

На правах рукописи

КИРСАНОВ Кирилл Игоревич

**ИНДУКЦИЯ ОПУХОЛЕВЫХ КЛОНОВ У ЛИЧИНОК ДРОЗОФИЛЫ
КАНЦЕРОГЕНАМИ МЛЕКОПИТАЮЩИХ**

Специальность 14.01.12 – онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

МОСКВА

2011

Работа выполнена в лаборатории механизмов химического канцерогенеза
НИИ Канцерогенеза Учреждения Российской академии медицинских наук
Российский онкологический научный центр имени Н.Н.Блохина РАМН
(директор – академик РАН и РАМН, д.м.н., проф. М.И.Давыдов)

Научный руководитель:

Доктор медицинских наук,
профессор

Белицкий Геннадий Альтерович

Официальные оппоненты:

Доктор биологических наук,
профессор

Ревазова Юлия Анатольевна

Доктор медицинских наук,
профессор

Бухман Владимир Михайлович

Ведущая организация:

Федеральное государственное
учреждение НИИ онкологии им.
Н.Н.Петрова

Защита диссертации состоится «03»_июня_2011 года в_14_ часов на
заседании диссертационного совета Д.001.017.01 РОНЦ имени Н.Н.Блохина
РАМН по адресу: 115478, Москва, Каширское шоссе, 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке РОНЦ им.
Н.Н.Блохина РАМН.

Автореферат разослан «_29_»__апреля___2011 года.

Ученый секретарь диссертационного совета

д.м.н., профессор

Ю.А. Барсуков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Принцип профилактической направленности является основополагающим в онкологической практике. По данным ВОЗ, при правильном проведении профилактических мероприятий можно предупреждать до 33% всех потенциальных случаев рака. Задача первичной профилактики злокачественных новообразований заключается в предупреждении действия канцерогенных агентов на уровне популяции. Среди этих агентов большую роль играют химические канцерогенные соединения, своевременное распознавание которых представляет собой важную задачу. Поскольку большинство канцерогенов обладают генотоксическими свойствами, наиболее эффективным методом их выявления является тестирование в соответствующих биологических системах. Основные принципы биологического тестирования химических соединений на мутагенность были сформулированы в начале 70-х годов прошлого века. Эти принципы основаны на идее создания батареи тестов, которые позволяют регистрировать различные типы генетических изменений, и в то же время являются достаточно экономичными.

Одним из перспективных краткосрочных тестов является SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) на дрозофиле, разработанный Г.А.Белицким и Е.М.Ховановой в середине 70-х годов на основании данных о способности химических канцерогенов увеличивать частоту появления соматических мозаичных клонов. К настоящему времени показано, что тест на соматический мутагенез и рекомбинацию чувствителен к широкому спектру канцерогенов млекопитающих и позволяет не только выявлять все типы нарушений ДНК, но и дискриминировать их.

Исследования по биотестированию, предназначенные для экстраполяции данных на более сложные организмы, требуют знания механизмов активации и дезактивации канцерогенных соединений, особенностей повреждения и репарации ДНК в данной системе, особенностей роста трансформированных клеток. *D.melanogaster* является классическим хорошо изученным объектом исследований молекулярных биологов и генетиков. Наличие близких гомологов генов-супрессоров опухолевого роста и онкогенов у дрозофилы и млекопитающих позволяет моделировать процессы индукции и прогрессии опухолевого клона в экспериментах на линиях дрозофилы, имеющих различные генетические модификации. Кроме того, эксперименты на данной модельной системе несложны в выполнении и относительно дешевы.

В 2001 году Р.А.Сидоровым и соавторами впервые была разработана модификация SMART, в которой показателем мутагенного действия агента является не изменения структуры или окраски нормального органа, а образование опухоли –

процесса, гораздо более приближенного к канцерогенезу. Данный метод биотестирования сочетает в себе ряд важных свойств, которые выделяют его из многих других, предложенных ранее. Во-первых в основе данного метода лежит нарушение функции гена-супрессора *wts*, мутации которого с высокой частотой определяются в клетках опухолей человека. Во-вторых, процесс образования опухолевых клонов включает в себя помимо индукции первичной мутации еще и процессы, связанные с выживанием и прогрессией опухолевого клона.

Несмотря на то, что тест для скрининга бластомогенной активности химических соединений на гетерозиготах *wts* был создан несколько лет назад, и его перспективность была отмечена в ряде лабораторий мира, он пока относится к категории развивающихся и нуждается в дальнейшей верификации на более широком круге канцерогенов млекопитающих. Другим направлением совершенствования данного теста является повышение его разрешающей способности. Все это потребовало углубленного изучения механизмов возникновения мутаций *wts/wts* и роли p53 в их элиминации, а также поиска подходов к повышению разрешающей способности теста путем внесения в клетку ряда мутантных супрессоров. Решению этих вопросов и посвящена данная работа, что делает ее обоснованным и актуальным исследованием в области экспериментальной онкологии.

Основные цели и задачи исследования

Целями данного исследования были: верификация теста SMART на бластомогенную активность канцерогенных соединений с различным механизмом повреждения ДНК, усовершенствование теста с использованием современных молекулярно-биологических подходов модулирования активности генов, участвующих в регуляции пролиферации, анализ функциональной гомологии гена-супрессора опухолевого роста дрозофилы и человека. В соответствии с основными целями исследования были поставлены следующие задачи:

1. Провести сравнительный анализ частоты образования спонтанных и индуцированных опухолевых клонов мутантных аллелей wts^{P4} и wts^{P2} .
2. Исследовать влияние канцерогенных соединений разных химических классов с различным механизмом повреждения ДНК на частоту формирования опухолевых клонов *wts/wts*
3. Провести исследование мутагенной и потенциальной канцерогенной активности не изученных ранее классических и новых узкобороздочных лигандов.
4. Изучить возможность повышения эффективности теста путем сочетания у одной особи мутаций по нескольким генам-супрессорам.

5. Изучить влияние ингибирования Dmp53 методом РНК-интерференции на частоту появления спонтанных и индуцированных опухолевых клонов;
6. Оценить функциональную гомологию гена-супрессора p53 человека, интегрированного в геном дрозофилы, и Dmp53 по их влиянию на частоту возникновения спонтанных и индуцированных химическими канцерогенами опухолей wts/wts.
7. Разработать метод визуализации соматических опухолевых клонов wts у личинок с перспективой создания системы их автоматизированного подсчёта.

Научная новизна

Впервые проведена сравнительная характеристика гетерозигот wtsP2/+ и wtsP4/+ по частоте формирования опухолевых клонов при спонтанном и индуцированном мутагенезе; впервые изучено влияние накопления мутаций по нескольким генам-супрессорам опухолевого роста на частоту образования трансформированных клонов; впервые исследовано влияние РНК-интерференции Dmp 53 на частоту образования опухолевых клонов и проведена оценка применимости данного метода ингибирования экспрессии генов для повышения чувствительности теста; впервые создана трансгенная модель, несущая мутантный по 234 кодону аллель p53 человека, и оценено влияние экспрессии этого гена на частоту формирования опухолей у дрозофилы; впервые удалось визуализировать опухолевый клон wts на стадии личиночного развития плодовой мушки.

Апробация работы

Диссертация апробирована и рекомендована к защите 27 декабря 2010 года на совместной научной конференции лабораторий Отдела химического канцерогенеза, лабораторий Отдела трансформирующих генов опухоли, лаборатории Механизмов прогрессии эпителиальных опухолей, лаборатории Молекулярной эндокринологии, лаборатории цитогенетики НИИ Канцерогенеза РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 9 печатных работ, в том числе 3 статьи опубликованы в журналах, рекомендованных ВАК МОН РФ соискателям ученой степени кандидата биологических наук.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 125 страницах машинописного текста, содержит 24 рисунка, 15 таблиц. Состоит из глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», «Выводы», «Список литературы».

Список литературы содержит 196 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы посвящен истории создания экспресс-тестов для выявления канцерогенов млекопитающих на дрозофиле и сравнительной оценке их эффективности. Подробно рассмотрены сильные и слабые стороны каждой из описанных систем, показано развитие этих методических подходов в РОНЦ и других исследовательских центрах. Описаны основные типы нарушений ДНК при воздействии химических канцерогенных агентов и возможности детекции этих нарушений при помощи тестов на дрозофиле. Во второй части обзора описаны особенности активации проканцерогенов в модельных системах, указаны факторы, влияющие на чувствительность SMART. Третья часть обзора посвящена основам моделирования канцерогенеза на дрозофиле.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы следующие методы исследования: тест на соматический мутагенез и рекомбинацию на дрозофиле в нескольких модификациях, бактериальный тест Эймса на мутагенную активность, молекулярное клонирование, полимеразная цепная реакция, трансформация бактериальных клеток, выделение ДНК и РНК из тканей дрозофилы, обратная транскрипция, определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, микроинъекция плазмиды в ранние эмбрионы дрозофилы, выделение и препаративное окрашивание имагинальных дисков и слюнных желез из личинок дрозофилы, флуоресцентная микроскопия, ингибирование активности генов при помощи РНК-интерференции, статистическая обработка данных.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование чувствительности тест-системы к химическим канцерогенам разных классов.

У дрозофилы ген *wts* необходим для контроля пролиферации клеток и нормального морфогенеза. Мутация в *wts* приводит к гипертрофии апикальной части эпителиальных клеток имагинальных дисков и их избыточной пролиферации [Bryant P.J. et al., 1994, Xu T et al, 2005], что при развитии особи в имаго проявляется в наличии опухолевых клонов. Однако не все мутантные по *wts* линии проявляют одинаковую бластомогенную активность.

В рамках данного исследования было изучено влияние мутации гена *wts*^{P4} на частоту образования гомозиготных опухолевых клонов при спонтанном и

индуцированном мутагенезе у гетерозигот $wts^{P4/+}$. Данный аллель впервые использовался в тесте на соматические мутации и рекомбинацию. Показано, что при его использовании частота опухолей при индукции одним и тем же генотоксическим агентом эквивалентной концентрации возрастает практически в 2 раза по сравнению с частотой опухолей у особей, несущих Р2-аллель. Существенно, что уровень спонтанного мутагенеза при использовании обоих аллелей был примерно одинаковым.

Для дальнейшей верификации SMART на гетерозиготах по wts в настоящем исследовании были использованы соединения нескольких химических классов, различных по типу вызываемого ими повреждения участков макромолекулы ДНК: 1) полициклические ароматические углеводороды, нитрополиарены и аминоазобензолы, электрофильные метаболиты которых образуют аддукты; 2) производное нитрозомочевины, аликилирующее ДНК; 3) производные платины, образующие внутрицепочечные сшивки ДНК; 4) бифункциональные хлорэтиламины, вызывающие как образование сшивок, так и аддуктов; 5) соединение, интеркалирующее между основаниями ДНК-дуплекса, 6) соединения, связывающиеся с ДНК по узкой бороздке за счёт образования водородных и ван-дер-ваальсовых связей. В качестве контролей на ложноположительный эффект использовались следующие неканцерогенные соединения: ДЭАБ¹, хризен, фенантрен, антрацен и 1234-ДБА.

Из табл.1 видно, что статистически значимое увеличение частоты появления опухолевых клонов у гетерозигот wts^{P4} наблюдалось при действии канцерогенов разных химических классов, однако ни один класс не имел преимущественной способности индуцировать эти клоны. Практически одинаковый уровень повышения частоты опухолей относительно контроля показали нитрополиарены 1-НП и 1,2-НФ, интеркалятор бромистый этидий и полициклические углеводороды (ПАУ) -БП и 1,2,5,6-ДБА. Более высокие, но также одинаковые показатели дали проканцероген из группы метилированных ПАУ 20-МХ и прямой метилирующий агент араноза. Еще более активными оказались проканцерогенный табакоспецифический нитрозамин ННК и генотоксическое производное платины – оксоплатин. Наиболее мутагенными в этом эксперименте были циклоплатам, не требующий метаболической активации, и проканцероген ДМБА.

¹ Список сокращений. БП–бенз(а)пирен, ДМБА- 7,12-диметилбенз(а)антрацен, 1234-ДБА – 1,2,3,4-добензантрацен, 1256-ДБА – 1,2,5,6-добензантрацен, ДМСО - диметилсульфоксид, ДЭАБ - диэтиламиноазобензол, 3-МеДАБ- 3-метил-4-диметиламиноазобензол, 20-МХ - 20-метилхолантрен, ННК–4-(метилнитрозамино)-1-(3-пиридин)-1-бутанон, ННН - N'-нитрозонорникотин, 1-НП- 1-нитропирен, 2-НФ- 2-нитрофлуорен, ОААТ - ортоаминоазотолуол, ПАУ - полициклические углеводороды, Dmp53 – *Drosophila melanogaster* p53, wts – warts, SMART - Somatic Mutation and Recombination Test.

Из табл.1 также видно, что ни один из известных типов повреждения ДНК не имеет преимуществ по частоте индукции опухолей wtsP4. Агенты, дающие массивные аддукты ДНК (ДМБА), не отличались по этому параметру от тех, которые вызывают поперечные сшивки (цисплатин) или преимущественно метилируют основания (араноза).

Действие прямых канцерогенов сарколизина и аранозы оказалось слабее ожидавшегося. Это может быть связано с их высокой реакционной способностью, вследствие чего они инактивировались компонентами среды и доходили до клеток имагинальных дисков в низкой концентрации.

Мы не обнаружили также количественной корреляции между канцерогенной активностью отдельных соединений у грызунов и частотой индукции опухолей этими соединениями у дрозофилы. Это хорошо видно на примере проканцерогенных ПАУ – БП, 20-МХ и ДМБА. Все три соединения, являющиеся в группе ПАУ наиболее сильными канцерогенами млекопитающих, на нашей модели существенно различались по частоте индуцируемых ими опухолей. У ДМБА, вызывавшего наибольшую частоту опухолей wtsP4, эта величина была в 6 раз больше, чем у БП, и в 4 раза выше, чем у 20-МХ.

Данный результат может быть обусловлен несколькими причинами. Во-первых, трансмембранный белок гена *mdr49*, который функционирует как насос, удаляющий из клетки гидрофобные ксенобиотики, в том числе ПАУ, может по-разному удалять замещенные и незамещенные ПАУ [Vase, 2006]. Другой очевидной причиной могут быть особенности системы метаболической активации ксенобиотиков у насекомых.

У млекопитающих лиганды типа ПАУ, связываясь с транскрипционным фактором AhR, инициируют экспрессию блока генов метаболизма ксенобиотиков. При этом индуцируются как активирующие монооксигеназы суперсемейства CYP, и среди них подсемейства CYP1A и CYP1B, так и ферменты детоксикации типа глутатион-S-трансферазы и НАД(Ф)Н:хинон оксиредуктазы-1. Для канцерогенного действия БП и 20-МХ активация этого блока является главным условием генотоксического и канцерогенного действия, а для ДМБА она не обязательна. У млекопитающих основной изоформой, необходимой для превращения БП и МХ в конечные диолэпоксиды, является CYP1A1, экспрессия которой в клетках млекопитающих при взаимодействии с этими лигандами AhR повышается в десятки раз [Fazili, 2010].

ДМБА активируется, в основном, изоформой CYP1B1, которая постоянно присутствует в клетке в качестве конститутивной изоформы [Buters, 2003]. Показано, что она одинаково работает у животных AhR+/+ и AhR-/- [Ide, 2004].

У личинок дрозофилы активность всех изоформ цитохрома Р-450 на порядок ниже, чем у грызунов, равно как и частота оборотов окисляемого субстрата на цитохроме [Фукс, 1990].

Кроме того, у насекомых отсутствует изоформа CYP1A1, которая у млекопитающих активирует большинство ПАУ [Brown, 2005]. Окисляемые ею субстраты, в частности БП и 20-МХ, метаболизируются у дрозофилы другими изоформами Р-450 благодаря их перекрывающейся субстратной специфичности, притом гораздо менее эффективно [Amichot, 1998].

Табл. 1 Частоты появления опухолевых клонов при спонтанном и индуцированном мутагенезе у особей с нормальной и ингибированной функцией Dmp53.

Вещество	Конц, мг/мл	+/ wts ^{P4}			Gal4/+; p53-RNAi/wts ^{P4}			
		N	n	p, %	N	n	p, %	
Неканцерогенные ксенобиотики	1234-ДБА	4,1	496	15	3,0	-	-	-
	Хризен	6,8	472	14	3,0	-	-	-
	Антрацен	5,34	231	8	3,5	-	-	-
	Фенантрен	5,34	514	19	3,7	-	-	-
	ДЭАБ	7,6	346	10	2,9	-	-	-
Канцерогены млекопитающих	3МеДАБ	7,2	437	15	3,4	-	-	-
	ОААТ	6,3	470	14	3,0	-	-	-
	Бромистый этидий	2,5	458	23	5,0*	-	-	-
	1256-ДБА	4,1	483	26	5,4*	-	-	-
	1-нитропирен	0,5	655	32	4,9*	499	37	7,4
	2-нитрофлуорен	0,42	483	27	5,6*	360	32	8,9
	Циклофосфамид	1,55	638	40	6,3*	474	72	15,2*
	Сарколизин	0,61	579	43	7,4*	556	67	12,1*
	Араноза	0,5	482	49	10,2*	504	113	22,4*
	20-МХ	4	548	55	10,0*	562	55	9,8
	ННК	3	456	72	15,8*	298	96	32,2*
	Циклоплатам	2,5	568	195	34,3*	491	262	53,4*
	Оксоплатин, 1	1	315	47	14,9*	326	129	39,6*
	Оксоплатин, 2	2	326	161	49,4	-	-	-
ДМБА	7,7	478	205	42,9*	518	435	84,0*	
Растворители (контроль)	10% ДМСО	-	770	20	2,6	642	50	7,8
	Вода	-	820	20	2,4	724	58	8,0

N-число особей, n- количество опухолей, p-частота формирования опухолевых клонов.

* – Частота статистически значимо отлична от соответствующего контроля, P < 0,01

Изоформа с субстратной специфичностью CYP1B1 млекопитающих экспрессируется в клетках личинки дрозофилы постоянно, и ее количество достаточно для активации ДМБА. В результате ДМБА начинает метаболизироваться и повреждать макромолекулы непосредственно после своего поступления в клетку, а БП и 20-МХ - только спустя значительный лаг-период, в течение которого индуцируется экспрессия метаболизирующих их монооксигеназ.

В результате мутагенный эффект ДМБА выражен у дрозофилы значительно более интенсивно, чем эффекты БП и 20-МХ. При низком базальном уровне изоформ Р-450, метаболизирующих ДМБА, их значительная активность может быть связана также и с ускоренным оборотом метаболизируемого субстрата на цитохроме. Такой механизм интенсификации метаболизма ПАУ, в сочетании с повышенным образованием дигидродиолов, мы наблюдали в ранних исследованиях в микросомах мутантной линии *Drosophila simulans* 364 uv, чувствительной к токсическому действию БП [Fuchs, 1992; 1995]. Следует также отметить, что и реакции метаболического превращения ПАУ у млекопитающих и насекомых значительно различаются. У первых - это образование диолэпоксидов, дающих массивные аддукты с ДНК и, в меньшей мере, образование хинонов, которые, восстанавливаясь до семихинонов, генерируют активные формы кислорода [Flowers-Gear, 1996]. У вторых - преимущественное превращение в хиноны [Фукс, 1990]. Стерически затрудненные метилированные ПАУ типа ДМБА не могут образовывать хиноны и активируются только путем образования диолэпоксидов. БП активируется обоими путями, но он же индуцирует и экспрессию НАД(Ф)Н:хинон оксиредуктазы-1, которая превращает хиноны в гидрохиноны, ингибируя их превращение в семихиноны и активные формы кислорода [Monks, 1992]. МХ, как и ДМБА, имеет метильную группу, что по-видимому, ограничивает его генотоксическое действие через образование хинонов и активных форм кислорода. При низком уровне активации изоформами, заменяющими в этом процессе CYP1A1, это приводит к низкому, в сравнении с млекопитающими, генотоксическому эффекту у дрозофилы.

Этим же объясняется и низкая частота опухолей wts, индуцированных другими ПАУ, как замещенными, так и не замещенными. При этом, однако, различия между канцерогенными для млекопитающих и практически не канцерогенными ПАУ сохраняются и у дрозофилы. Частота опухолей, индуцированных слабо канцерогенными 2-НФ, 1-НП и более канцерогенным 1,2,5,6-ДБА в эксперименте была выше, чем у неканцерогенного 1,2,3,4-ДБА.

Несмотря на несоответствие в экспрессии отдельных изоформ метаболизирующих ферментов, тест на индукцию опухолей wtsP4 и wtsP2 не давал ложноположительных результатов и позволял отличать канцерогенные ПАУ от

неканцерогенных, как это было показано и в предыдущей нашей работе [Sidorov, 2001].

В то же время, на канцерогенах других классов мы получили ряд ложноотрицательных результатов, свидетельствующих о том, что не все канцерогены млекопитающих могут быть выявлены на нашей модели. В частности, это относится к азокрасителям. Эти соединения не проявили бластомогенного действия на нашей модели. Частота опухолей, возникших после обработки личинок канцерогенным для печени мышей ОААТ или печеночным канцерогеном крыс 3-МеДАБ не отличалась от неканцерогенного ДЭАБ и контроля. Это также может быть объяснено отсутствием у дрозофилы изоформы CYP1A1, которая необходима для окисления аминогруппы и превращения проканцерогенных ОААТ и 3-МеДАБ в активные N-сульфооксипроизводные [Declos, 1986].

При действии канцерогенных нитрополиаренов 1-НП и 2-НФ мы получили лишь двукратное по сравнению с контролем повышение частоты опухолей wts. Эти соединения имеют два пути метаболической активации. Основным является их восстановление до активных нитрозопроизводных, второстепенным через превращение в диолэпоксиды, подобно незамещенным канцерогенным ПАУ. Повидимому, у дрозофилы оба процесса выражены слабее, чем у млекопитающих [Andersson, 2009].

В данной серии экспериментов особое внимание было уделено тестированию соединений, связывающихся с макромолекулой ДНК по малой бороздке. Эти соединения обладают высокой аффинностью к ДНК благодаря их способности образовывать водородные и ван-дер-ваальсовы связи по узкой бороздке биополимера. Для эксперимента были отобраны классические узкобороздочные лиганды Hoechst33342 и Hoechst33258 и новосинтезированные производные бисбензимидазолов MB и MB(Ac), димер MB – DB11, а также цианиновый краситель SYBR Gold, обладающий свойствами как узкобороздочного лиганда, так и интеркалятора.

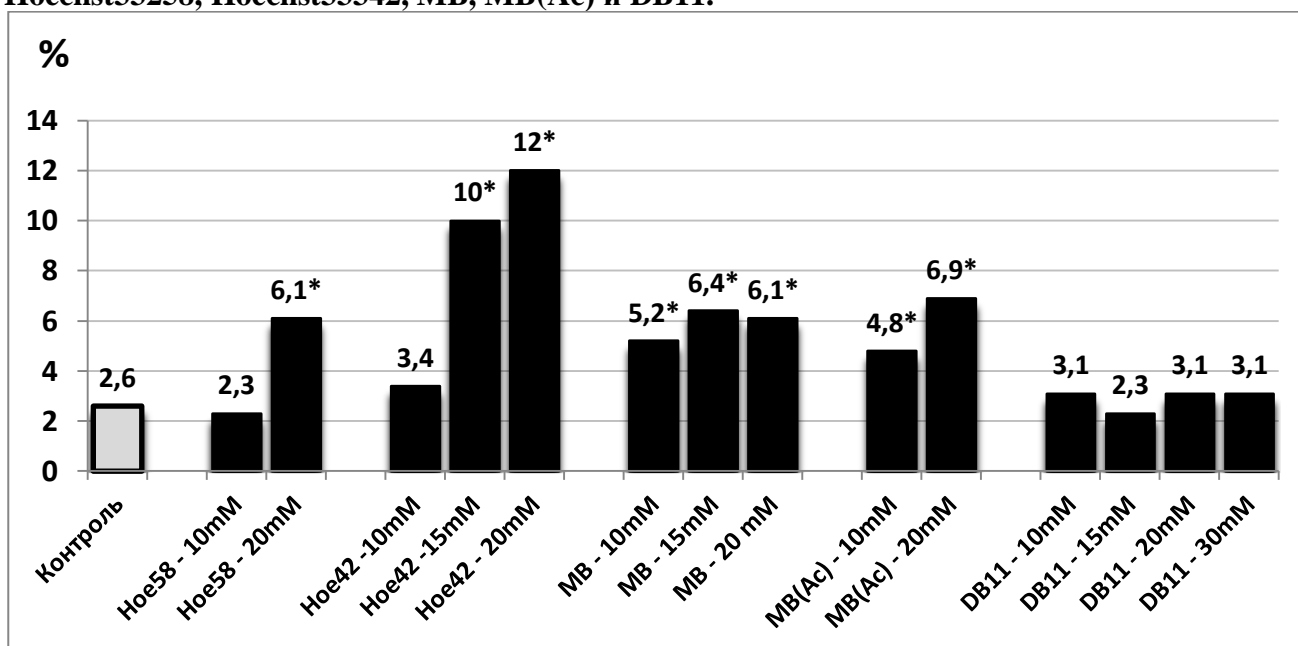
При исследовании влияния узкобороздочных лигандов на частоту образования опухолевых клонов wts, мутагенную активность продемонстрировали Hoe42, Hoe58, MB, MB(Ac), а также SYBR Gold (рис.1).

Исследование связывания узкобороздочных лигандов с ДНК политенных хромосом *in vivo* показало, что протестированные соединения при кормлении ими личинок по-разному окрашивают ДНК клеток слюнных желез (рис.4), что, по всей видимости, связано с различной проницаемостью мембраны клеток для каждого из соединений. Так, наибольшая проницаемость была зарегистрирована для

Ноеchst33342; меньшая интенсивность окраски ДНК была показана для Ноеchst33358, MB, MB(Ас) и DB11.

Для того, чтобы убедиться, что наши образцы Ноеchst33342 и Ноеchst33258 не содержат мутагенных примесей и демонстрируют характерное для узкобороздочных бисбензимидазолов отсутствие мутагенного эффекта в тесте на реверсивные мутации на *Salmonella typhimurium*, а также охарактеризовать новосинтезированные соединения, мы исследовали эти соединения в тесте Эймса на штаммах TA100 и TA98.

Рис.1. Частота появления опухолевых клонов *wts* при обработке личинок *wts*/+ Ноеchst33258, Ноеchst33342, MB, MB(Ас) и DB11.



*-частота образования опухолей значимо выше частоты появления клонов у контрольной группы, $P < 0,01$

Эксперименты по индукции реверсий у сальмонеллы в основной модификации теста Эймса на штаммах TA98 и TA100 в диапазоне концентраций от 5 мМ до 5 мкМ показали, что Ноеchst 33258 и Ноеchst 33342 не мутагены. Они не вызывают мутации типа замены пар оснований или сдвига рамки считывания, как в присутствии, так и в отсутствии активирующей микросомальной смеси S9.

При определении мутагенной активности димерного производного бисбензимидазолов DB(11) и цианинового красителя также было показано, что эти соединения не вызывают увеличения частоты реверсий ни в штамме TA98, ни в TA100, независимо от наличия или отсутствия активирующей смеси S9.

Мономерные производные бисбензимидазолов MB и MB(Ас) не проявили мутагенной активности при проведении экспериментов на штамме TA100 в присутствии и в отсутствии активирующей смеси S9. Однако при тестировании этих

соединений на штамме TA98 при обработке микросомной фракцией печени крыс наблюдалось увеличение количества реверсий для обоих агентов. Количество реверсий при исследовании MB увеличилось в 7-8,8 раз, в то время как для MB(Ac) это значение составило 1,8-3,7 раз. Без фракции S9 ни один из красителей не вызывает увеличения числа ревертантов на обоих штаммах.

Табл.2 Результаты тестирования мутагенного эффекта Hoechst33258, Hoechst33342, MB, MB(Ac), DB11 и SYBR Gold на индикаторных штаммах Salmonella Typhimurium TA100 и TA98.

	TA98*		TA100**	
	-S9***	+S9	-S9	+S9
Hoechst33258	—****	—	—	—
Hoechst33342	—	—	—	—
MB	—	+	—	—
MB(Ac)	—	+	—	—
DB11	—	—	—	—
SYBR Gold	—	—	—	—

* - чувствителен к соединениям, индуцирующим мутации со сдвигом рамки считывания

** - штамм, чувствительный к веществам, индуцирующим мутации с заменой оснований

*** - наличие или отсутствие активации ферментами микросомных монооксигеназ крыс

**** - мутагенная активность соединения («+» означает наличие, «—» - отсутствие мутагенной активности)

Полученные данные дают основание предположить, что узкобороздочные лиганды вызывают преимущественно соматическую рекомбинацию. Это хорошо согласуется с результатами опубликованного исследования, направленного на тестирование других ингибиторов топоизомеразы I в SMART, в котором была продемонстрирована превалирующая роль соматической рекомбинации в возникновении соматических мозаичных клонов [Frei et al., 1996].

Мы показали, что SMAR-тест на гетерозиготах wts позволяет выявлять потенциальные мутагенные, рекомбиногенные и бластомогенные свойства соединений, вызывающих повреждения ДНК путем нарушения работы ферментов ее метаболизма.

Итак, верификация SMART с использованием гетерозигот по wtsP4 на 26 соединениях, как канцерогенных для млекопитающих, так и слабо канцерогенных и не канцерогенных, показала, что данная модификация теста обладает высокой специфичностью, то есть частота опухолей при действии не канцерогенных для млекопитающих соединений не превышала уровень контроля. Чувствительность метода по отношению к канцерогенам генотоксического действия была полной: все канцерогены вызвали повышение частоты опухолей wts. При исследовании

чувствительности теста к канцерогенам, нуждающимся в метаболической активации, практически все проканцерогены вызвали увеличение частоты появления опухолей. Исключение составили аминоазокрасители, что может быть связано с отсутствием у дрозофилы ферментов, способных активировать эти соединения.

Увеличение чувствительности и разрешающей способности теста.

Усовершенствование системы SMART с целью повышения эффективности выявления потенциально опасных для человека соединений подразумевает, прежде всего, увеличение его чувствительности и разрешающей способности. Это позволит, с одной стороны, уменьшить размер выборки, необходимой для получения достоверного ответа, а с другой стороны, получать достоверные различия при использовании меньших доз тестируемых соединений. В нашей работе были использованы следующие подходы: (1) одновременная инактивация в соматическом мозаичном клоне нескольких генов, влияющих на пролиферацию и запуск апоптоза; (2) подавление запуска апоптоза с помощью РНК-интерференции Dmp53; (3) получение трансгенной линии дрозофилы с геном p53 человека, имеющем мутацию в ДНК-связывающем домене.

Влияние накопления мутаций по нескольким генам-супрессорам на частоту образования опухолевых клонов.

В рамках данной задачи были впервые получены и охарактеризованы клоны, гомозиготные по гену-супрессору опухолевого роста dco3.

Dco - ген, расположенный в третьей хромосоме, в цитогенетическом районе 100A5,6 –100B1,2, является необходимым для нормального развития и контроля роста имагинальных дисков личинки *D.melanogaster*. Продукт этого гена является гомологом казеиновой киназы I и в норме вовлечен ещё и в регуляцию циркадного ритма. Изучение трёхмерной структуры и последовательности аминокислот данной киназы у разных организмов выявило, что этот белок является высококонсервативным. Мутация dco3 в гомозиготном состоянии является летальной. При этом клетки имагинального диска продолжают делиться дольше, чем при нормальном развитии личинки. В результате развиваются неспособные вступить в метаморфоз гигантские личинки с крупными имагинальными дисками, [Zilian O. et al., 1999].

Нами было показано, что морфологически эти клоны неотличимы от клонов wts, однако образуются с частотой в 2 раза меньшей, как при спонтанном, так и при индуцированном оксоплатином мутагенезе. По этой причине использование гена dco3

в качестве единственного маркерного гена при создании биотеста не представляло интереса, поскольку не могло привести к увеличению чувствительности системы.

Далее мы исследовали совместное действие пар мутаций *p53* и *dco*, *p53* и *wts*, *dco* и *wts* на частоту соматического мозаицизма. В этой серии экспериментов были получены особи, у которых вследствие рекомбинации в соматических клетках, образовывались опухолевые клоны следующих генотипов: ($wts^{P2} dco^3$), ($p53^{259H.GUS} dco^3$), ($p53^{259H.GUS} wts^{P2}$). При исследовании совместного действия этих пар мутаций было установлено значимое увеличение частот клонов в сравнении с вариантами без мутации *p53*. Частота клонов *wts* в комбинации с доминантно-негативной мутацией *p53* увеличилась в 4,4 раза, а частота опухолей *dco* в сочетании с данной мутацией *p53* – в 1,8 раз:

Генотип клона	Частота формирования опухолей	
	Вода	Оксоплатин
(wts^{P2})	3,5%	22,6%
(<i>dco</i>)	1,4%	12,2%
($wts^{P2} dco^3$)	8,0%	66,7%
($p53^{259H.GUS} dco^3$)	3,7%	22,1%
($p53^{259H.GUS} wts^{P2}$)	4%	99,6%

Было зарегистрировано неаддитивное увеличение частоты опухолей при анализе гетерозигот по двум генам-супрессорам опухолевого роста *dco* и *wts*. Так, частота опухолей у *цис*-дигетерозигот (оба мутантных гена расположены на одной из гомологичных хромосом) превосходила частоту клонов *dco* в 6 раз (66,75% против 12,3%), частоту клонов *wts* – в 2,7 раз (66,75% и 22,6%), и превышала арифметическую сумму частот клонов *dco* и *wts* в 1,8 раз (66,75% против 34,9%). Подобный эффект был зарегистрирован и для спонтанного мутагенеза ($1,4\% + 1,98\% < 8,02\%$).

Чтобы исследовать частоту появления клонов при накоплении мутаций по трем генам-супрессорам опухолевого роста, нами были сконструированы *цис*-гетерозиготы по генам *wts* и *dco* (оба типа гетерозигот имели также доминантно-негативную мутацию в гене *p53*, действие которой проявлялось во всех клетках организма, в том числе и в опухолевых клонах). У *цис*-дигетерозигот + *wts dco*³ / *p53*^{259H.GUS} + + в основном образовывались клоны, гомозиготные по обеим мутациям. Частота образования клонов ($wts dco Dmp53^{259H}$) составила 4,4% при спонтанном мутагенезе и 45,1% - при индукции оксиплатином. То есть, при накоплении мутаций по трем генам-супрессорам опухолевого роста мы наблюдали снижение частоты появления опухолевых клонов по сравнению с частотой появления клонов, несущих две мутации. Одним из предположений, объясняющих этот эффект может быть снижение

жизнеспособности соматической клетки при накоплении в ней мутаций по нескольким генам, играющим важную роль в пролиферативной активности и стимуляции апоптоза.

По-видимому, повышение чувствительности системы путем комбинации мутаций в отдельных генах можно ожидать в случае использования генов, ответственных за поддержание нормального клеточного гомеостаза, имеющих неперекрывающиеся функции и сигнальные пути.

Влияние ингибирования гена-супрессора Dmp53 с помощью РНК-интерференции.

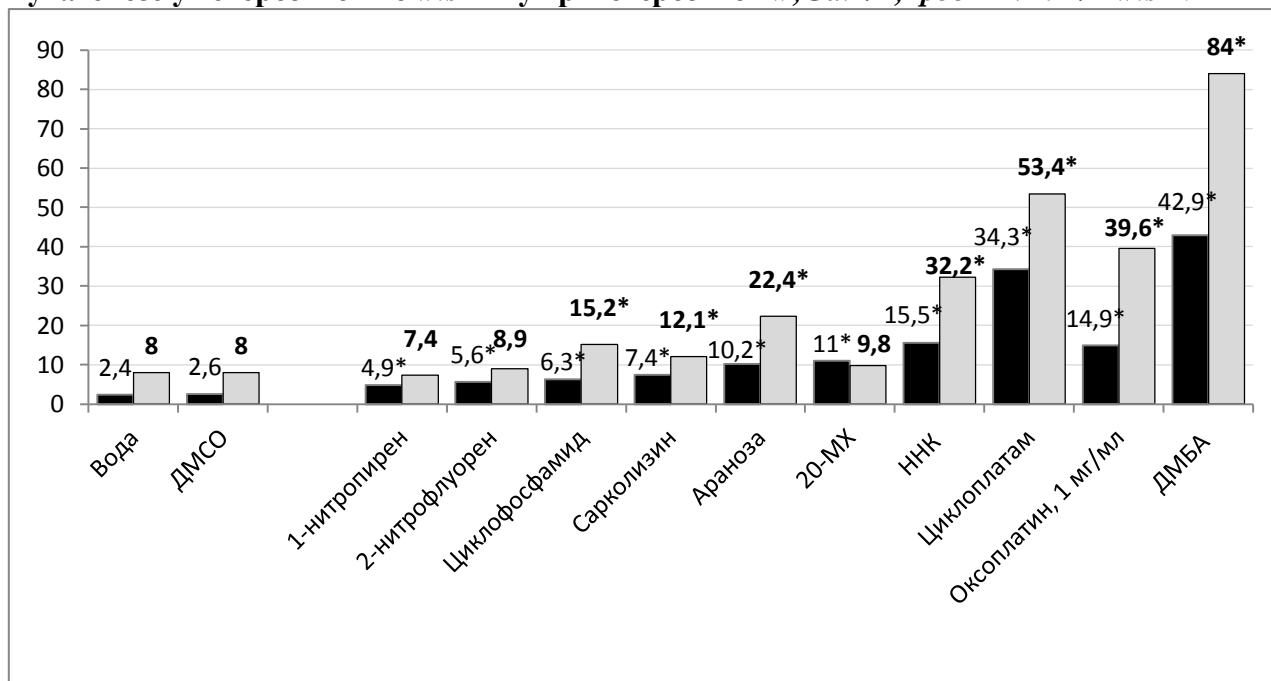
Далее мы исследовали возможность увеличения частоты появления опухолевых клонов и увеличения его чувствительности при помощи РНК-интерферентного ингибирования Dmp53. Метод РНК-интерференции на сегодняшний день широко используется при модулировании экспрессии генов. По сравнению с введением мутации преимуществами данного метода являются его методическая простота и свобода в выборе мишени для инактивации. Немаловажно, что при РНК-интерференции снижается экспрессия нужного белка, а не нарушается его структура, как в случае внесения мутаций. Известно, что мутация может приводить не только к инактивации таргетного гена, но и к приобретению мутантным белком новых, не характерных для нативного, функциональных активностей (эффект gain-of-function).

Мы изучили влияние ингибирования функциональной активности Dmp53 методом РНК-интерференции на частоту формирования опухолевых клонов wts (рис.2). В результате действия оксоплатина на гетерозигот wts^{P4} , несущих трансгенный элемент РНК-интерференции p53 в III хромосоме, частота образования опухолевых клонов при спонтанном и индуцированном оксоплатином мутагенезе увеличилась.

Влияние ингибирования p53 методом РНК-интерференции на частоту образования опухолевых клонов при действии других канцерогенов было различным. При этом тип повреждения ДНК и класс канцерогенов не оказывали влияния на этот эффект. Например, ДМБА, араноза, бромистый этидий и ННК вызывали одинаковое повышение частоты появления клонов - в 2 раза. В то же время, ввиду того, что частота опухолей в контроле также увеличилась в 3 раза, относительные показатели различий между опытом и контролем снизились таким образом, что в ряде случаев стали не значимыми. Например, при действии канцерогенных нитрополиаренов (1-НП и 2-НФ) на личинок с пониженным уровнем p53 мы не наблюдали значимого увеличения частоты появления опухолевых клонов по сравнению с контрольной группой (7,4% и 8,9% против 8% в контроле), хотя у личинок с нормальной

экспрессией p53 эти же вещества в эквимолярной концентрации индуцировали значительно большее количество опухолей по сравнению с контролем (4,9%; 5,6% против 2,6%, $p > 0,01$).

Рис.2. Частота появления опухолевых клонов при спонтанном и индуцированном мутагенезе у гетерозигот по wts^{P4} и у тригетерозигот $w; Gal4/+; p53-RNAi +/+ wts^{P4}$.



■ - частота появления клонов при мутагенезе у гетерозигот по wts^{P4} ,

■ - Частота появления опухолевых клонов при спонтанном и индуцированном мутагенезе у тригетерозигот $w; Gal4/+; p53-RNAi +/+ wts^{P4}$,

* – частота статистически значимо отлична от соответствующего контроля, $P < 0,01$, наибольший доверительный интервал нигде не превышал $\pm 0,5\%$.

Для объяснения полученных результатов наиболее вероятными представляются три предположения. Первое состоит в том, что в результате «off-target»- эффекта, либо в результате нарушения регулирования фланкирующих вставку генов, были нарушены какие-то структуры или сигнальные пути, влияющие на выживаемость трансформированных клеток. Второе заключается в том, что экспрессия трансгенных конструктов РНК-интерференции недостаточна для полного ингибирования Dmp53. Оба эти предположения согласуются с опасениями и предупреждениями сток-центра, от которого была получена данная линия [Dietzl et al., 2007]. Третье связано с наличием у дрозофилы p53-независимого механизма контроля стабильности генома, который может активироваться в связи с ингибированием функций p53. Запуск этого пути с последующим арестом клеточного цикла и апоптозом поврежденных клеток происходит не только у дрозофилы. В частности, остановка клеточного цикла в G1-фазе в ответ на внесение в культуру фибробластов 3Т3 бенз(а)пирена происходила,

наряду с нормальными, также и в клетках с доминантно-негативной мутацией p53 или нокаутных по p53 [Hsing et al., 2000].

Основной p53-зависимый путь апоптоза у дрозофилы связан с изменением экспрессии проапоптотических белков Rpr², HID, Grim, SKL и JAFRAC2 [Xu D. et al., al, 2009]. Эти белки либо разобщают связи между ингибиторами апоптоза (DIAP) и каспазами, что приводит к активации каспазного каскада, либо препятствуют связыванию DIAP с белком TRAF1, активирующим JNK, что, в свою очередь, тоже приводит к апоптозу.

В основе p53-независимого пути программируемой клеточной гибели у дрозофилы лежит способность к активации JNK-зависимого апоптоза без участия TRAF1. Лиганд семейства TNF связывается с рецептором Wengen, далее происходит последовательное эффекторное фосфорилирование и активация киназ MSN, Tak1, NER и JNK. Этот путь активации апоптоза высоко консервативен и имеет аналоги у многих организмов, в том числе и млекопитающих. In vivo этот вид апоптоза играет значительную роль при устранении аберрантных клонов и при контроле нормального морфогенеза. Возможно, что у личинок с ингибированием Dmp53, нитрополиарены вызывают компенсаторную активацию именно этого пути апоптоза, что и обуславливает отсутствие повышения частоты образования опухолевых клонов у имаго. Таким образом, ингибирование Dmp53 не привело к увеличению чувствительности тест-системы.

Исследование влияния экспрессии мутантного p53 человека на формирование опухолевых клонов у дрозофилы.

Используемые для тестирования канцерогенов млекопитающих организмы должны отвечать определенным требованиям, таким как высокая чувствительность, специфичность отклика, возможность быстрой регистрации ответа, простота содержания в лабораторных условиях и т.д. [Худолей В., 1999]. Однако главной проблемой краткосрочного биотестирования канцерогенов является максимальная адекватность применяемых систем молекулярно-биологическим параметрам млекопитающих, а также корреляция регистрируемых ответов системы с канцерогенезом у млекопитающих. К настоящему времени, основным подходом к решению этой проблемы при краткосрочном тестировании на дрозофиле является создание трансгенных линий, экспрессирующих гены млекопитающих.

² DIAP – Drosophila Inhibitor of Apoptosis Protein, JNK- c-Jun N-terminalkinase, TNF – Tumor Necrosis Factor, TRAF1 - TNF receptor-associated factor 1, YAP – Yes-associated protein, Yki – Yorkie, *mats-mob as tumour suppressor*.

Для выяснения степени гомологии системы распознавания поврежденной ДНК у дрозофилы и человека в плане ее способности контролировать возникновение опухолей, на первом этапе была создана трансгенная линия дрозофилы, экспрессирующая мутантный p53 человека. Как известно, Dmp53 - это структурный и функциональный гомолог гена p53 человека. Основными функциями Dmp53 являются активация апоптоза и остановки клеточного цикла, в то время как человеческий гомолог данного гена обладает большим количеством функциональных активностей.

Создание трансгенной линии включало в себя несколько этапов: 1) клонирование кДНК человеческого гена p53 с мутацией в плазмидный вектор, содержащий мобильный Р-элемент для интеграции в хромосому дрозофилы; 2) инъекция указанного вектора и хелперной плазмиды, несущей транспозазу, в ранние эмбрионы дрозофилы с целью их трансформации; 3) отбор трансформантов, установление изолиний; 4) картирование полученных Р-инсерций; 5) анализ экспрессии белка.

Далее мы провели оценку влияния экспрессии и гиперэкспрессии мутантного p53 человека на частоту соматического мозаицизма.

В качестве контроля были использованы гетерозиготы $uw; wts^{P4}/+$. Частота спонтанного мозаицизма составила для этих особей 3,1%, индуцированного оксоплатином (1 мг/мл) – 21,9%. Чтобы исключить влияние экспрессии вспомогательного белка Gal4 в данной тест-системе, его влияние на частоту формирования опухолевых клонов было исследовано на гетерозиготах $Gal4/+; wts^{P4}/+$. В этих экспериментах было показано, что присутствие белка-модулятора экспрессии трансгена не вносит существенный вклад в частоту формирования клонов как при спонтанном, так и при индуцированном оксоплатином мозаицизме (рис.3).

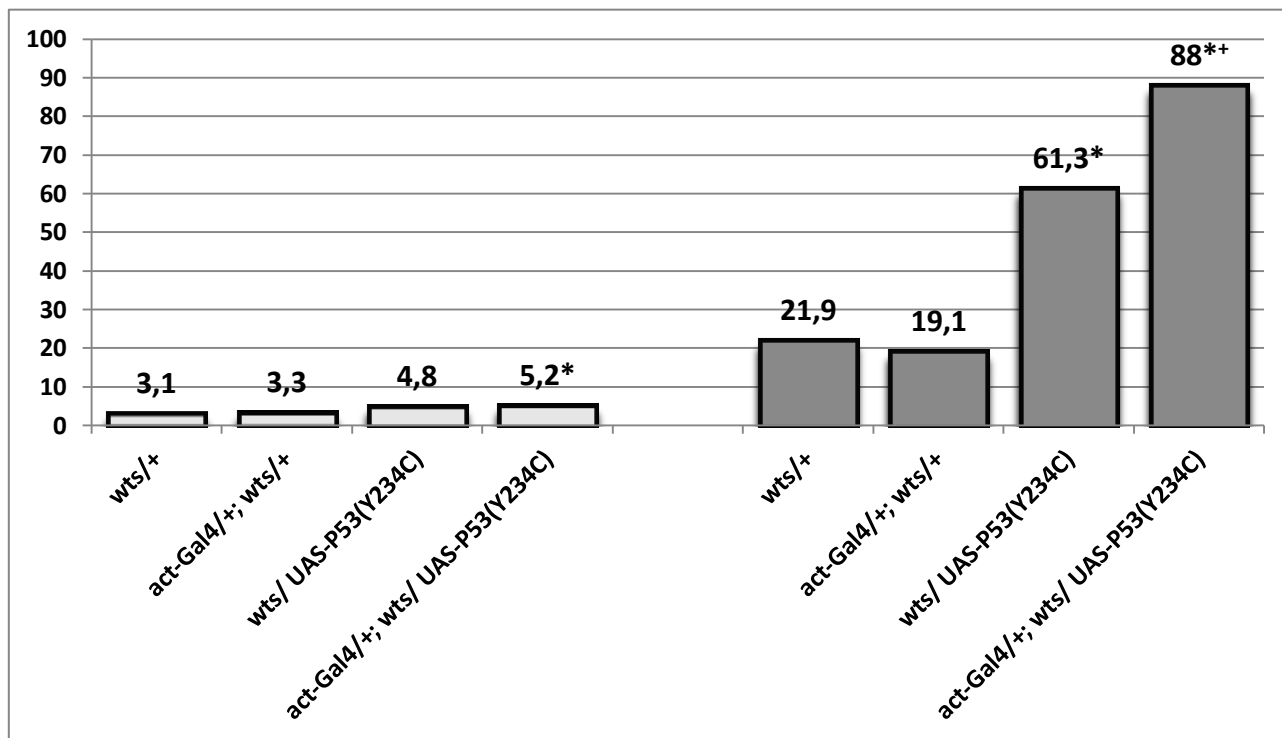
Гетерозиготы $wts^{P4} +/+ p53^{Y234C}$ были получены в результате скрещивания $\text{♀}uw; p53^{Y234C} \times \text{♂}w; wts^{P4}/TM3$. У этих особей экспрессия трансгена находилась на среднем уровне. Частота соматического мозаицизма у данных гетерозигот составила – 4,8% при обработке 10% ДМСО и 61,3% при обработке оксоплатином 1 мг/мл.

Для исследования влияния гиперэкспрессии мутантного p53 человека на частоту формирования опухолевых клонов в результате скрещивания $uw; p53^{Y234C} \times w; Gal4; wts^{P4}/TM3$ были получены тригетерозиготы $Gal4/+; p53^{Y234C}/wts^{P4}$. Мы наблюдали дальнейшее увеличение частоты появления клонов как при спонтанном, так и при индуцированном оксоплатином (1мг/мл) мутагенезе (5,2% и 88% соответственно).

Полученные нами данные свидетельствуют о наличии функциональной гомологии между p53 человека и Dmp53 дрозофилы в плане их способности

контролировать уровень соматических мутаций и рекомбинаций, возникающих как спонтанно, так и при действии генотоксических агентов. Трансгенный p53 человека

Рис.3. Частота появления опухолевых клонов при спонтанном (■) и индуцированном оксоплатином (■) мутагенезе у особей с различной экспрессией трансгенного p53 человека и без него.



*-частота формирования опухолей статистически значимо отлична от частоты образования опухолевых клонов у особей wts/+, $P < 0,05$; + - частота значимо отлична от частоты появления клонов у дигетерозигот wts/UAS-p53(Y234C), $P < 0,01$.

оказал такое же влияние на частоту возникновения клонов wts/wts, как ингибирование Dmp53 методом РНК-интерференции или введение доминантно-негативной мутации Dmp53, что свидетельствует о наличии функциональной гомологии между p53 человека и дрозофилы в плане их контроля формирования опухолевых клонов.

Оптимизация системы регистрации результатов SMART на гетерозиготах wts/+.

Учитывая высокую перспективность SMART, одним из подходов к его оптимизации является усовершенствование системы регистрации результатов. Одним из перспективных путей автоматизации этого биотеста может быть визуализация опухолевых клонов в имагинальных дисках на стадии личинки с последующим их автоматическим подсчетом.

Для решения этой задачи мы использовали Gal4/Gal80 регулируемую экспрессию белка GFP (Green Fluorescent Protein). В этой системе экспрессия

флуоресцентного белка находится под контролем UAS-промотора, активация которого происходит при наличии белка Gal4. Gal80 является ингибитором экспрессии Gal4. Таким образом, при наличии Gal80 экспрессия остальных двух белков подавлена.

Путем скрещивания $w; Gal4 \text{ UAS-GFP}; Gal80 \times w; +; wts^{P4}/TM3$ были получены особи $w; Gal4 \text{ UAS-GFP}; Gal80/wts^{P4}$. У таких особей при соматической рекомбинации происходит потеря гетерозиготности по III хромосоме, что приводит к формированию опухолевых клонов. Поскольку генетические регионы *wts* и *Gal80* находятся рядом, при рекомбинации в большинстве случаев утрачивается *Gal80*, что приводит к восстановлению экспрессии и *Gal4*, и *GFP*. Таким образом, можно наблюдать флуоресценцию клеток мозаичного клона в зелёном диапазоне (498 нм) при освещении его синим светом (395 нм).

Нами были получены светящиеся клоны *wts*, сформировавшиеся на крыловых имагинальных дисках дрозофилы (рис.5). Области свечения GFP не имели характерной формы и занимали различную площадь крылового диска. Самые большие из них занимали около 1/2 крылового диска. Структура таких имагинальных дисков была значительно изменена, а края не имели чёткой границы. Как было показано ранее, такие изменения морфологии имагинальных дисков характерны для опухолевых клонов *wts/wts* [Xu et al, 1995].

Таким образом, мы показали возможность избирательной флуоресцентной визуализации опухолевых клонов в биотесте на гетерозиготах *wts*. Возможность автоматизации теста на соматические мутации и рекомбинацию ранее в литературе не обсуждалась. На базе изученной системы может быть создан полуавтоматический метод тестирования канцерогенной активности химических соединений. Решение этой задачи, поможет не только исключить влияние эффекта «других глаз» и значительно уменьшить время тестирования одного агента, но и сделает биотестирование на дрозофиле более доступным для большего числа лабораторий.

Рис.4. Связывание узкобороздочных лигандов с ДНК поличенных хромосом *in vivo*.

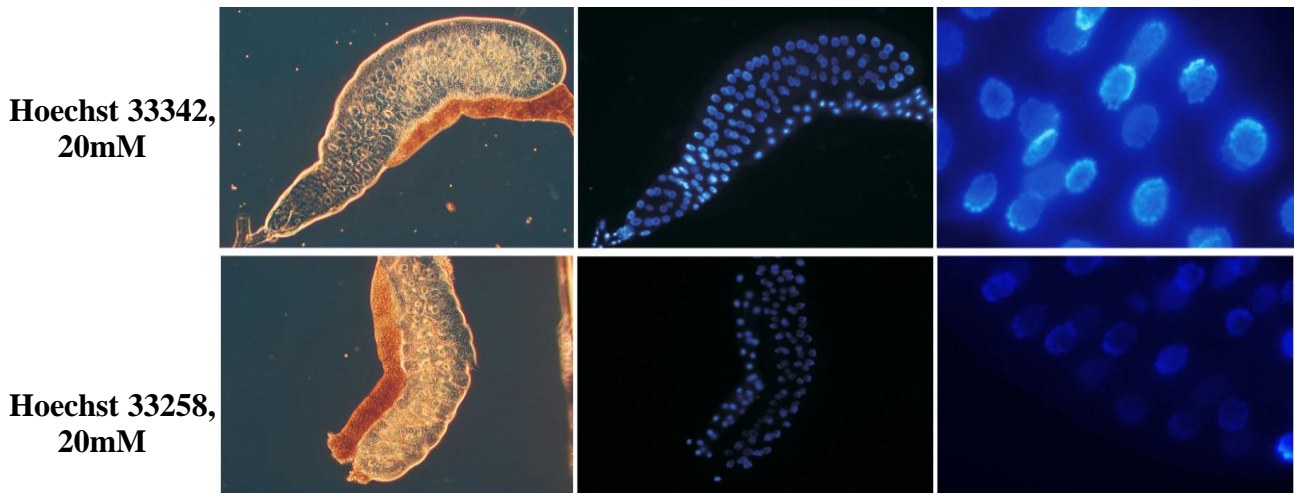
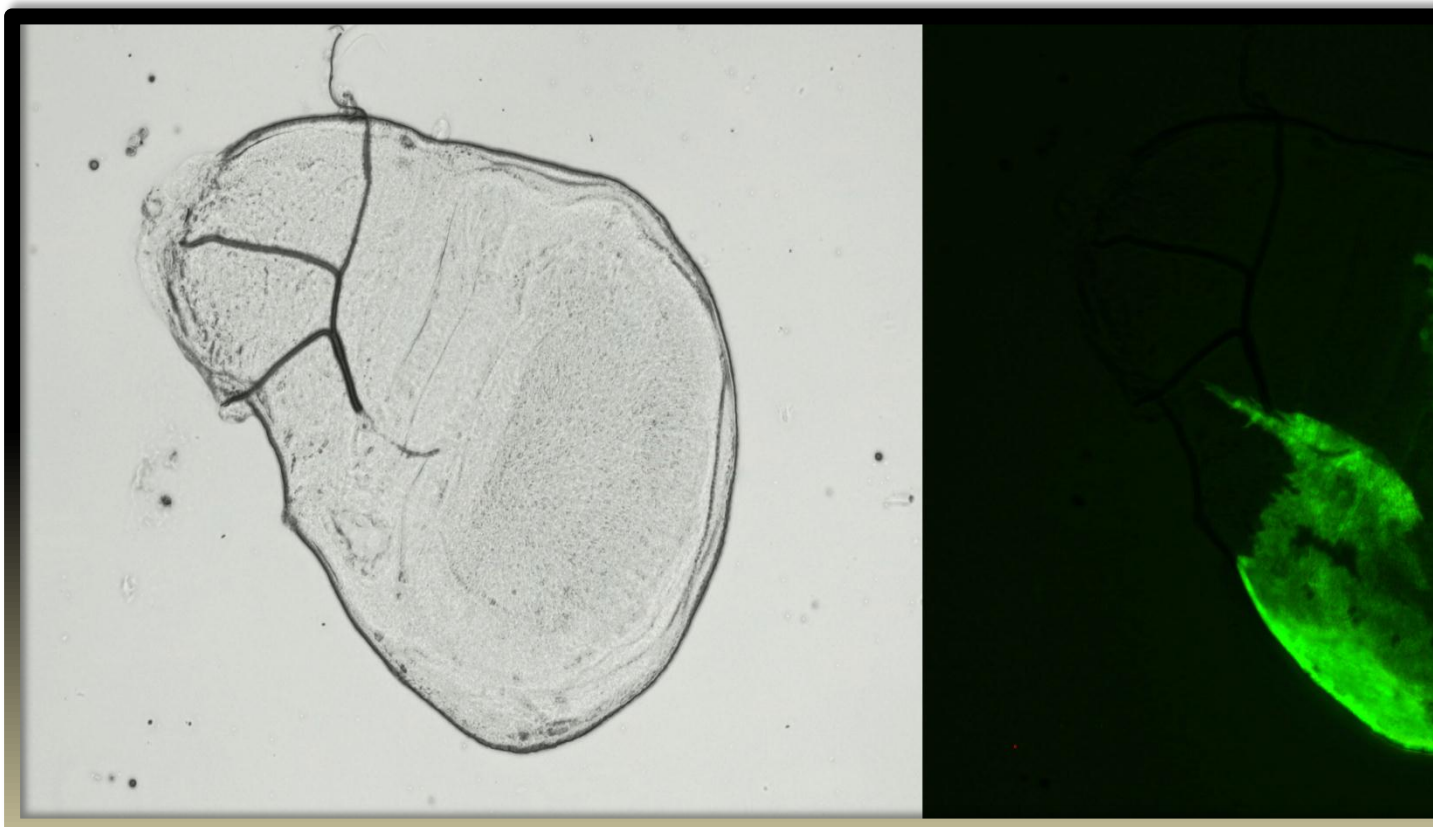
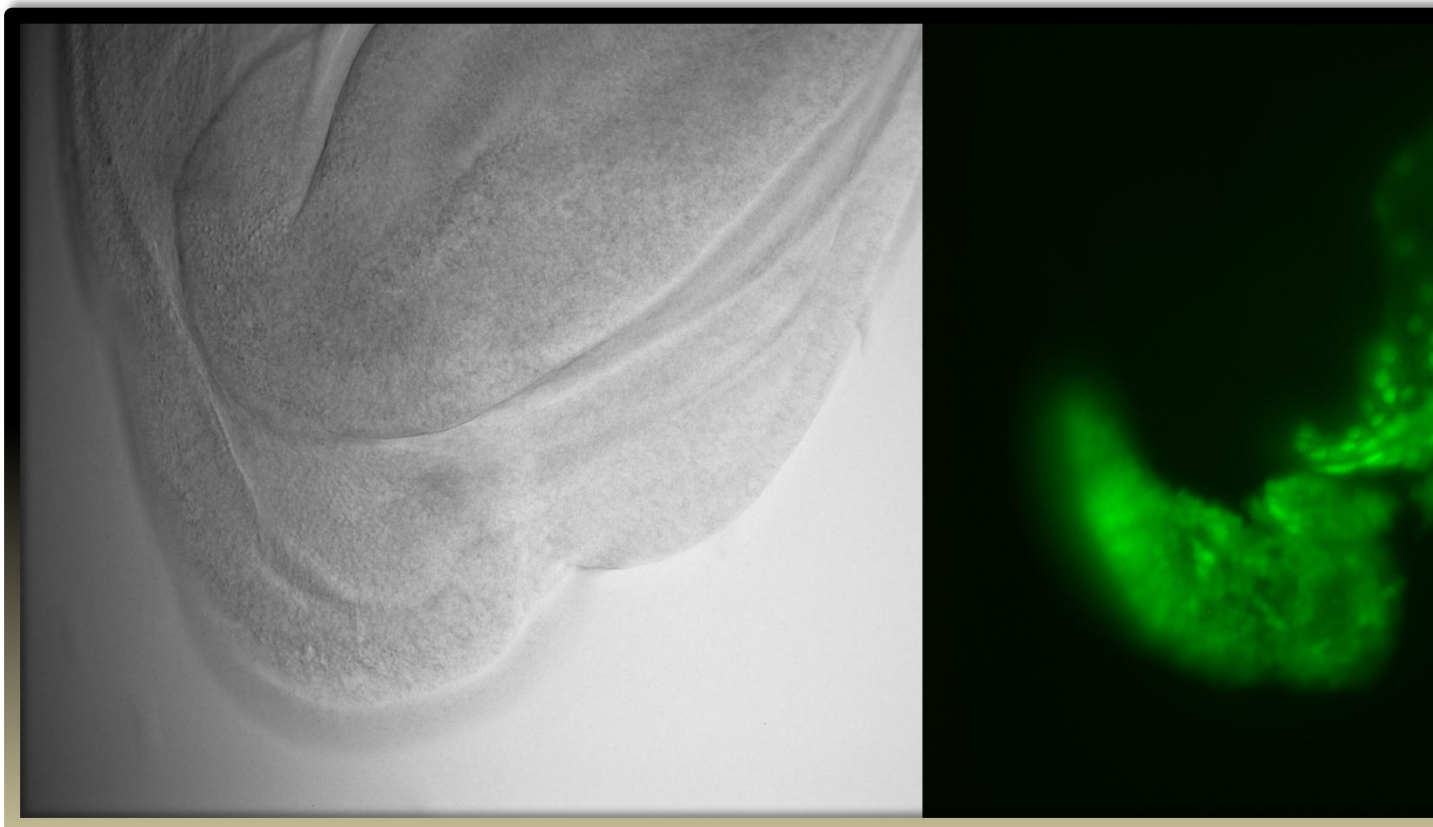


Рис.5. Экспрессия GFP в гомозиготных по *wts* клетках опухолевого клона, сформировавшегося на крыловых имагинальных дисках дрозофилы.





ВЫВОДЫ

1. Канцерогены млекопитающих с различным типом генотоксического действия способны вызывать опухоли у личинок дрозофилы, гетерозиготных по гену *wts*. Эта способность продемонстрирована на примере выборки канцерогенов, включающей алкилирующие агенты, соединения, образующие массивные аддукты ДНК или поперечные межнитевые сшивки, интеркаляторы и узкобороздочные лиганды.
2. Опухоли у дрозофилы вызывали канцерогенные полициклические ароматические углеводороды, нитрополиарены, табакоспецифические N-нитрозамины, производные нитрозомочевины, хлорэтиламины, платиносодержащие соединения, интеркалирующие фенантридины и узкобороздочные лиганды бисбензимидазольного ряда.
3. Ложноположительных результатов теста не было (100% специфичность), так как не канцерогенные аналоги этих соединений опухолей не вызывали. Ложноотрицательный ответ был получен в одном случае - для видоспецифичных гепатоканцерогенов грызунов из ряда аминокрасителей.
4. Аллели *wts* отличаются по чувствительности к канцерогенам млекопитающих. Наилучший результат был получен при использовании гетерозигот по аллелю

wts^{P4}. Частота опухолей у гетерозигот по этому аллелю была вдвое выше, чем для аллеля wts^{P2}, использовавшегося ранее.

5. Впервые с помощью данного типа SMART был продемонстрирован мутагенный эффект нетоксичных доз узкобороздочных лигандов, которые не проявляли активности в тесте Эймса. Это свидетельствует о необходимости использовании SMART на дрозофиле при анализе эффектов соединений, обладающих опосредованным генотоксическим эффектом.
6. Показан синергизм эффектов мутаций в генах - супрессорах опухолевого роста dco и wts. Найдено неаддитивное увеличение частоты опухолей при использовании дигетерозигот dco +/+ wts. При накоплении мутаций по трем генам-супрессорам dco, wts и Dmp53 у тригетерозигот было зарегистрировано снижение частоты опухолей относительно дигетерозигот wts+/+ Dmp53^{259H} и dco wts/ ++.
7. Впервые показано, что частота как спонтанных, так и индуцированных опухолей wts у дрозофилы возрастает при ингибировании активности Dmp53 методом РНК-интерференции.
8. Продемонстрирована функциональная гомология между p53 человека и Dmp53 дрозофилы по их способности контролировать уровень соматических мутаций и рекомбинаций, возникающих как спонтанно, так и при действии генотоксических агентов. Экспрессия мутантного p53 человека в клетках дрозофилы приводит к увеличению частоты появления опухолевых клонов wts/wts.
9. На основании Gal4/Gal80-регулируемой экспрессии флуоресцентного маркера разработан метод визуализации опухолевых клонов wts у личинок для создания автоматизированного SMART.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Кирсанов К.И., Лесовая Е.А., Сидоров Р.А., Белицкий Г.А., Якубовская М.Г. Анализ бластомогенной активности канцерогенов млекопитающих на дрозофиле с использованием аллеля wtsP4 и ингибированием p53 методом РНК-интерференции. Журнал «Генетика», №4, том 47, с.1-9., 2011.
2. Kirsanov K.I., Lesovaya E.A., Yakubovskaya M.G., Belitsky G.A. SYBR Gold and SYBR Green II are not mutagenic in Ames test. Mutation Research, №699, p.1-4, 2010.
3. Хитрово И.А., Кирсанов К.И., Лесовая Е.А., Белицкий Г.А., Якубовская М.Г. Результаты сравнительного анализа мутагенной активности флуоресцентных красителей ДНК бромистого этидия и SYBR Gold. Вестник РОНЦ, т.20, №4, стр. 38-43, 2009.
4. Kirsanov K.I. Investigation of human p53 function in Drosophila model, The European Association for Cancer Research Newsletters, №1, p:21, 2009.
5. Kirsanov K.I. Five mammalian carcinogens are active in a short-term tumorigenicity assay in Drosophila. Dros. Inf. Serv. 91, pp.77-79, 2008.
6. G.A.Belitsky, K.I.Kirsanov, E.M.Khovanova R.A.Sidorov, E.G.Ugnivenko. Non-additive combined effect of multiple mutations in tumor suppressor genes on the frequency of hyperplastic mosaic clones in Drosophila imagoes. Drosophila Information Service, 2005, 88:72-74
7. R.A.Sidorov, K.I.Kirsanov, I.D.Alexandrov, M.V. Alexandrova E.M.Khovanova. The influence of the p53 mutation on the tumor frequency in wts/+ heterozygotes. Drosophila Information Service, 2003, 86:105-106.
8. Кирсанов К.И., Белицкий Г.А., Якубовская М.Г. Ингибирование p53 дрозофилы путем РНК-интерференции увеличивает частоту появления опухолевых клонов wts, индуцируемых химическими канцерогенами млекопитающих. Тезисы к19-ой Международной конференции «СПИД, рак и общественное здоровье». Русский журнал СПИД, рак и общественное здоровье, том14, №1, стр.22, 2010.
9. Sidorov R.A., E.M.Khovanova, Kirsanov K.I., E.G.Ugnivenko. The role of gene white in increase of mosaic clone frequency in D.melanogaster and D.simulans. Abstract book, 47th Annual Drosophila Research Conference, Houston.