериментах *in vitro* и *in vivo* как в монотерапии, так и в сочетании с традиционными цитотоксическими препаратами, а также в составе комбинированной терапии в нескольких клинических исследованиях [3–5]. Основным свойством, делающим CQ потенциальным противораковым средством, является его способность подавлять аутофагию [6, 7]. Аутофагия – эволюционно консервативный катаболический процесс, обеспечивающий деградацию и избирательную утилизацию поврежденных белков, макромолекул и органелл в лизосомах. При стрессе или недостатке питательных веществ аутофагия может быть альтернативным источником энергии, поддерживающим гомеостаз и временное выживание клеток [8–10]. Основные этапы аутофагии включают формирование фагофора, окружающего поврежденный клеточный материал, и аутофагосом, которые доставляются к лизосомам и сливаются с ними. Ключевыми молекулярными маркерами аутофагии являются белок биогенеза аутофагосом Ulk-1 (Unc-51 like autophagy activating kinase 1), белок фагофора Beclin-1, рецепторный белок p62/SQSTM1 (Ubiquitin-binding protein p62/Sequestosome 1) и белок аутофагосом LC3-II (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3). Однако, если влияние негативных факторов слишком сильное или длительное, активируются процессы апоптоза. Основным механизмом, связывающим процессы аутофагии и апоптоза, является конкурентное взаимодействие Beclin-1 с белками семейства Bcl-2 на внешней мембране митохондрий. Комплекс Beclin-1 и антиапоптотического белка Bcl-2 подавляет аутофагию, а их диссоциация вследствие формирования связи Bcl-2 и проапоптотического белка Bax приводит к высвобождению Beclin-1 и стимуляции аутофагии. Если же уровня Bcl-2 недостаточно для связывания Bax, активируются эффекторы апоптоза, в том числе каспаза-3 [11–12].

Механизм действия CQ заключается в ингибировании слияния аутофагосом и лизосом. В результате в клетках накапливаются зрелые аутофагосомы, что препятствует деградации белка и сдвигает равновесие в сторону гибели. Однако, кроме подавления аутофагии, противоопухолевый фармакологический профиль CQ включает и другие механизмы, такие как ингибирование пролиферации, индукция апоптоза или влияние на сосудистую сеть опухоли. Такое многогранное действие CQ делает его привлекательным и перспективным для лечения рака, несмотря на описанные побочные эффекты [13].

Известно, что в зависимости от типа клеток и степени активации аутофагия может играть цитопротекторную или цитопатическую роль в ответ на различные стрессы, в том числе лечебные [8–10]. Поэтому использование в качестве объектов исследования клеток различного происхождения представляет большой интерес. Целью данной работы было сравнить влияние CQ на клетки двух опухолевых линий – Т-лимфобластной лейкемии MOLT-3, первоначально полученной из периферической крови человека, и нейробластомы человека IMR-32, происходящей из нервного гребня и представляющей собой смесь нейробласт-подобных клеток и фибробластов. Такое разное про-

исхождение может быть причиной их различной чувствительности к CQ вследствие специфичности метаболических реакций, потребностей в питательных веществах и кислороде. Эффективность действия CQ оценивали по изменению экспрессии генов апоптоза (*CASP3*, *BAX*, *BCL2*) и аутофагии (*ULK1*, *BECN1*, *MAP1LC3B*). Клетки культивировали в полной ростовой среде и в условиях сывороточного голодания, которое способно как активировать аутофагию, так и сдвигать равновесие от аутофагии к апоптозу в зависимости от времени [11, 12].

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточная линия MOLT-3 была получена в компании «Биолот» (Россия). Линия IMR-32 была заказана в центре коллективного пользования «Коллекция культур клеток позвоночных» (the shared research facility «Vertebrate cell culture collection») Института цитологии Российской академии наук. Для выращивания клеток MOLT-3 использовали среду RPMI-1640, для IMR-32 – среду DMEM («Биолот», Россия). Среды содержали 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (Биолот, Россия).

Клетки MOLT-3 и IMR-32 рассеивали на 96- или 6-луночные культуральные планшеты (Jet Biofil, Китай) с плотностью $\sim 5 \times 10^4$ или $5-7 \times 10^5$ клеток на лунку соответственно и выращивали параллельно в полных ростовых и в бессывороточной средах в течение 24 и 48 ч без CQ или с его различными концентрациями (10, 30, 50 и 100 мкМ). После этого клетки использовали для оценки их жизнеспособности или лизировали для выделения РНК. Каждый эксперимент проводили не менее 5 раз.

Жизнеспособность клеток определяли методом МТТ, как описано ранее [14]. Раствор МТТ (5 мг/мл PBS) вносили в каждую лунку планшета в конечной концентрации 0.06% за 2 ч до окончания эксперимента. Для растворения кристаллов формазана в лунки добавляли лизирующий раствор (20% SDS, 50% N,N-диметилформамида на соляной кислоте) и оставляли на ночь. Интенсивность фиолетового окрашивания определяли на планшетном ридере CLARIOstar Plus (BMG Labtech, Германия) при длине волны 570 нм. Процент жизнеспособных клеток в каждой опытной лунке считывали, принимая экстинкцию контрольных клеток за 100%.

Суммарную РНК выделяли из клеток, как описано ранее [14]. Реагент ExtractRNA («Евроген», Россия) добавляли в лунки из расчета 1 мл на 1 млн для клеток MOLT-3 или 1 мл на 10 см² поверхности для клеток IMR-32. Лизаты центрифугировали в течение 10 мин при 4°C и 12000 g. После добавления к супернатанту хлороформа (0.2 мл на 1 мл раствора ExtractRNA) суспензии центрифугировали в течение 15 мин при 12 000 g и 4°C. К РНК-содержащей фазе добавляли изопропанол (0.5 мл на 1 мл раствора ExtractRNA) и центрифугировали 10 мин при 4°C и 12 000 g. Осадок разбавляли в 75%-ном этаноле и хранили при –20°C. Общее содержание РНК в пробах определяли по соотношению коэффициентов поглощения 260/280 нм на спектрофотометре NanoPhotometer-N50 (IMPLEN, Германия).

Обратную транскрипцию проводили, смешивая 1 мкг РНК с 1 мкл смеси праймеров Random(dN)10-primer, а затем, последовательно инкубируя со смесью, содержащей 4 мкл Storage Buffer 5x («Евроген»), 2 мкл смеси дезоксинуклеотидов (dNTP), 2 мкл дитиотреитола (DTT), 2 мкл деионизированной воды (dH₂O) и 1 мкл MMLV ревертазы из набора MMLV RT («Евроген») в течение 5 мин при 25°C, 60 мин при 42°C и 5 мин при 70°C. Полученную кДНК разбавляли dH₂O в 10 раз и хранили при –20°C. Реакции ПЦР в реальном времени проводили на термоциклере C1000 Touch с блоком обнаружения CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Реакционная смесь содержала 1 мкл раствора полученной кДНК, по 1 мкл прямого и обратного праймеров (10 нМ), 17 мкл dH₂O и 5 мкл qPCRmix-HS SYBR Master Mix («Евроген»). Программа состояла из дена-

турации при 95 °С в течение 5 мин, 45 циклов амплификации (денатурации при 95 °С в течение 5 с, отжига при 57–63 °С в течение 10–50 с и элонгации при 72 °С в течение 30 с). Результаты ПЦР анализировали с помощью программного обеспечения CFX Manager (Bio-Rad Laboratories, Inc., США). Специфичность амплификации проверяли по наличию единственных пиков кривых плавления. Все реакции проводили в трех повторениях для каждой пробы. Последовательности праймеров, синтезированных компанией «Евроген», представлены в табл. 1. Для работы были отобраны пары праймеров с наибольшей эффективностью амплификации. Температура плавления была оптимизирована с помощью программы Primer Blast tool (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Эффективность амплификации рассчитывали по формуле $E = 10^{(1/\alpha)}$, где α – угол наклона стандартной кривой. Для оценки относительной экспрессии изучаемых генов использовали метод $2^{-\Delta\Delta CT}$ с нормализацией по гену *CNOT4* (CCR4-NOT Transcription Complex Subunit 4) [15]. Результаты выражены в относительных единицах, где уровень экспрессии в контрольном образце принимается за единицу.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности, температура и время отжига праймеров, использованных для ПЦР-анализа

Ген	Номер последовательности гена (NCBI)	Прямой праймер (5'→3') Обратный праймер (3'→5')	Температура (°C) и время отжига (с) праймеров
<i>BAX</i>	NM_001291429.2	Forward: TCCCCCGAGAGGTCTTTT Reverse: CGCCCCAGTTGAAGTTG	57, 10
<i>BCL2</i>	NM_000633.3	Forward: AGTACCTGAACCGGCACCT Reverse: GGCCGTACAGTCCACAAA	57, 50
<i>CASP3</i>	NM_032991.2	Forward: AACTGGACTGTGGCATTGAG Reverse: ACAAAGCGACTGGATGAACC	56, 30
<i>ULK1</i>	NM_003565.4	Forward: GGCAAGTTCGAGTTCTCCCG Reverse: CGACCTCCAAATCGTGCTCT	59, 50
<i>BECN1</i>	NM_001313998.2	Forward: CCATGCAGGTGAGCTTCGT Reverse: GAATCTGCGAGAGACACCATC	57, 50
<i>MAP1LC3B</i>	NM_022818.5	Forward: TTCAGGTTACAAAACCCGC Reverse: TCTCACACAGCCCGTTTACC	57, 30
<i>CNOT4*</i>	NM_001393371.1	Forward: GTCCAAAACCTGACTGCATGTATC Reverse: GGTGTTTACCCGCCTGCAT	57, 10

Примечание. * – контрольный ген.

Результаты работы анализировали в программе GraphPad Prism 8.1 (San Diego, CA, США). Данные предварительно проверяли на выбросы (применяя критерий Рауса с достоверностью $\alpha = 0.05$) и нормальность распределения (используя критерий Шапиро–Уилка). Изменения жизнеспособности клеток анализировали с помощью

однофакторного анализа ANOVA для множественных сравнений с апостериорным тестом Даннетта. Для оценки различий экспрессии генов использовали непараметрический тест Краскела–Уоллиса для множественных сравнений и апостериорный тест Данна. Различия считались достоверными при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Жизнеспособность клеток. Для определения концентраций CQ, оптимальных для изучения его влияния на экспрессию генов апоптоза и аутофагии, клетки MOLT-3 и IMR-32 обрабатывали 10–100 мкМ CQ в течение 24 и 48 ч. После 24-часовой инкубации в полной ростовой среде RPMI-1640, содержащей 10% сыворотки, жизнеспособность клеток MOLT-3 достоверно снижалась только после инкубации с 50 и 100 мМ CQ (на 39 и 81% соответственно) (рис. 1). Увеличение времени культивирования до 48 ч привело к статистически значимому снижению выживаемости этих клеток и после добавления 30 мкМ CQ, а в присутствии 100 мкМ CQ жизнеспособность упала до чрезвычайно низкого уровня. В среде без сыворотки чувствительность клеток MOLT-3 к CQ увеличилась. Так, после 24 ч все концентрации CQ оказали ингибирующий эффект на выживаемость клеток, хотя 48-часовая инкубация с 10 мкМ CQ привела к статистически значимому увеличению жизнеспособности.

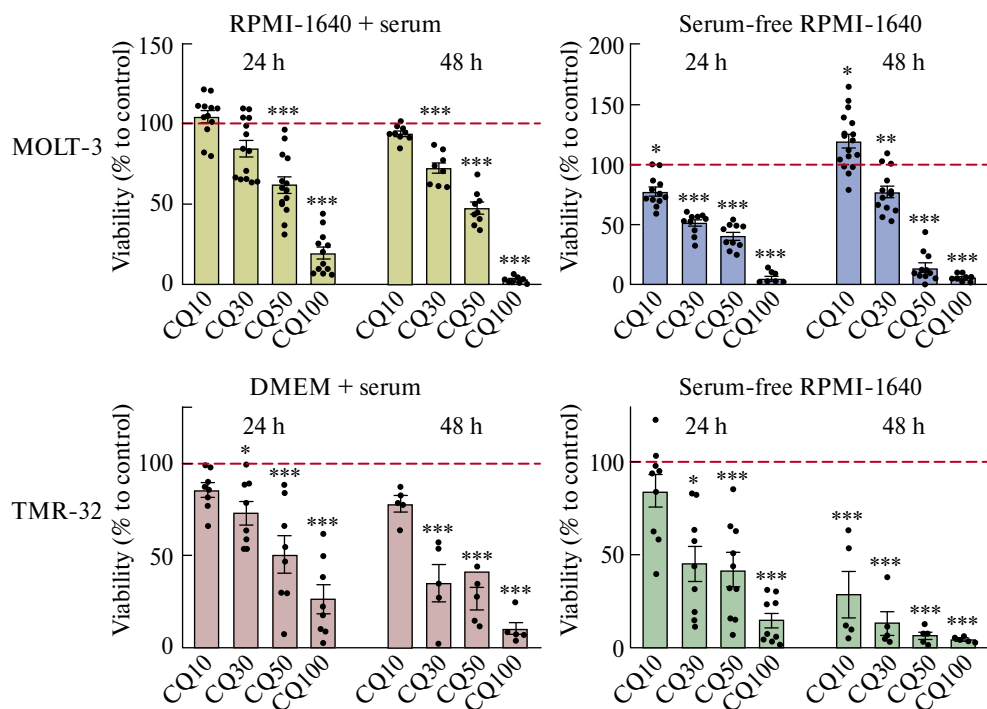


Рис. 1. Жизнеспособность клеток MOLT-3 и IMR-32 после культивирования с 10–100 мкМ CQ в полных и бессывороточных средах в течение 24 и 48 ч. Представлены средние значения $\pm SE$ ($n = 8 - 15$) для каждой линии клеток. Уровень жизнеспособности клеток, растущих в контрольных условиях, принят за 100% и показан в виде красной прерывистой линии. CQ(10–100) – хлорохин в разных концентрациях. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контролем (однофакторный анализ ANOVA для множественных сравнений с апостериорным тестом Даннетта).

Влияние CQ на клетки нейробластомы IMR-32 в целом было сравнимо с таковым на линию MOLT-3, хотя в условиях длительного голодания чувствительность этих клеток ко всем концентрациям CQ была несколько выше (рис. 1).

В целом результаты теста МТТ показали, что концентрациями CQ, которые оказывают значительный ингибирующий эффект на жизнеспособность клеток обеих линий, но не приводят к их полной гибели, являются 30 и 50 мкМ. Поэтому для изучения экспрессии генов апоптоза и аутофагии использовали именно эти концентрации.

Экспрессия генов апоптоза. В клетках линии MOLT-3 в полной ростовой среде уровень экспрессии гена *CASP3*, кодирующего каспазу-3 – ключевой эффектор апоптоза, не отличался от такового в контрольных клетках в присутствии 30 мкМ, но увеличивался под действием 50 мкМ CQ после обработки как в течение 24, так и 48 ч (рис. 2). В среде без сыворотки обе концентрации CQ стимулировали экспрессию гена *CASP3* после 24 ч культивирования, но не оказали влияния после 48 ч инкубации. В клетках IMR-32 содержание *CASP3* мРНК оставалось стабильным после 24-часовой обработки обеими концентрациями CQ независимо от среды инкубации (рис. 2). Как в полной ростовой, так и в бессывороточной средах экспрессия этого гена повышалась только в ответ на добавление 50 мкМ CQ и увеличение времени культивирования до 48 ч.

Уровень экспрессии гена *BAX*, кодирующего проапоптотический белок BAX, в полной среде RPMI-1640 оставался стабильным в клетках MOLT-3 как после 24-часовой, так и после 48-часовой обработки обеими концентрациями CQ (рис. 3). В бес-

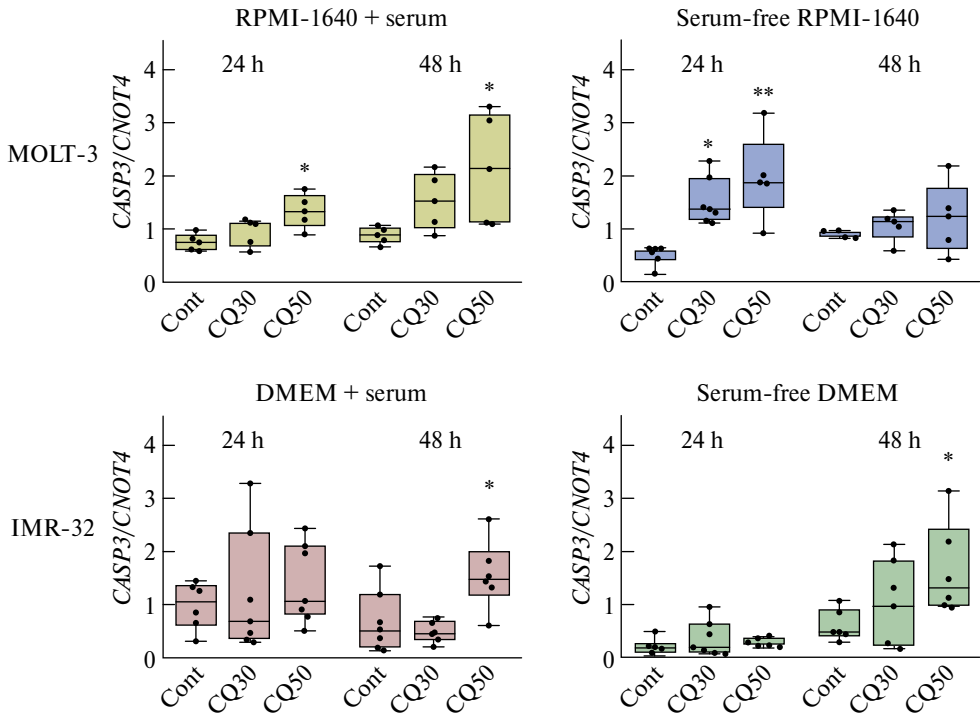


Рис. 2. Влияние 30 и 50 мкМ CQ на относительную экспрессию гена *CASP3* в клетках MOLT-3 и IMR-32 в полной и бессывороточной средах RPMI-1640 и DMEM соответственно после 24- и 48-часовой культивирования. Данные нормализованы относительно референсного гена *CNOT4*. Показаны медианы и межквартильные диапазоны ($n = 5 - 7$). Cont – контроль, CQ30 – 30 мкМ хлорохина, CQ50 – 50 мкМ хлорохина. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем (тест Краскела–Уоллиса для множественных сравнений с апостериорным тестом Данна).

сывороточной среде 24-часовая инкубация как с 30, так и с 50 мкМ CQ привела к увеличению экспрессии гена *BAX*, в отличие от 48-часовой обработки. В клетках IMR-32 уровень *BAX* мРНК не изменился ни в одной из сред после 24-часовой обработки CQ (рис. 3). Однако экспрессия этого гена в клетках нейробластомы увеличивалась после 48-часовой инкубации в присутствии 30 и 50 мкМ CQ в среде с сывороткой и в ответ на обработку 50 мкМ CQ в условиях голодания.

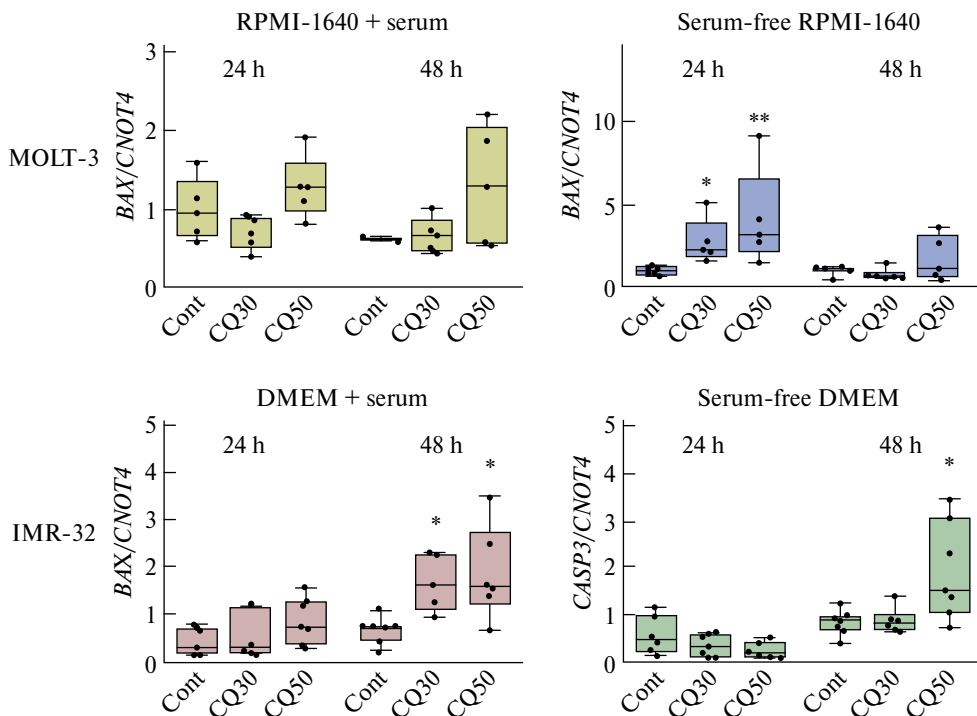


Рис. 3. Изменение экспрессии гена *BAX* в клетках MOLT-3 и IMR-32 после 24- и 48-часовой инкубации с разными концентрациями CQ в средах с сывороткой и без нее. Показаны медианы и межквартильные диапазоны ($n = 5 - 7$). Cont – контроль, CQ30 – 30 мкМ хлорохина, CQ50 – 50 мкМ хлорохина. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем (тест Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

В клетках MOLT-3 уровень мРНК гена *BCL2*, кодирующего антиапоптотический белок Bcl-2, увеличивался в ответ на обработку 50 мкМ CQ в полной ростовой среде и в присутствии обеих концентраций CQ в бессывороточной среде (рис. 4). В клетках IMR-32 экспрессия гена *BCL2* оставалась стабильной в обеих средах, кроме статистически значимого повышения в ответ на обработку 30 мкМ CQ в полной ростовой среде (рис. 4).

Экспрессия генов аутофагии. В клетках MOLT-3 в полной ростовой среде экспрессия гена *ULK1*, кодирующего инициаторный белок аутофагии ULK-1, оставалась стабильной независимо от времени инкубации или концентрации CQ (рис. 5). В среде без сыворотки содержание мРНК этого гена снижалось в присутствии обеих концентраций CQ после 24-часовой обработки, но не отличалось от контроля после 48-часовой. Однако в клетках IMR-32 ни одна из применяемых концентраций CQ не оказала влияния на уровень экспрессии гена *ULK1* ни в одной из сред (рис. 5).

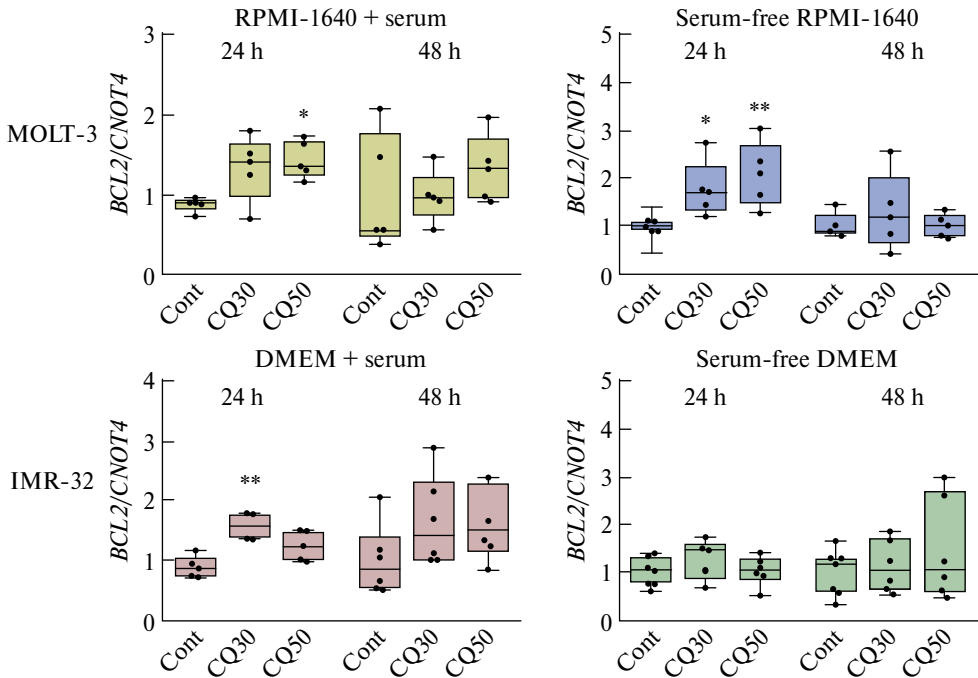


Рис. 4. Влияние CQ на экспрессию гена *BCL2* в клетках линий MOLT-3 и IMR-32 после 24- и 48-часовой инкубации в полных и бессывороточных средах. Показаны медианы и межквартильные диапазоны ($n = 5 - 7$). Cont – контроль, CQ30 – 30 мкМ хлорохина, CQ50 – 50 мкМ хлорохина. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем для клеток каждой линии (тест Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

Экспрессия гена *BECN1*, кодирующего ключевой белок аутофагии Beclin-1, в клетках MOLT-3 увеличивалась в полной ростовой среде после инкубации с 50 мкМ CQ в течение 24 ч, но снижалась под действием обеих концентраций CQ после увеличения времени культивирования (рис. 6). В бессывороточной среде как 30, так и 50 мкМ CQ приводили к повышению продукции мРНК этого гена после 24-часовой инкубации, но были неэффективны после 2 суток. В клетках IMR-32 обе концентрации CQ снижали уровень *BECN1* мРНК в среде с добавлением сыворотки, но не оказали влияния на его экспрессию в бессывороточной среде (рис. 6).

Уровень мРНК гена *MAPLC3B*, кодирующего маркер аутофагосом LC3B, в клетках MOLT-3 увеличивался после инкубации с 50 мкМ CQ течение 48 ч в полной ростовой среде и с обеими концентрациями CQ в течение 24 ч в бессывороточной среде (рис. 7). Однако ни одна из схем обработки CQ не оказала влияния на экспрессию гена *MAPLC3B* в клетках IMR-32 (рис. 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования последних лет показали, что во многих случаях аутофагия является причиной прогрессирования онкологических заболеваний различной природы, а ее высокий уровень коррелирует с низкой выживаемостью пациентов. Поэтому поиску соединений, способных увеличивать чувствительность раковых клеток к индукторам апоптоза путем подавления аутофагии, в последние годы уделяется большое внимание [16, 17]. В настоящей работе было проанализировано влияние ингибитора аутофагии

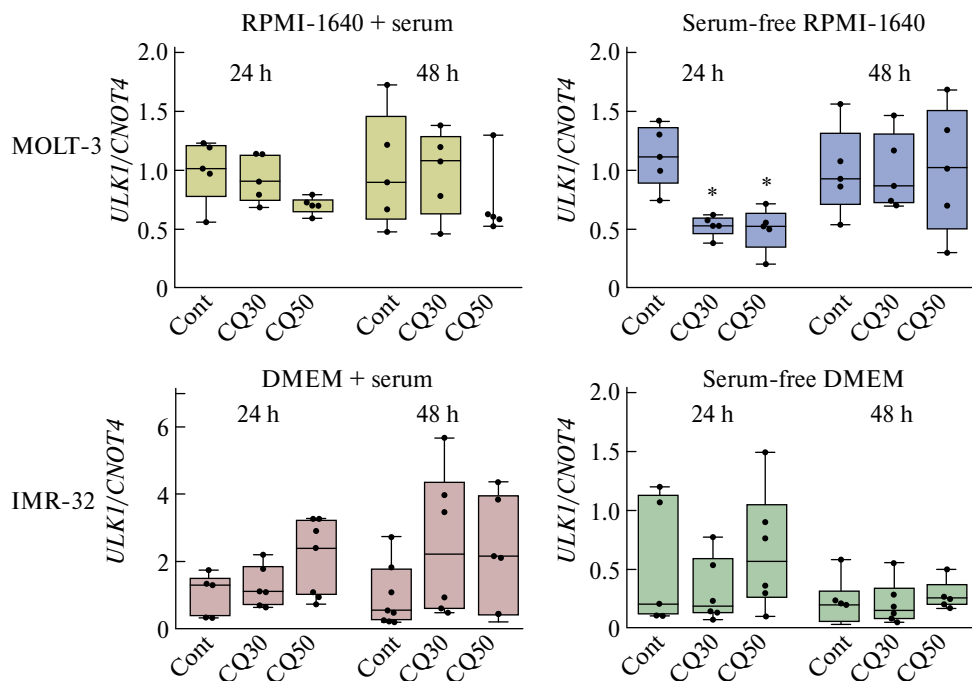


Рис. 5. Уровни мРНК гена аутофагии *ULK1* после обработки клеток MOLT-3 и IMR-32 разными концентрациями CQ в средах с сывороткой и без нее в течение 24 и 48 ч. Показаны медианы и межквартильные диапазоны ($n = 5 - 7$). Cont – контроль, CQ30 – 30 мкМ хлорохина, CQ50 – 50 мкМ хлорохина. * $p < 0.05$ по сравнению с контролем (тест Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

хлорохина (CQ) на клетки двух опухолевых линий – MOLT-3 и IMR-32, культивируемых в полных ростовых средах и в условиях недостатка питательных веществ (в средах без сыворотки), с целью определения его оптимальных концентраций для дальнейшего применения в комбинации с химиотерапевтическими препаратами.

Несколько исследований *in vitro* и *in vivo* показали, что CQ и его аналог HCQ в качестве моноагентов способны эффективно ингибировать аутофагию в опухолевых клетках нескольких типов – мозга [18, 19], щитовидной железы [20], остеосаркомы U2OS [21], молочной железы [22–25], яичников [26], шейки матки человека [21], аденокарциномы эндометрия [27], мочевого пузыря человека [28] и Т-клеточной лейкемии/лимфомы [29]. Введение CQ подавляло рост ортотопической опухоли глиобластомы U87MG [30], гуманизированной опухоли печени с клетками HepG2-GFP [31] и ксенографтной меланомы [32] у мышей.

Сравнительный анализ жизнеспособности клеток MOLT-3 и IMR-32, проведенный в нашей работе, показал, что оптимальными концентрациями CQ, индуцирующими 30–50%-ное снижение жизнеспособности клеток обеих линий как в полной, так и в бессывороточной средах после 24-часовой обработки, являются 30 и 50 мкМ (рис. 1). Увеличение времени инкубации до 48 ч привело к высокому уровню гибели клеток, особенно в условиях сывороточного голодания, поэтому эта схема эксперимента не подходит для дальнейших исследований. В целом эти результаты соответствуют данным, полученным ранее на клетках других типов. Так, концентрации CQ в диапазоне 10–50 мкМ после 24- и 72-часовой обработки были способны подавлять аутофагию в клетках меланомы SK-MEL23 и VMM39 [32] и Т-клеточной лейкемии/лимфомы (ATLL) [29], опу-

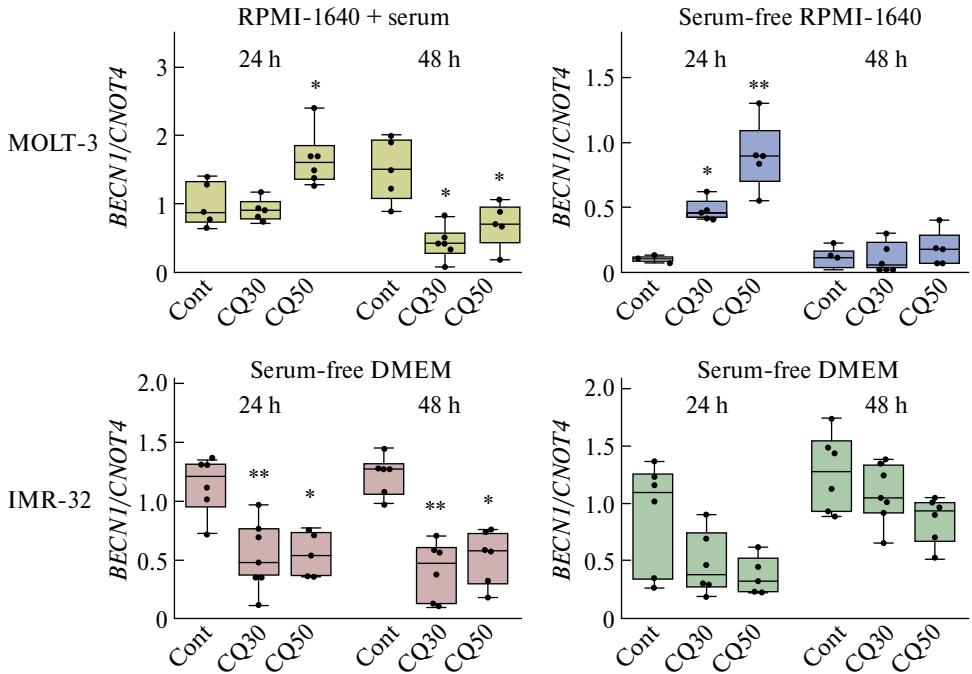


Рис. 6. Влияние 30 и 50 мкМ CQ на экспрессию гена *BECN1* в клетках линий MOLT-3 и IMR-32 после 24- и 48-часовой инкубации в полных и бессывороточных средах. Показаны медианы и межквартильные диапазоны ($n = 5 - 7$). Cont – контроль, CQ30 – 30 мкМ хлорохина, CQ50 – 50 мкМ хлорохина. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем для клеток каждой линии (тест Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

холевых клетках молочной железы MCF-7, Hs578t, MDAMB231 и SUM159PT [23,24], печени HepG2 и Huh7 [31], щитовидной железы TPC1, ATC1 и KTC1 [20], мочевого пузыря RT4, 5637 и T24 [28], яичников [26], а также в первичных культурах стволовых клеток глиобластомы #993, G112SP и #1095 [19] и поджелудочной железы [33]. Более высокая концентрация CQ (100 мкМ), но короткая обработка (2–5 ч) использовалась для ингибирования аутофагии в клетках рака шейки матки HeLa и остеосаркомы U2OS [21]. Более низкие концентрации (0.5–20 мкМ и 24–72 ч) оказывали подобное действие в клетках рака молочной железы Hs578t, MDAMB231 и SUM159PT [22], эндометрия AN3CA, KLE и Ishikawa [27], мозга 794R и AM38R [18].

Во всех этих работах степень подавления аутофагии оценивали по накоплению белков – маркеров ее основных этапов Beclin-1, p62 или LC3-II в клетках. Так, обработка CQ индуцировала увеличение числа аутофагосом и поздних эндосом, сопровождающееся повышением экспрессии белков LAMP (Lysosomal-associated membrane protein 1), p62 или LC3-II в клетках HeLa [21], U2OS [21] и TNBC (Triple negative breast cancer) [22, 24]. CQ или HCQ предотвращали слияние лизосом и индуцировали накопление аутофагосом, p62 и LC3 в клетках рака мочевого пузыря [28] и аденокарциномы эндометрия [27]. Однако CQ не оказал влияния на рост ксенографтной опухоли поджелудочной железы с клетками, полученными от пациентов, и не увеличивал уровень LC3-II в первичных культурах клеток PDAC (Pancreatic duct adenocarcinoma) Panc1, 8988 T and VxPC3 cell lines, хотя и подавлял аутофагию [33].

Действие CQ в клетках не ограничивается ингибированием аутофагии. После попадания в цитоплазму он путем пассивной диффузии распределяется по клеточным

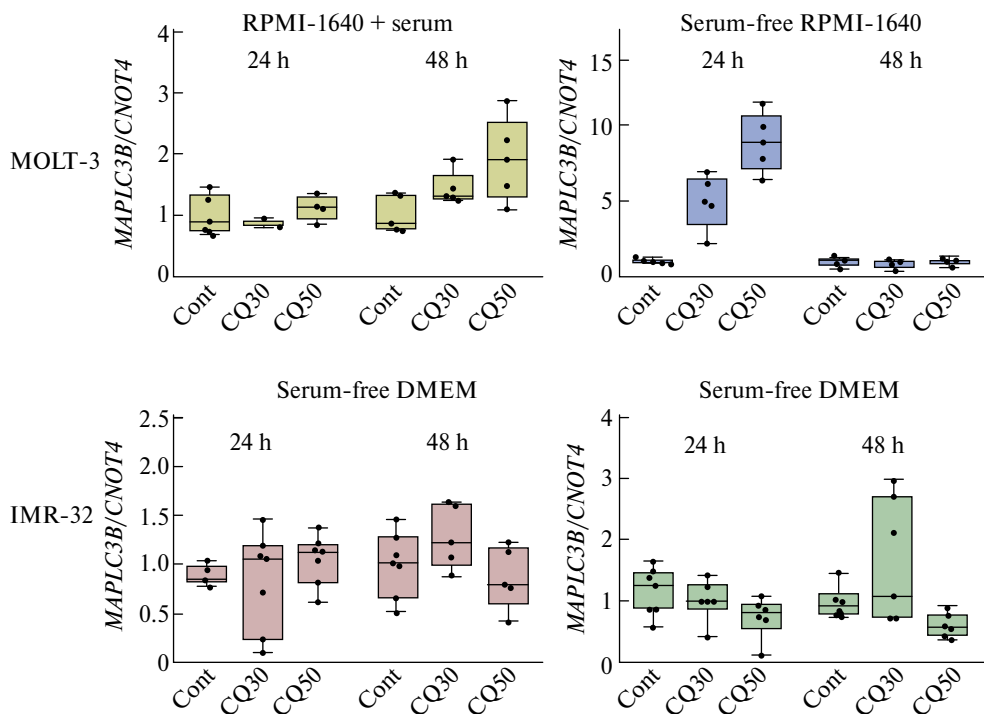


Рис. 7. Экспрессия гена аутофагии *MAP1LC3B* в клетках MOLT-3 и IMR-32 после инкубации с различными концентрациями CQ в разных средах. Показаны медианы и межквартильные диапазоны ($n = 5 - 7$). Cont – контроль, CQ30 – 30 мкМ хлорохина, CQ50 – 50 мкМ хлорохина. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ по сравнению с контролем для клеток каждой линии (тест Краскела–Уоллиса с апостериорным тестом Данна).

структурам, вовлеченным в процессы синтеза и деградации белка – цистернам аппарата Гольджи, эндосомам и лизосомам. В кислой внутренней среде этих органелл он подвергается протонации и вызывает ее защелачивание. В результате подавляется способность ферментов расщеплять поврежденный клеточный материал и блокируется механизм выживания опухолевых клеток, что стимулирует апоптоз [6, 34]. Среди описанных эффектов CQ известна его способность активировать стресс эндоплазматического ретикулума [35], нарушать сигнальные пути хемокинов, увеличивать продукцию активных форм кислорода, повреждать митохондрии, активировать антиопухолевые иммунные реакции, влиять на внутриклеточный баланс кальция [25, 30]. Например, CQ снижал жизнеспособность клеток глиобластомы U87MG путем активации каспазы-3, проапоптотических белков BAX и p53 [30]. Подавление роста клеток меланомы SKMe123 было связано с предотвращением деградации проапоптотического белка PUMA (p53 upregulated modulator of apoptosis) независимо от лизосом [32]. Уменьшение туморогенности клеток PDAC было связано с ингибированием сигнальных путей рецепторов хемокинов CXCL12/CXCR4 и подавлением экспрессии генов плюрипотентности [33]. Обработка CQ раковых клеток печени HepG2 привела к нарушению фазы G0/G1 клеточного цикла, повреждению ДНК, активации каспазы-3 и проапоптотического белка Vim, расщеплению PARP (Poly (ADP-ribose) polymerase), потере митохондриального мембранного потенциала [31]. В клетках рака мочевого пузыря человека CQ или HCQ ингибировали пролиферацию и формирование колоний, индуцировали фрагментацию ДНК, расщепление PARP, активацию каспаз 7 и 3 [28]. Ингибирование

пролиферации и формирования колоний клеток из-за увеличения популяции апоптотических клеток было описано и в клетках аденокарциномы эндометрия [27].

Наша работа была посвящена изучению возможных изменений экспрессии генов апоптоза и аутофагии как отсроченных ответов клеток на действие CQ, свидетельствующих о глубоких нарушениях транскрипционных механизмов. Несмотря на схожий профиль снижения жизнеспособности (рис. 1), экспрессия этих генов в клетках линий MOLT-3 и IMR-32 сильно различалась. Наиболее значительные изменения экспрессии генов наблюдались в клетках MOLT-3, культивируемых с CQ в бессывороточной среде. В них фиксировались изменения экспрессии как генов апоптоза – увеличение уровней мРНК *CASP3* и *BAX* (Рис. 2–4), так и аутофагии – снижение содержания мРНК *ULK1*, но увеличение экспрессии *BECN1* и *MAPLC3B* (рис. 5–7). Клетки IMR-32 оказались более устойчивы как к действию CQ, так и к условиям сывороточного голодания. Так, ген *CASP3* в клетках MOLT-3 активировался уже после 24-часовой инкубации с CQ в обеих средах, в то время как в клетках IMR-32 – только после инкубации в течение 48 ч (рис. 2). Однако, в отличие от клеток MOLT-3, в клетках IMR-32 после 48 ч культивирования в полной ростовой среде наряду с геном *CASP3* увеличивалась экспрессия гена *BAX* (рис. 3). Кроме того, влияние CQ на клетки IMR-32, по-видимому, не связано с процессами аутофагии. Например, из трех протестированных генов аутофагии в этих клетках изменялась экспрессия только гена *BECN1* (рис. 6).

Интересно, что одновременно с проапоптотическим геном *BAX* в клетках MOLT-3 увеличивалась экспрессия антиапоптотического гена *BCL2*. Причина такого феномена неясна. Возможно, это свидетельствует о каком-либо компенсаторном процессе, инициирующемся в клетках для предотвращения апоптоза. Стимуляция гена *BCL2* может быть связана с активностью гена *BECN1*. Известно, что взаимодействие белков Bcl-2 и Beclin-1 на наружной мембране митохондрий ингибирует аутофагию, в то время как фосфорилирование Beclin-1 протеинкиназами DAP (Death-associated protein kinase) приводит к диссоциации комплекса Bcl-2/Beclin-1 и конкурентному образованию пары Bcl-2-Bax, что активирует аутофагию [12, 36, 37]. Физическое взаимодействие Beclin-1 и Bcl-2 на мембране митохондрий регулируется протеазами кальпаинами, одними из ключевых эффекторов апоптоза, способными расщеплять белки-мишени и структурные компоненты клеток. Кроме того, многочисленные работы последних лет показали, что Beclin-1 может выполнять в клетках и другие функции, кроме аутофагии. После расщепления каспазами белка Beclin-1 на N- и C-терминальные фрагменты его C-терминальный фрагмент может транслоцироваться к митохондриальной мембране для индукции выхода цитохрома C. Более того, этот фрагмент Beclin-1 может облегчать транслокацию Bax к митохондриям, таким образом снижая интенсивность аутофагии. Таким образом, Beclin-1 регулирует процессы апоптоза и аутофагии, опосредуя обратную связь между ними [12, 36, 37].

Анализируя результаты нашей работы, можно предположить, что менее продолжительное воздействие CQ на клетки MOLT-3 в условиях сывороточного голодания изменяет экспрессию маркеров аутофагии и проницаемость мембран митохондрий посредством активации белка BAX и каспаз, что приводит к апоптозу. В случае длительного голодания гибель клеток характеризуется независимым от аутофагии механизмом. Более того, стабильная экспрессия генов апоптоза после 48-часовой обработки CQ даже после удаления сыворотки из среды свидетельствует о том, что время голодания является фактором, который может сдвигать состояние клеток от гибели к стимуляции защитных механизмов аутофагии. Нечувствительность клеток IMR-32 к CQ или недостатку питательных веществ также можно объяснить активацией компенсаторных или защитных механизмов. Так, в недавних исследованиях было показано, что аутофагия, индуцируемая коротким голоданием, увеличивала чувствительность клеток к апоптозу в случае применения антиопухолевых препаратов, а апоптотические эффекты сильно снижались после применения ингибиторов аутофагии. Однако в случае длительного голодания аутофагия, наоборот, провоцировала выживаемость клеток [18, 38].

ВКЛАДЫ АВТОРОВ

Идея исследования и дизайн эксперимента (Н. И. А.), проведение экспериментов и сбор материала для исследования (А. В. Т., Е. Д. П., Т. В. С., О. В. Н.), обработка результатов (А. В. Т., Е. Д. П., О. В. Н., Н. И. А.), написание и редактирование текста (Н. И. А.).

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 23-25-00316 (<https://rscf.ru/project/23-25-00316/>) с использованием оборудования центра коллективного пользования Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Статья не содержит описания исследований с участием людей или с использованием животных в качестве экспериментальных объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы настоящей работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chern YJ, Tai IT* (2020) Adaptive response of resistant cancer cells to chemotherapy. *Cancer Biol Med* 17(4): 842–863.
<https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2020.0005>
2. *Weng X, Zeng WH, Zhong LY, Xie LH, Ge WJ, Lai Z, Qin Q, Liu P, Cao DL, Zeng X* (2024) The molecular mechanisms of chemotherapeutic resistance in tumors (Review). *Oncol Rep* 52(5): 157.
<https://doi.org/10.3892/or.2024.8816>
3. *Fong W, To KKW* (2021) Repurposing chloroquine analogs as an adjuvant cancer therapy. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov* 16(2): 204–221.
<https://doi.org/10.2174/1574892815666210106111012>
4. *Mohsen S, Sobash PT, Algwaiz GF, Nasef N, Al-Zeidaneen SA, Karim NA* (2022) Autophagy agents in clinical trials for cancer therapy: A brief review. *Curr Oncol* 29(3): 1695–1708.
<https://doi.org/10.3390/curroncol29030141>
5. *Agalakova NI* (2024) Chloroquine and chemotherapeutic compounds in experimental cancer treatment. *Int J Mol Sci* 25(2): 945.
<https://doi.org/10.3390/ijms25020945>
6. *De Sanctis JB, Charris J, Blanco Z, Ramirez H, Martinez GP, Mijares MR* (2023) Molecular mechanisms of chloroquine and hydroxychloroquine used in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 23(10): 1122–1144.
<https://doi.org/10.2174/1871520622666220519102948>
7. *Hassan AM, Zhao Y, Chen X, He C* (2024) Blockage of autophagy for cancer therapy: A comprehensive review. *Int J Mol Sci*. 25(13): 7459.
<https://doi.org/10.3390/ijms25137459>
8. *Noguchi M, Hirata N, Tanaka T, Suizu F, Nakajima H, Chiorini JA* (2020) Autophagy as a modulator of cell death machinery. *Cell Death Dis* 11: 517.
<https://doi.org/10.1038/s41419-020-2724-5>
9. *Russell RC, Guan KL* (2022) The multifaceted role of autophagy in cancer. *EMBO J* 41(13): e110031.
<https://doi.org/10.15252/embj.2021110031>
10. *Hama Y, Ogasawara Y, Noda NN* (2023) Autophagy and cancer: Basic mechanisms and inhibitor development. *Cancer Sci* 114(7): 2699–2708.
<https://doi.org/10.1111/cas.15803>
11. *He L, Zhang J, Zhao J, Ma N, Kim SW, Qiao S, Ma X* (2018) Autophagy: The Last Defense against Cellular Nutritional Stress. *Adv Nutr* 9(4): 493–504.
<https://doi.org/10.1093/advances/nmy011>

12. *Prerna K, Dubey VK* (2022) Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding. *Int J Biol Macromol* 204: 258–273.
<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.02.005>
13. *Skrzeszewski M, Maciejewska M, Kobza D, Gawrylak A, Kieda C, Waś H* (2024) Risk factors of using late-autophagy inhibitors: Aspects to consider combined with anticancer therapies. *Biochem Pharmacol* 225: 116277.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2024.116277>
14. *Trubnikova AD, Prokopenko ES, Sokolova TV, Nadei OV, Agalakova NI* (2023) Expression of apoptosis and autophagy genes in HeLa and Hek 293 cells under conditions of nutrient deprivation. *J Evol Biochem Phys* 59: 2304–2314.
<https://doi.org/10.1134/S0022093023060315>
15. *Racz GA, Nagy N, Tovari J, Apati A, Vertessy BG* (2021) Identification of new reference genes with stable expression patterns for gene expression studies using human cancer and normal cell lines. *Sci Rep* 11: 19459.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-98869-x>
16. *Zhang T, Yu J, Cheng S, Zhang Y, Zhou CH, Qin J, Luo H* (2023) Research progress on the anticancer molecular mechanism of targets regulating cell autophagy. *Pharmacology* 108(3): 224–237.
<https://doi.org/10.1159/000529279>
17. *Rahman MA, Saikat AS, Rahman MS, Islam M, Parvez MA, Kim B* (2023) Recent update and drug target in molecular and pharmacological insights into autophagy modulation in cancer treatment and future progress. *Cells* 12(3): 458.
<https://doi.org/10.3390/cells12030458>
18. *Mulcahy Levy JM, Zahedi S, Griesinger AM, Morin A, Davies KD, Aisner DL, Kleinschmidt-DeMasters BK, Fitzwalter BE, Goodall ML, Thorburn J, Amani V, Donson AM, Birks DK, Mirsky DM, Hankinson TC, Handler MH, Green AL, Vibhakar R, Foreman NK, Thorburn A* (2017) Autophagy inhibition overcomes multiple mechanisms of resistance to BRAF inhibition in brain tumors. *Elife* 6: e19671.
<https://doi.org/10.7554/eLife.19671>
19. *Müller A, Weyerhäuser P, Berte N, Jonin F, Lyubarskyy B, Sprang B, Kantelhardt SR, Salinas G, Opitz L, Schulz-Schaeffer W, Giese A, Ella L, Kim EL* (2023) Concurrent Activation of Both Survival-Promoting and Death-Inducing Signaling by Chloroquine in Glioblastoma Stem Cells: Implications for Potential Risks and Benefits of Using Chloroquine as Radiosensitizer. *Cells* 12(9): 1290.
<https://doi.org/10.3390/cells12091290>
20. *Kazakova D, Shimamura M, Kurashige T, Hamada K, Nagayama Y* (2022) Re-evaluation of the role of autophagy in thyroid cancer treatment. *Endocr J* 69(7): 847–862.
<https://doi.org/10.1507/endocr.EJ22-0017>
21. *Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema KJ, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F* (2018) Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* 48: 1435–1455.
<https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1474314>
22. *Choi DS, Blanco E, Kim YS, Rodriguez AA, Zhao H, Huang TH, Chen CL, Jin G, Landis MD, Burey LA, Qian W, Granados SM, Dave B, Wong HH, Ferrari M, Wong ST, Chang JC* (2014) Chloroquine eliminates cancer stem cells through deregulation of Jak2 and DNMT1. *Stem Cells* 32: 2309–2323.
<https://doi.org/10.1002/stem.1746>
23. *Duarte D, Vale N* (2016) New trends for antimalarial drugs: Synergism between antineoplastics and antimalarials on breast cancer cells. *Biomolecules* 10: 1623.
<https://doi.org/10.3390/biom10121623>
24. *Liang DH, Choi DS, Ensor JE, Kaipparattu BA, Bass BL, Chang JC* (2016) The autophagy inhibitor chloroquine targets cancer stem cells in triple negative breast cancer by inducing mitochondrial damage and impairing DNA break repair. *Cancer Lett* 376: 249–258.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.04.002>
25. *El-Gowily AH, Loutfy SA, Ali EM, Mohamed TM, Mansour MA* (2021) Tioconazole and chloroquine act synergistically to combat doxorubicin-induced toxicity via inactivation of PI3K/AKT/mTOR signaling mediated ROS-dependent apoptosis and autophagic flux inhibition in MCF-7 breast cancer cells. *Pharmaceuticals (Basel)* 14(3): 254.
<https://doi.org/10.3390/ph14030254>
26. *Pagotto A, Pilloto G, Mazzoldi EL, Nicoletto MO, Frezzini S, Pastò A, Amadori A* (2017) Autophagy inhibition reduces chemoresistance and tumorigenic potential of human ovarian cancer stem cells. *Cell Death Dis* 8(7): e2943.
<https://doi.org/10.1038/cddis.2017.327>

27. Fukuda T, Oda K, Wada-Hiraike O, Sone K, Inaba K, Ikeda Y, Miyasaka A, Kashiyama T, Tanikawa M, Arimoto T, Kuramoto H, Yano T, Kawana K, Osuga Y, Fujii T (2015) The anti-malarial chloroquine suppresses proliferation and overcomes cisplatin resistance of endometrial cancer cells via autophagy inhibition. *Gynecol Oncol* 137(3): 538–545.
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2015.03.053>
28. Lin YC, Lin JF, Wen SI, Yang SC, Tsai TF, Chen HE, Chou KY, Hwang TI (2017) Chloroquine and hydroxychloroquine inhibit bladder cancer cell growth by targeting basal autophagy and enhancing apoptosis. *Kaohsiung J Med Sci* 33(5): 215–223.
<https://doi.org/10.1016/j.kjms.2017.01.004>
29. Fauzi YR, Nakahata S, Chilmi S, Ichikawa T, Nueangphuet P, Yamaguchi R, Nakamura T, Shimoda K, Morishita K (2021) Antitumor effects of chloroquine/hydroxychloroquine mediated by inhibition of the NF- κ B signaling pathway through abrogation of autophagic p47 degradation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *PLoS One* 16(8): e0256320.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0256320>
30. Kim EL, Wüstenberg R, Rübsam A, Schmitz-Salue C, Warnecke G, Bücker EM, Pettkus N, Speidel D, Rohde V, Schulz-Schaeffer W, Deppert W, Giese A (2010) Chloroquine activates the p53 pathway and induces apoptosis in human glioma cells. *Neuro-Oncol* 12(4): 389–400.
<https://doi.org/10.1093/neuonc/nop046>
31. Hu T, Li P, Luo Z, Chen X, Zhang J, Wang C, Chen P, Dong Z (2016) Chloroquine inhibits hepatocellular carcinoma cell growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 35(1): 43–49.
<https://doi.org/10.3892/or.2015.4380>
32. Lakhter AJ, Sahu RP, Sun Y, Kaufmann WK, Androphy EJ, Travers JB, Naidu SR (2013) Chloroquine promotes apoptosis in melanoma cells by inhibiting BH3 domain-mediated PUMA degradation. *J Invest Dermatol* 133(9): 2247–2254.
<https://doi.org/10.1038/jid.2013.56>
33. Balic A, Sørensen MD, Trabulo SM, Sainz B Jr, Cioffi M, Vieira CR, Miranda-Lorenzo I, Hidalgo M, Kleeff J, Erkan M, Heeschen C (2014) Chloroquine targets pancreatic cancer stem cells via inhibition of CXCR4 and hedgehog signaling. *Mol Cancer Ther* 13(7): 1758–1771.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0948>
34. Niemann B, Puleo A, Stout C, Markel J, Boone BA (2022) Biologic functions of hydroxychloroquine in disease: from COVID-19 to cancer. *Pharmaceutics* 14: 2551.
<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122551>
35. Nakano K, Masui T, Yogo A, Uchida Y, Sato A, Kasai Y, Nagai K, Anazawa T, Kawaguchi Y, Uemoto S (2020) Chloroquine induces apoptosis in pancreatic neuro-endocrine neoplasms via endoplasmic reticulum stress. *Endocr Relat Cancer* 27: 431–439.
<https://doi.org/10.1530/ERC-20-0028>
36. Zalckvar E, Berissi H, Eisenstein M, Kimchi A (2009) Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 and Bcl-XL. *Autophagy* 5(5): 720–722.
<https://doi.org/10.4161/auto.5.5.8625>
37. Ye J, Zhang J, Zhu Y, Wang L, Jiang X, Liu B, He G. (2023) Targeting autophagy and beyond: Deconvoluting the complexity of Beclin-1 from biological function to cancer therapy. *Acta Pharm Sin B*. 13(12): 4688–4714.
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.08.008>
38. Mattiolo P, Yuste VJ, Boix J, Ribas J (2015) Autophagy exacerbates caspase-dependent apoptotic cell death after short times of starvation. *Biochem Pharmacol* 98(4): 573–586.
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2015.09.021>

Effect of Chloroquine on Expression of Apoptosis and Autophagy Genes in Molt-3 and Imr-32 Cells

E. S. Prokopenko^{a, b}, T. V. Sokolova^a, O. V. Nadei^a, A. D. Trubnikova^a,
and N. I. Agalakova^{a, *}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry of Russian Academy of Sciences, Saint-Petersburg*

^b*Saint-Petersburg State University, Saint-Petersburg, Russia*

*E-mail: nagalak@mail.ru

The goal of the study was to compare an influence of chloroquine (CQ) on expression of apoptosis and autophagy genes in the cells of two tumor cells – leukemia MOLT-3 and neuroblastoma IMR-32 cultured in complete growth and serum-free RPMI-1640 and DMEM media, respectively, for 24 and 48 hours. The viability of cells was evaluated by MTT method, gene expression – by real time PCR. For MTT test, the cells were incubated with 10–100 μM CQ. The expression of apoptosis (*CASP3*, *BAX*, *BCL2*) and autophagy (*ULK1*, *BECN1*, *MAP1LC3B*) genes was studied using 30 and 50 μM CQ, which exerted considerable inhibitory effect on viability of cells of both lines, but did not promote their complete death. The sensitivity of both cell lines to CQ was higher in serum-free medium, however, the expression of apoptosis and autophagy genes substantially differed between them. In MOLT-3 cells, mRNA levels of pro-apoptotic genes *CASP3* and *BAX* increased after 24-h incubation in serum-free medium, whereas in IMR-32 cells the expression of these genes increased only after 48-h in the presence of higher CQ concentration. In the cells of both lines 24-h CQ treatment resulted in enhanced expression of anti-apoptotic gene *BCL2*. In MOLT-3 cells, the absence of nutrients different combinations stimulated the genes of all three autophagy stages *ULK1*, *BECN1* и *MAP1LC3B*, but none of applied treatment schemes did not affect the expression of *ULK1* and *MAP1LC3B* genes in IMR-32 cells. Overall, 24-h culture with CQ under conditions of serum starvation appears to be more optimal for modulation of autophagy in MOLT-3 cells. In IMR-32 cells, CQ does not exert considerable influence on expression of autophagy genes, and their decreased viability is associated with activation of other mechanisms.

Keywords: MOLT-3, IMR-32, cell viability, apoptosis genes, autophagy genes