

**Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии
имени Н.Н. Блохина»
Министерства здравоохранения Российской Федерации**

На правах рукописи

ФЕТИСОВ ТИМУР ИГОРЕВИЧ

**МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ НЕГЕНОТОКСИЧНЫХ
ДНК-ТРОПНЫХ ПРЕПАРАТОВ КУРАКСИНА СВL0137 И ДИМИНАЗЕНА
НА КЛЕТКИ ОПУХОЛЕЙ СИСТЕМЫ КРОВИ**

14.01.12 – Онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Кирсанов Кирилл Игоревич

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Классификация опухолей системы крови	13
1.1.1. Миелоидные заболевания	14
1.1.2. Лимфоидные заболевания	17
1.2. Сигнальные пути в опухолях системы крови	19
1.2.1. Сигнальный путь WNT/ β -катенин	19
1.2.2. Сигнальный путь Hedgehog	22
1.2.3. Сигнальный путь Notch	24
1.2.4. Сигнальный путь TGF β	27
1.2.5. Сигнальный путь PPAR	29
1.3 Семейство белков PARP как мишень в терапии опухолей системы крови	31
1.4. Низкомолекулярные ДНК-тропные соединения	33
1.4.1. Интеркалирующие соединения	34
1.4.2. Алкилирующие соединения	36
1.4.3. Узкобороздочные лиганды	38
1.4.4. Соединения со смешанным типом взаимодействия	40
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	44
2.1. Список реактивов, использованных в работе	44
2.2. Приборы, использованные в работе	44
2.3. Линии опухолевых клеток	45
2.4. Определение цитотоксического эффекта	45
2.5. Определение уровня клеточной гибели по окрашиванию ДНК пропидий йодидом (PI)	47
2.6. Определение уровня апоптоза	47
2.7. Выделение РНК из опухолевых клеток	48
2.8. Условия проведения обратной транскрипции	48
2.9. ПЦР в реальном времени	48

2.10. Определение уровня активности PARP-1	49
2.11. Вестерн-блоттинг	49
2.12. Получение моноцитарной фракции клеток крови пациентов	50
2.13. Анализ эффективности совместного применения лекарственных препаратов.....	50
2.14. Оценка противоопухолевой активности кураксина CBL0137 и диминазена <i>in vivo</i> на модели мышинового острого миелоидного лейкоза WENI- 3	51
2.15. Статистический анализ.....	52
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	53
3.1. Сравнительный анализ цитотоксической активности CBL0137 и диминазена на клетках опухолей системы крови <i>in vitro</i> и их противоопухолевой активности <i>in vivo</i>	53
3.1.1. Оценка цитотоксического эффекта ДНК-тропных молекул в отношении клеток опухолей системы крови.....	53
3.1.2. Оценка противоопухолевого эффекта негенотоксичных ДНК-тропных малых молекул <i>in vivo</i>	57
3.2. Анализ биологических эффектов кураксина CBL0137.....	64
3.2.1. Анализ влияния кураксина CBL0137 на клеточный цикл	64
3.2.2. Оценка апоптогенной активности кураксина CBL0137 на клеточных линиях опухолей системы крови	67
3.2.3. Исследование влияния кураксина CBL0137 на экспрессию генов сигнальных путей	70
3.2.4. Исследование влияния на активность белка PARP-1.....	74
3.3. Анализ влияния кураксина CBL0137 на цитотоксические эффекты доксорубицина, даунорубицина и иматиниба.....	75
3.4. Оценка цитотоксического эффекта кураксина на клетки переживающих культур пациентов с опухолями системы крови.....	76
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	78

4.1. Сравнение противоопухолевой активности негенотоксичных ДНК-тропных молекул	79
4.2. Влияние кураксина на апоптоз и клеточный цикл в клетках опухолей системы крови.....	80
4.3. Влияние кураксина на экспрессию кластеров генов таргетных путей.....	81
4.4. Ингибирующее действие кураксина на активность белка PARP-1	84
4.5. Кураксин CBL0137 потенцирует эффекты препаратов, применяемых в терапии опухолей ОСК.....	84
4.6. Кураксин CBL0137 демонстрирует цитотоксический эффект в отношении клеток переживающих культур, полученных от пациентов с опухолями системы крови.....	85
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	86
ВЫВОДЫ	88
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	90
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	92

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Опухоли системы крови (ОСК) – гетерогенная группа злокачественных новообразований органов кроветворения, таких как костный мозг, лимфатические узлы. Наиболее яркими представителями заболеваний данной нозологической группы являются лейкозы, множественная миелома и лимфомы, вносящие значительный вклад в структуру онкозаболеваемости (7%) и смертности (8%). Подходы к химиотерапии ОСК и результаты лечения зависят от возрастной группы пациентов и индивидуальных молекулярно-генетических особенностей. За последнее тридцатилетие значительные успехи были достигнуты в лечении подростковых острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ): пятилетняя безрецидивная выживаемость возросла до 70%. Тем не менее, ОЛЛ продолжает быть одной из основных причин смерти в подростковой группе. Для пациентов старше 30 лет пятилетняя выживаемость при ОЛЛ и остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) продолжает оставаться сравнительно низкой, варьируя от 10% до 50% в зависимости от возрастной группы пациентов и молекулярно-генетических особенностей. При этом от 7% до 18% летальных исходов от ОМЛ обусловлены побочным токсическим действием химиотерапии.

В настоящее время в терапии ОСК применяются цитостатические химиотерапевтические препараты (цитарабин, циклофосфамид, идарубицин, винкристин, доксорубицин и др.). Эти препараты не обладают избирательностью по отношению к опухолям и оказывают токсическое действие на все активно пролиферирующие клетки организма. Это определяет развитие таких побочных эффектов как нарушение гемопоэза, развитие гастроинтестинальной токсичности. Кроме того, применение цитостатиков приводит к возникновению вторых первичных опухолей, в основном, острых миелолейкозов, обладающих высокой резистентностью к химиотерапии.

В современной комбинированной химиотерапии лейкозов активно используются гормональные препараты - глюкокортикостероиды (дексаметазон,

преднизалон). Однако и эта группа препаратов не лишена недостатков, среди которых наиболее опасными являются инфекционные осложнения на фоне стойкой иммуносупрессии, развитие диабета, асептический остеонекроз, нарушения водно-солевого баланса.

Существенный вклад в повышение эффективности терапии ОСК внесли таргетные препараты, такие как ингибиторы тирозиновых киназ, в особенности, ингибиторы химерного белка BCR-ABL (иматиниб, базатиниб и др.), и анти-CD20 (ритуксимаб). Существенными ограничениями таргетной терапии являются узкая направленность препарата лишь на клетки, имеющие специфическое генетическое нарушение, и быстрая клональная эволюция опухоли, приводящая к появлению резистентного пула опухолевых клеток. Кроме того, множественность генетических нарушений, обуславливающих малигнизацию клетки, делает необходимой разработку большого количества новых таргетных препаратов, что является исключительно трудозатратным и дорогостоящим процессом.

Таким образом, все группы используемых препаратов имеют определенные недостатки, снижающие их эффективность и/или ограничивающие их применение, что актуализирует разработку новых подходов в терапии ОСК. В качестве одного из таких подходов можно рассматривать применение негенотоксичных ДНК-тропных малых молекул, которые, не взаимодействуя с ДНК ковалентно, способны формировать комплексы с макромолекулой за счет водородных связей, а также Ван-дер-Ваальсовых и электростатических взаимодействий. В эту группу входят как классические узкобороздочные лиганды (DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол), производные бисбензамидина пентамидин и диминазен, производные бисбензимидазола – хехст33342 и хехст33258, нетропсин), так и бифункциональные соединения, которые способны как интеркалировать между парами оснований, так и взаимодействовать с малой бороздкой макромолекулы, например, карбазольное производное кураксин CBL0137. Хотя эти агенты не обладают способностью ковалентно связываться с ДНК, их взаимодействие с узкой бороздкой приводит к изменению активности ряда ферментов (топоизомеразы I, хеликазы, ТАТА- связывающих белков,

поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1, дестабилизации хроматина и, как следствие, изменению активности ряда сигнальных путей клетки, вовлеченных в патогенез опухолей, в частности, сигнального пути WNT и сигнальные пути, активируемые гипоксией. Некоторые соединения уже применяются в медицинской или ветеринарной практике, кроме того, для некоторых из этих соединений уже показана противоопухолевая активность для ряда нозологий.

Степень разработанности проблемы

Работа посвящена изучению противоопухолевого действия двух негеноотоксичных ДНК-тропных препаратов, а именно Кураксина CBL0137 и диминазена. Кураксин CBL0137 – новый активно изучаемый противоопухолевый препарат, который представляет собой производное карбазола и способен как интеркалировать между парами оснований, так и взаимодействовать с малой бороздкой макромолекулы. Противоопухолевая активность этого препарата была продемонстрирована относительно широкого спектра солидных опухолей *in vitro* и *in vivo*. В основе противоопухолевого эффекта кураксина CBL0137 лежит его способность взаимодействовать с комплексом белков SPT16 и SSRP-1, образующих гистоновый шаперон FACT, что в свою очередь вызывает перераспределение комплекса FACT в ядре. Интегральным результатом воздействия CBL0137 на опухолевые клетки является существенное изменение активности пропролиферативных, провоспалительных и антиапоптотических сигнальных путей и активация IFN-зависимых сигнальных путей. Так, на разных моделях было показано влияние на сигнальные пути NF-kB, WNT, Notch.

Диминазен (беренил) относится к группе узкобороздочных лигандов (УБЛ) и применяется как антипротозойное средство для животных, инфицированных *Trypanosoma equiperdum*. Несмотря на отсутствие работ по противоопухолевой активности диминазена, для этого соединения показан ряд эффектов, свидетельствующих о возможности использования в терапии опухолей. Так беренил ингибирует LPS-индуцированную активацию воспалительных сигнальных путей NF-kB, STAT и p38, таким образом модулируя иммунный

ответ. Кроме того, диминазен связывает G-квадруплексы, находящиеся в таких важных для канцерогенеза генах, как *c-myc*, *bcl2* и *Tel22*.

Принимая во внимание недостаточную эффективность современных лекарственных средств, применяемых в терапии ОСК, противоопухолевую активность ДНК-тропных молекул в отношении солидных опухолей, активность ДНК-тропных малых молекул в отношении ряда молекулярных мишеней, которые рассматриваются перспективными для терапии ОСК, представляется обоснованным и целесообразным детальное изучение противоопухолевого действия ДНК-тропных малых молекул относительно ОСК с целью отбора более эффективных молекул, а также анализ молекулярных механизмов их действия.

Цель исследования

Целью настоящей работы являлась оценка противоопухолевого потенциала ДНК-тропных негенотоксичных малых молекул CBL0137 и диминазена в отношении ОСК, а также выбор более активного соединения и анализ механизмов его противоопухолевого эффекта.

Задачи исследования

В соответствии с основной целью исследования были поставлены следующие задачи:

- сравнить цитотоксическую активность CBL0137 и диминазена в отношении клеток ОСК *in vitro* и выбрать более активное соединение;
- сравнить противоопухолевую активность CBL0137 и диминазена в отношении ОСК на модели *in vivo* и выбрать более активное соединение;
- изучить влияние более эффективной ДНК-тропной малой молекулы на клеточный цикл при использовании ряда линий ОСК;
- проанализировать апоптогенную активность более эффективной ДНК-тропной малой молекулы на клетках ОСК;
- провести анализ влияния более эффективной ДНК-тропной малой молекулы на активность сигнальных путей в клетках ОСК;

- изучить влияние выбранной ДНК-тропной малой молекулы на функционирование PARP1;
- изучить лекарственные взаимодействия с другими препаратами, применяемыми в терапии;
- изучить противоопухолевую активность CBL0137 в отношении опухолевых клеток переживающих культур, полученных от пациентов с ОСК.

Методы и методология исследования

В исследовании в качестве методологической основы были применены комплексный и системный подходы с использованием молекулярно-биологических методов исследования, а также методов моделирования процессов канцерогенеза в системах *in vitro* и на лабораторных животных. В работе были использованы клетки линии Т- и В-клеточного острого лимфобластного лейкоза CCRF-CEM и CCRF-SB, острого миелоидного лейкоза KG-1 и THP-1, хронического миелоидного лейкоза K562, множественной миеломы RPMI-8226 и NCI-H929 и мышьяная клеточная линия острого миелоидного лейкоза WENI-3. Цитотоксический эффект определяли с помощью МТТ-теста. Для оценки антипролиферативного эффекта исследовали влияние на клеточный цикл методом проточной цитофлуориметрии после окраски йодистым пропидием. Уровень апоптоза был определен методом проточной цитофлуориметрии после окраски йодистым пропидием и Аннексином-V, меченным FITC. Активность PARP-1 оценивали методами: реакция поли-АДФ-рибозилирования, вестерн-блоттинг. Оценку влияния на сигнальные пути опухолевых клеток осуществляли методом ПЦР в реальном времени с применением тестовой системы по оценке влияния на транскриптом клетки Human Signal Transduction Pathway Finder RT2Profiler PCR Array. Для исследования противоопухолевого эффекта исследуемых соединений *in vivo* была использована модель ОСК – мышьяный перевиваемый лейкоз WENI-3.

Научная новизна

Научная новизна данного исследования заключается в том, что впервые продемонстрированы:

- цитотоксические эффекты ДНК-тропных негенотоксичных молекул на клетки ОСК;
- противоопухолевые эффекты ДНК-тропных негенотоксичных молекул на модели ОСК *in vivo*;
- большая эффективность CBL0137 по сравнению с диминазеном в отношении ОСК *in vitro* и *in vivo*;
- вклад в противоопухолевый эффект *in vitro* CBL0137 активации апоптоза и ареста клеточного цикла
- действие CBL0137 на сигнальные пути в клетках ОСК, осуществляемое, прежде всего, на сигнальные пути WNT- и Hedgehog;
- ингибирование кураксином ДНК-зависимой активации белка PARP-1;
- потенцирующее влияние CBL0137 на цитотоксический эффект доксорубицина, даунорубицина и иматиниба в клетках ОСК.

Теоретическая и практическая значимость

Низкомолекулярные ДНК-тропные соединения необходимы для более безопасной и эффективной химиотерапии ОСК. В ходе выполнения диссертационной работы было протестировано противоопухолевое действие соединений, относящихся к узкобороздочным лигандам и соединениям со смешанным типом взаимодействия с ДНК. Для представителей двух классов была оценена цитотоксичность в отношении клеток ОСК и проведен анализ противоопухолевой активности *in vivo*. Для наиболее активного соединения – CBL0137, была продемонстрирована апоптогенная активность и способность ингибировать клеточный цикл. Также было показано, что во всех линиях CBL0137 модулирует активность сигнальные пути WNT/ β -катенин, Hedgehog, Notch и PPAR. Была оценена способность CBL0137 влиять на активность белка PARP-1. Была показана способность CBL0137 потенцировать цитотоксический

эффект других препаратов, применяемых в терапии ОСК. Полученные данные свидетельствуют о том, что данное соединение является перспективным для дальнейшего проведения доклинических испытаний в качестве потенциального препарата для терапии ОСК в моно- и комбинированных режимах.

Положения, выносимые на защиту

- 1) Соединение со смешанным типом взаимодействия с ДНК – кураксин CBL0137, обладает более выраженным противоопухолевым эффектом по сравнению с узкобороздочным лигандом диминазеном на моделях ОСК *in vitro* и *in vivo*.
- 2) В основе цитотоксической активности кураксина CBL0137 лежит как способность индуцировать апоптоз, так и ингибировать прогрессию фаз клеточного цикла.
- 3) Во всех тестируемых линиях кураксин CBL0137 влиял на активность сигнальных путей Hedgehog и WNT/ β -катенин.
- 4) Кураксин CBL0137 способен ингибировать активацию белка PARP-1.
- 5) Кураксин CBL0137 потенцирует цитотоксический эффект применяемых в терапии ОСК препаратов.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в соответствии с принятыми стандартами исследований по экспериментальной онкологии, полученные автором новые данные согласуются с отдельными имеющимися в литературе данными по изучению биологических свойств низкомолекулярных ДНК-тропных молекул. Достоверность полученных данных основана на адекватном выборе и корректном использовании в исследовании современных методов анализа, полученные результаты обработаны с использованием адекватных методов математической статистики.

Результаты исследования были представлены и обсуждены на конференциях: Медицинская Весна (30 апреля - 6 мая 2014, Москва, Россия), Молекулярная онкология: итоги и перспективы (16-17 декабря 2015, Москва,

Россия), кластер конференции "Оргхим 2016" (27 июня -1 июля 2016, Санкт-Петербург, Россия), XX менделеевский съезд по общей и прикладной химии (26-30 сентября 2016, Екатеринбург, Россия), 8-й международный симпозиум по биоорганической химии (4-8 сентября 2016, Москва, Россия), Молекулярная онкология: итоги и перспективы (6-8 декабря 2015, Москва, Россия), III Петербургский онкологический форум «Белые ночи» (23–24 июня 2017, Санкт-Петербург, Россия), Четвертая международная научная конференция Секция неорганической и координационной химии и физической и коллоидной химии 2017 (24-28 апреля 2017 Москва, Россия), Молекулярная онкология: итоги и перспективы (6-8 декабря 2017, Москва, Россия), 12-я международная конференция и 5-я азиатская конференция по мутагенам окружающей среды (Сеул, Корея, 2017 г.), IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (17-19 декабря 2018, Москва, Россия), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (8-12 апреля 2019, Москва, Россия), V Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (16-18 декабря 2019, Москва, Россия).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Опухоли системы крови (ОСК) представляют собой новообразования, развивающиеся из клеток органов кроветворения и вносящие значительный вклад в структуру онкозаболеваемости (7%) и смертности (8%). В настоящее время по частоте распространения они занимают 5-6 место среди всех онкологических заболеваний и составляют около 50% злокачественных новообразований у детей и лиц юношеского возраста. К настоящему времени накоплен клинический опыт, позволяющий проводить химиотерапию ОСК. Основные достижения в этой области связаны с химиотерапией, включающей индукционный и консолидирующий режимы, направленные на достижение и поддержание ремиссии. К проблемам современной химиотерапии ОСК следует отнести: узкий терапевтический коридор используемых препаратов (есть узкий интервал между лечебной и токсической дозами); неспецифичность эффектов действия используемых препаратов (токсическое действие цитостатических препаратов на нормальные, делящиеся клетки организма), что обуславливает развитие неспецифических побочных эффектов. Перечисленные недостатки нередко являются причиной смертельных исходов у больных и значительно снижают качество жизни в дальнейшем.

В последние годы перспективным подходом в комбинированной химиотерапии является направленная постгеномная коррекция профиля экспрессии генов, активность которых связана с генетической стабильностью, ослаблением контроля над пролиферацией и приобретением ряда других свойств опухолевой клетки.

В обзоре литературы рассмотрены: классификация ОСК; молекулярные механизмы, вовлеченные в их патогенез; классификация ДНК-тропных негенотоксичных малых молекул.

1.1. Классификация опухолей системы крови

ОСК относятся к клональным заболеваниям, то есть опухолевые клетки являются потомством одной первоначально трансформированной клетки [1]. Они

представляют собой широкую группу заболеваний, включающую новообразования лимфоидного и миелоидного рядов дифференцировки. Для их классификации используют морфологический, цитогенетический, генетический анализы, учитывая клинические особенности заболеваний.

В соответствии с этим основными видами ОСК по распространённости делят на локальные и генерализованные заболевания. К первой группе относятся лимфомы - первоначально локализующиеся вне костного мозга опухоли (преимущественно в лимфатических узлах), которые представляют собой разрастания малигнизированных клеток, образующих солидные опухоли с возможной колонизацией ими костного мозга и генерализацией процесса. Ко второй группе относят лейкозы, которые имеют первичную локализацию в костном мозге и впоследствии диссеминируют в кровяное русло, селезенку, лимфатические узлы, печень и другие ткани. Несмотря на значительные внутригрупповые различия данная группа опухолей имеет схожий патогенез.

1.1.1. Миелоидные заболевания

По классификации ВОЗ от 2016 года миелоидные новообразования включают такие заболевания как: миелодиспластический синдром (МДС), острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), миелопролиферативные новообразования (МПН), миелопролиферативные заболевания, протекающие с эозинофилией, и миелодиспластические-миелопролиферативные заболевания [2].

Миелодиспластический синдром – это клональное заболевание, характеризующееся цитопенией, дисплазией одной или нескольких линий миелоидной дифференцировки и повышенным риском развития острого миелоидного лейкоза [3]. Цитогенетически данная группа характеризуется довольно высокой частотой хромосомных аномалий. При этом наблюдаются сложные абберрации или изолированные аномалии хромосом 5, 7, 9, 11, 12, 13 [4], а также соматические мутации в следующих генах: TP53, EZH2, ETV6, RUNX1, ASXL1 [5] [6].

Согласно ВОЗ 2016 миелопролиферативные новообразования включают заболевания, связанные с мутациями JAK2/CALR/MPL (такие как истинная

полицитемия (ИП), эссенциальная тромбоцитемия (ЭТ), первичный миелофиброз (ПМФ)), хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), хронический нейтрофильный лейкоз (ХНЛ), хронический эозинофильный лейкоз (ХЭЗ) [2]. Заболевания этой группы возникают в результате злокачественной трансформации гемопоэтической стволовой клетки или клетки-предшественника костного мозга с последующей пролиферацией и дифференцировкой до зрелых форм (Рисунок 1). Чаще всего клеточным субстратом МПЗ являются представители гранулоцитарного ряда - нейтрофилы. ХМЛ занимает особое место в этой группе новообразований. Более чем в 95% случаев заболевания в основе патогенеза лежит образование транслокации $t(9;22)(q34;q11)$, так называемой Филадельфийской хромосомы. В результате такого генетического нарушения на хромосоме 22 образуется ген *BCR-ABL*, который кодирует химерный белок с молекулярной массой 210 кДа [7]. Данный белок имеет выраженную тирозин-киназную активность, что обуславливает цепь событий, ведущих к усилению клеточной пролиферации.

Другой крупной группой МПН являются новообразования, несущие мутации в: гене, кодирующем тирозиновую киназу из семейства Янус-киназ *JAK-2* (наиболее распространены мутации *JAK2V617F*, *JAK2D620E* [8] [9]); гене рецептора тромбопоэтина *MPL* (наиболее часто встречается мутация *MPLW515* [16834459]); гене, кодирующем кальретикулин *CALR* (наиболее распространены мутации *CALR p.L367fs*46* и *CALR p.K385fs*47* [10]). Описанные выше гены ассоциированы с сигнальным путём STAT/JAK и их мутация приводит к его гиперактивации [9-11].

Миелопролиферативные заболевания, протекающие с эозинофилией - клональные заболевания, характеризующиеся наличием хромосомных мутаций в генах рецепторных тирозиновых киназ *PDGFRA*-, *PDGFRB*- и *FGFR1*, а также образованием химерного гена *PCMI-JAK2* [12].

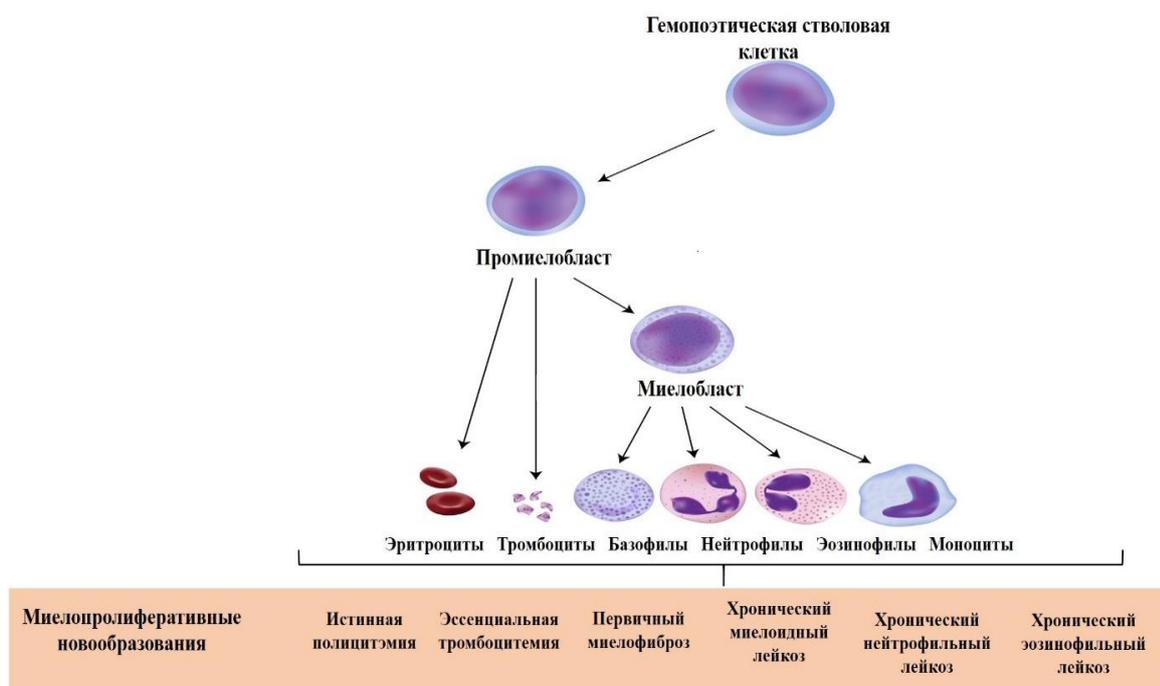


Рисунок 1 - Миелопролиферативные новообразования

Миелодиспластические миелопролиферативные заболевания совмещают в себе клинические, лабораторные и морфологические особенности МДС и МПН. Данная группа заболеваний характеризуется рефрактерной анемией с кольцевыми сидеробластами и выраженным тромбоцитозом. Цитологенетически для этой группы характерно наличие мутаций в генах *SRSF2*, *TET2* и *ASXL1* встречающиеся более чем в 80% случаев [13] [14].

Острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) - гетерогенная группа клональных ОСК, характеризующаяся нарушением дифференцировки, активной пролиферацией клеток-предшественниц и, как следствие, накоплением в костном мозге и периферической крови незрелых гемопоэтических клеток. ОМЛ является самым распространенным заболеванием этой группы среди взрослых, составляя 70% случаев [15]. В первую очередь это связано с возрастным накоплением мутаций в клетках костного мозга. Так, к возрасту 70 лет около 10% клеток системы крови человека имеют клональные мутации [16]. Среди наиболее часто мутирующих генов встречаются регуляторы таких процессов как РНК-сплайсинг (*SRSF2*), метилирование ДНК (*DNMT3a*, *TET2*, *IDH1/2*), модификация хроматина (*ASXL1*), способствующие развитию МДС у данной возрастной категории. Однако

в ряде случаев описанные мутации встречаются у пациентов с ОМЛ, что подразумевает злокачественную трансформацию МДС и развитие «вторичного» ОМЛ [17]. В отличие от вторичных ОМЛ, пациенты с ОМЛ *de novo* несут мутации в другом паттерне генов, чаще всего это *RUNX1*, *CEBPA*, *FLT3* и *MLL* [17]. Также при ОМЛ встречается большое количество перестроек хромосом 3, 5, 7, 11, 12 и др., что приводит к изменению экспрессии ряда генов, в том числе к подавлению активности генов супрессоров опухолевого роста и активации экспрессии онкогенов [18].

1.1.2. Лимфоидные заболевания

Согласно уточненной в 2016 году классификации ВОЗ 2008 г новообразования лимфоидной ткани можно разделить на: острые лейкозы смешанного фенотипа, лимфогранулематоз (болезнь Ходжкина), посттрансплантационные лимфопролиферативные заболевания, гистиоцитарные или дендритные новообразования [19], Т- и В-лимфобластные лейкозы и лимфомы, в последней группе выделяют: В-лимфобластные лейкозы и лимфомы, Т-лимфобластные лейкозы и лимфомы [2].

Острые лейкозы смешанного фенотипа (ОЛСФ) – гетерогенная группа заболеваний, характеризующаяся наличием «билинейных» популяций, экспрессирующих как маркеры миелоидного ростка, так и маркеры лимфоидного [20], при этом в одних случаях встречаются клоны, каждый из которых экспрессирует маркеры, характерные только для одной линии, в других случаях клетки на поверхности своей мембраны экспрессируют маркеры сразу двух линий. В этой группе также выделяют лимфобластные лейкозы и лимфомы из НК-клеток. При ОЛСФ высока частота появления хромосомных аномалий, в ряде популяций достигающая 90% [21], но специфической мутации, характеризующей данную группу, до сих пор не выделено. При этой нозологии могут встречаться такие мутации как $t(9;22)(q34;q11)$ с образованием гена *BCR-ABL1*, $t(v;11q23)$ с перестройкой гена *MLL* [20] и т.д.

В-клеточные лимфобластные лимфомы и лейкозы. Для данной группы опухолей наиболее характерны хромосомные нарушения. Сюда можно отнести

появление таких мутантных генов как: *ETV-RUNX1*, *KMT2A/MLL*, *BCR-ABL*, *IL3-IGH*, *E2A-HLF* [22]. Кроме того, встречается гиперплоидность хромосом 4, 6, 10, 14, 17, 18, 21 и X [23]. Также для данной группы характерно появление точечных мутации в генах, регулирующих развитие лимфоидных клеток: *PAX5*, *IKZF1*, *LMO2*, *ETV6*, которые наблюдаются в 40% случаев заболеваний [24]. Помимо этого, регистрируется высокая частота мутации в генах супрессоров опухолевого роста: *TP53*, *RD1*, *CDKN2A/CDKN2B* [24]. Среди этих нарушений можно выделить мутации в гене *IKZF1*, который кодирует транскрипционный фактор Ikaros, необходимый для регуляции дифференцировки лимфоидной ткани [25].

Т-клеточные лимфобластные лимфомы и лейкозы. Трансформация Т-клеток в бласты - сложный процесс, зависящий от различных генетических изменений, модулирующих пролиферацию, выживание и дифференцировку. Наиболее частой генетической аномалией, характерной для Т-клеточных опухолей является делеция участка 9p21, несущего последовательность генов опухолевых супрессоров *p16/INK4A* и *p14/ARF*. Данная мутация встречается более чем в 70% случаев лейкозов и лимфом [26]. Кроме того, более чем для 50% случаев Т-клеточных опухолей характерно наличие активирующих мутаций в гене *NOTCH1* [27]. Последнее приводит к конститутивной активации сигнального пути Notch, необходимого для выживания Т-клеток [28]. Таким образом, инактивация опухолевых супрессоров *p16/INK4A* и *p14/ARF* и активация сигнального пути Notch являются ключевыми событиями в патогенезе Т-клеточных опухолей. Эти опухоли характеризуются также рядом специфичных мутаций, связанных с транслокациями онкогенов, таких как: *TAL1*, *TAL2*, *LYL1*, *BHLHB1*, *LMO2*, *HOXA*, *MYC*, *MYB* под промоторы генов *TCRB* и *TCRA*, специфичных для Т-клеток [29, 30].

Лимфогранулематоз Ходжкина – новообразование лимфоидной ткани, характеризующееся наличием гигантских клеток Рид–Березовского–Штернберга в лимфоузлах. Для данной нозологии одним из частых генетических нарушений является мутация в гене опухолевого супрессора *TNFRSF14*, данное нарушение встречается более чем в 40% случаев [31]. В ряде случаев наблюдается

амплификация генов, кодирующих иммунные чекпоинты PD-L1 и PD-L2 [32]. Помимо этого, в 20% случаев обнаруживаются транслокации онкогенов *BCL1*, *BCL2*, *BCL3*, *BCL6*, *REL* и *MYC* под промоторную область генов иммуноглобулинов [33].

Таким образом, современная классификация ОСК отражает клеточный состав новообразований, соответствующий этапу гемопозеза, на котором произошла трансформация клетки-предшественника. Для большинства форм опухолей системы крови характерны определенные генетические нарушения и соответствующие им изменения активности сигнальных путей.

1.2. Сигнальные пути в опухолях системы крови

Канцерогенез – процесс характеризующийся последовательными генетическими и эпигенетическими изменениями, которые позволяют клеткам выходить из-под гомеостатического контроля. Опухолевая прогрессия, помимо изменения внутренних сигналов клетки, тесно связана с изменениями в сложном взаимодействии опухолевых клеток с клетками микроокружения и внеклеточным матриксом. Таким образом, опухолевые клетки обладают рядом свойств, отличающих их от нормальных клеток, таких как: резистентность к проапоптотическим сигналам; метаболическим изменениям, в том числе переходу на анаэробный гликолиз; индукцию ангиогенеза; уход из-под иммунного контроля; изменение миграционной активности и др. В основе всех приобретенных опухолевыми клетками свойств лежат нарушения регуляции передачи сигнальных путей.

1.2.1. Сигнальный путь WNT/ β -катенин

Канонический сигнальный путь WNT (Сигнальный путь WNT/ β -катенин) – ключевой регулятор таких клеточных процессов как дифференцировка, миграция, пролиферация, апоптоз и поддержание стволового фенотипа [34] [35]. Главным компонентом этого пути является β -катенин, принадлежащий к семейству эволюционно консервативных белков – катенинов. Данное семейство разделено на три подсемейства: β -подсемейство (β -катенин и плако-глобин), подсемейство

p120 (p120, ARVCF, δ -катенин), α -подсемейство (α -E-катенин, α -N-катенин, α -T-катенин) [36]. Изначально предполагали, что β -катенин может локализоваться только вблизи клеточной мембраны и участвует в процессах адгезии и формирования клеточных контактов, дальнейшие исследования продемонстрировали роль β -катенина, как мессенджера сигнала от гликопротеинов WNT [37]. Семейство секретируемых липид-модифицированных белков WNT, кодирующихся 19 генами [38], функционально можно разделить на три основные группы: активирующие канонический сигнальный путь WNT (WNT2, WNT2b, WNT3, WNT3a, WNT8), активирующие неканонические сигнальные пути, т.е. не связанные с функционированием β -катенина (WNT5a, WNT7a), бисфункциональные, активирующие как канонический, так и неканонические сигнальные пути (WNT11) [39, 40].

В основе функционирования сигнального пути WNT лежит постоянная деградация β -катенина в отсутствии WNT-лиганда [41]. Главным регулятором активности этого сигнального пути является комплекс деградации β -катенина, компонентами которого являются: APC (adenomatous polyposis coli), GSK3 β (glycogen synthase kinase 3 β), CK1 (casein kinase 1) и Axin [42]. Эти белки фосфорилируют β -катенин по аминокислотным остаткам Ser45, Ser33, Ser37 и Ser41, что в свою очередь приводит к активации комплекса E3-убиквитин лигазы TRCP-1 и последующей протеосомной деградации [43]. В ответ на взаимодействие рецептора Fz (Frizzeld) и ко-рецепторов LPR5/6 с WNT-лигандами и агонистами R-spondin и Norrin происходит активация белка DVL (Dishevelled) и связывание белка деградирующего комплекса Axin [41]. Перечисленные выше события приводят к распаду комплекса деградации β -катенина, накоплению β -катенина в цитоплазме и последующей транслокации в ядро, где он связывается с транскрипционным фактором TCF/Lef, что запускает экспрессию таргетных генов [44, 45].

Сигнальный путь WNT играет важную роль при созревании клеток-предшественников, гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), в зрелые клетки крови [46]. В тканях кроветворения WNT-сигналинг активирован на всех этапах

развития организма. Во время эмбриогенеза его активность регулирует формирование первичной полоски, в задней части которой будет закладываться желточный мешок с очагами эритропоэза [47], во время фетальной фазы сигнальный путь необходим для выживания клеток [48]. В кроветворных органах взрослого организма сигнальный путь WNT является одним из факторов взаимодействия между гемопоэтическими стволовыми клетками и клетками межклеточного окружения - экспрессия WNT-лигандов остеокластами ускоряет формирование гемопоэтических стволовых ниш [49] [50].

Для нормального гемопоэза необходима точная регуляция активности WNT-сигналинга, что достигается за счёт баланса между внеклеточными, цитоплазматическими и внутриядерными звеньями сигнального пути. Для устойчивого развития опухолей системы крови необходима активация пролиферации, ингибирование апоптоза и блокирование дифференцировки, что может являться результатом дерегуляции WNT-сигналинга. Транслокация β -катенина в ядро наблюдается в клетках лейкозов [51], лимфом [52] и множественной миеломы [53], однако механизмы активации могут быть разными. Среди нарушений сигнального пути WNT в ОСК можно выделить повышение чувствительности к WNT-лиганду, повышение активности передачи WNT-сигнала, нарушение экспрессии генов транскрипционных факторов TCF и Lef (Рисунок 2).

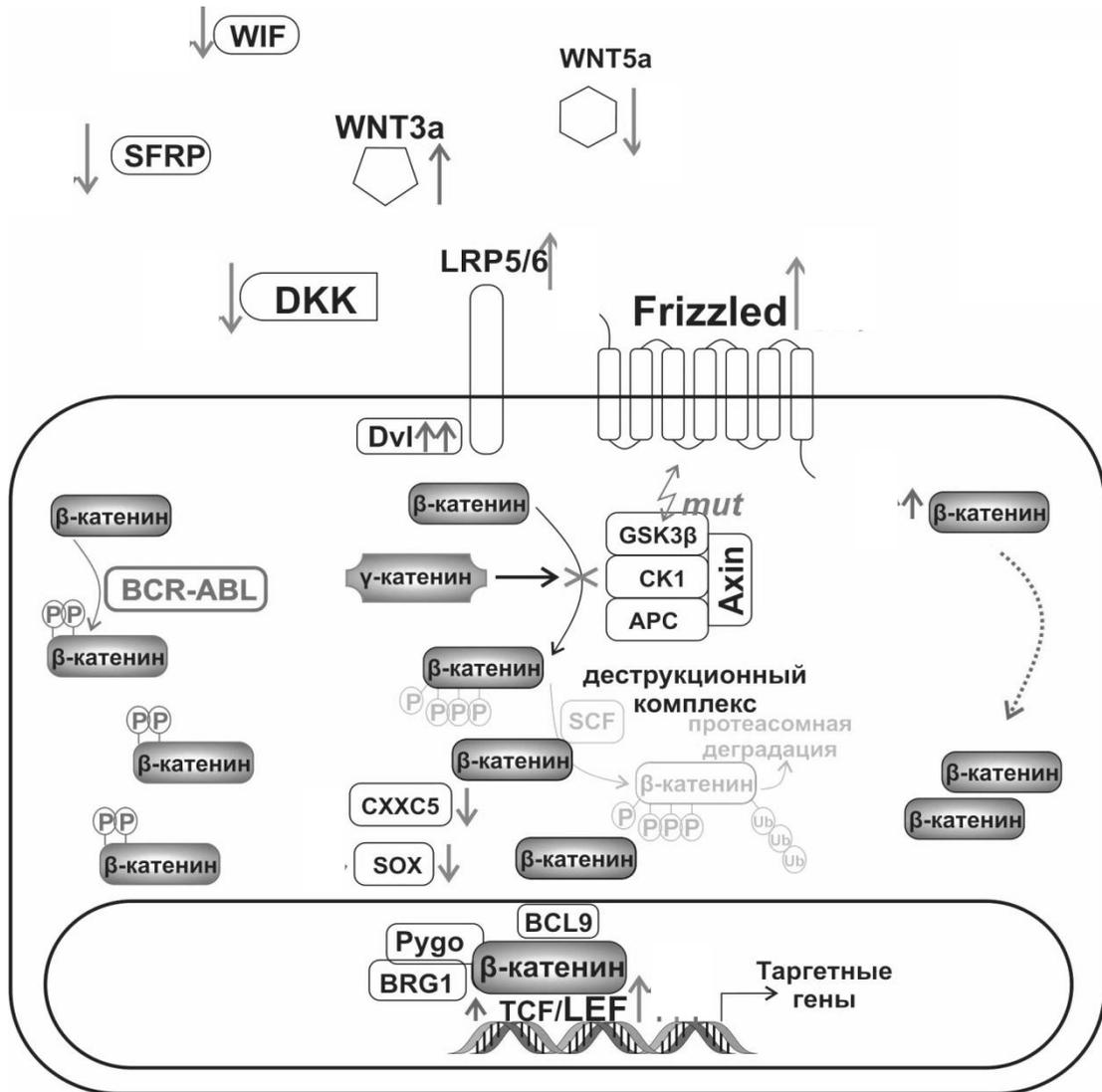


Рисунок 2 - Схематическое изображение сигнального пути WNT/β-катенин с возможными поломками в опухолях системы крови. Где ↑ - повышенная экспрессия, ↓ - снижение экспрессии, mut – мутации

1.2.2. Сигнальный путь Hedgehog

Сигнальный каскад Hedgehog является ключевым регулятором эмбрионального развития, клеточной пролиферации и поддержания стволового фенотипа [54]. У млекопитающих выделяют три белка Hedgehog (Hh): Sonic-Hedgehog (Shh), Indian-Hedgehog (Ihh) и Desert-Hedgehog (Dhh) [55]. Shh и Ihh зачастую имеют совпадающие функции для ряда тканей, но в основном, Shh регулирует развитие клеток нервной системы и вовлечен в формирование конечностей, Ihh вовлечен в развитие костного скелета, в то время как Dhh ассоциирован с регуляцией гонадогенеза [56-58]. Sonic-Hedgehog среди них

является самым изученным белком, кроме того, именно он является регулятором гемопоэза [59].

Канонический Shh-путь активируется при взаимодействии гликопротеина Shh, играющего роль лиганда, и трансмембранного белка Patched (Ptch). В отсутствие своего лиганда Ptch ингибирует активность белка Smo, выполняющего роль рецептора, связанного с G-белком [60, 61]. Взаимодействие Shh с Ptch приводит к деградации последнего, в тоже время происходит высвобождение Smo, его транслокация на первичную целию клетки, где происходит активация еще одного участника сигнального пути – Gli. Далее Gli перемещается в ядро, где выполняет роль транскрипционного фактора [62]. В настоящее время выделяют 3 белка Gli (Gli1, Gli2, Gli3), каждый из которых имеет в своей структуре цинковый палец и выполняет роль транскрипционного фактора. Gli1 выполняет роль активатора транскрипции, в то время как Gli3 действует как ингибитор транскрипции, Gli2 бифункционален и его активность определяется посттранскрипционными модификациями [63].

Гемопоэз является Hedgehog-зависимым процессом. Данный путь активен уже в период гемопоэза в стенке желточного мешка (2-я и 3-я недели эмбрионального развития), однако на этом этапе сигнальный путь в большей степени вовлечен в васкулогенез и в меньшей - в гепатопоэз [64]. Позже, во время формирования так называемого аорто-гонадо-мезонефроса сигнальный путь Nn необходим для выживания и увеличения популяции ГСК [65]. В дальнейшем активность Nn-сигналинга необходима для поддержания ниш ГСК во время фетального гемопоэза и костномозгового гемопоэза [66]. Кроме поддержания пула ГСК сигнальный путь Nn во взрослом организме участвует в лимфопоэзе. Продуцируемый дендритными клетками Shh оказывает антиапоптотическое и пролиферативное действие на В-клетки герминальных центров [67]. Nn-сигналинг также вовлечен в формирование CD4 и CD8 Т-лимфоцитов [68, 69].

Одним из косвенных признаков того, что сигнальный путь Nn играет важную роль при развитии опухолей системы крови, является эффективность действия ингибиторов Nn-сигналинга (например, циклофамин) на опухолевые

клетки этих нозологических форм [70, 71]. Кроме того, в ряде ОСК активация сигнального пути Hh приводит к развитию МЛУ [72, 73]. К основным механизмам дерегуляции этого сигнального пути относятся: паракринная активация и гиперэкспрессия компонентов сигнального пути, в основном Gli1, Ptch1 и Smo [72, 74] (Рисунок 3).

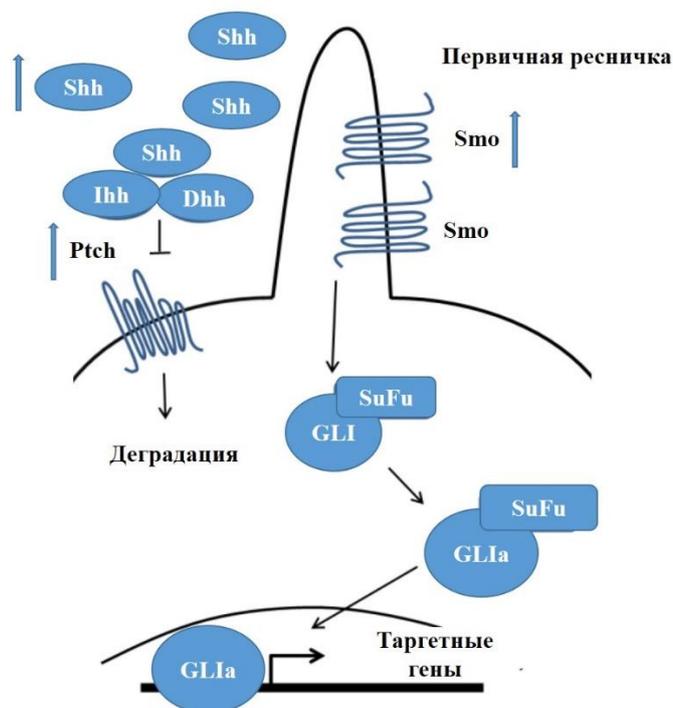


Рисунок 3 - Схематическое изображение сигнального пути Hedgehog и пути его активации в опухолях системы крови (адаптировано из [77])

Первый путь является основным механизмом активации Hh-сигналинга при множественной миеломе и некоторых видах лейкозов и связан со взаимодействием опухолевых и стромальных клеток костного мозга [75, 76].

1.2.3. Сигнальный путь Notch

Эволюционно-консервативный сигнальный путь Notch является основным регулятором межклеточных взаимодействий. В зависимости от клеточного контекста этот сигнальный путь может как положительно, так и отрицательно регулировать следующие процессы: пролиферацию, клеточную гибель, поддержание стволового фенотипа и активацию дифференцировки [78, 79].

Семейство трансмембранных рецепторов Notch у млекопитающих включает 4 белка, отвечающих за разные функции [80]. Внеклеточный домен всех белков Notch содержит повторы, подобные эпидермальному фактору роста (EGF-подобные повторы), которые необходимы для взаимодействия с лигандом [81]. За этими повторами следует регион негативной регуляции, предотвращающий активацию рецептора в отсутствие лиганда, и домен гетеродимеризации [82], трансмембранный домен и внутриклеточный домен (NICD – Notch Intracellular Domain) [83]. В качестве лигандов в данном сигнальном пути выступают белки семейства Delta и Serrate, также являющиеся трансмембранными белками. У млекопитающих семейство Delta представлено белками Dll1, Dll3, Dll4, а семейство Serrate включает Jagged1, Jagged2 [84]. Образовавшийся комплекс лиганда с рецептором проникает в клетку посредством эндоцитоза. Далее происходит конформационное изменение рецептора и его последующее протеолитическое расщепление с помощью протеазы ADAM. Всё это приводит к образованию части рецептора NEXT, протеолиз которой осуществляет γ -секретаза, при этом происходит высвобождение белка NICD и его транслокация в ядро [85]. В ядре, взаимодействуя с факторами RBPJ и MAML, NICD образует транскрипционный активационный комплекс Notch, который запускает транскрипцию Notch-зависимых генов.

Впервые роль сигнального пути Notch как регулятора гемопоэза начали рассматривать после обнаружения экспрессии рецептора Notch-1 в клетках-предшественниках, положительных по CD34 [86]. В дальнейшем для сигнального пути Notch была показана ключевая роль как в регуляции дифференцировки стволовых клеток миелоидного и лимфоидного ростков, так и в регуляции дифференцировки клеток-предшественников этих ростков. Конститутивная активация этого пути в стволовых клетках приводит к их выживанию и самообновлению [87]. Активация сигналинга Notch в гемопоэтических стволовых клетках человека происходит в результате взаимодействия рецептора Notch1 с лигандами Jagged1, Dll1 и Dll4, экспрессируемыми мезенхимальными клетками костного мозга [88]. Notch регулирует как дифференцировку T-клеток, так и B-

клеток [89]. Экспрессия лигандов Notch происходит как в тимусе, где дифференцируются Т-клетки [90], так и в маргинальной зоне лимфоузлов, где происходит дифференцировка В-клеток [91].

Впервые вовлеченность сигнального пути Notch в патогенез ОСК была показана в клетках Т-клеточного лейкоза. В опухолевых клетках была найдена транслокация $t(7:9)(q34;q34)$, в результате которой образуется усеченная форма белка Notch1, соответствующая NICD [92]. Такая мутация приводит к активации сигнального пути и промоции опухолевого роста, что связано с влиянием Notch на сигнальные пути PI3K/Akt и Мус. Позже активация сигнального пути Notch была показана для разных видов ОСК. Наиболее распространенными причинами aberrантной активации Notch-сигналинга являются: активирующие мутации в гене Notch-1 [93] и гиперэкспрессия рецепторов или лигандов [94] (Рисунок 4). Однако для ряда ОСК показана опухоль-ингибирующая роль сигнального пути Notch. Например, при В-клеточном остром лейкозе активация Notch может приводить к апоптозу и аресту клеточного цикла [95].

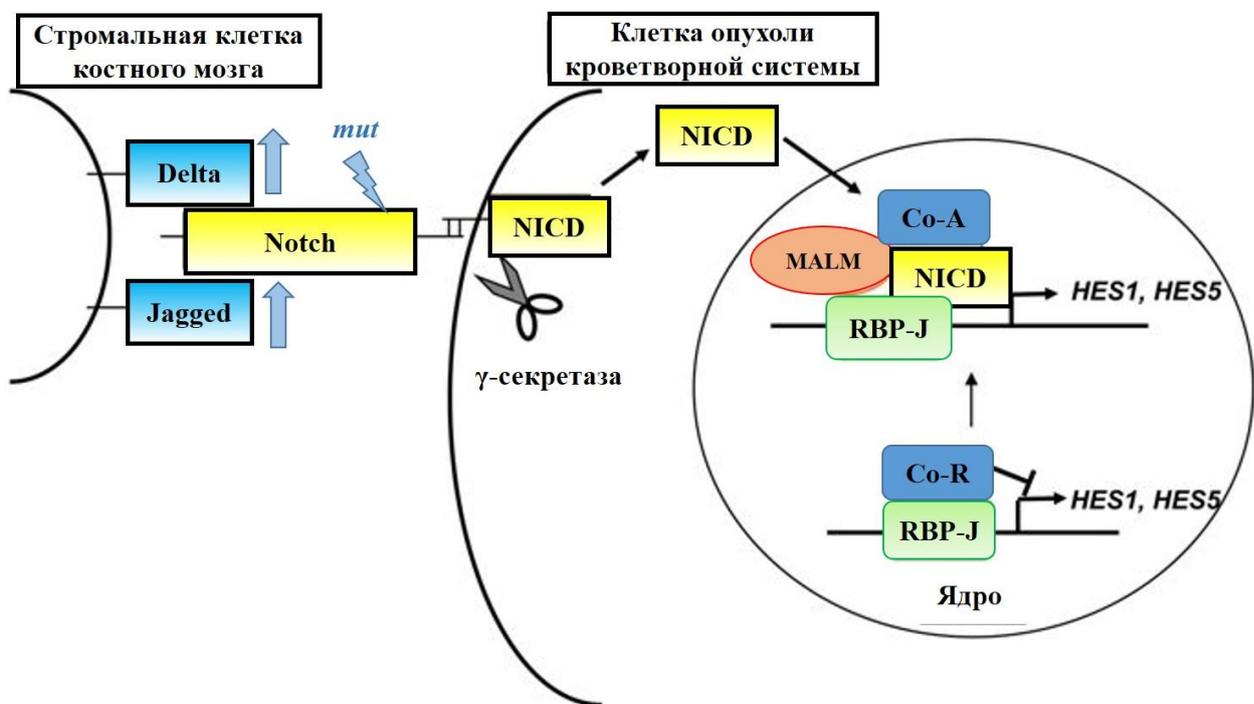


Рисунок 4 - Схематическое изображение сигнального пути Notch и пути его активация в опухолях системы крови (адаптировано из [96])

1.2.4. Сигнальный путь TGF β

Сигнальный путь трансформирующего фактора роста β выполняет функции регулятора программ развития многоклеточного организма. TGF β -зависимые цитокины влияют на клеточную пролиферацию и дифференцировку, играют активную роль в морфогенезе и поддержании тканевого гомеостаза.

Работа сигнального пути TGF β осуществляется посредством взаимодействия лигандов TGF β (у млекопитающих выделяют TGF β 1, TGF β 2 и TGF β 3) с рецепторами первого и второго типов, белками Smad (Smad-зависимый путь) и рядом других белков, включающих ERK1/2, p38, Akt (Smad-независимый путь) [97, 98]. Доступ лиганда к рецептору контролируется рядом внеклеточных связывающих факторов, таких как пептид LAP, белки LTBP, Noggin, Chordin, DAN и NBL1 [99]. Классическая активация сигналинга TGF β начинается со связывания лиганда со вторым рецептором TGF β (TGF β R2), этот комплекс фосфорилирует TGF β R1. В свою очередь фосфорилированный TGF β R1 фосфорилирует SMAD2 и SMAD3. Фосфорилированные белки SMAD2 и SMAD3 образуют гетеродимерный или гетеротримерный комплекс с белком SMAD4 [100]. Этот комплекс транслоцируется в ядро, где взаимодействует с ДНК-связывающими белками (AML, ATF-2, CBP и другими) [101, 102].

Основная роль сигнального пути TGF β в регуляции гемопоэза заключается в контроле численности популяции стволовых клеток, что реализуется через «удержание» гемопоэтических стволовых клеток в состоянии покоя [103]. Одним из механизмов, сопряжённых с подавлением пролиферации ГСК, является активация белками сигнального пути экспрессии рост-ингибирующих молекул, таких как p15, p21 и p27 [104, 105]. Однако данные эффекты продемонстрированы в основном с использованием TGF- β 1. Для изоформы TGF- β 2 было показано, что кратковременное увеличение концентрации лиганда на сублинии Kit-положительных ГСК приводило к схожим с экспозицией TGF- β 1 эффектам, в то время как базальный уровень TGF- β 2 запускал пролиферацию пула Kit⁺ ГСК, т.е. приводил к обратным эффектам [106]. В другой работе продемонстрирована зависимость функциональной активности TGF- β 2 от состава смеси сывороточных

белков и возраста [107]. Сигнальный путь TGF β способствует продвижению клеток по миелоидному ростку посредством активации пролиферации клеток-предшественниц миелоидного ростка и угнетения деления клеток-предшественниц лимфоидного ростка [108].

Как и в ГСК сигнальный путь TGF β в ОСК ингибирует пролиферацию, тем самым выступая в качестве супрессора опухолевого роста [109]. В основе нарушения работы сигнального каскада лежит снижение активности белков Smad, что может происходить либо из-за мутаций в генах, кодирующих эти белки, либо из-за взаимодействия с другими белками, например, химерными белками AML1/EVI1, AML1/ETO [110], [111] или вирусными белками Evi-1 и Tax [112, 113], что приводит к функциональной инактивации белков Smad. Другим механизмом резистентности к рост-ингибирующим сигналам сигнального пути TGF β является снижение рецепторов TGF β R [114]. Однако в ряде ОСК активация пути TGF β , наоборот, приводит к промоции опухолевого роста. При миелодиспластическом синдроме повышенная активность этого пути связана с угнетением эритропоэза [115], кроме того, в клетках хронического миелоидного лейкоза активация TGF β приводит к экспрессии генов *ICAM* и *KitL* [116], продукты которых способствуют уклонению опухолевых клеток от иммунного надзора и повышению пролиферационной активности [116] (Рисунок 5).

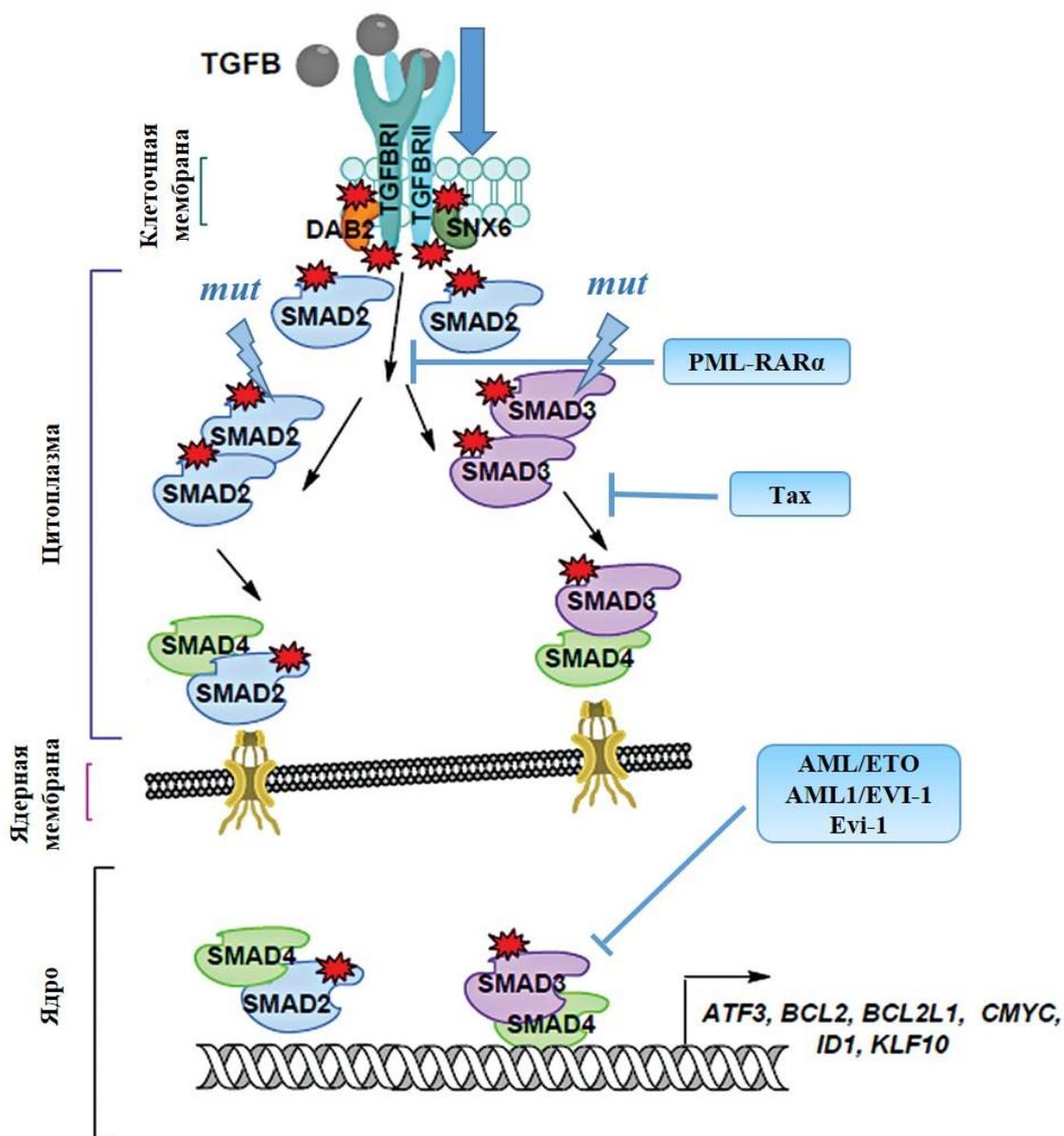


Рисунок 5 - Схематическое изображение сигнального пути TGF β и пути его активации в опухолях системы крови (адаптировано из [117])

1.2.5. Сигнальный путь PPAR

Рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами (PPAR), принадлежат к семейству лиганд-активируемых ядерных белков, которые также включают эстрогеновые, тиреоидные и глюкокортикоидные рецепторы [118]. Семейство белков PPAR состоит нескольких членов, кодируемых генами: *PPAR- α* (*NR1C1*), *PPAR- β* (*NR1C2*, известный также как *PPAR- δ*) и *PPAR- γ* (*NR1C3*). Изоформы PPAR экспрессируются определенными типами тканей, из-за чего функции каждой их ветвей этого сигнального пути различаются. Так, *PPAR- α* в

большей степени экспрессируется в клетках печени, почек, эпителиоцитах кишечника, сердечной и поперечнополосатой мускулатуры, в которой выполняет роль регулятора катаболизма жирных кислот и синтеза липопротеинов [119, 120]. PPAR- β экспрессируется клетками головного мозга, жировой тканью и клетками кожи [121]. А PPAR- γ в основном экспрессируется дифференцированными адипоцитами, при этом основной его функцией является регуляция адипогенеза и депонирование липидов [122]. Активация PPAR происходит при взаимодействии как с эндогенными лигандами, так и с синтетическими, например, тиазолидиндионами [123]. После активации специфическим лигандом белки PPAR транслоцируются в ядро, где образуют гетеродимерный комплекс с другим ядерным рецептором – рецептором ретиноида X. В ядре этот комплекс связывается с соответствующими респонсивными элементами (PPRE) [124]. Функция PPAR может модулироваться рядом ко-факторов (как активаторов, так и репрессоров) [125].

Роль сигнального пути PPAR в гемопоэзе изучена недостаточно. Известно, что ядерные рецепторы PPAR вместе с глюкокортикостероидным рецептором усиливают пролиферацию эритробластов и выход эритроцитов из костного мозга [126]. Однако отдельно активация, как и дефицит белка PPAR, не приводит к изменениям в составе клеток эритроцитарного ростка. Кроме того, в клетках ГСК белки PPAR выполняют роль регулятора метаболизма, модулируя экспрессию генов дыхательной цепи переноса электронов и ферментов гликолиза [127, 128]. Кроме того, активация PPAR в ГСК запускает митофагию и способствует асимметричному делению, характерному для стволовых клеток [129, 130].

На клетках ХЛЛ была показана способность PPAR- β повышать выживаемость опухолевых клеток в условиях метаболического стресса, что раскрывает возможности использования в химиотерапии этого заболевания ингибиторов PPAR- β [127]. Кроме того, для клеток ХЛЛ была показана защитная роль PPAR- α от цитотоксического действия ГК [129].

В то же время, в основном белки PPAR играют роль опухолевых супрессоров, в том числе и в ОСК [131]. Так, несмотря на экспрессию PPAR γ

клетками множественной миеломы, его активация приводит к апоптозу опухолевых клеток, а линии клеток, гиперэкспрессирующих PPAR γ , характеризуются большей долей клеток, находящихся в спонтанном апоптозе, в сравнение с другими линиями [132, 133]. Также активация PPAR γ в клетках ОМЛ приводит к инактивации киназ Erk и, как результат, подавлению клеточного роста [134].

Подводя итог обзору изменений сигнальных путей в клетках ОСК, можно отметить, что наиболее часто они затрагивают:

- сигнальные пути WNT и Hedgehog, активация которых приводит к бесконтрольной пролиферации, ослаблению апоптоза и приобретению опухолевыми клетками стволового фенотипа;

- сигнальный путь Notch, активация которого необходима для развития ряда опухолей ОСК благодаря его влиянию на ряд пропролиферативных сигнальных путей таких как Мус и PI3K/AKT, хотя в некоторых типах опухолей его активация вызывает может вызывать апоптоз и арест клеточного цикла;

- сигнальный путь TGF β , инактивация которого сопровождается дедифференцировкой и пролиферацией опухолевых клеток;

- сигнальный путь PPAR, влияющий на пролиферацию и выживаемость опухолевых клеток.

1.3 Семейство белков PARP как мишень в терапии опухолей системы крови

Белки семейства PARP катализируют реакцию поли-АДФ-рибозилирования (PAR) белков и нуклеиновых кислот [135]. В основе реакции, осуществляемой ферментами, лежит перенос остатка аденозиндифосфат-рибозы (АДФ-рибозила) на поли-АДФ-рибозильную цепь, связанную с модифицируемым белком. Донором АДФ-рибозы в этой реакции является никотинамидадениндинуклеотид (NAD $^{+}$). Реакция, в результате которой образуется полимер размером до 200 звеньев, является крайне энергозатратной [136], но необходимой для правильного протекания таких процессов как пролиферация, клеточная гибель, репарация и ремоделирование хроматина [135] (Рисунок 6).

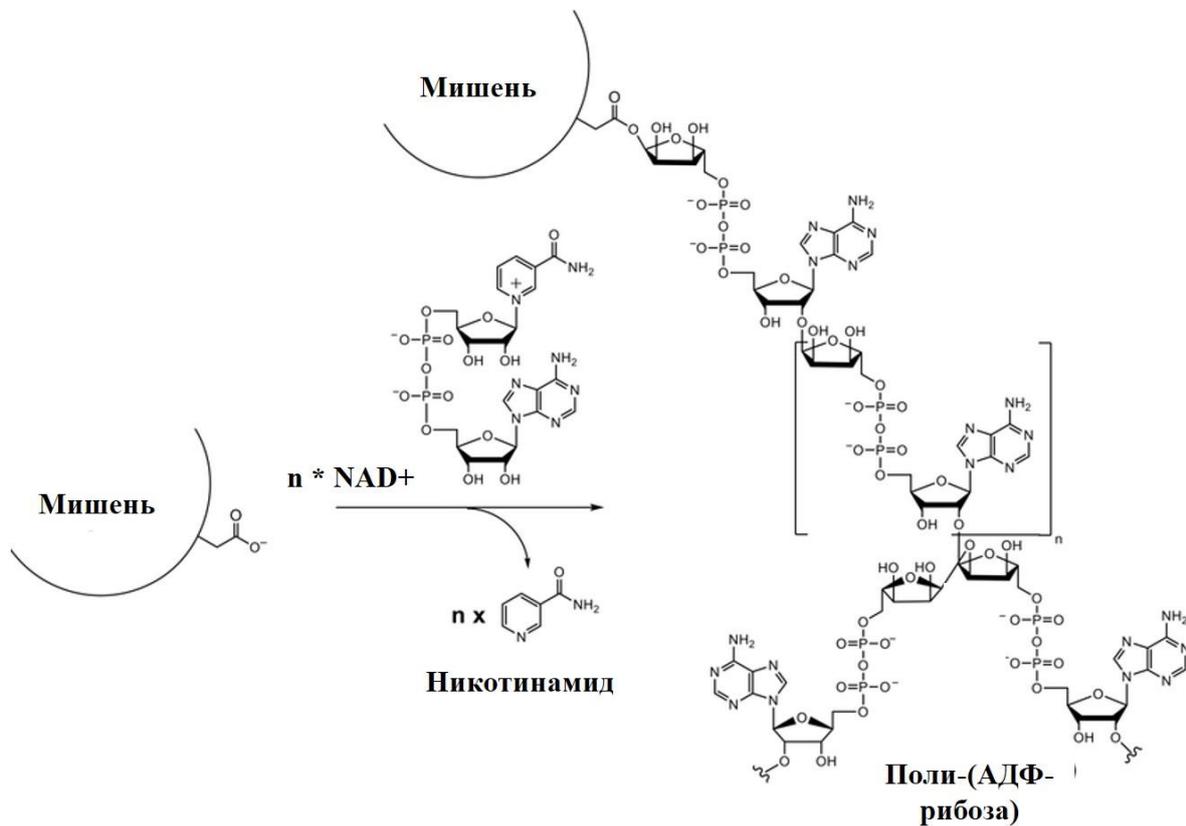


Рисунок 6 - Реакция поли-АДФ-рибозилирования

Семейство белков PARP у человека насчитывает 17 членов, учитывая наличие консервативного каталитического домена, по всей видимости произошедших от одного белка. Белок PARP1 ответственен за 85–90% всех реакций поли-АДФ-рибозилирования, происходящих в клетке и является наиболее изученным белком этого семейства. По распространенности в ядре белок PARP1 занимает второе место после гистонов. Молекулярная масса его составляет 113 кДа, а структура насчитывает 1014 аминокислотных остатков. PARP1 состоит из 3 доменов: (1) N-концевой домен, включающий сайт связывания с ДНК и сайт NLS, ответственный за определение местоположения белка в ядре; (2) Центрального аутомодификационного домена; (3) С-концевого каталитического домена [137]. ДНК-связывающий сайт N-концевого домена содержит три цинковых пальца: первый и второй палец необходимы для активации PARP-1 при образовании одноцепочечных и двуцепочечных разрывов в ДНК (соответственно), третий палец ответственен за восстановление структуры ДНК-связывающего домена [137]. Аутомодификационный домен является

акцептором АДФ-рибозы. Этот домен содержит мотив BRCT, служащий посредником между некоторыми белками системы репарации [138]. Каталитический домен необходим для инициации и удлинения цепи поли-АДФ-рибозы [139]. При этом в качестве субстрата могут выступать как сами белки PARP, так и другие белки, в том числе гистоны, факторы транскрипции, белки системы репарации. Рост полимера регулируется рядом ферментов, гидролизующих поли-АДФ-рибозу: поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазой (PARG) и АДФ-рибозил гидролазой (ARNH3).

Гиперэкспрессия белка PARP1 - одно из наиболее распространенных нарушений, встречающихся при различных типах опухолей [140-142], в том числе и ОСК [143]. В первую очередь это обуславливает повышенную активность путей, обеспечивающих репарацию одно- и двуцепочечных разрывов. Одним из относительно новых подходов в лечении опухолей является использование синтетической летальности, феномена, при котором ингибирование пары белков приводит к клеточной смерти, в то время как ингибирование их по отдельности не обладает таким эффектом [144]. В ОСК мутации в генах гомологичной репарации приводят к повышенной чувствительности клеток к ингибиторам PARP [145]. Так, при наличии мутаций в генах гомологичной рекомбинации *BRCA1/2*, *ATM*, *POLD* применение ингибиторов PARP1 дополнительно ослабляет активность эксцизионной репарации, что ведет к накоплению одно- и двуцепочечных разрывов [146, 147]. В результате этого в опухолевых клетках множественно запускается процесс соединения негомологичных концов, что в конечном итоге приводит к гибели (синтетической летальности) [148].

1.4. Низкомолекулярные ДНК-тропные соединения

В зависимости от типа взаимодействия с ДНК малые ДНК-тропные молекулы делят на следующие классы: интеркалирующие соединения, алкилирующие агенты, узкобороздочные лиганды и молекулы со смешанным типом взаимодействия. Некоторые интеркалирующие соединения и алкилирующие агенты уже получили достаточно широкое распространение в химиотерапии за счет своей генотоксичности, обусловленной их способностью

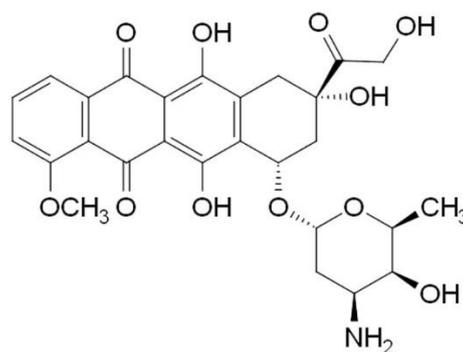
образовывать аддукты и модифицировать основания ДНК. В настоящее время идет изучение эпигенетической составляющей в действии таких генотоксических агентов. Использование негенотоксичных малых ДНК-тропных молекул, способных влиять на функционирование ДНК-зависимых ферментов и эпигенетическую регуляцию транскрипции рассматривают как новый перспективный подход к совершенствованию химиотерапии опухолей.

Эпигенетическая коррекция профиля экспрессируемых генов на постгеномном уровне раскрывает новые возможности для современной химиотерапии опухолей. К методам такой коррекции прежде всего относят влияние на паттерн метилирования ДНК, гистоновый код, третичную структуру ДНК, а также посттранскрипционные изменения РНК (РНК-интерференция, Р-тельца и стрессовые гранулы) [149-151]. Одним из вариантов реализации этого подхода является применение молекул, аффинных к определённым последовательностям ДНК, которые необходимы для транскрипции генов и функционирования белков «домашнего хозяйства». [152].

1.4.1. Интеркалирующие соединения

Интеркалирующие соединения или интеркаляторы - плоские полициклические ароматические молекулы, которые встраиваются между парами оснований ДНК, что приводит к локальным изменениям в структуре ДНК и, как следствие, к ингибированию репликации и транскрипции. Этот класс соединений был получен благодаря скринингу противоопухолевой активности антибактериальных и антисептических соединений. «Плоская» структура низкомолекулярных соединений позволяет взаимодействовать с двумя смежными парами оснований ДНК, при этом плоскость соединения располагается параллельно плоскости оснований, что вызывает некоторую «раскрутку» двойной спирали, однако общая структура В-формы ДНК сохраняется [153]. Из этого класса молекул широкое распространение в химиотерапии получили доксорубин (Рисунок 7), камптотецин, а также аналоги последнего - топотекан и иринотекан.

Доксорубин относится к группе антрациклиновых антибиотиков, проявляющих разнообразную биологическую активность. Эти агенты способны ингибировать топоизомеразы I и II и воздействовать на репликацию и транскрипцию [154]. Помимо ДНК, доксорубин связывает митохондриальную ДНК и ряд белков, включая DNMT1. Наблюдаемое при этом ингибирование DNMT1 приводит к изменению паттерна метилирования ДНК [155-157]. Доксорубин используется в лечении таких опухолей как саркомы мягких тканей, лимфомы и некоторые другие ОСК.



Доксорубин

Рисунок 7 – Химическая формула доксорубина.

Камптотецин и его производные (Рисунок 8) являются классическими ингибиторами топоизомеразы I. Механизм действия камптотецина заключается в связывании с комплексом топоизомеразы I и ДНК, вызывая блокировку стадии лигирования ДНК, что в итоге ведет к появлению большого количества одноцепочечных разрывов и апоптозу [158]. В клинической практике наибольшее значение имеют следующие производные камптотецина: иринотекан, являющийся более активным производным, и топотекан, обладающий повышенной растворимостью. Эти препараты применяются в терапии таких опухолей как рак яичника, рак легкого и др.

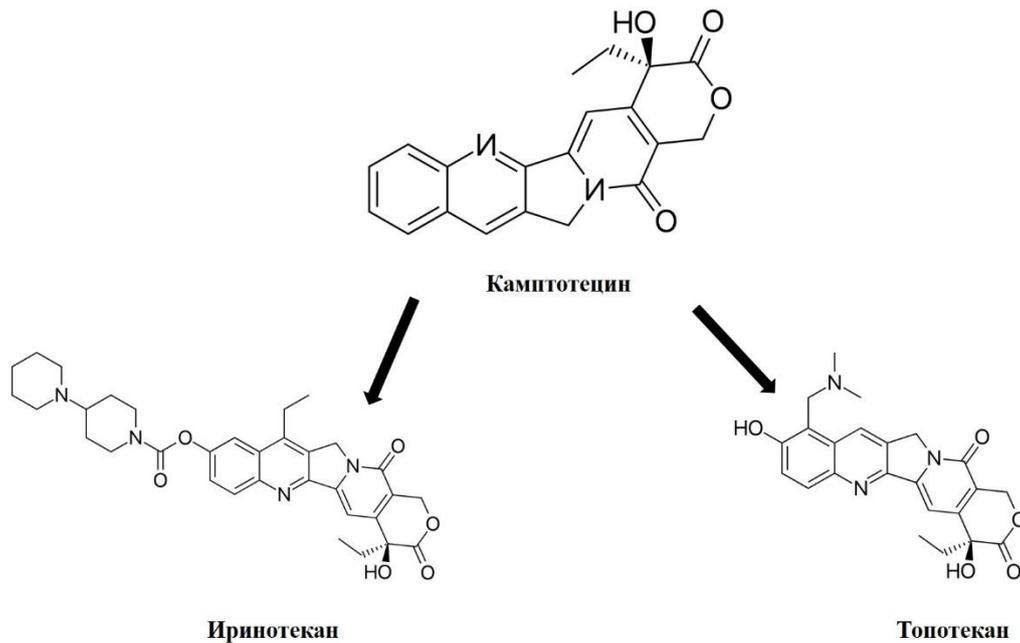


Рисунок 8 – Химические формулы камптотецина, иринотекана и топотекана.

1.4.2. Алкилирующие соединения

ДНК-связывающие алкилирующие соединения – группа химиотерапевтических соединений, при действии которых алкильная группа присоединяется к основаниям ДНК [159]. Процесс алкилирования может происходить как со стороны узкой бороздки, так и со стороны широкой бороздки, что обусловлено способностью соединений взаимодействовать с ними. Реакция алкилирования чаще всего происходит по N7-, N2- и O6-положениям гуанина, N1- и N3- положениям цитозина N3 и зависит от природы самого алкилирующего соединения [160]. В основе цитотоксического эффекта этих соединений лежит влияние на репликацию и транскрипцию. В настоящее время выделяют следующие группы алкилирующих агентов: производные бис-(бета-хлорэтил)амин, этилендиамины, триазены, препараты платины, нитрозомочевин, производные метансульфоновой кислоты.

Производные бис-(бета-хлорэтил)амин – группа соединений содержащих азиридин. Электрофильный ион азиридина связывается с нуклеофильным центром основания, главным образом N7 гуанином [159]. Полученные продукты моноалкилирования приводят к накоплению мутаций, кроме того, хлорная группа

может реагировать с N7 соседнего гуанина, что приводит к образованию внутри- и межцепочечных сшивок [161].

Этилендиамины характеризуются наличием одного или нескольких азиридиновых циклов. Алкилирование ДНК происходит по тем же механизмам, что и при действии бис-(бета-хлорэтил)аминов. В результате их действия образуются образуя N7:N7 «кросс-связи» [162].

Соединения из класса нитрозмочевины были открыты благодаря изучению антипролиферативного эффекта 1-метил-3-нитро-1-нитрозогуанидина [163]. В настоящее время в медицинской практике используются кармустин, ломустин, нимустин и фотемустин. Соединения этой группы в основном применяют в лечении опухолей головного мозга, меланомы и некоторых видов карциноидных опухолей. В основе их механизма действия лежит образование диазогидроксида, алкилирующего как нуклеиновые кислоты, так и белки [163].

Наиболее известным представителем производных метансульфоновой кислоты, применяемым в онкологии является бусульфан, который используют в терапии хронического миелоидного лейкоза. Противоопухолевый эффект этого препарата обусловлен образованием иона этиленимина, который напрямую или с образованием карбокатиона алкилирует ДНК. Это в свою очередь индуцирует появление внутрицепочечных «сшивок» ДНК или «сшивок» белок-ДНК, что и приводит к цитотоксическому эффекту [164].

Триазены характеризуются наличием 3 соединенных атомов азота. Их производные, такие как дакарбазин, используются в терапии некоторых видов сарком мягких тканей, меланомы и лимфом. Соединения этой группы образуют 5-(3-метил-1-триазенил)имидазол-4-карбоксамид и ион метилдiazония, ответственные за алкилирование N3 аденина и N7, O6 гуанина [165]. Кроме того, из-за его неправильного связывания с тимидином, O6-метилгуанин может индуцировать появление разрывов цепи ДНК [165].

Производные платины тормозят клеточный цикл в фазе G₀, подавляют синтез ДНК и РНК за счет формирования внутрицепочечных и межцепочечных сшивок ДНК [166, 167]. Производные платины включают соединения трех

поколений, в частности, цисплатин (первого поколения), карбоплатин (второго поколения) и оксалиплатин (третьего поколения). Соединения этого класса активно применяются в онкологической практике для лечения солидных опухолей пищевода, мочевого пузыря, кожи, яичника и других опухолей.

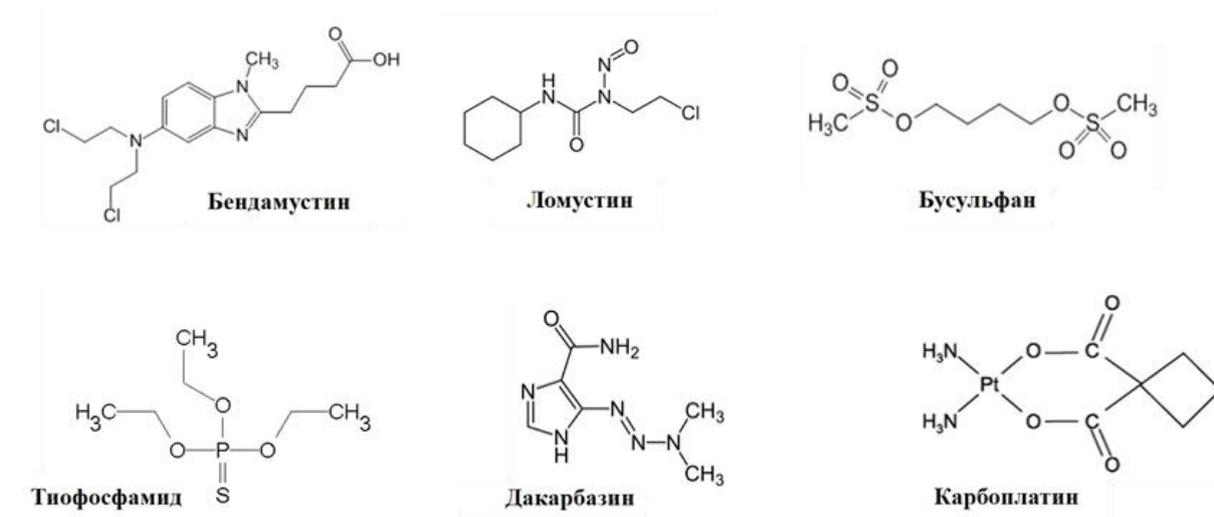


Рисунок 9 – Формулы некоторых химиотерапевтических препаратов из группы алкилирующих соединений

1.4.3. Узкобороздочные лиганды

Узкобороздочные лиганды (УБЛ) - тип соединений, которые взаимодействуют с малой бороздкой ДНК посредством нековалентных связей. Соединения, принадлежащие к этому типу, обычно имеют форму полумесяца (Рисунок 10), что соответствует изгибу малой бороздки ДНК и позволяет связываться с ней за счёт водородных и Ван-дер-ваальсовых взаимодействий. Водородные связи образуются при взаимодействии гетероатомов гетероциклических оснований ДНК и атомов водорода при гетероатомах заместителей УБЛ. Образование таких водородных связей обуславливает взаимодействие с АТ-богатыми последовательностями ДНК, что нехарактерно ни для интеркаляторов, ни для алкилирующих агентов [168]. Константа связывания таких молекул варьирует от 10^5 до 10^9 [169]. Хотя на данный момент УБЛ не используются как противоопухолевые препараты, некоторые из них (пентамидин, диминазен) применяются в медицинской практике как противопротозойные и

антибактериальные препараты. Далее будут приведены характеристики наиболее перспективных для терапии опухолей препаратов.

Нетропсин относится к пирольным полиамамидам. Связывание с ДНК проходит по малой борозде в АТ-богатых участках [170]. При этом амидная группа нетропсина образует водородную связь с тимином и N3-атомом аденина. В области связывания нетропсина с макромолекулой происходит релаксация спирали ДНК, что в свою очередь ведет к изменению активности РНК-полимеразы [171, 172]. Таким образом, нетропсин модулирует активность белков HMGAl/2 и топоизомеразы I, тем самым ингибируя пролиферацию и инвазию [173, 174].

Хехсты, группа УБЛ, которые изначально применяли в качестве флуоресцентных красителей ДНК клеточных ядер. В дальнейшем для Hoechst 33258 была продемонстрирована противоопухолевая активность, однако на первой фазе клинических испытаний была выявлена индукция гипергликемии, из-за чего дальнейшие его испытания в качестве противоопухолевого препарата не проводились [175]. Несмотря на то, что сам Hoechst 33258 не нашёл применения в клинике, на его основе разрабатываются противоопухолевые препараты, обладающие цитотоксической активностью относительно клеток рака молочной железы, аденокарциномы толстого кишечника и ОСК [176].

В медицинской практике пентамидин применяется как антибиотик в лечении пневмоцистной пневмонии. Недавно для него была выявлена способность взаимодействовать с малой бороздкой ДНК, преимущественно с АТ-богатыми последовательностями [177] и продемонстрирована цитотоксичность для опухолевых клеток. В основе противоопухолевой активности пентамидина лежит как взаимодействие с ДНК, так и с белками [178]. Соединение ингибирует связывание белков S100B и p53, тем самым предотвращая подавление активности p53 [179]. Кроме того, оно ингибирует активность фосфатазы PRL, которая представляет собой потенциальную мишень в терапии опухолей [180].

Ближайшее производное пентамидина – диминазен, обладает более «компактной» химической формулой. Применяется в ветеринарной практике в

борьбе с протозойными инфекциями, и рядом бактерий, таких как бруцеллы и стрептококки. По характеру взаимодействия с ДНК это соединение напоминает пентамидин, однако диминазен имеет более высокую константу связывания. Для диминазена показана способность стабилизировать G-квадруплексы ДНК [181], ингибировать активность белка топоизомеразы II [182]. Кроме того, для диминазена синтезировали ряд комплексов с платиной, демонстрирующих цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток [183].

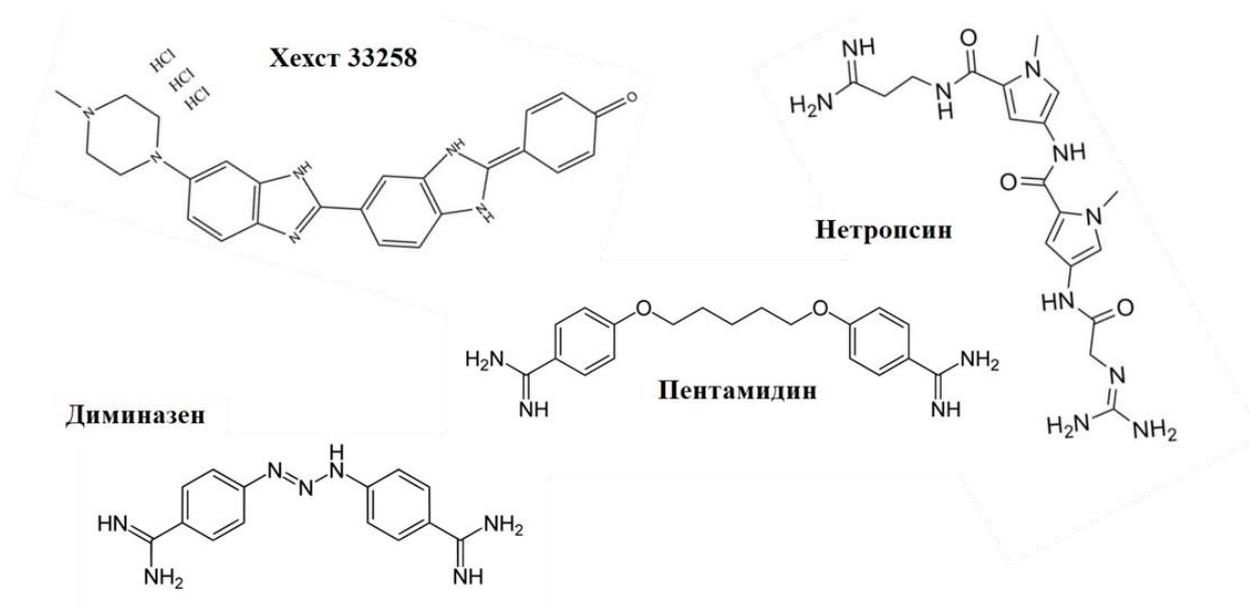


Рисунок 10 – Химические формулы некоторых узкобороздочных лигандов

1.4.4. Соединения со смешанным типом взаимодействия

Большинство низкомолекулярных ДНК-тропных соединений взаимодействуют с макромолекулой по смешанному типу. Для таких молекул характерно как нековалентное взаимодействие с узкой бороздкой ДНК, так и интеркаляция между парами оснований. Одним из классов таких соединений являются кураксины (Рисунок 11). Для кураксинов первого поколения (квинакрина) для клеток рака легкого был показан сенсibiliзирующий эффект к эрлотинибу [184]. Кроме того, для квинакрина была показана противоопухолевая активность в отношении клеток рака яичника и молочной железы [185, 186]. Квинакрин не обладает необходимой избирательностью и эффективностью, что повлекло за собой разработку кураксинов второго поколения (CBL0100, CBL0137, CBL0000). Кураксин CBL0137 продемонстрировал наименьшую токсичность на

мышцах и наибольшую эффективность в отношении ряда опухолей [187]. Для этого соединения была показана как способность взаимодействовать с узкой бороздкой ДНК, так и интеркалировать между парами оснований [188][189]. Было показано, что этот агент модулирует активность топоизомераз, а также проявляет эпигенетическую активность [190].

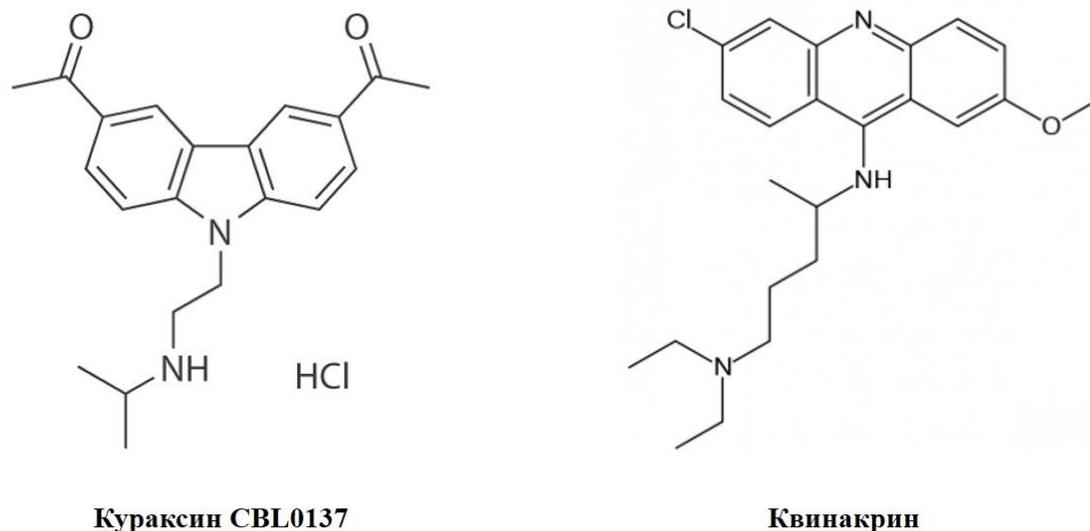


Рисунок 11 - Химическая структура кураксинов первого и второго поколения

Предполагается, что взаимодействие CBL0137 с ДНК приводит к изменению ее конформации и функциональному ингибированию белкового комплекса FACT [191]. Белковый комплекс FACT функционирует как гистоновый шаперон и включает две субъединицы: белок SSRP1 и белок SPT16 [191]. Данный комплекс преимущественно взаимодействует с гистоновым димером H2A/H2B, но также может связываться и с H3/H4 тетрамером в нуклеосоме и с ДНК [192, 193]. Взаимодействуя с нуклеосомой, FACT задействован в таких процессах как репликация ДНК, транскрипция и репарация [194-196]. Компоненты белкового комплекса FACT необходимы для правильного эмбриогенеза [197], в то время как во взрослом организме компоненты FACT экспрессируются клетками яичек и щитовидной железы [190]. Наиболее «FACT-зависимыми» оказались опухолевые клетки, в том числе опухолевые клетки со стволовым фенотипом [194, 198, 199]. Более того, чем сильнее в опухолевых клетках экспрессируются субъединицы

FACT, тем более злокачественным фенотипом обладает опухоль [194]. Одним из первых описанных механизмов, вовлеченных в противоопухолевую активность CBL0137, является FACT-зависимая активация белка p53 [200]. Было показано, что после введения CBL0137 FACT связывает белок CK2, образуя комплекс, фосфорилирующий p53 по Ser³⁹², что приводит к активации этого белка [200]. Кроме того, кураксин-опосредованное функциональное ингибирование FACT приводит к подавлению активности сигнального пути NF-κB, регулирующего пролиферацию, апоптоз и воспаление [200]. На клетках меланомы кожи B16 было продемонстрировано, что помимо активации p53 и ингибирования сигнального пути NF-κB, введение CBL0137 приводит к снижению активности белков теплового шока HSF1/hsp70, что вызывает подавление HSP1-зависимой транскрипции и повышение поглощения препарата клетками в условиях умеренной гипертермии [201]. Картер и соавторы продемонстрировали большую эффективность CBL0137 на клетки нейробластомы с гиперэкспрессией гена *MYCN* по сравнению с клетками с низкой и средней экспрессией этого гена [202]. Повышенная экспрессия гена *MYCN* встречается в 20% случаев нейробластом человека [203]. На клетках немелкоклеточного рака легкого была продемонстрирована способность CBL0137 предотвращать связывание белка SP3 с промоторной зоной гена *NOTCH1* [204]. В ряде опухолей белок SP3 функционирует как ингибитор промотора сигнального пути Notch [205]. Недавно нами была показана способность CBL0137 ингибировать активность сигнального пути WNT/β-катенин в клетках рака толстой кишки [206]. Данный механизм может лежать в основе ингибирования ДМГ-индуцированного развития опухолей толстого кишечника у мышей. В ряде исследований продемонстрирована способность CBL0137 вызывать апоптоз и снижать способность к самообновлению популяции стволовых клетках опухолей, что в свою очередь сенситизирует клетки опухоли к применяемым в терапии цитотоксическим препаратам [204, 207].

Таким образом, по данным литературы в качестве наиболее перспективных соединений для изучения возможности их применения в терапии ОСК можно

рассматривать СВL0137 и диминазен. Они представляют собой негенотоксичные ДНК-тропные агенты, для которых способность влиять на функционирование ряда ДНК-зависимых ферментов в клетках солидных опухолей была продемонстрирована как *in vitro*, так и *in vivo*, что свидетельствует об актуальности изучения эффектов этих соединений на клетки ОСК.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Список реактивов, использованных в работе

1. Гентамицин, «ПанЭко», Россия
2. 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), «ПанЭко», Россия
3. Изопропиловый спирт, «Химмед», Россия
4. Йодистый пропиций, «Sigma-Aldrich», США
5. Кураксин CBL0137, «Incuron», США
6. Набор для флуоресцентной окраски клеток Annexin V-FITC/PI, «Sigma-Aldrich», США
7. Набор реагентов «ОТ-1» для обратной транскрипции, «Синтол», Россия
8. Набор реактивов для ПЦР, «Синтол», Россия
9. Натрий хлорид, «Химмед», Россия
10. Натрий цитрат, «Химмед», Россия
11. Обратная транскриптаза MMLV, «Синтол», Россия
12. Пируват натрия, «ПанЭко», Россия
13. Тестовая система Human Signal Transduction Pathway Finder RT2Profiler PCR Array, «Qiagen», США)
14. Тризол (TRIzol Reagent), «Invitrogen», США
15. Тритон-X100, «Sigma-Aldrich», США
16. Фосфорно-солевой буфер (PBS), «Flow Laboratories», Англия
17. Хлороформ, «Химмед», Россия
18. Этиловый спирт

2.2. Приборы, использованные в работе

1. Проточный цитофлуориметр FACSCalibur («Becton Dickinson», США);
2. Спектрофотометр Nanodrop ND-2000 («Thermo Fisher Scientific», США);

3. Микропланшетный ридер Multiskan FC («Thermo Fisher Scientific», США);

4. Амплификатор Real-time CFX Connect Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA;

2.3. Линии опухолевых клеток

В работе использовали клетки острых миелоидного и лимфоцитарного лейкоза человека KG-1 и THP-1 и клетки острого миелоидного лейкоза мышей WENI-3, которые были получены из коллекции культур позвоночных института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия), клетки острого лимфоцитарного лейкоза CCRF-Cem, любезно предоставленные И.Будуновой (университет Норсвестерн, Чикаго, США); клетки хронического миелоидного лейкоза K562, клетки множественной миеломы RPMI-8226, NCI-H929 и клетки острого миелобластного лейкоза, которые были любезно предоставлены Н.И. Моисеевой НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина, (Москва, Россия). Клетки культивировали в стандартной среде RPMI-1640, содержащей 10%-ную эмбриональную сыворотку телят и раствор пенициллина-стрептомицина (5000 ЕД/мл пенициллина и 5000 ЕД/мл стрептомицина, ПанЭко, Россия) при 37°C и в 5%-ном CO₂. Контроль за ростом и изменением морфологии клеток осуществляли с помощью инвертированного светового микроскопа (Nikon eclipse e200). В целях длительного хранения клеточные линии замораживали в среде для криоконсервации, содержащей 70% среды RPMI-1640, приготовленной по вышеописанной схеме, 20% эмбриональную сыворотку телят и 10% диметилсульфоксид (ДМСО, Helicon, Россия).

2.4. Определение цитотоксического эффекта

Цитотоксический эффект определяли с помощью МТТ-теста. МТТ-тест является общепринятым колориметрическим методом для определения количества жизнеспособных клеток и цитотоксической (антипролиферативной и/или про-апоптотической) активности различных химиопрепаратов. Данный метод основан на восстановлении МТТ-реагента (3-(4 5-диметилтиазол-2-ил)-2-5-

дифенил-тетразолий бромид) НАДФ-Н-зависимыми оксидоредуктазами в оптически активное вещество синего цвета – формазан. Количество формазана, образовавшегося в результате данной реакции пропорционально количеству жизнеспособных клеток в лунке (Рисунок 12).

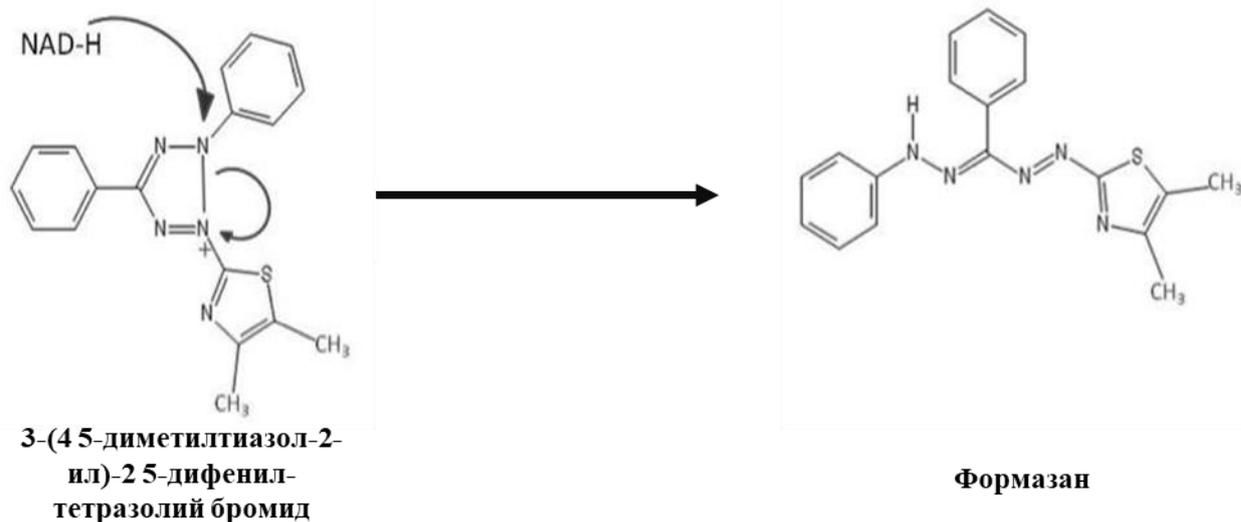


Рисунок 12 - Реакция превращения МТТ-реагента в формазан под действием митохондриальных ферментов живых клеток

Приготовление рабочего раствора МТТ

200 мг МТТ-реагента (ПанЭко, Россия) растворяли в 40 мл теплого физиологического раствора (5мг/мл). Раствор пропускали через 0,4 мкм фильтры и хранили при +4°C не более 1 месяца.

Постановка эксперимента

Для проведения МТТ-теста клетки в количестве 10 тыс. для 72 часов экспозиции, 15 тыс. – для 48 часов и 18 тыс. – для 24 часов экспозиции с препаратами, рассеивали в 96-луночные планшеты (Costar, КНР). После рассеивания в 96-луночные планшеты клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂, после чего клетки обрабатывали СВL0137 (от 10 мкМ до 0,1 мкМ) и инкубировали в течение 24, 48 и 72 часов. Далее в среду с клетками вводили 10 мкл МТТ-реагента в концентрации 5 мг/мл. Через 3 часа после инкубации с МТТ-реагентом клетки центрифугировали (1500 об/мин) в течение 5 минут, среду отбирали, а образовавшийся формазан растворяли в ДМСО. Измерения

оптической плотности проводили с помощью микропланшетного ридера Multiskan FC. Выживаемость клеток в присутствии исследуемого вещества рассчитывали по формуле: $(\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}) / (\text{ОП контр. лунок} - \text{ОП среды}) \times 100\%$, где ОП — оптическая плотность.

2.5. Определение уровня клеточной гибели по окрашиванию ДНК пропидий йодидом (PI)

Клеточную гибель оценивали по методу Nicoletti I. (1991). Полученную клеточную суспензию отмывали в PBS, ресуспендировали в охлажденном 70% этаноле и хранили при +4°C. Перед окрашиванием клетки центрифугировали (7 мин, 1500 об/мин), удаляли надосадочную жидкость и вносили раствор, содержащий 5 мкг/мл PI, 0,1% натрия цитрат, 0,1% Тритон X-100. Инкубировали в темноте в течение 15 мин при 4°C. Суспензию клеток анализировали на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (“Becton Dickinson”, США), полученные данные обрабатывали в программе Winmid. Долю клеток, находящихся в процессе клеточной гибели, определяли, как пре-G1-пик на гистограмме.

2.6. Определение уровня апоптоза

Суспензию клеток дважды промывали в растворе PBS и ресуспендировали в связывающем буфере в концентрации 1×10^6 клеток/мл. Аликвоты, содержащие 1×10^5 клеток в 100 мкл окрашивали 10 мкл йодида пропидия (5 мг/мл) и 5 мкл Аннексина V, меченного FITC (50 мкг/мл). Клетки инкубировали 15 мин. в темноте при комнатной температуре. Для анализа методом проточной цитофлуориметрии к окрашенным клеткам добавляли 300 мкл связывающего буфера. Окрашенные по Аннексину V-FITC и PI клетки оценивали по следующим критериям: живые клетки — клетки с цельными ядрами, без конденсации хроматина, которые не окрашиваются ни Аннексин V-FITC, ни PI; ранние апоптотические изменения — клетки связывают Аннексин V-FITC; некротические изменения — клетки окрашиваются PI; поздние апоптотические изменения — клетки как связывают Аннексин V-FITC, так и окрашиваются PI. Для

количественной оценки содержания апоптотических клеток использовали апоптотический индекс (АИ), который рассчитывали по формуле: $AI = (Na/No) * 100$, где Na – количество апоптотических клеток, No – общее количество клеток.

2.7. Выделение РНК из опухолевых клеток

После культивирования исследуемые клетки отбирали в количестве $1 * 10^6$ и отмывали двукратно в ФСБ центрифугированием при 1500 об/мин в течение 5 мин. Выделение тотальной клеточной РНК проводили с помощью TRI-реагента. Концентрацию РНК определяли по оптической плотности раствора, измеренной на бесцветном спектрофотометре Nanodrop ND-2000 при длине волны 260 нм. Об отсутствии примесей в смеси РНК судили по соотношению значений оптической плотности раствора при длинах волн 260 нм и 280 нм.

2.8. Условия проведения обратной транскрипции

Для получения кДНК брали 1 мкг выделенной РНК, смешивали с 0,4 мкг случайных гексамерных олигонуклеотидов, денатурировали при $4^{\circ}C$ и охлаждали на льду. Смесь для постановки обратной транскрипции включала: 2 ед. обратной транскриптазы MMLV, соответствующий буфер, 0,5 ед. ингибитора рибонуклеаз, 0,5 мМ дНТФ, и дистиллированную воду (до 12 мкл). Реакцию проводили при $37^{\circ}C$ в течение 1 ч, затем останавливали инактивацией обратной транскриптазы при $95^{\circ}C$ в течение 5 мин, разбавляли полученную кДНК стерильной водой свободной от РНКаз и использовали аликвоты для проведения ПЦР-амплификации со специфическими праймерами.

2.9. ПЦР в реальном времени

Количественный ПЦР-анализ в реальном времени проводили с применением тестовой системы Human Signal Transduction Pathway Finder RT²Profiler PCR Array, представляющей из себя панель из 84 пар праймеров к таргетным генам для 10 сигнальных путей и 5 генов домашнего хозяйства (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1*, и *RPLP0*). В смесь для постановки реакции входило 25 ед Taq-полимеразы, 4 мкг кДНК, 1200 мкл соответствующего буфера, содержащего

SYBR Green Master Mix. ПЦР-анализ в режиме реального времени проводили с использованием ПЦР-анализатора Real-time CFX Connect (Bio-Rad). Программа амплификации была составлена в соответствии с требованиями производителя: 95°C – 10 мин, 40 циклов (95°C – 15 с, 60°C – 1 мин). Анализ данных, полученных с применением этой системы, был проведен с помощью программного обеспечения, представленного на сайте производителя (<https://dataanalysis2.qiagen.com/pcr>).

2.10. Определение уровня активности PARP-1

Реакционная смесь для постановки реакции поли-АДФ-рибозилирования состояла из ДНК-лиганда h44p, взятого в концентрации 10 нМ, белка PARP1 в количестве 0,1 ед. и ингибитора реакции (или тестируемых препаратов). Реакция протекала в 20 мкл буфера PARP при 37 °С в течение 1 часа. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл 3х буфера для нанесения и нагреванием в течение 10 минут. Реакционные смеси анализировали методом гелевого электрофореза по Лэммли в 10% ДСН-ПААГ с 4%-м концентрирующим слоем, который ранее использовался нами [183, 208]. Количество поли-АДФ-рибозы определяли методом вестерн-блоттинга.

2.11. Вестерн-блоттинг

Полиакриламидный гель (ПААГ) заливали и устанавливали в электрофоретическую камеру MINIProtean TETRA, оснащенную штатным источником питания PowerPac Basic (BioRad, США). В камеру добавляли буфер для электрофореза, состоящий из 1-кратного Tris-Gly и 1% по объему раствора SDS (10%). В качестве маркера молекулярного веса использовали маркер SeeBlue Plus (Invitrogen, США). Устанавливали следующий режим работы: 300 В, 20 мА при комнатной температуре. Трансфер PAR из геля на мембрану Immobilon-P 0.45 мкм (Millipore, США) проводили в течение 1 часа в 1-кратном Tris-Gly буфере при температуре +4°C (20 В, 300 мА). Фиксацию мембраны осуществляли раствором 5% БСА при комнатной температуре в течение 30 минут. Для иммуноблоттинга использовали антитела к поли-АДФ-рибозе (Anti-poly(ADP-

ribose)antibody, Tulip Biolabs, США), в качестве вторичных антител использовали антитела α -mouse. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 1,5 часов при температуре $+4^{\circ}\text{C}$; со вторичными- в течение часа при тех же условиях.

2.12. Получение моноцитарной фракции клеток крови пациентов

Выделение моноядерной фракции клеток из образцов, полученных от пациентов с ОКС, осуществляли по методу Боумма (1968), в основе которого лежит седиментация моноцитов в одноступенчатом градиенте плотности фиколла с использованием пробирок SepMate (STEMCELL Technologies, США). В нижнюю камеру пробирки типа SepMate добавляли фиколл в объеме 15 мл. Образец крови пациента разводили в стерильном фосфатном буфере, содержащем 5%-й FBS в соотношении 1:1, и по стенке добавляли в верхнюю камеру пробирки, после чего образец откручивали в центрифуге при следующих условиях: комнатная температура, скорость 1200g, 10 минут с отключённым механизмом торможения центрифуги. После центрифугирования получившуюся верхнюю фазу отбирали в обычную 50 мл пробирку и разводили до 50 мл фосфатным буфером с FBS. Получившийся раствор центрифугировали при 300g в течение 8 минут. Супернатант сливали, а к полученному осадку добавляли 5 мл ASK-буфера для разрушения оставшихся эритроцитов. Далее образец центрифугировали при тех же условиях. Полученную фракцию клеток использовали в экспериментах. Полученные клетки рассаживали в количестве 20 тысяч клеток на лунку, после 24 часовой экспозиции клетки обрабатывались кураксином CBL0137 в концентрациях от 10 мкМ до 0,1 мкМ и инкубировали в течение 72-х часов. Для оценки цитотоксичности выбранного соединения проводили МТТ-тест.

2.13. Анализ эффективности совместного применения лекарственных препаратов

Эффективность совместного действия CBL0137 и препаратов, применяемых в терапии ОКС, оценивали с помощью комбинационного индекса (combination index, CI) [208] по формуле:

$$CI = D1/D501 + D2/D502 + (D1 * D2) / (D501 * D502),$$

где D501 и D502 – величины воздействий, требуемые для достижения 50% эффекта, а D1 и D2 – величины воздействий (концентрации препаратов), дающие схожий эффект. CI < 1, CI = 1 и CI > 1 соответствуют синергизму, аддитивному эффекту или антагонизму рассматриваемых воздействий.

2.14. Оценка противоопухолевой активности кураксина CBL0137 и диминазена *in vivo* на модели мышиноного острого миелоидного лейкоза WENI-

3

В эксперименте использовали 40 мышей линии BALB/c. Мышей разделили на 4 группы по 10 мышей: группа отрицательного контроля, которым не вводили исследуемые соединения и клетки WENI-3; группы положительного контроля, которой проводилась перевивка опухолевых клеток; группы исследуемых препаратов, которым были проведены перевивка опухолевых клеток и обработка препаратами. Перевивку клеток лейкоза WENI-3 мышам линии BALB/c проводили путем внутрибрюшинного введения клеточной взвеси в количестве 100 тыс. клеток на мышь. По прошествии 7 дней, необходимых для развития лейкоза, начинали введение растворов препаратов: диминазена (150 мг/кг внутрибрюшинно через день на протяжении 14 дней), CBL0137 (50 мг/кг внутривенно через 2 дня на протяжении 14 дней). В основу критериев оценки противоопухолевой активности исследуемых соединений лег гистологический анализ внутренних органов (см. главу «Результаты исследований»).

Гистологический анализ

Для подготовки гистологических срезов использовали стандартный протокол: после вскрытия и экстирпации ткани фиксировали в 10% формалине («BioVitrum», Россия) в течение 3-х суток. Затем образцы тканей обезвоживали спиртами (70%; 96% – 1, 96% – 2; 100% – 1, 100% – 2), хлороформом, заливали в гистомикс (Histomix extra, «BioVitrum», Россия). Удаление парафина и окрашивание гистологических препаратов проводили по следующей схеме: Ксилол–1; Ксилол–2; спирты (100%, 96%, 70%), гематоксилин-эозин.

Обезвоживание и заключение препаратов в бальзам проводили по следующей схеме: спирты (100%, 96%, 70%); Ксилол –1; Ксилол –2; монтирующая среда Bio-Mount.

2.15. Статистический анализ

Для определения статистической значимости различий между группами животных при анализе противоопухолевого действия препаратов использовали критерий χ^2 Пирсона. В остальных экспериментах для определения статистической значимости выявленных различий использовали парный двухвыборочный t-тест Стьюдента для средних значений. Средние значения и среднеквадратичные отклонения рассчитывали с помощью пакета программ Microsoft Excel. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Данное исследование было направлено на изучение противоопухолевой активности нового негенотоксичного препарата CBL0137 и неиспользуемого ранее в онкологической практике антипаразитарного препарата диминазен на моделях ОСК *in vitro* и *in vivo*.

Основные результаты, изложенные в данной главе, получены и опубликованы в следующих статьях [206, 210-212].

3.1. Сравнительный анализ цитотоксической активности CBL0137 и диминазена на клетках опухолей системы крови *in vitro* и их противоопухолевой активности *in vivo*

3.1.1. Оценка цитотоксического эффекта ДНК-тропных молекул в отношении клеток опухолей системы крови

На первом этапе был проведен анализ цитотоксического эффекта негенотоксичных ДНК-тропных молекул относительно опухолей системы крови.

Для этого использовали метод МТТ на клеточных линиях ОСК человека (KG-1, K562, CCRF-SB, CCRF-Cem, THP-1, RPMI-8226, NCI-H929) и мыши (WENI-3). Данный тест основан на определении метаболической активности клеток, а именно способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5 дифенилтетразолиум бромида (МТТ реагента) до формазана. Концентрацию формазана определяли, измеряя оптическую плотность (OD) при длине волны 540 и 720 нм. Оценку проводили через 72 часа после обработки клеток соединением. В качестве отрицательного контроля использовали клетки после инкубации в среде RPMI-1640. В проведенном исследовании клетки обрабатывали CBL0137 и диминазеном в концентрациях от 10 мкМ до 0,1 мкМ, однако, в связи с низкой токсичностью концентрации диминазена были увеличены (до 100 - 1 мкМ). Для обоих соединений была рассчитана концентрация, при которой погибает 50% клеток (IC50).

Таблица 1 - Сравнение значений IC50 соединений со смешанным типом взаимодействия (CBL0137) и узкобороздочного лиганда (диминазен). Значение IC50 высчитывали по данным, полученным в МТТ-тесте на цитотоксичность, через 72 часов после обработки препаратами

Клеточные линии	Кураксин		Диминазен	
	IC50 (мкМ)	Стандартное отклонение ($\pm S$)	IC50 (мкМ)	Стандартное отклонение ($\pm S$)
CCRF-CEM	0,9	$\pm 0,12$	56	$\pm 6,9$
K562	0,71	$\pm 0,17$	79	± 15
KG-1	0,56	$\pm 0,13$	84	± 18
CCRF-SB	0,74	$\pm 0,19$	62,5	$\pm 5,4$
WENI-3	0,46	$\pm 0,1$	86	± 12
THP-1	0,57	$\pm 0,09$	69	$\pm 9,9$
RPMI-8226	0,66	$\pm 0,28$	67	$\pm 6,4$
H929	0,41	$\pm 0,06$	55	$\pm 8,4$

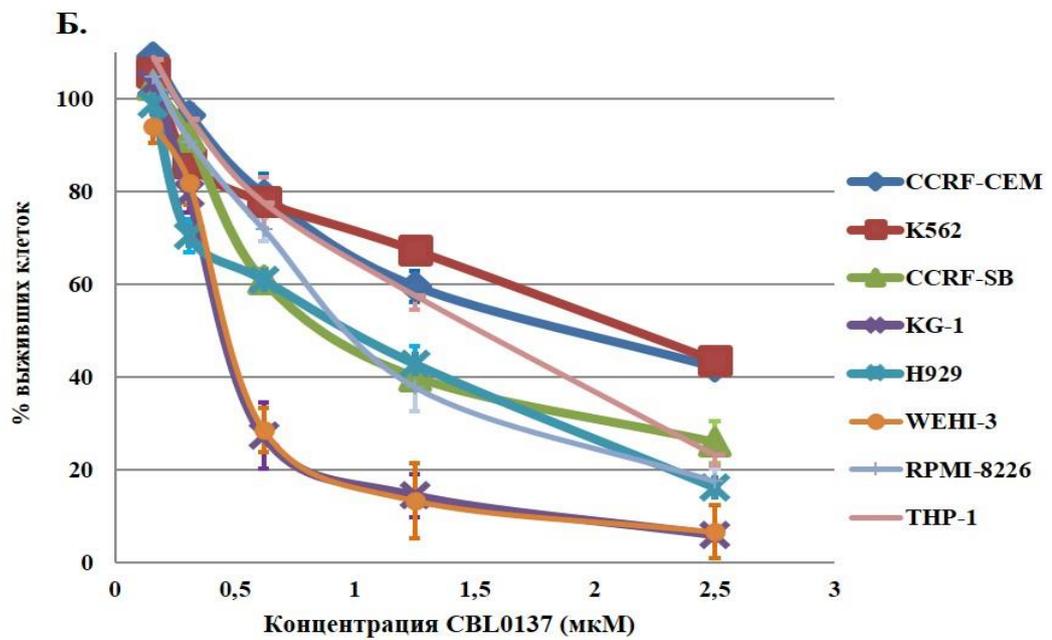
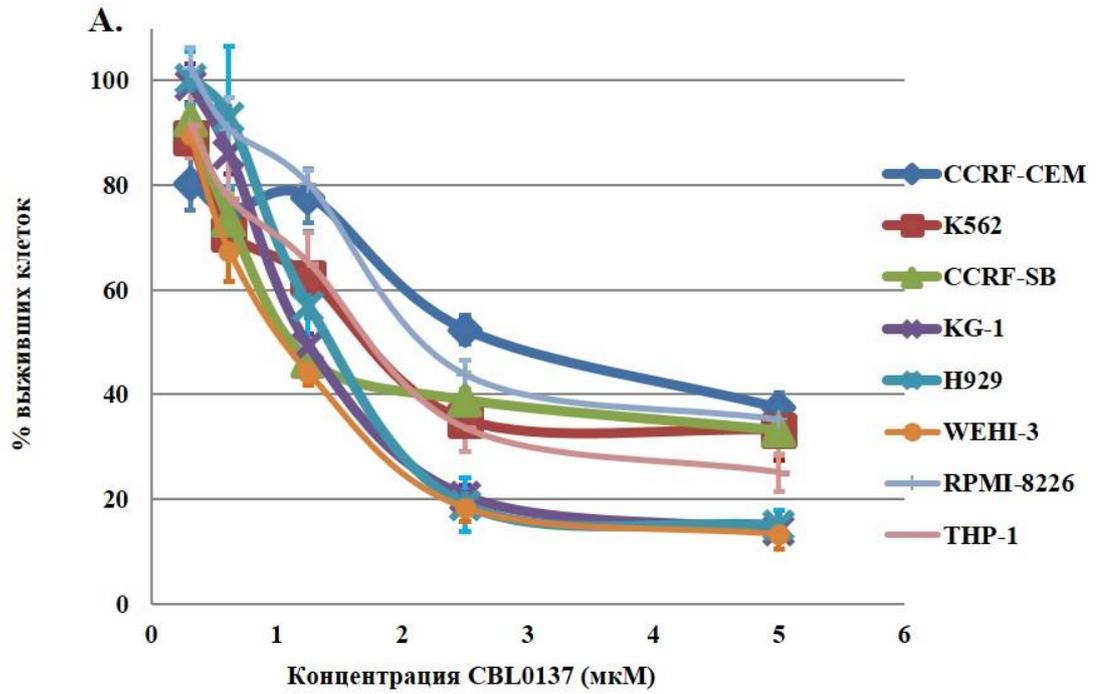
CBL0137 оказался наиболее цитотоксичным для клеток острого миелоидного лейкоза (KG-1, THP-1 и WENI-3) и клеток множественной миеломы NCI-H929, в то время как для линии Т-клеточного лейкоза (CCRF-CEM) наблюдался наименьший цитотоксический эффект. Диминазен продемонстрировал наибольший цитотоксический эффект для линии Т-клеточного лейкоза (CCRF-CEM), В-клеточного лейкоза (CCRF-SB) и линии множественной миеломы (NCI-H929), наименьший эффект диминазен оказал на линии острого миелоидного лейкоза (KG-1 и WENI-3) и хронического миелоидного лейкоза (K562)

С целью выявления наиболее эффективных концентраций для проведения последующих экспериментов дополнительно была проведена оценка цитотоксического эффекта на временных интервалах 24 и 48 часов. В работе использовали те же концентрации CBL0137. Для каждой линии анализировали зависимость выживаемости клеток от концентрации, а также рассчитывали IC50. Цитотоксический эффект CBL0137 проявлялся уже через 24 часа экспозиции для всех клеточных линий, при этом наибольший эффект наблюдался в отношении клеток линий WENI-3 ($1 \pm 0,4$ мкМ), KG-1 ($1,3 \pm 0,09$ мкМ), NCI-H929 ($1,2 \pm 0,05$

мкМ), CCRF-SB ($1,2 \pm 0,24$ мкМ), наименьший эффект наблюдался в отношении клеток линий RPMI8226 ($2,3 \pm 0,1$ мкМ) и CCRF-CEM ($3,5 \pm 0,4$ мкМ). При использовании более продолжительных временных интервалов экспозиции к CBL0137 (48 и 72 часа) для большинства клеточных линий наблюдалось время-зависимое снижение IC50, однако для линий K562, CCRF-CEM, CCRF-SB, ТНР-1, Н929 это различие в IC50 не достигало статистической значимости. Таким образом, для каждой клеточной линии наблюдался время- и дозозависимый цитотоксический эффект, который был статистически значимым для всех линий клеток при экспозиции к CBL0137 в течение 72 часов ($p < 0,05$).

Таблица 2 - Таблица сравнения значений IC50 CBL0137 на разных временных отрезках. Значение IC50 рассчитывали по данным, полученным с помощью МТТ-теста на цитотоксичность, после 24, 48 и 72 часов экспозиции к препарату. Между экспозициями 24 часа и 72 часа наблюдался статистически значимый время-зависимый цитотоксический эффект ($p < 0,05$)

Клеточные линии	24 часа		48 часов		72 часа	
	IC50 (мкМ)	Стандартное отклонение ($\pm S$)	IC50 (мкМ)	Стандартное отклонение ($\pm S$)	IC50 (мкМ)	Стандартное отклонение ($\pm S$)
CCRF-CEM	3,5	$\pm 0,4$	1,8	$\pm 1,8$	0,9	$\pm 0,12$
K562	1,8	$\pm 0,7$	2,2	$\pm 0,135$	0,71	$\pm 0,17$
KG-1	1,3	$\pm 0,09$	0,85	$\pm 0,12$	0,56	$\pm 0,13$
CCRF-SB	1,2	$\pm 0,24$	0,9	$\pm 0,18$	0,74	$\pm 0,19$
WENI-3	1	$\pm 0,2$	0,5	$\pm 0,07$	0,46	$\pm 0,1$
ТНР-1	2	$\pm 0,2$	1,75	$\pm 0,3$	0,57	$\pm 0,09$
RPMI-8226	2,3	$\pm 0,1$	1,2	$\pm 0,18$	0,66	$\pm 0,28$
Н929	1,2	$\pm 0,05$	1	$\pm 0,2$	0,41	$\pm 0,06$



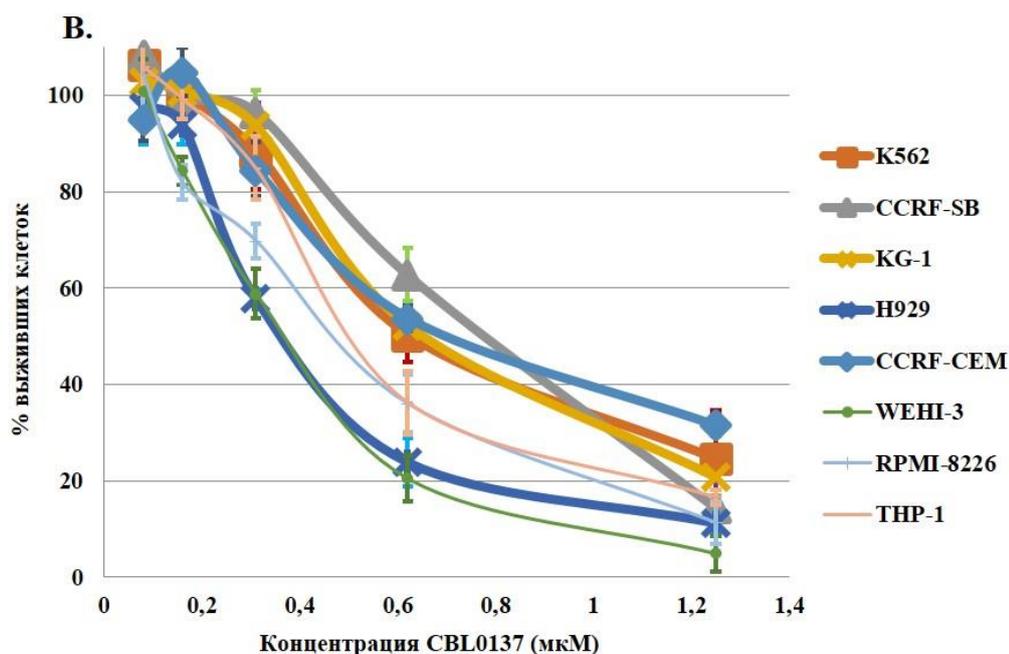


Рисунок 13 – Диаграммы, отражающие дозовую и временную зависимости цитотоксичности SBL0137 по результатам МТТ-теста. (А) 24 часа экспозиции к препарату; (Б) 48 часов экспозиции к препарату; (В) 72 часа экспозиции к препарату

3.1.2. Оценка противоопухолевого эффекта негенотоксичных ДНК- тропных малых молекул *in vivo*

Острый миелобластный лейкоз WENI-3 был впервые описан как перевиваемая опухоль для мышей линии BALB/c в 1990 году. Данная линия используется для индукции острого миелоидного лейкоза у мышей линии BALB/c. Опухолевые клетки могут вводиться как внутривенно, так и внутривенно, приводя к развитию острого миелоидного лейкоза. При анализе степени поражения печени и селезенки были использованы критерии, отраженные в таблице 3 и рисунке 14.

Таблица 3 – Ранжирование поражений селезенки опухолевыми клетками

Поражения селезенки	
Степень 0 (фото 1а и 1б)	Интактный орган
Степень 1 (фото 2а и 2б)	Узелки белой пульпы сохранены, наблюдаются отчетливые контуры и неповрежденной структурой с гермиальными центрами. Красная пульпа содержит мегакариоциты (как маркер гемопоэза) и отдельные опухолевые клетки
Степень 2 (фото 3а и 3б)	Наблюдается изменение структуры белой пульпы, но с отчетливыми контурами. Герминальные центры наблюдаются только у половины узелков. Красная пульпа содержит группы опухолевых клеток и мегакариоциты
Степень 3 (фото 4а и 4б)	Количество узелков белой пульпы снижено до 2 и менее в поле зрения, структура узелков изменена. Красная пульпа инфильтрирована опухолевыми клетками, очагов гемопоэза не наблюдается
Степень 4 (фото 5а и 5б)	Цитоархитектоника селезенки нарушена, граница между красной и белой пульпы отсутствует, на всем протяжении наблюдается инфильтрация опухолевых клеток

Таблица 4 – Ранжирование поражений печени опухолевыми клетками

Поражения печени	
Степень 0 (фото 6а и 6б)	Интактный орган
Степень 1 (фото 7а и 7б)	Единичные опухолевые клетки или малые инфильтраты
Степень 2 (фото 8а и 8б)	Опухолевые инфильтраты среднего размера
Степень 3 (фото 9а и 9б)	Опухолевые инфильтраты большого размера
Степень 4 (фото 10а и 10б)	Тотальное поражение печени с нарушением цитоархитектоники

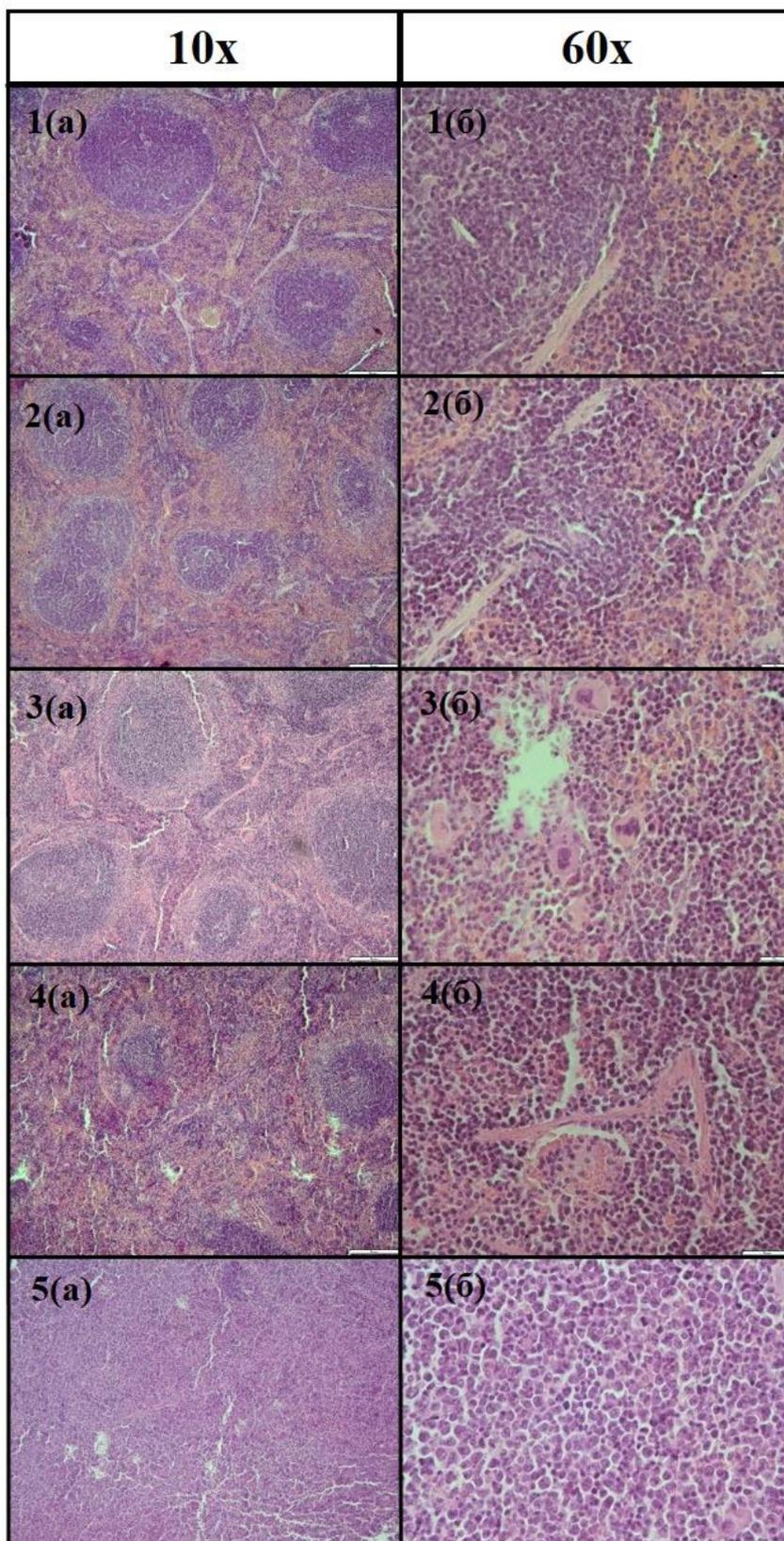


Рисунок 14 – Варианты поражения селезенки опухолевыми клетками соответствующие таблице № 3. Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение 10x и 60x соответственно.

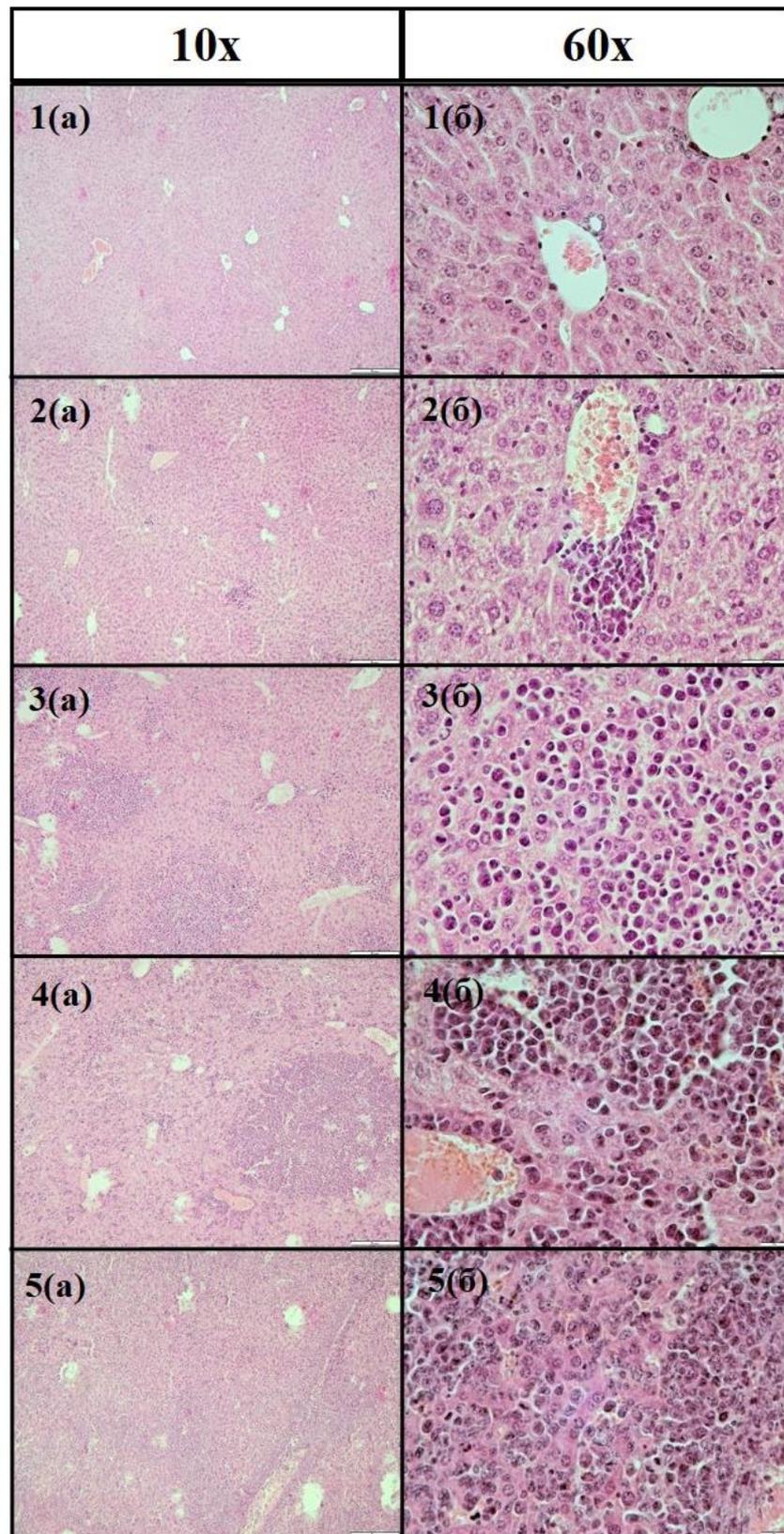


Рисунок 15 – Варианты поражения печени опухолевыми клетками соответствующие таблице № 4. Окраска гематоксилин и эозин. Увеличение 10x и 60x соответственно

В нашем исследовании клетки WENI-3 вводили внутривенно. Инъекции препаратов были начаты на 7 день после перевивки опухолевых клеток. Данная схема введения препаратов была оптимальной для анализа противоопухолевого эффекта препаратов и их комбинаций при моделировании лейкоза с использованием опухолевых клеток WENI-3. Гистопатологическое исследование органов у группы мышей, которые подверглись вскрытию через 7 дней после введения WENI-3, подтвердило, что в 100% случаев наблюдается опухолевая инфильтрация селезенки (80% составляло поражение 1-ой степени и 20% - 2ой). Кроме того, в 20% случаев наблюдается очаговая единичная опухолевая инфильтрация печени. На 22 сутки после начала эксперимента в группе, не получавшей препараты, селезенка была поражена в 100%, при этом наблюдалось усиление степени поражения: 20% - первая степень, 20% - вторая, 40% - третья и 20% - четвертая. Поражения печени наблюдались у 80% животных, из них у 10% - в печени локализовались единичные опухолевые клетки, у 30% - большие опухолевые инфильтраты и у 40% животных наблюдалось тотальное поражение печени. Введение CBL0137 приводило к достоверному снижению поражений печени и селезенки до 40% и 50% соответственно. Кроме того, это приводило к ослаблению поражений. Так, среди поражений селезенки не наблюдалось 4 стадии, а частота появления 3 стадии поражений уменьшилась до 20%. Также CBL0137 снижал частоту возникновения формирований тотальных поражений с 40% до 10% и формирование больших инфильтратов с 30% до 10%. Введение диминазена не приводило к снижению частоты возникновения поражений печени и селезенки. Однако частота развития тотальных поражений печени снизилась с 40% до 10% и количество больших инфильтратов с 30% до 10%, а количество легких поражений увеличилось, так единичные опухолевые клетки встречались в 20% случаев, а малые инфильтраты в 40% случаев. Также снижалась частота развития серьезных поражений селезенки. Так, в группе диминазена отсутствовало тотальное поражение органа, поражения 3-ей степени встречались только у 10% животных, при этом частота поражений первой степени составляла 70%.

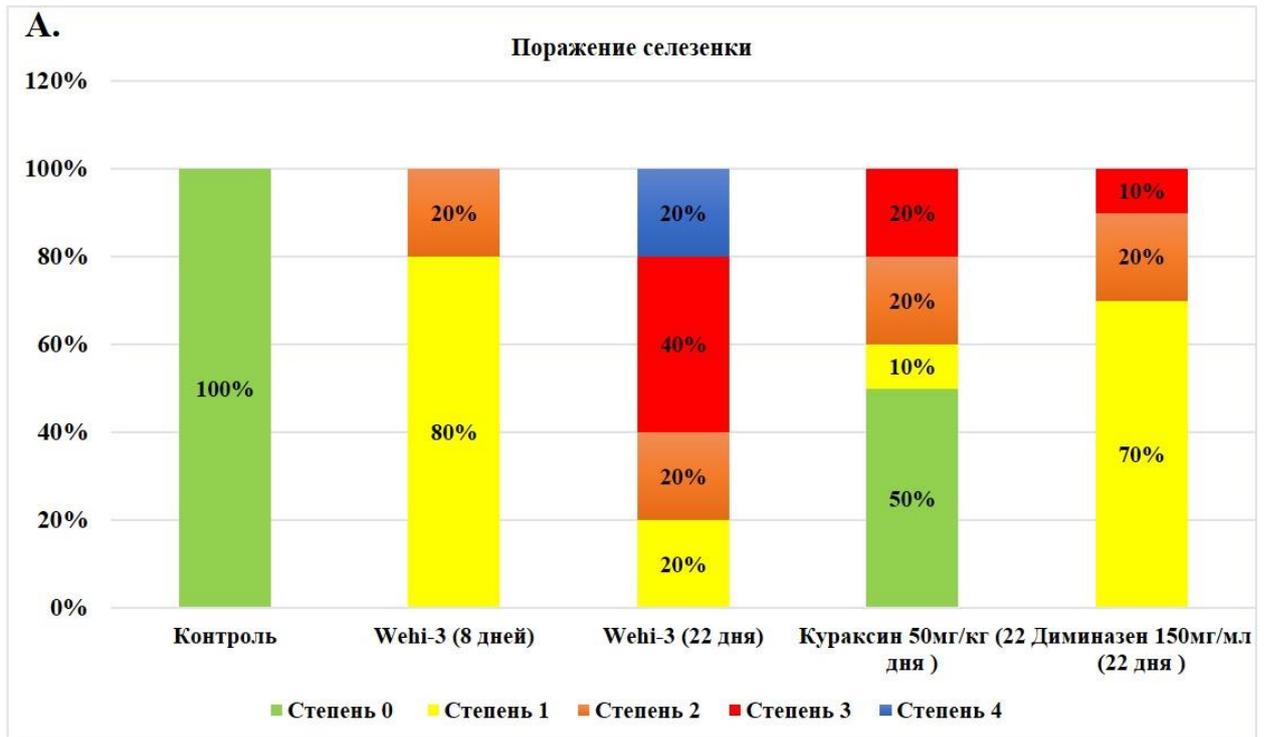
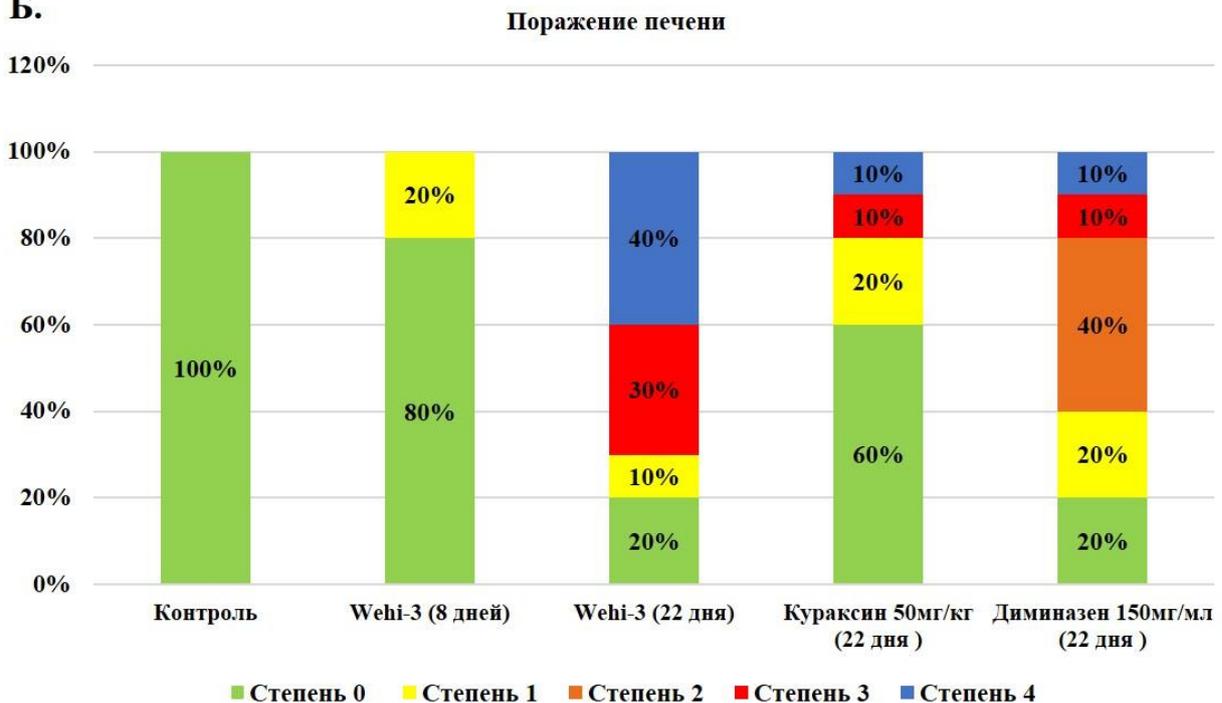
**Б.**

Рисунок 16 - Эффективность терапевтического действия СВL0137 и диминазена на мышинной модели острого миелоидного лейкоза WEHI-3. (А) Сравнение частоты и степени поражений селезенки не леченных животных и животных, которым вводили кураксин или диминазен; (Б) Сравнение частоты и степени поражений печени не леченных животных и животных, которым вводили кураксин или диминазен

3.2. Анализ биологических эффектов кураксина CBL0137

3.2.1. Анализ влияния кураксина CBL0137 на клеточный цикл

С помощью проточной цитофлуориметрии была изучена способность CBL0137 влиять на клеточный цикл в опухолевых клетках ряда линий, полученных при онкозаболеваниях системы крови человека (KG-1, K562, CCRF-SB, CCRF-Cem, THP-1, RPMI-8226, NCI-H929) и мышей (WENI-3). Клетки инкубировали в течение 24 часов с CBL0137, концентрации которого не превышали значения IC₅₀ и составляли: 1 мкМ, 0,75 мкМ и 0,5 мкМ для линий CCRF-SB, KG-1, WENI-3, RPMI-8226 и NCI-H929; 1,5 мкМ, 1,25 мкМ и 1 мкМ для линий CCRF-CEM, K562 и THP-1. Во всех линиях при действии CBL0137 наблюдалось увеличение пре-G₁-пика на гистограмме цитофлуориметрического анализа при использовании в качестве красителя ДНК йодистого пропидия. Так, использование максимальной концентрации CBL0137 увеличивало пре-G₁-пик гистограммы для линий THP-1 до 18%, CCRF-CEM – 21%, K562 – 19%, H929 – 11%, RPMI-8226 – 15%, WENI-3 – 15%, KG-1 – 23%, CCRF-SB – 21%. В данной субпопуляции клеток запущен процесс клеточной гибели. Кроме того, для ряда линий было продемонстрировано статистически значимое увеличение субпопуляции клеток, для которых наблюдался G₂/M-арест клеточного цикла. Так, при обработке клеток линии CCRF-Cem минимальными концентрациями CBL0137 происходило увеличение доли клеток, находящихся в G₂/M фазе клеточного цикла с 26% до 51%, в линии THP-1 - с 26% до 39%, в NCI-H929 - с 27% до 40%, а в линиях RPMI-8226 и K562 использование максимальных концентраций увеличивало долю клеток в этой фазе с 24% до 39% и с 26% до 50% соответственно. Для линий KG-1, WENI-3 и CCRF-SB доля популяции клеток, находящихся в G₁ фазе увеличивалась с 54% до 79%, с 50% до 74% и с 54% до 66% соответственно. Таким образом, с одной стороны, цитотоксический эффект CBL0137 ассоциирован с остановкой клеточного цикла в G₁-фазе или G₂/M-арестом. При этом, характер наблюдаемых изменений в клеточном цикле зависел от гистогенеза опухолевых клеток, то есть наблюдались существенные различия в эффектах CBL0137 на опухолевые клетки линий, полученных от пациентов с

различными нозологическими формами онкозаболеваний системы крови. С другой стороны, CBL0137 приводил к увеличению пре-G₁-пика, что свидетельствует об активации в субпопуляции клеток процессов гибели (апоптоза и/или некроза).

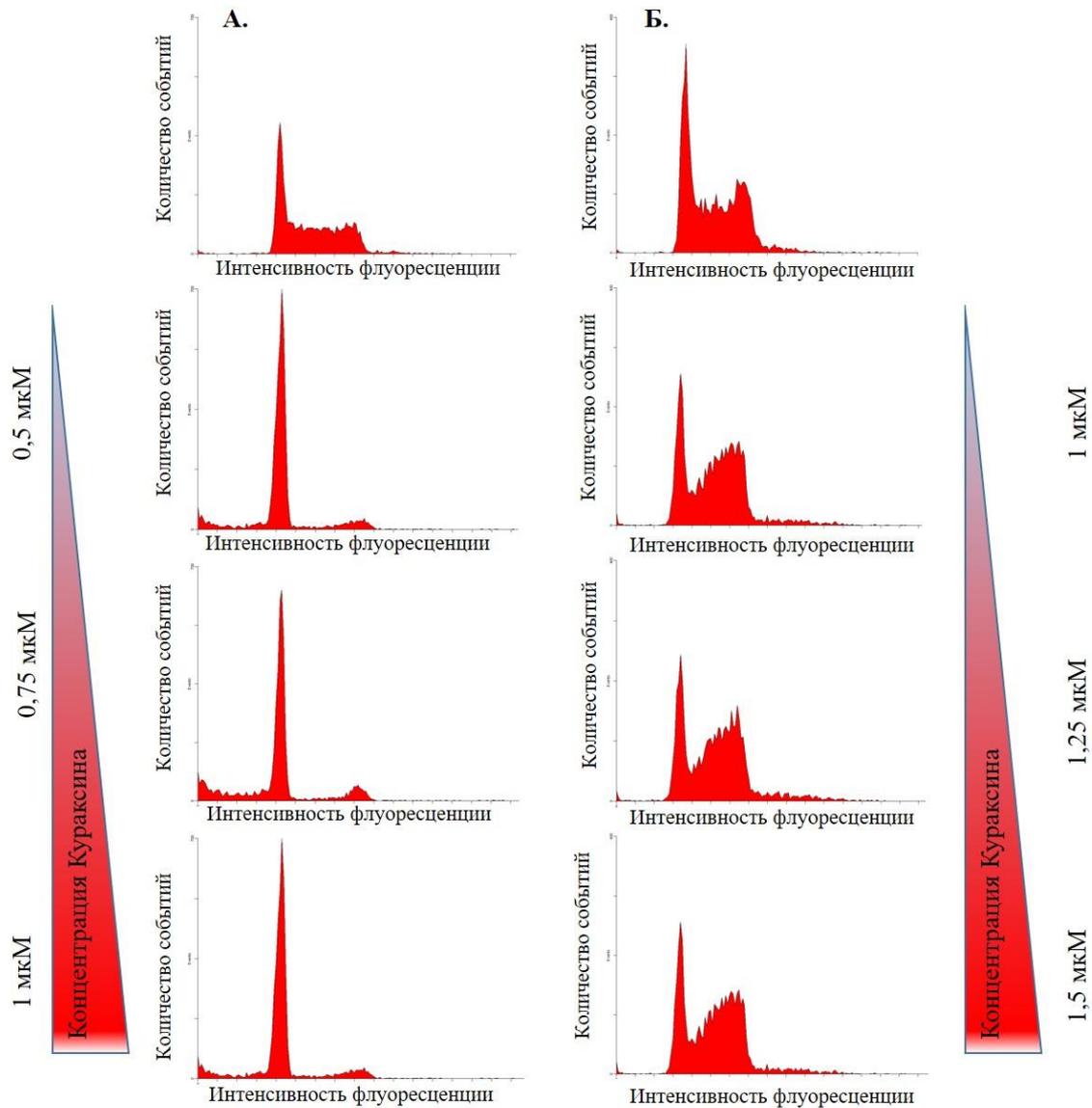


Рисунок 17 - Характеристические гистограммы распределения клеток по фазам клеточного цикла после 24 часов обработки кураксинем CBL0137. (А) – для клеток линии KG-1 по фазам клеточного цикла в ответ на введение кураксина CBL0137. (Б) – для клеток линии K562

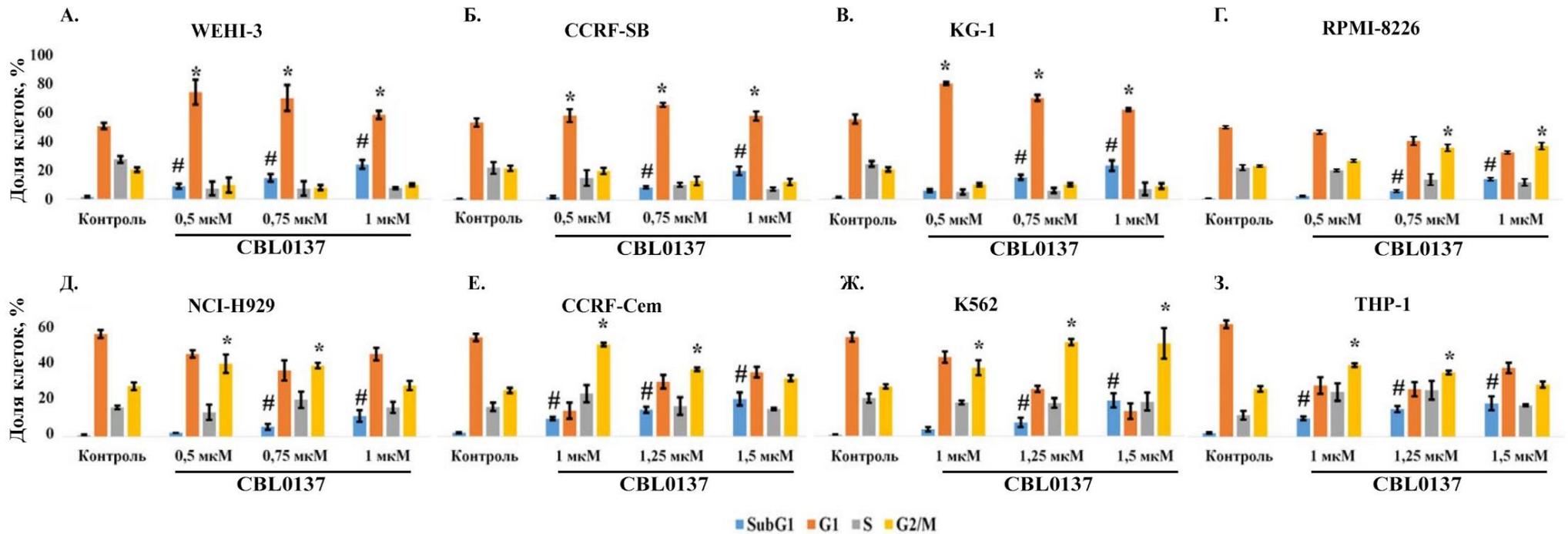


Рисунок 18 - Распределение клеток по фазам клеточного цикла после 24-часовой экспозиции к кураксину CBL0137. (А, Б, В) – Индукция ареста клеток в G_1 фазе клеточного цикла; (Д - З) – Индукция кураксином CBL0137 G_2/M -ареста клеточного цикла; Статистически значимое различие между необработанными контрольными клетками и клетками, обработанными кураксином CBL0137,: * - по доле клеток, находящихся в G_2/M -аресте клеточного цикла, $p < 0,05$; # - по доле клеток в пре- G_1 -пике, $p < 0,05$

3.2.2. Оценка апоптогенной активности кураксина CBL0137 на клеточных линиях опухолей системы крови

В связи с увеличением пре-G₁-пика в распределении клеток ОСК в ответ на инкубацию с CBL0137, что свидетельствует об активации процессов клеточной гибели, на следующем этапе исследования была проанализирована апоптогенная активность CBL0137 в отношении выбранных линий. Оценку апоптогенной активности CBL0137 в клетках ОСК проводили по транслокации фосфатидилсерина и нарушению целостности клеточной мембраны, используя окраску аннексином V-FITC и йодистым пропидием. После обработки клеток CBL0137 наблюдалось дозо-зависимое увеличение доли клеток с ранними апоптотическими изменениями, а также клеток, находящихся на поздней стадии апоптоза. Так, в максимальной концентрации CBL0137 увеличивал долю клеток линии WENI-3, находящихся в апоптозе, на 76%, линии KG-1 - на 67%, линии NCI-H929 - на 74%, линии ТНР-1 - на 43%, линии CCRF-CEM - на 36%, линии K562 - на 34%, линии RPMI-8226 - на 57%, линии CCRF-SB - на 46%. Таким образом, на данном этапе исследования было показано, что цитотоксический эффект CBL0137 на клетки ОСК может быть обусловлен его апоптогенной активностью.

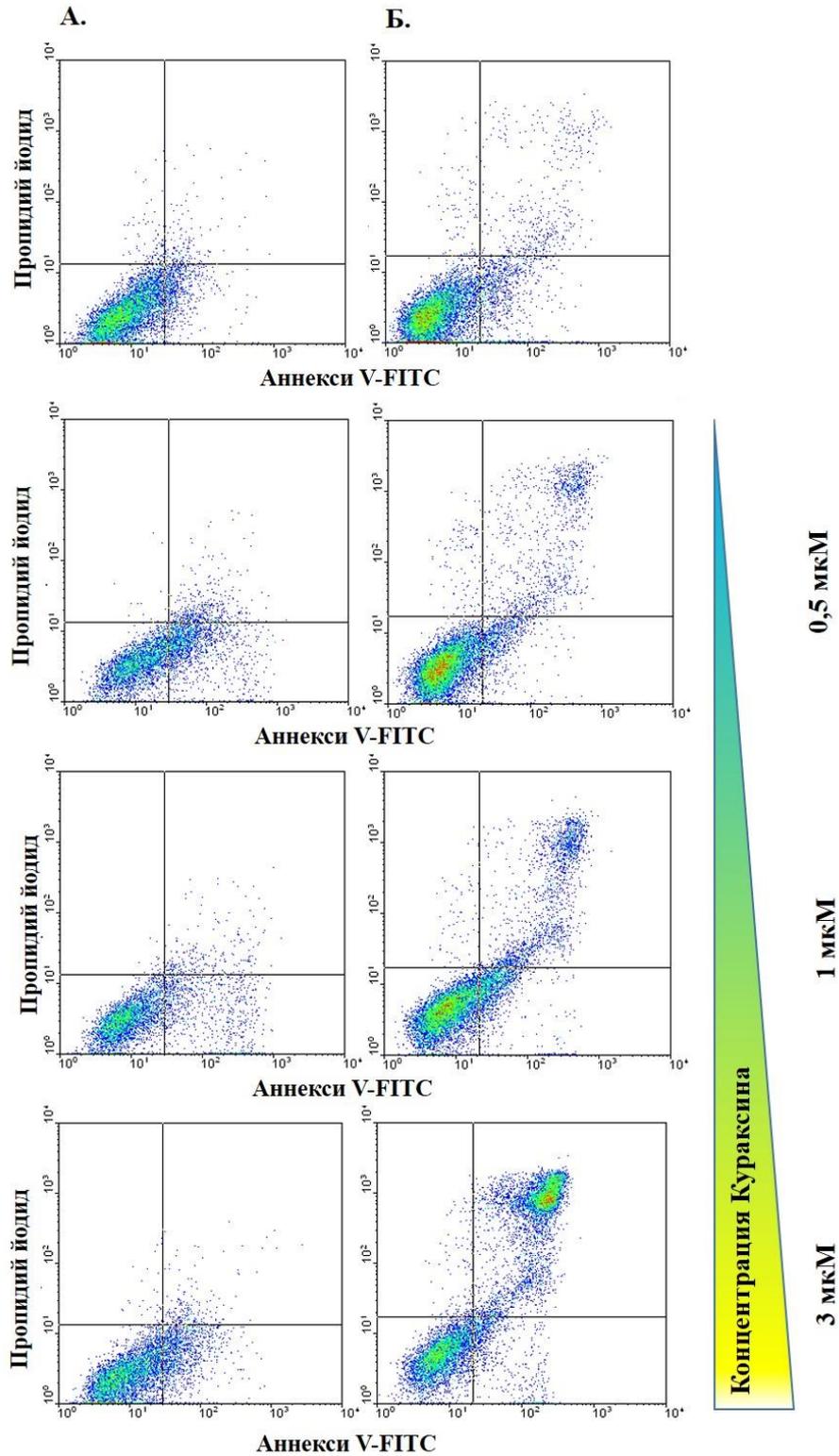


Рисунок 19 - Характеристические гистограммы окраски клеток Аннексином V-FITC и PI после 24 часов обработки кураксином CBL0137. (А) - Гистограмма окраски клеток линии CCRF-Sea1; (Б) - Гистограмма окраски клеток линии THP-1

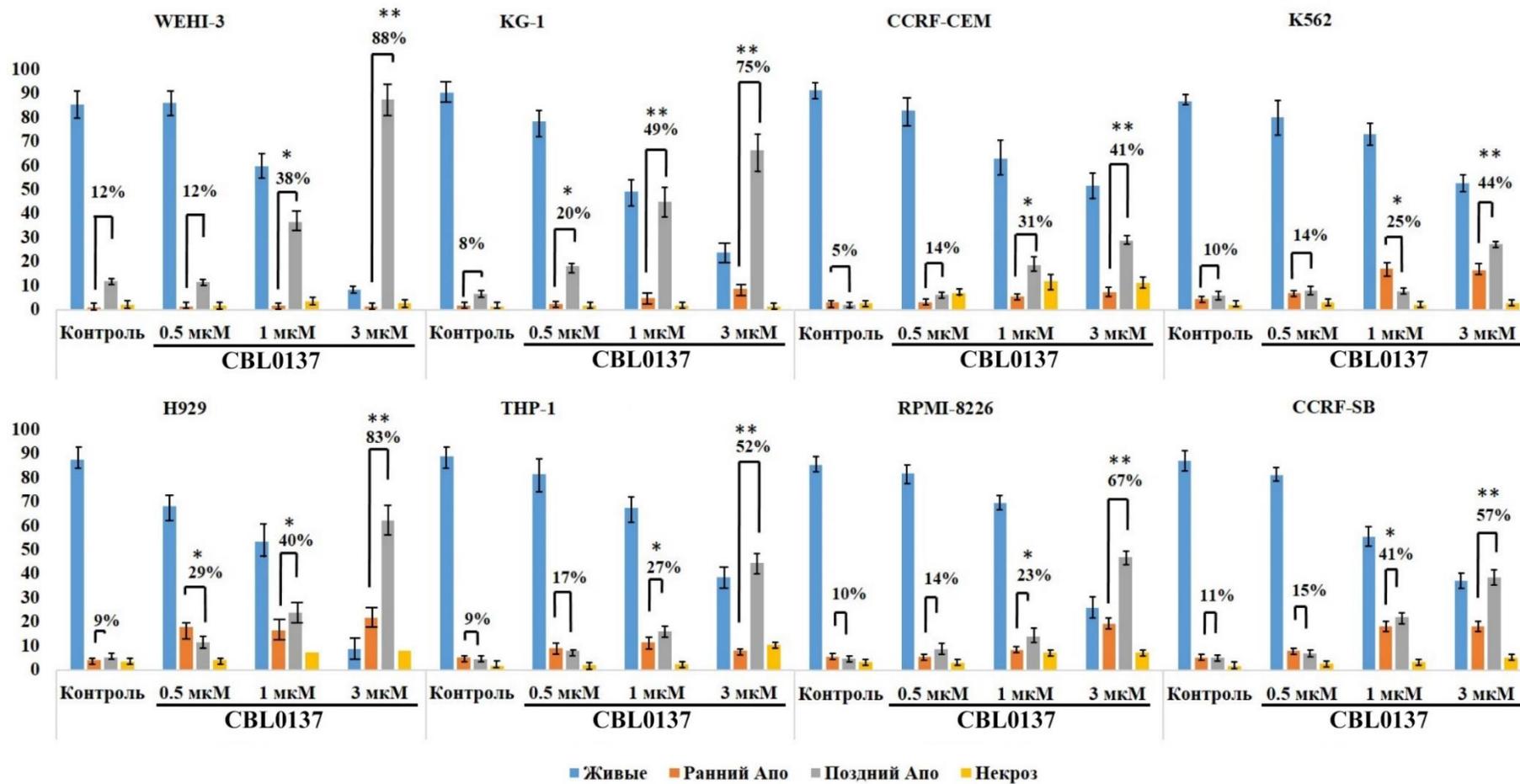


Рисунок 20 - Проапоптотический эффект соединения со смешанным типом взаимодействия CBL0137 на клетки опухолей системы крови. Анализ проводили с помощью проточной цитофлуориметрии. Об индукции апоптоза судили по окраске PI и Аннексином V-FITC. * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$; ** - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,01$

3.2.3. Исследование влияния кураксина CBL0137 на экспрессию генов сигнальных путей

К настоящему времени было показано, что интегральным эффектом функционального ингибирования комплекса FACT CBL0137 является активация сигнальных путей p53, Notch и интерферона, а также подавление активности NF- κ B, WNT/ β -катенина в клетках солидных опухолей. В нашей работе мы исследовали влияние CBL0137 на сигнальные пути клеток ОКС.

Влияние CBL0137 на экспрессию генов исследовали с использованием набора 84 пар праймеров (Human Signal Transduction Pathway Finder RT2Profiler PCR Array) для таргетных генов следующих сигнальных путей: (1) TGF- β (8 генов); (2) NF- κ B (8 генов); (3) WNT/ β -катенин (9 генов); (4) PPAR γ (8 генов); (5) Hedgehog (9 генов); (6) Notch (9 генов); (7) STAT/JAK (9 генов); (8) p53 (9 генов); а также генов, активация которых связана с (9) гипоксией (9 генов) и (10) оксидативным стрессом (9 генов). В этом исследовании использовали 4 линии клеток ОКС: линию CCRF-SB, в клетках которой CBL0137 вызывал увеличение субпопуляции клеток в ранней G1-фазе, и линии ТНР-1, CCRF-Cem, RPMI-8226, в клетках которых CBL0137 индуцировал G2/M-арест клеточного цикла. Клетки ТНР-1 и CCRF-Cem обрабатывали CBL0137 в концентрации 1,5 мкМ, в то время как для линий CCRF-SB и RPMI-8226 использовали концентрацию препарата 1 мкМ. Это связано с большей чувствительностью последних линий к агенту. Через 24 часа после обработки CBL0137 было зарегистрировано существенное (более чем в 2 раза) изменение экспрессии для 43 генов в линии CCRF-SB, для 37 генов в линии ТНР-1, для 36 генов в линии CCRF-Cem и для 38 генов в линии RPMI-8226.

Наибольшему влиянию в линии ТНР-1 были подвержены кластеры генов, относящихся к сигнальным путям WNT (7 из 9 генов панели), Hedgehog (5/9), PPAR (5/8), а также к путям, запускаемым в ответ на гипоксию (7/9). Было продемонстрировано снижение экспрессии таргетных генов для всех сигнальных путей. При действии препарата на клетки CCRF-Cem было показано изменение экспрессии генов сигнальных путей Notch (8/9), WNT (7/9) и Hedgehog (6/9). При

этом экспрессия практически всех таргетных генов сигнальных путей WNT и Hedgehog снизилась, тогда как экспрессия всех таргетных генов сигнального пути Notch возросла. В клетки линии RPMI-8226 в ответ на применение CBL0137 изменялась экспрессия таргетных генов сигнальных путей WNT (7/9), Hedgehog (6/9), Nf- κ B (5/8), TGF β (5/8), а также пути, запускаемых в ответ на гипоксию (6/9). Стоит отметить, что в большинстве случаев экспрессия таргетных генов перечисленных путей снижалась. При обработке линии CCRF-SB было зарегистрировано изменение экспрессии таргетных генов путей TGF β (7/8), WNT (8/9), PPAR (6/8) и Hedgehog (5/9). Для сигнального пути Hedgehog данное воздействие носило однонаправленный характер в сторону снижения экспрессии генов, в то время как для ряда генов остальных сигнальных путей наблюдалось повышение экспрессии. Таким образом, в данном исследовании было показано, что CBL0137 модулирует активность сигнальных путей WNT и Hedgehog вне зависимости от гистогенеза клеток ОСК. В тоже время, CBL0137 оказывает моделирующее действие на экспрессию генов, активация которых связана с гипоксией для линий множественной миеломы (RPMI-9226) и острого миелоидного лейкоза (THP-1). Ранее было показано, что CBL0137 индуцирует апоптоз и увеличивает чувствительность клеток рака легкого к цисплатину [204]. В нашем исследовании на клетках Т-клеточного лейкоза мы также наблюдали активацию сигнального пути Notch. Однако для данного типа лейкозов этот сигнальный путь необходим для прогрессии опухоли, играя анти-апоптотическую роль. Таким образом, это может объяснить наименьшую цитотоксичность CBL0137 в отношении данной линии клеток [27]. Кроме того, на клетках солидных опухолей неоднократно показано, что CBL0137 приводит к активации экспрессии эфферентных генов P53. В нашем исследовании при обработке клеток CBL0137 не выявлено однонаправленного изменения кластеров таргетных генов P53, что отчасти может объясняться мутацией в гене P53, которая содержится в клетках используемых линий [213, 214].

ТНР-1

Гипоксия	<i>ADM</i>	<i>CA9</i>	<i>EPO</i>	<i>HMOX1</i>	<i>SERPINE1</i>	<i>SLC2A1</i>	<i>VEGFA</i>
	-2,9	-13,3	-18,5	-2,5	-6,5	-3,2	-2,9
Сигнальный путь WNT	<i>AXIN2</i>	<i>CCND2</i>	<i>DAB2</i>	<i>MMP7</i>	<i>MYC</i>	<i>PPARD</i>	<i>WISP1</i>
	-3,5	-4	-3,2	-5,9	-4,3	-2,9	-9,8
Сигнальный путь Hedgehog	<i>BMP4</i>	<i>WNT1</i>	<i>WNT2B</i>	<i>WNT5A</i>	<i>WNT6</i>		
	-4,5	-5	-3,1	-13,9	-4,8		
Сигнальный путь PPAR γ	<i>CPT2</i>	<i>FABP1</i>	<i>OLR1</i>	<i>SLC27A4</i>	<i>SOCS3</i>		
	-3,2	-6,6	-7,1	-4,6	-2,1		
Сигнальный путь TGF β	<i>ATF4</i>	<i>EMPI</i>	<i>MYC</i>				
	-3,5	-4,1	-4,3				
Сигнальный путь P53	<i>BBC3</i>	<i>EGFR</i>	<i>FAS</i>				
	-3,1	-23	2,4				
Сигнальный путь Notch	<i>HEY1</i>	<i>HEY2</i>	<i>ID1</i>				
	-5,7	-8,1	-6,6				
Сигнальный путь NF- κ B	<i>CSF1</i>	<i>IFNG</i>					
	-2,9	-4,4					
Сигнальный путь JAK/STAT	<i>SOCS3</i>	<i>FCER2</i>					
	-2,1	-16,6					
Оксидативный стресс	<i>GSR</i>	<i>HMOX1</i>					
	-3,3	-2,5					

CCRF-SB

Сигнальный путь WNT	<i>AXIN2</i>	<i>CCND1</i>	<i>CCND2</i>	<i>MMP7</i>	<i>MYC</i>	<i>PPARD</i>	<i>WISP1</i>	<i>FOSL1</i>
	-2,5	-2,9	-2,8	-2,7	-3,5	-2,5	-3,6	2,1
Сигнальный путь TGF β	<i>IFRD1</i>	<i>MYC</i>	<i>HERPUD1</i>	<i>GADD45B</i>	<i>EMPI</i>	<i>ATF4</i>	<i>CDKN1B</i>	
	-2,4	-3,5	-2,2	-7,9	-3,9	-2,1	2,1	
Сигнальный путь PPAR γ	<i>ACSL3</i>	<i>ACSL4</i>	<i>ACSL5</i>	<i>CPT2</i>	<i>OLR1</i>	<i>SOCS3</i>		
	-2,5	-2,4	-2,1	-2,4	-2,6	2		
Сигнальный путь Hedgehog	<i>BCL2</i>	<i>BMP4</i>	<i>PTCH1</i>	<i>WNT2B</i>	<i>WNT5A</i>			
	-2	-3,8	-3	-2,9	-2,4			
Сигнальный путь JAK/STAT	<i>CCND1</i>	<i>FCER2</i>	<i>CEBPD</i>	<i>LRG1</i>	<i>SOCS3</i>			
	-2,9	-4,4	2,5	2,6	2			
Сигнальный путь p53	<i>EGFR</i>	<i>FAS</i>	<i>PCNA</i>	<i>BBC3</i>				
	-3,8	-2,4	-2,4	2,7				
Гипоксия	<i>LDHA</i>	<i>SLC2A1</i>	<i>VEGFA</i>	<i>ADM</i>				
	-2,8	-2,6	-3,2	2,5				
Сигнальный путь Notch	<i>HES5</i>	<i>HEY1</i>	<i>ID1</i>					
	2,6	2	2,8					
Сигнальный путь NF- κ B	<i>BIRC3</i>	<i>TNF</i>	<i>IFNG</i>					
	-5,3	-2,6	3,2					
Оксидативный стресс	<i>INXRD1</i>							
	2,4							

Рисунок 21 - Влияние CBL0137 на экспрессию таргетных генов сигнальные пути клеток опухолей системы крови. Клетки обрабатывали малотоксичными дозами соединения CCRF-SB – 1 мкМ и ТНР-1; экспозиция составляла 24 часа

CCRF-Cem

Сигнальный путь Notch	<i>HES5</i>	<i>HEY1</i>	<i>HEY2</i>	<i>HEYL</i>	<i>ID1</i>	<i>JAG1</i>	<i>LFNG</i>	<i>NOTCH1</i>
	4	6,7	3,9	4,9	6	7,8	3,3	4,4
Сигнальный путь WNT	<i>AXIN2</i>	<i>CCND1</i>	<i>CCND2</i>	<i>FOSL1</i>	<i>MMP7</i>	<i>MYC</i>	<i>WISP</i>	
	-10,5	-3,4	-5	5,1	-2,3	-5,8	2,9	
Сигнальный путь Hedgehog	<i>BCL2</i>	<i>PTCH1</i>	<i>WNT1</i>	<i>WNT2B</i>	<i>WNT3A</i>	<i>WNT6</i>		
	-2,9	4,3	-5,8	-4,5	-4,8	-5,7		
Сигнальный путь NF-κB	<i>BCL2A1</i>	<i>BIRC3</i>	<i>CCL5</i>	<i>IFNG</i>	<i>TNF</i>			
	-2,9	-3,3	2,9	5,9	3,2			
Сигнальный путь JAK/STAT	<i>IRF1</i>	<i>CCND1</i>	<i>SOCS3</i>					
	-7,6	-3,4	3,2					
Сигнальный путь TGFβ	<i>IFRD1</i>	<i>MYC</i>	<i>TNFSF10</i>					
	-2	-5,8	6,4					
Сигнальный путь P53	<i>BAX</i>	<i>EGFR</i>						
	-5	-3,9						
Гипоксия	<i>CA9</i>	<i>VEGFA</i>						
	-2,3	-5,3						
Сигнальный путь PPARγ	<i>OLR1</i>	<i>SOCS3</i>						
	3,8	3,2						
Окислительный стресс	<i>NQO1</i>							
	2,5							

RPMI-8226

Сигнальный путь WNT	<i>AXIN2</i>	<i>CCND1</i>	<i>CCND2</i>	<i>DAB2</i>	<i>MMP7</i>	<i>MYC</i>	<i>WISP1</i>
	-2,4	-2,1	-2,7	-2,4	-2,5	-2,7	3,1
Сигнальный путь Hedgehog	<i>BCL2</i>	<i>WNT1</i>	<i>WNT2B</i>	<i>WNT5A</i>	<i>WNT6</i>	<i>PTCH1</i>	
	-2,7	-3,1	-5,1	-2,8	-2,4	2,7	
Гипоксия	<i>VEGFA</i>	<i>CA9</i>	<i>LDHA</i>	<i>SERPINE</i>	<i>EPO</i>	<i>SLC2A1</i>	
	-2,7	-2,5	-2,3	-3,3	2,3	2,3	
Сигнальный путь TGFβ	<i>ATF4</i>	<i>HERPUD</i>	<i>MYC</i>	<i>GADD45B</i>	<i>IFRD1</i>		
	-2,8	-5	-2,7	3,2	2,3		
Сигнальный путь PPARγ	<i>OLR1</i>	<i>ACSL3</i>	<i>CPT2</i>	<i>SLC27A4</i>			
	-3,5	2,3	2,7	2,4			
Сигнальный путь NF-κB	<i>BCL2A1</i>	<i>IFNG</i>	<i>TNF</i>	<i>STAT1</i>			
	-3	-2,6	-3	2,0			
Сигнальный путь p53	<i>BBC3</i>	<i>BTG2</i>	<i>PCNA</i>				
	-2,8	-3,4	2				
Сигнальный путь Notch	<i>ID1</i>						
	3,6						
Окислительный стресс	<i>TXNRD1</i>						
	2,4						
Сигнальный путь JAK/STAT	<i>CCND1</i>						
	-2,1						

Рисунок 22 - Влияние CBL0137 на экспрессию таргетных генов сигнальные пути клеток опухолей системы крови. Клетки обрабатывали малотоксичными дозами соединения RPMI-8226 – 1 мкМ и CCRF-Cem – 1,5 мкМ; экспозиция составляла 24 часа

3.2.4. Исследование влияния на активность белка PARP-1

Ранее *in vitro* и *in vivo* было продемонстрировано, что при действии некоторых ДНК-тропных молекул (узкобороздочных лигандов) происходит вытеснение из ДНК полифункционального белка поли(АДФ-рибозы)-полимеразы I (PARP1), что приводит к ингибированию ДНК-зависимого пути активации этого белка. Белок PARP-1 задействован в регуляции таких процессов как клеточный цикл и апоптоз. Недавно было продемонстрировано, что ингибирование активности белка PARP-1 приводит к G₂/M-аресту клеточного цикла [215, 216]. В связи с тем, что CBL0137 в ряде клеточных линий вызывал G₂/M-арест и, кроме того, является препаратом со смешанным механизмом действия, функционируя как интеркалятор и узкобороздочный лиганд, мы исследовали влияние CBL0137 на ДНК-зависимую активацию белка PARP-1. В качестве модельной системы была использована реконструированная система определения активности PARP-1 *in vitro*, включающая: субстрат (NAD), фермент (PARP1) и активатор ферментативной реакции. В качестве активатора мы использовали 44-членный олигонуклеотид, содержащий две взаимно комплементарных области, которые способны образовывать двухцепочечную структуру ДНК, имеющую одноцепочечный разрыв. Такое соединение уже применялось ранее в качестве удобной модели [217]. Была продемонстрирована способность CBL0137 ингибировать ДНК-зависимую активацию в реконструктивной системе.

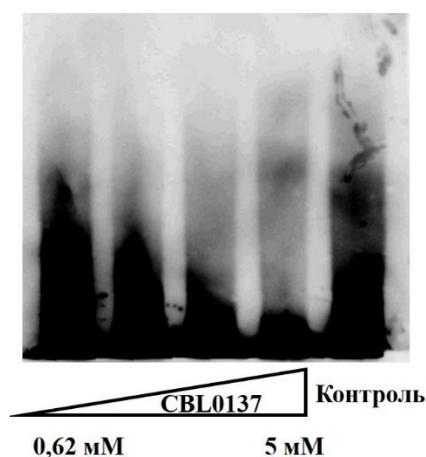


Рисунок 23 - Реакция поли(АДФ)-рибозилирования в присутствии ДНК-дуплекса h44, при разных концентрациях кураксина CBL0137. Значение IC₅₀ кураксина составило 2 мМ.

3.3. Анализ влияния кураксина CBL0137 на цитотоксические эффекты доксорубицина, даунорубицина и иматиниба

Среди продемонстрированных нами эффектов CBL0137 можно выделить ряд изменений в экспрессии генов, участвующих в развитии лекарственной устойчивости к препаратам, применяемым в терапии опухолей системы крови. К таким мишеням можно отнести сигнальный путь WNT/ β -катенин [218, 219], сигнальный путь Hedgehog [220, 221], сигнальные пути, активируемые при гипоксии [222], белок поли(АДФ-рибоза)-полимераза I [223]. В связи с этим, нами было исследовано влияние CBL0137 на цитотоксический эффект других лекарственных средств, применяемых в терапии лейкозов.

Влияние CBL0137 исследовали методом оценки цитотоксичности с помощью МТТ-теста на клетках K562 и подсчёта комбинационного индекса CI, в качестве лекарственных препаратов использовали доксорубицин, даунорубицин и иматиниб. Для анализа совместного эффекта CBL0137 была использована концентрация 0,62 мкМ, приводящая к гибели 20% клеток (IC₂₀). CI для комбинации даунорубицина и CBL0137 составил 0,5; для комбинации доксорубицина и CBL0137 - CI = 0,56; а для комбинации CBL0137 с иматинибом - CI = 0,35. Таким образом, во всех случаях комбинационный индекс был < 1, что говорит о синергизме цитотоксического эффекта CBL0137 и выбранных лекарственных средств.

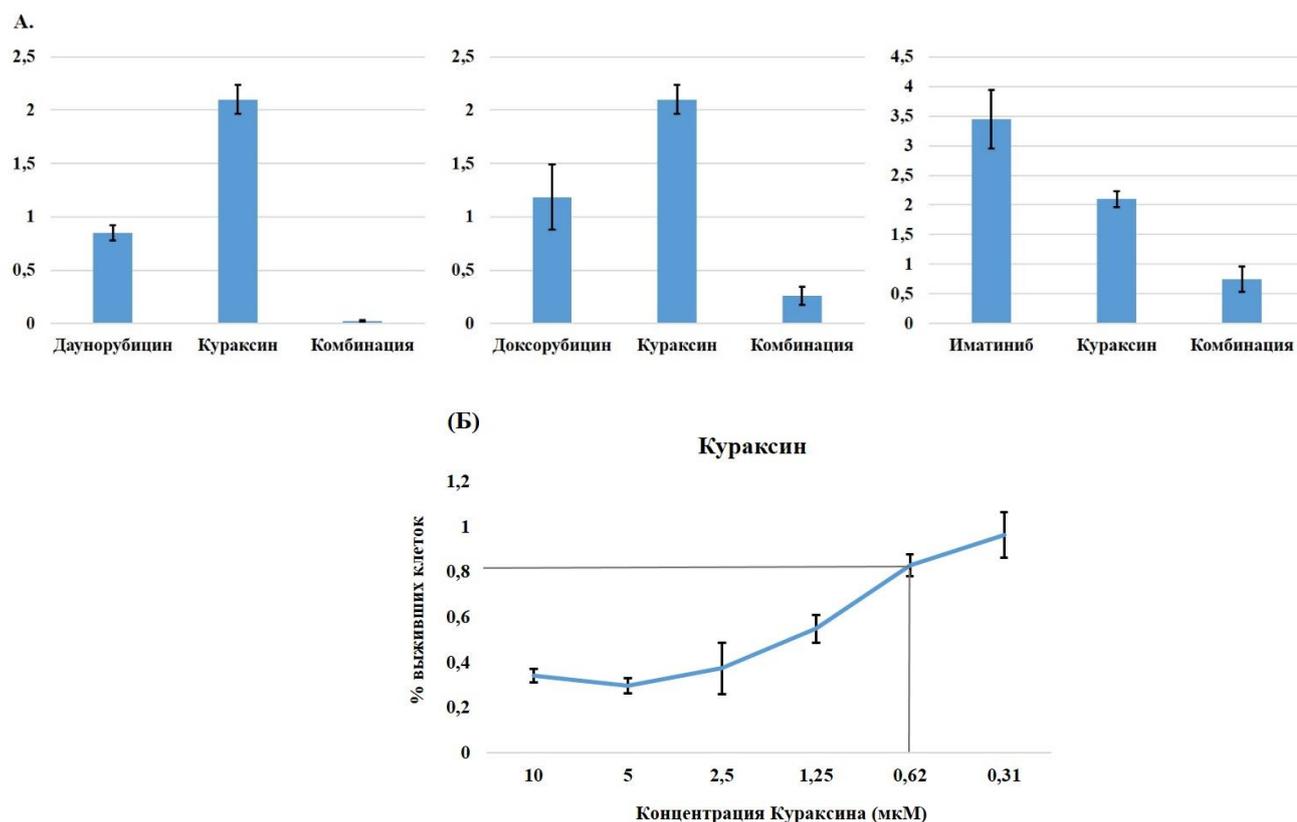


Рисунок 24 - Анализ лекарственного взаимодействия кураксина CBL0137 с даунорубицином, доксорубицином и иматинибом. (А) Сравнение IC50 препаратов в монорежиме и в комбинации с CBL0137. (Б) Доза CBL0137, выбранная для исследования лекарственного взаимодействия, соответствует IC20

3.4. Оценка цитотоксического эффекта кураксина на клетки переживающих культур пациентов с опухолями системы крови

Для оценки цитотоксического эффекта на переживающие культуры ОСК из отделения химиотерапии гемобластозов НИИ Клинической Онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» была получена кровь от 7 пациентов, у которых была впервые диагностирована опухоль (3 пациента) и тех, которые получали лечение не менее чем за 3 месяца до забора крови (4 пациента). Оценку цитотоксичности проводили методом МТТ-теста после 72 часов инкубации опухолевых клеток с CBL0137 в концентрациях от 0,1 мкМ до 30 мкМ. Для каждого случая рассчитывался коэффициент IC50. Среднее значение IC50 составило $8,9 \pm 4$ мкМ, минимальное значение – 1,1 мкМ и наблюдалось у пациента с острым миелоидным лейкозом М5 по Франко-американско-

британской классификации (острый монобластный лейкоз), максимальное значение составляло 24 мкМ у пациента с Т-клеточным лимфобластным лейкозом. Для каждого случая были построены графики зависимости выживаемости от концентрации препарата.

Таблица 5 - Данные пациентов

	Диагноз	Проводимая терапия	Значения IC50 (мкМ)
Пациент №1	Острый миелоидный лейкоз (M0 по ФАБ)	R-CHOP, mini BEAM	9,9
Пациент №2	Хронический Лимфолейкоз	Терапия не проводилась	3,8
Пациент №3	Острый миелоидный лейкоз (M5 по ФАБ)	Терапия не проводилась	1,1
Пациент №4	Острый миелоидный лейкоз (M2 по ФАБ)	Терапия не проводилась	1,9
Пациент №5	Т-клеточный лимфобластный лейкоз	ОЛЛ-2016	13
Пациент №6	Т-клеточный лимфобластный лейкоз	ОЛЛ-2016	24
Пациент №7	Хронический Лимфолейкоз	Терапия не проводилась	8,9

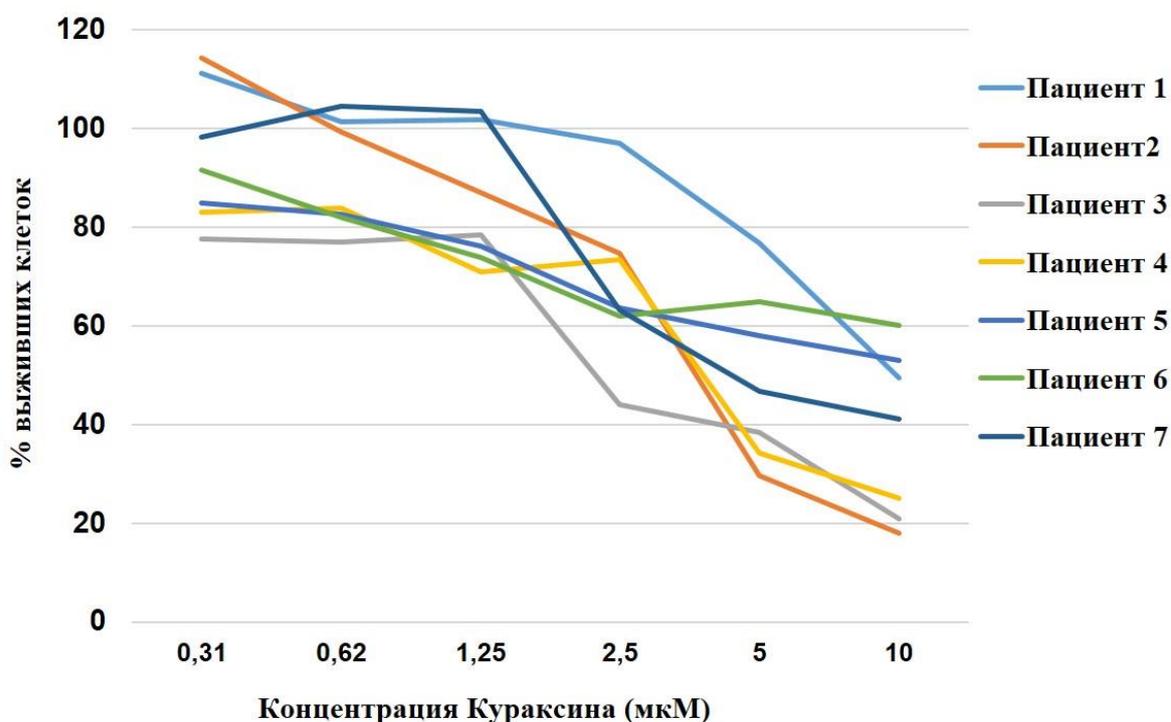


Рисунок 22 - Цитотоксический эффект кураксина CBL0137 на опухолевые клетки от пациентов со злокачественными новообразованиями системы крови

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время разработка новых подходов и поиск лекарственных средств для терапии ОСК представляет собой активно развиваемое направление экспериментальной онкологии. В основном эти исследования направлены на поиск потенциальных таргетных препаратов, проявляющих специфическое ингибирующее действие на определенные молекулярные мишени. В представленном исследовании нами был использован новый подход – использование ДНК-тропных соединений мультитаргетной направленности, для которых на моделях различных солидных опухолей был продемонстрирован выраженный противоопухолевый эффект. Так в качестве одного из препаратов был выбран CBL0137, противоопухолевое и антиканцерогенное действие которого было продемонстрировано на целом ряде моделей солидных опухолей *in vitro* [203, 205] и *in vivo* [203].

При выборе второго соединения для исследования мы применили как подход, использованный при выборе CBL0137, так и учитывали другой современный подход поиска новых противоопухолевых препаратов – перепрофилирование лекарственных средств. Данный подход существенно ускоряет введение изучаемого соединения в клиническую практику лечения онкозаболеваний, так как препарат уже применяется при лечении заболеваний неонкологического профиля. Наше внимание привлек антипаразитарный препарат диминазен, поскольку в предыдущих исследованиях нашей лаборатории было установлено, что он эффективно ингибирует ДНК-зависимую активацию PARP1 в клетках рака молочной железы BT474. Кроме того, противоопухолевая активность диминазена была продемонстрирована с помощью колоногенного теста на клетках следующих линий: PC-3 рака предстательной железы; Skov3 и Ovca 432 рака яичников; PNX рака почки, BT474 рака молочной железы и *in vivo* на ксенографтах рака почки [183].

4.1. Сравнение противоопухолевой активности негенотоксичных ДНК-тропных молекул

На первом этапе проводилось сравнение противоопухолевой активности негенотоксичных ДНК-тропных малых молекул диминазена и CBL0137 *in vitro* и *in vivo*.

В первую очередь была проведена оценка цитотоксического эффекта этих молекул *in vitro* на широкой выборке линий ОСК. Мы наблюдали выраженный цитотоксический эффект CBL0137 на всех исследуемых линиях, в то же время, при тех же концентрациях диминазена не демонстрировал цитотоксического эффекта. Для его достижения используемые концентрации были увеличены в 10 раз. Концентрации IC₅₀ диминазена в среднем превышали на 2 порядка концентрации IC₅₀ CBL0137. Полученные результаты по эффекту CBL0137 на метаболическую активность клеток ОСК в целом соответствуют ранее опубликованным данным по влиянию CBL0137 клетки солидных опухолей толстой кишки, рака легкого. IC₅₀ диминазена в отношении клеток ОСК, определенная с помощью МТТ-теста оказалась в 2-3 раза выше по сравнению со значениями IC₅₀, полученным в колоногенном тесте при использовании клеток ряда клеточных линий солидных опухолей различных нозологических форм [183].

Кроме того, на модели перевиваемого мышинового лейкоза WENI-3 была произведена оценка противоопухолевого эффекта CBL0137 и диминазена. Было продемонстрировано, что инъекции CBL0137 приводили к редукции 50% случаев лейкозов, в остальных случаях CBL0137 снижал скорость развития поражений внутренних органов (печени и селезенки). Инъекции диминазена не приводили к редуцированию опухоли у мышей, тем не менее при его действии наблюдалось значительное торможение развития лейкоза.

Таким образом, на первом этапе для дальнейшего исследования была отобрана наиболее активная молекула.

4.2. Влияние кураксина на апоптоз и клеточный цикл в клетках опухолей системы крови

Противоопухолевый эффект *in vitro* подразумевает совокупность антипролиферативного и проапоптотического эффекта. В нашем исследовании оценивали оба параметра. Выбор временной экспозиции кураксина CBL0137 в первую очередь обосновывается данными о том, что проникновение CBL0137 в клеточное ядро, нековалентное связывание с ДНК, изменение структуры хроматина и транслокация гистонового шаперона FACT в хроматин регистрируются уже через несколько минут после обработки клеток этим агентом [189]. Кроме того, в терапии ОСК большое значение играет скорость ответа клетки на воздействие препарата. С учетом того, что механизм избирательного противоопухолевого действия CBL0137 связывают с его способностью индуцировать транслокацию FACT в хроматиновую фракцию ядра, что приводит к изменению активности целого ряда сигнальных путей, мы сконцентрировали свое внимание на более ранних ответах клетки. Концентрации были подобраны с учетом результатов МТТ-теста. В исследовании наибольшая анализируемая концентрация препарата должна превышать IC₅₀ для всех линий, однако в связи с высокой чувствительностью клеток линии KG-1, WENI-3, CCRF-SB и NCI-H929, максимальная используемая концентрация составляла 3 мкМ. Для линии CCRF-Sem, являющейся наименее чувствительной к CBL0137, при данной концентрации IC₅₀ достигнуто не было. Мы наблюдали выраженный апоптогенный эффект на клетки ОСК, наступающий уже через 24 часа после обработки клеток. Результат, полученный с данной серии экспериментов был сопоставим с результатами, полученными на линиях солидных опухолей [207]. Наиболее чувствительными к CBL0137 оказались линии острого миелоидного лейкоза WENI-3 и KG-1, а также линия множественной миеломы NCI-H929, наименее чувствительными оказались линии Т-клеточного лейкоза CCRF-SEM и хронического миелоидного лейкоза K562. Антипролиферативный эффект CBL0137 оценивали по способности индуцировать клеточный арест. Выбор временного интервала экспозиции клеток к CBL0137 в первую очередь

обосновывается данными о периоде удвоения клеток, который для каждой из анализируемых линий превышает 24 часа. В данном исследовании использовали концентрации ниже IC₅₀, что позволяло уменьшить загрязнение клеточной популяции погибшими клетками, и, таким образом, получать воспроизводимые данные. Кроме того, в связи с достаточно узким интервалом действия препарата использовали промежуточную концентрацию – 0,75 мкМ. Было показано, что введение CBL0137 приводило к аресту клеточного цикла, однако фаза ареста для популяций клеток выбранных линий различалась. Так, CBL0137 вызывал в клетках линий CCRF-CS, WENI-3 и KG-1 арест в ранней G₁-фазе клеточного цикла, в то время как в остальных линиях наблюдался G₂/M-арест клеточного цикла. Таким образом, было продемонстрировано, что противоопухолевый эффект CBL0137 *in vitro* включает в себя как индукцию апоптоза, так и ингибирование клеточного цикла. Кроме того, учитывая данные МТТ-теста, показывающие, что CBL0137 демонстрирует как дозовую, так и временную зависимость, арест клеточного цикла и индукцию апоптоза можно рассматривать как последовательно идущие процессы.

4.3. Влияние кураксина на экспрессию кластеров генов таргетных путей

При изучении влияния CBL0137 на экспрессию кластеров генов сигнальных путей в разных клеточных линиях нами было установлено, что наиболее общим эффектом является снижение экспрессии таргетных генов сигнальных путей WNT/ β -катенин и Hedgehog. Эти сигнальные пути активно вовлечены в патогенез ОСК и их компоненты рассматриваются как потенциальные мишени в терапии данной группы новообразований [224, 225]. Так, сигнальный путь WNT участвует в регуляции таких процессов клетки как дифференцировка, пролиферация, регуляция апоптоза, поддержание стволового фенотипа и миграция [34, 226]. Нарушения регуляции, приводящие к гиперактивации этого сигнального пути, играют ключевую роль в развитии ОСК. К наиболее частым нарушениям механизмов регуляции сигнального пути WNT относятся: повышение чувствительности к лиганду, эпигенетическая репрессия WNT-антагонистов,

гиперэкспрессия WNT-лиганда, нарушение деградации β -катенина в цитоплазме и изменение активности TCF/Lef [51].

Сигнальный путь Hedgehog – один из ключевых регуляторов эмбрионального развития [227], у взрослых этот сигнальный путь регулирует поддержание гемопозеза, в частности, дифференцировку Т-клеток [69]. В патогенезе ОСК Hedgehog выступает как положительный регулятор пролиферации и выживания, а также поддержания популяции стволовых клеток и развития множественной лекарственной устойчивости [228]. Стоит отметить, что кросс-взаимодействие данных сигнальных путей встречается в патогенезе как солидных опухолей [229, 230], так и ОСК [231]. Кросс-взаимодействие этих путей может осуществляться сразу по нескольким механизмам. Во-первых, на цитоплазматическом уровне – за счёт вовлечения в регуляцию обоих путей таких белков как GSK3 β , CK1 α , SuFu. В частности, GSK3 β и CK1 α являются компонентами комплекса, разрушающего β -катенин, таким образом осуществляя ингибирование сигнального пути WNT, в тоже время эти белки могут фосфорилировать Gli3, что вызывает деградацию С-концевого пептида и образование Gli3R, подавляющего активность Gli1 [232] и, в свою очередь, приводит к ингибированию сигнального пути Hedgehog. С другой стороны, для белка SuFu, известного ингибитора сигнального пути Hedgehog, недавно было показано влияние на ядерно-цитоплазматическое распределение β -катенина [233]. Во-вторых, путь Hedgehog регулирует экспрессию белков, вовлеченных в регуляцию сигнального пути WNT, в частности: WNT1, WNT2b, WNT3a [234]. В тоже время, среди таргетных генов WNT сигналинга имеются регуляторы пути Hedgehog. Например, транскрипционный фактор Мус активирует экспрессию гена Gli, тем самым активируя сигнальный путь Hedgehog [235]. Ранее было показано, что CBL0137 ингибирует сигнальный путь WNT, в том числе снижая экспрессию гена Мус [206]. Таким образом, ингибирование сигнальных путей Hedgehog и WNT во всех тестируемых клеточных линиях может представлять собой связанные события: снижение активности сигнального пути WNT приводит к

снижению экспрессии гена *c-Myc*, что в свою очередь приводит к снижению активности пути Hedgehog.

Кроме того, для 2 из 4 линий CBL0137 снижал экспрессию кластера таргетных генов сигнальных путей PPAR γ , TGF β и гипоксии. Гипоксия в опухолевых клетках способствует развитию МЛУ [236], вызывает активацию миграционной активности и активацию сигнальных путей, ингибирующих апоптоз [237]. Однако ингибирование таких путей как TGF β и PPAR γ в клетках лейкозов приводит к ослаблению апоптогенного сигнала и усилению пролиферации [238, 239]. В то же время, для множественной миеломы ингибирование TGF β является перспективной стратегией лечения костных поражений [240].

На клетках солидных опухолей было неоднократно продемонстрировано активирующее влияние CBL0137 на сигнальные пути, запускаемые белком p53. В наших экспериментах при обработке клеток CBL0137 мы не наблюдали активации кластера генов p53, что отчасти может быть связано с низкой экспрессией или мутациями в гене p53 в используемых линиях [213, 241]. В линии Т-клеточного лейкоза CCRF-CEM введение CBL0137 приводило к повышению экспрессии таргетных генов сигнального пути Notch – ключевого регулятора пролиферации и выживания. Этот сигнальный путь гиперактивирован в более чем 50% случаев Т-клеточного лейкоза за счёт активирующей мутации *NOTCH1* [27]. Клетки CCRF-CEM несут мутацию в гене *NOTCH1* [242], что отражается в более высоком базовом уровне экспрессии почти всех эфферентных генов пути, кроме того, ранее было показано, что CBL0137 в клетках рака легкого способен активировать экспрессию *NOTCH1* и таргетных генов (*HES*, *HEY1*, *HEY2*) по следующему механизму: при взаимодействии с хроматином CBL0137 вытесняет негативный регулятор SP3 из промотора гена *NOTCH1*, что приводит к усилению экспрессии последнего [204].

4.4. Ингибирующее действие кураксина на активность белка PARP-1

Ингибирование активности белка PARP-1 сейчас рассматривается как одно из перспективных направлений в разработке новых лекарственных средств как в терапии солидных опухолей [243, 244], так и в терапии ОСК [245, 246]. Ингибиторы PARP-1 могут быть использованы как в качестве самостоятельных агентов для терапии, выступая в роли индуктора синтетической летальности [247], так и в роли сенситизаторов опухолевых клеток к цитотоксическому или лучевому воздействию [223, 248]. Ранее было показано, что узкбороздочные лиганды способны ингибировать активность белка PARP-1, разобщая связь с ДНК-активатором по конкурентному механизму, УБЛ специфически ингибируют ДНК-зависимую активацию PARP1 [183, 249]. В этой работе была показана способность CBL0137 ингибировать ДНК-зависимую активацию PARP-1.

4.5. Кураксин CBL0137 потенцирует эффекты препаратов, применяемых в терапии опухолей ОСК

К механизмам действия CBL0137 относятся ингибирование ДНК-зависимой активации белка PARP-1 и модуляция сигнальных путей WNT/ β -катенин и Hedgehog, принимающих участие в развитии множественной лекарственной устойчивости по разным механизмам. Так, ДНК-зависимая активация белка PARP-1 запускает механизмы репарации ДНК, включая эксцизионную репарацию нуклеотидов и оснований, а также гомологичную рекомбинацию, при этом чувствительность опухолевых клеток к генотоксичным агентам снижается [250-253]. Сигнальные пути Hedgehog и WNT также вовлечены в развитие резистентности, активируя в популяции опухолевых клеток со стволовым фенотипом пролиферацию и выживание [254, 255]. Эта суб-популяция клеток способна переживать химиотерапию за счёт ряда особенностей, к которым относятся: повышенная экспрессия белков ABC-транспортеров [256], активация систем предотвращения клеточной гибели [257], изменение в экспрессии метаболических ферментов [258], уклонение от иммунного надзора [259]. В нашем исследовании мы оценивали влияние CBL0137 на терапевтический эффект

таких препаратов как доксорубицин, даунорубицин и иматиниб. Данные препараты были выбраны, так как для каждого из них показано влияние вышеописанных механизмов при развитии резистентности [223, 260-262]. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что CBL0137 потенцирует цитотоксические эффекты выбранных нами препаратов. Эти данные хорошо согласуются с данными проведенных ранее исследований для цисплатина [204] и представляют собой новый вариант использования CBL0137 в качестве препарата-сенситизатора к химиотерапевтическому лечению.

4.6. Кураксин CBL0137 демонстрирует цитотоксический эффект в отношении клеток переживающих культур, полученных от пациентов с опухолями системы крови

При изучении цитотоксического эффекта кураксина CBL0137 на опухолевые клетки, полученные из крови пациентов, страдающих ОСК, было показано, что CBL0137 обладает цитотоксичностью в отношении всех полученных переживающих культур клеток. Стоит отметить, что полученные в приведенном исследовании данные сопоставимы с результатами исследования Сомерс и соавторов [263]. Необходимо отметить, что цитотоксический эффект кураксина CBL0137 на клетки, полученные из крови пациентов, которым ранее проводилась терапия, был значительно ниже, чем эффект CBL0137 на клетки, полученные из крови пациентов, без предшествующей терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние десятилетия внимание специалистов, разрабатывающих противоопухолевые препараты, вновь привлекли малые молекулы, тропные к ДНК. В определенной степени это произошло вследствие того, что для анализа нарушений функций генома стали применяться новые методы, позволившие выявить значительно более широкий спектр взаимосвязанных повреждений, происходящих при злокачественной трансформации клетки. В связи с этим приоритетность приобрели классы малых молекул, которые действуют мультитаргетно, так как в результате взаимодействия биополимера с малыми ДНК-тропными молекулами изменяются характеристики спирали ДНК, влияя на функционирование многих ферментов, обеспечивающих метаболизм, репарацию, репликацию ДНК, а также процессы транскрипции и ее регуляции. Это, с одной стороны, усложняет задачу создания новых противоопухолевых препаратов на основе малых молекул, поскольку одновременно должны учитываться как отдельные противоопухолевые эффекты этих соединений, так и сложная система взаимозависимых изменений в функционировании генома клетки, а с другой стороны, раскрывают перспективу воздействия сразу на несколько механизмов, обеспечивающих реализацию ключевых особенностей опухолевой клетки, что замедляет процесс развития лекарственной резистентности. К перспективным малым молекулам в плане использования в химиотерапии опухолей можно отнести новый препарат кураксин CBL0137, взаимодействующий с ДНК по механизмам интеркаляции и связывания с узкой бороздкой, и антипаразитарный препарат диминазен, представляющий собой узкобороздочный лиганд, исследуемый в плане наличия противоопухолевой активности.

Данные предыдущих исследований кураксина CBL0137, включая демонстрацию проапоптотических и противовоспалительных эффектов, способность подавлять WNT- и cMYC-сигнальные пути, противоопухолевую активность в отношении широкого спектра солидных опухолей *in vitro* и *in vivo*, дали основание предполагать, что этот новый препарат окажется эффективным и в отношении ОСК.

Другая малая ДНК-тропная молекула, диминазен (беренил), которая привлекла наше внимание, относится к группе узкобороздочных лигандов (УБЛ), представляет из себя производное пентамидина и применяется как антипротозойное средство для животных, инфицированных *Trypanosoma equiperdum*. Несмотря на отсутствие работ по противоопухолевой активности диминазена, некоторые из его известных свойств дают основание изучить его в этом направлении. Так, диминазен ингибирует LPS-индуцированную активацию воспалительных сигнальных путей NF- κ B, STAT и p38, модулируя иммунный ответ, кроме того диминазен связывает G-квадруплексы, находящиеся в таких важных для канцерогенеза генах, как *c-myc*, *bcl2* и *Tel22*. В предыдущих исследованиях нашей лаборатории была описана способность диминазена ингибировать PARP1. Таким образом, накопленные к настоящему времени данные о молекулярных эффектах кураксина CBL0137 и диминазена стали основой для выполнения исследования по анализу противоопухолевого действия этих соединений в отношении опухолей системы кроветворения.

При выполнении данного диссертационного исследования было изучено противоопухолевое действие некоторых ДНК-тропных малых молекул. Для этих агентов был проведен анализ цитотоксичности в отношении клеток ОСК различных типов и исследована противоопухолевая активность *in vivo*. Для наиболее активного соединения, кураксина CBL0137, изучена апоптогенная активность и способность ингибировать клеточный цикл. Помимо этого, в рамках работы был проведен анализ влияния CBL0137 на уровень экспрессии таргетных генов 10 основных сигнальных путей, регуляция которых связана в патогенезом ОСК, а также исследована способность CBL0137 влиять на активность одного из основных факторов активации репарации ДНК белка PARP-1. Также была изучена способность CBL0137 потенцировать действие химиопрепаратов, применяемых в терапии ОСК, и исследована его цитотоксическая активность на клетках переживающих культур, полученных от пациентов.

ВЫВОДЫ

Полученные в представленном исследовании данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Кураксин CBL0137 и диминазен обладают цитотоксическим действием в отношении клеток 8 линий опухолей системы крови, различных по гистогенезу. При этом IC50 кураксина CBL0137 более чем в 50 раз ниже IC50 диминазена.

2. Кураксин CBL0137 и диминазен демонстрируют противоопухолевый эффект в отношении перевиваемого острого миелоидного лейкоза мышей. При этом у 50% животных, получавших кураксин CBL0137, не отсутствуют опухолевые поражения печени и селезенки, а у животных с опухолевыми поражениями органов наблюдается замедление процесса инфильтрации в сравнении с животными контрольной группы. Диминазен не влияет на частоту поражения органов, однако снижает степень поражения органов опухолевыми клетками.

3. При действии кураксина CBL0137 на клетки опухолей системы крови наблюдаются нарушения клеточного цикла: для линии CCRF-SB, WENI-3 и KG-1 наблюдается увеличение субпопуляции клеток, находящихся в G1-фазе, в то время как в клетках линий CCRF-Cem, THP-1, NCI-H929, RPMI-8226 и K562 происходит G2/M-арест клеточного цикла.

4. Кураксин CBL0137 обладает апоптогенным эффектом, вызывая дозо-зависимое увеличение доли клеток с ранними апоптотическими изменениями, а также клеток, находящихся на поздней стадии апоптоза.

5. В клетках всех тестируемых линиях кураксин CBL0137 ингибирует активность сигнальных путей Hedgehog и WNT/ β -катенин.

6. В реконструированной системе *in vitro* кураксин CBL0137 способен дозо-зависимо ингибировать активацию белка PARP-1.

7. Кураксин CBL0137 потенцирует цитотоксический эффект применяемых в терапии ОСК доксорубицина, даунорубицина и иматиниба.

8. Кураксин CBL0137 оказывает выраженный цитотоксический эффект на клетки переживающих культур, полученных от пациентов с опухолями системы крови.

9. Результаты проведения доклинического исследования действия кураксина CBL0137 на опухоли системы крови свидетельствуют о перспективности проведения клинических испытаний по его использованию в комбинированной химиотерапии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДМСО - диметилсульфоксид

НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат

МАИР – международное агентство по изучению рака

ОСК – опухоли системы крови

ПЦР – полимеразная цепная реакция

AIF - фактор, индуцирующий апоптоз

AP-1-активирующий протеин 1

APAF-1 - фактор, активирующий апоптотические протеазы

BCR- рецептор к В-клеточному антигену

cAMP – циклоаденинмонофосфат

CBP - CREB-связывающий белок

CCND2 – циклин D1

CCND1 – циклин D2

CD11b - поверхностный интегрин-рецептор подсемейства β 2-интегринов

c-IAP1 – клеточный ингибитор апоптоза 1

SpdA- Compound A, 2-(4-ацетофенил)-2-хлор-N-метилдиэтиламмоний хлорид

CREB – белок, связывающийся к респонсивными элементами cAMP

DBD- ДНК-связывающий домен

DUSP1 - фосфатаза 1 двойной специфичности

EDTA - этилендиаминтетрауксусная кислота

Erk1/2- внеклеточная киназа $1/2$, регулируемая сигнальными путями

FcRI - рецепторы суперсемейства иммуноглобулинов

FKBP51 – белок 51, связывающий FK506

FKBP52 - белок 52, связывающий FK506

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа

GFP – зеленый флуоресцентный белок

GRIP1- белок 1, взаимодействующий с глутаматом

GSK-3 β - киназа гликогенсинтазы-3 β

IFN γ -интерферон-гамма

IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 и IL-13- интерлейкины 1, 4, 5, 6, 10, 13
LBD - лиганд-связывающий домен
LPS - липополисахарид
15-LXA4 - 15-липоксин A4
MHC I, MHC II- главный комплекс гистосовместимости 1,2
MPO - миелопероксидаза
MTT - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий-бромид), «
NCL - нуклеолин
NFAT – ядерный транскрипционный фактор активированных Т-клеток
NFκB- ядерный транскрипционный фактор «каппа-би»
nGRE - отрицательные GRE
NR3C1 - группа C ядерных рецепторов подсемейства 3
NTD - N-концевой транс-активационный домен
PBS – фосфорно-солевой буфер
PI – пропидий йодид
PPAR - рецепторы активаторов пролиферации пероксисом
miRNAs – микроРНК
Rpl27 - рибосомный белок L27
SCFR - рецептор фактора стволовых клеток
SRC1 - коактиватор стероидных рецепторов 1
TAM - опухоль-ассоциированные макрофаги
TF- транскрипционный фактор
Th1, Th2, Th17 – Т-хелперы 1, 2, 17
TLR (toll like receptors) Toll-подобные рецепторы
TMA - тримеллитовый ангидрид
TNFα- фактор некроза опухоли альфа
VEGF - фактор роста эндотелия сосудов
XIAP – кодируемый X-хромосомой ингибитор апоптоза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Landau, D.A. Clonal evolution in hematological malignancies and therapeutic implications / D.A. Landau, S.L. Carter, G. Getz et al. // *Leukemia*. – 2014. – Vol. 28, N 1. – P. 34-43.
2. Arber, D.A. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia / D.A. Arber, A. Orazi, R. Hasserjian et al. // *Blood*. – 2016. – Vol. 127, N 20. – P. 2391-2405.
3. Ma, X. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States / X. Ma, M. Does, A. Raza et al. // *Cancer*. – 2007. – Vol. 109, N 8. – P. 1536-1542.
4. Smith, S.M. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series / S.M. Smith, M.M. Le Beau, D. Huo et al. // *Blood*. – 2003. – Vol. 102, N 1. – P. 43-52.
5. Bejar, R. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes / R. Bejar, K. Stevenson, O. Abdel-Wahab // *N. Engl. J. Med.* – 2011. – Vol. 364, N 26. – P. 2496-2506.
6. Bejar, R. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes / R. Bejar, K.E. Stevenson, B.A. Caughey et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2012. – Vol. 30, N 27. – P. 3376-3382.
7. Arun, A.K. Frequency of rare BCR-ABL1 fusion transcripts in chronic myeloid leukemia patients / A.K. Arun, A. Senthamizhselvi, S. Mani et al. // *Int. J. Lab. Hematol.* – 2017. – Vol. 39, N 3. – P. 235-242.
8. James, C. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera / C. James, V. Ugo, J.P. Le Couedic et al. // *Nature*. – 2005. – Vol. 434, N 7037. – P. 1144-1148.

9. Kralovics, R. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders / R. Kralovics, F. Passamonti, A.S. Buser et al. // *N. Engl. J. Med.* – 2005. – Vol. 352, N 17. – P. 1779-1790.

10. Tefferi, A. The prognostic advantage of calreticulin mutations in myelofibrosis might be confined to type 1 or type 1-like CALR variants / A. Tefferi, T.L. Lasho, A. Tischer et al. // *Blood.* – 2014. – Vol. 124, N 15. – P. 2465-2466.

11. Pikman, Y. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia / Y. Pikman, B.H. Lee, T. Mercher et al. // *PLoS Med.* – 2006. – Vol. 3, N 7. – P. e270.

12. Gotlib, J. World Health Organization-defined eosinophilic disorders: 2017 update on diagnosis, risk stratification, and management / J. Gotlib // *Am. J. Hematol.* – 2017. – Vol. 92, N 11. – P. 1243-1259.

13. Mughal, T.I. An International MDS/MPN Working Group's perspective and recommendations on molecular pathogenesis, diagnosis and clinical characterization of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms / T.I. Mughal, N.C. Cross, E. Padron et al. // *Haematologica.* – 2015. – Vol. 100, N 9. – P. 1117-1130.

14. Itzykson, R. Prognostic score including gene mutations in chronic myelomonocytic leukemia / R. Itzykson, O. Kosmider, A. Renneville et al. // *J. Clin Oncol.* – 2013. – Vol. 31, N 19. – P. 2428-2436.

15. Yamamoto, J.F. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997-2002 / J.F. Yamamoto, M.T. Goodman // *Cancer Causes Control.* – 2008. – Vol. 19, N 4. – P. 379-390.

16. Shlush L.I. Age-related clonal hematopoiesis / L.I. Shlush // *Blood.* – 2018. – Vol. 131, N 5. – P. 496-504.

17. Lindsley, R.C. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations / R.C. Lindsley, B.G. Mar, E. Mazzola et al. // *Blood*. – 2015. – Vol. 125, N 9. – P. 1367-1376.
18. Kumar, C.C. Genetic abnormalities and challenges in the treatment of acute myeloid leukemia / C.C. Kumar // *Genes Cancer*. – 2011. – Vol. 2, N 2. – P. 95-107.
19. Swerdlow, S.H. The 2016 revision of the World Health Organization classification of lymphoid neoplasms / S.H. Swerdlow, E. Campo, S.A. Pileri et al. // *Blood*. – 2016. – Vol. 127, N 20. – P. 2375-2390.
20. Charles, N.J. Mixed-Phenotype Acute Leukemia: Diagnostic Criteria and Pitfalls / N.J. Charles, D.F. Boyer // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 2017. – Vol. 141, N 11. – P. 1462-1468.
21. Manola, K.N. Cytogenetic abnormalities in acute leukaemia of ambiguous lineage: an overview / K.N. Manola // *Br. J. Haematol.* – 2013. – Vol. 163, N 1. – P. 24-39.
22. Zhang, X. B lymphoblastic leukemia/lymphoma: new insights into genetics, molecular aberrations, subclassification and targeted therapy / X. Zhang, P. Rastogi, B. Shah et al. // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8, N 39. – P. 66728-66741.
23. Paulsson, K. High hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia / K. Paulsson, B. Johansson // *Genes Chromosomes Cancer*. – 2009. – Vol. 48, N 8. – P. 637-660.
24. Mullighan, C.G. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia / C.G. Mullighan, S. Goorha, I. Radtke et al. // *Nature*. – 2007. – Vol. 446, N 7137. – P. 758-764.

25. Mullighan, C.G. BCR-ABL1 lymphoblastic leukaemia is characterized by the deletion of Ikaros / C.G. Mullighan, C.B. Miller, I. Radtke et al. // Nature. – 2008. – Vol. 453, N 7191. – P. 110-114.

26. Ferrando, A.A. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia / A.A. Ferrando, D.S. Neuberg, J. Staunton et al. // Cancer Cell. – 2002. – Vol. 1, N 1. – P. 75-87.

27. Weng, A.P. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia / A.P. Weng, A.A. Ferrando, W. Lee et al. // Science. – 2004. – Vol. 306, N 5694. – P. 269-271.

28. Li, X. Notch Signaling in T-Cell Development and T-ALL / X. Li, H. von Boehmer // ISRN Hematol. – 2011. – Vol. 2011. – P. 921706.

29. Su, X. Transforming potential of the T-cell acute lymphoblastic leukemia-associated homeobox genes HOXA13, TLX1, and TLX3 / X. Su, H. Drabkin, E. Clappier // Genes Chromosomes Cancer. – 2006. – Vol. 45, N 9. – P. 846-855.

30. Bernard, O.A. A new recurrent and specific cryptic translocation, t(5;14)(q35;q32), is associated with expression of the Hox11L2 gene in T acute lymphoblastic leukemia / O.A. Bernard, M. Busson-LeConiat, P. Ballerini et al. // Leukemia. – 2001. – Vol. 15, N 10. – P. 1495-1504.

31. Salipante, S.J. Recurrent somatic loss of TNFRSF14 in classical Hodgkin lymphoma / S.J. Salipante, A. Adey, A. Thomas et al. // Genes Chromosomes Cancer. – 2016. – Vol. 55, N 3. – P. 278-287.

32. Roemer, M.G. PD-L1 and PD-L2 Genetic Alterations Define Classical Hodgkin Lymphoma and Predict Outcome / M.G. Roemer, R.H. Advani, A.H. Ligon et al. // J. Clin. Oncol. – 2016. – Vol. 34, N 23. – P. 2690-2697.

33. Martin-Subero, J.I. Deutsche Krebshilfe Network Project Molecular Mechanisms in Malignant L. Chromosomal breakpoints affecting immunoglobulin loci are recurrent in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin lymphoma / J.I. Martin-Subero, W. Klapper, A. Sotnikova et al. // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, N 21. – P. 10332-10338.

34. Rulifson, I.C. Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation / I.C. Rulifson, S.K. Karnik, P.W. Heiser et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104, N 15. – P. 6247-6252.

35. Lu, D. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells / D. Lu, M.Y. Choi, J. Yu et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108, N 32. – P. 13253-13257.

36. Zhao, Z.M. The evolutionary history of the catenin gene family during metazoan evolution / Z.M. Zhao, A.B. Reynolds, E.A. Gaucher // *BMC Evol. Biol.* – 2011. – Vol. 11. – P. 198.

37. Ozawa, M. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species / M. Ozawa, H. Baribault, R. Kemler // *EMBO J.* – 1989. – Vol. 8, N 6. – P. 1711-1717.

38. Loh, K.M. Generating Cellular Diversity and Spatial Form: Wnt Signaling and the Evolution of Multicellular Animals / K.M. Loh, R. van Amerongen, R. Nusse // *Dev Cell.* – 2016. – Vol. 38, N 6. – P. 643-655.

39. Tao, Q. Maternal wnt11 activates the canonical wnt signaling pathway required for axis formation in *Xenopus* embryos / Q. Tao, C. Yokota, H. Puck et al. // *Cell.* – 2005. – Vol. 120, N 6. – P. 857-871.

40. Mikels, A.J. Wnts as ligands: processing, secretion and reception / A.J. Mikels, R. Nusse // *Oncogene*. – 2006. – Vol. 25, N 57. – P. 7461-7468.
41. Cruciat, C.M. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators / C.M. Cruciat, C. Niehrs // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – Vol. 5, N 3. – P. a015081.
42. Stamos, J.L. The beta-catenin destruction complex / J.L. Stamos, W.I. Weis // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – Vol. 5, N 1. – P. a007898.
43. Liu, C. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism / C. Liu, Y. Li, M. Semenov // *Cell*. – 2002. – Vol. 108, N 6. – P. 837-847.
44. Angers, S. Proximal events in Wnt signal transduction / S. Angers, R.T. Moon // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2009. – Vol. 10, N 7. – P. 468-477.
45. Cadigan, K.M. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus / K.M. Cadigan, M.L. Waterman // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2012. – Vol. 4, N 11.
46. Luis, T.C. Wnt signaling strength regulates normal hematopoiesis and its deregulation is involved in leukemia development / T.C. Luis, M. Ichii, M.H. Brugman et al. // *Leukemia*. – 2012. – Vol. 26, N 3. – P. 414-421.
47. Takada, S. Wnt-3a regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo / S. Takada, K.L. Stark, M.J. Shea et al. // *Genes. Dev.* – 1994. – Vol. 8, N 2. – P. 174-189.
48. Luis, T.C. Wnt3a deficiency irreversibly impairs hematopoietic stem cell self-renewal and leads to defects in progenitor cell differentiation / T.C. Luis, F. Weerkamp, B.A. Naber et al. // *Blood*. – 2009. – Vol. 113, N 3. – P. 546-554.
49. Abed, E. R-spondins are newly recognized players in osteoarthritis that regulate Wnt signaling in osteoblasts / E. Abed, T.F. Chan, A. Delalandre et al. // *Arthritis Rheum.* – 2011. – Vol. 63, N 12. – P. 3865-3875.

50. Pennetier, D. Size control of the *Drosophila* hematopoietic niche by bone morphogenetic protein signaling reveals parallels with mammals / D. Pennetier, J. Oyallon, I. Morin-Poulard et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2012. – Vol. 109, N 9. – P. 3389-3394.

51. Fetisov, T.I. Alterations in WNT Signaling in Leukemias / T.I. Fetisov, E.A. Lesovaya, M.G. Yakubovskaya et al. // *Biochemistry (Mosc).* – 2018. – Vol. 83, N 12. – P. 1448-1458.

52. Zhang, D. Abnormal Wnt signaling and stem cell activation in reactive lymphoid tissue and low-grade marginal zone lymphoma / D. Zhang, M.F. O'Neil, M.T. Cunningham et al. // *Leuk. Lymphoma.* – 2010. – Vol. 51, N 5. – P. 906-910.

53. Derksen, P.W. Illegitimate WNT signaling promotes proliferation of multiple myeloma cells / P.W. Derksen, E. Tjin, H.P. Meijer et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2004. – Vol. 101, N 16. – P. 6122-6127.

54. Bangs F., Anderson K.V. Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling / F. Bangs, K.V. Anderson // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2017. – Vol. 9, N 5.

55. Burglin, T.R. The Hedgehog protein family / T.R. Burglin // *Genome Biol.* – 2008. – Vol. 9, N 11. – P. 241.

56. Yao, P.J. Sonic Hedgehog Signaling and Hippocampal Neuroplasticity / P.J. Yao, R.S.Petralia, M.P Mattson // *Trends Neurosci.* – 2016. – Vol. 39, N 12. – P. 840-850.

57. Yang, J. The Hedgehog signalling pathway in bone formation / J. Yang, P. Andre, L. Ye et al. // *Int. J. Oral Sci.* – 2015. – Vol. 7, N 2. – P. 73-79.

58. O'Hara, W.A. Desert hedgehog is a mammal-specific gene expressed during testicular and ovarian development in a marsupial / W.A. O'Hara, W.J. Azar, R.R. Behringer et al. // *BMC Dev. Biol.* – 2011. – Vol. 11. – P. 72.

59. Shi, X. Sonic Hedgehog Signaling Regulates Hematopoietic Stem/Progenitor Cell Activation during the Granulopoietic Response to Systemic Bacterial Infection / X. Shi, S. Wei, K.J. Simms et al. // *Front. Immunol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 349.

60. Choudhry, Z. Sonic hedgehog signalling pathway: a complex network / Z. Choudhry, A.A. Rikani, A.M. Choudhry et al. // *Ann. Neurosci.* – 2014. – Vol. 21, N 1. – P. 28-31.

61. Goetz, S.C. The primary cilium: a signalling centre during vertebrate development / S.C. Goetz, K.V. Anderson // *Nat. Rev. Genet.* – 2010. – Vol. 11, N 5. – P. 331-344.

62. Ruiz i Altaba, A. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain / A. Ruiz i Altaba, V. Palma, N. Dahmane // *Nat. Rev. Neurosci.* – 2002. – Vol. 3, N 1. – P. 24-33.

63. Niewiadomski, P. Gli Proteins: Regulation in Development and Cancer / P. Niewiadomski, S.M. Niedziolka, L. Markiewicz et al. // *Cells.* – 2019. – Vol. 8, N 2.

64. Dyer, M.A. Indian hedgehog activates hematopoiesis and vasculogenesis and can respecify prospective neurectodermal cell fate in the mouse embryo / M.A. Dyer, S.M. Farrington, D. Mohn et al. // *Development.* – 2001. – Vol. 128, N 10. – P. 1717-1730.

65. Peeters, M. Ventral embryonic tissues and Hedgehog proteins induce early AGM hematopoietic stem cell development / M. Peeters, K. Ottersbach, K. Bollerot // *Development.* – 2009. – Vol. 136, N 15. – P. 2613-2621.

66. Mar, B.G. The controversial role of the Hedgehog pathway in normal and malignant hematopoiesis / B.G. Mar, D. Amakye, I. Aifantis et al. // *Leukemia*. – 2011. – Vol. 25, N 11. – P. 1665-1673.

67. Sacedon, R. Sonic hedgehog is produced by follicular dendritic cells and protects germinal center B cells from apoptosis / R. Sacedon, B. Diez, V. Nunez et al. // *J. Immunol.* – 2005. – Vol. 174, N 3. – P. 1456-1461.

68. Kappes, D.J. CD4-CD8 lineage commitment: an inside view / D.J. Kappes, X. He, X. He // *Nat. Immunol.* – 2005. – Vol. 6, N 8. – P. 761-766.

69. Rowbotham, N.J. Activation of the Hedgehog signaling pathway in T-lineage cells inhibits TCR repertoire selection in the thymus and peripheral T-cell activation / N.J. Rowbotham, A.L. Hager-Theodorides, M. Cebecauer et al. // *Blood*. – 2007. – Vol. 109, N 9. – P. 3757-3766.

70. Kawahara, T. Cyclopamine and quercetin suppress the growth of leukemia and lymphoma cells / T. Kawahara, N. Kawaguchi-Ihara, Y. Okuhashi et al. // *Anticancer Res.* – 2009. – Vol. 29, N 11. – P. 4629-4632.

71. Peacock, C.D. Hedgehog signaling maintains a tumor stem cell compartment in multiple myeloma / C.D. Peacock, Q. Wang, G.S. Gesell et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2007. – Vol. 104, N 10. – P. 4048-4053.

72. Kim, J.E. Sonic hedgehog signaling proteins and ATP-binding cassette G2 are aberrantly expressed in diffuse large B-cell lymphoma / J.E. Kim, R.R. Singh, J.H. Cho-Vega et al. // *Mod. Pathol.* – 2009. – Vol. 22, N 10. – P. 1312-1320.

73. Hegde, G.V. Targeting of sonic hedgehog-GLI signaling: a potential strategy to improve therapy for mantle cell lymphoma / G.V. Hegde, C.M. Munger, K. Emanuel et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2008. – Vol. 7, N 6. – P. 1450-1460.

74. Long, B. Activation of the Hedgehog pathway in chronic myelogenous leukemia patients / B. Long, H. Zhu, C. Zhu et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 30. – P. 8.

75. Blotta, S. Canonical and noncanonical Hedgehog pathway in the pathogenesis of multiple myeloma / S. Blotta, J. Jakubikova, T. Calimeri et al. // *Blood.* – 2012. – Vol. 120, N 25. – P. 5002-5013.

76. Dierks, C. Essential role of stromally induced hedgehog signaling in B-cell malignancies / C. Dierks, J. Grbic, K. Zirlik et al. // *Nat. Med.* – 2007. – Vol. 13, N 8. – P. 944-951.

77. Cannonier, S.A. The Role of Hedgehog Signaling in Tumor Induced Bone Disease / S.A. Cannonier, J.A. Sterling // *Cancers (Basel).* – 2015. – Vol. 7, N 3. – P. 1658-1683.

78. Lozier, J. Notch signaling regulates bile duct morphogenesis in mice / J. Lozier, B. McCright, T. Gridley // *PLoS One.* – 2008. – Vol. 3, N 3. – P. e1851.

79. Matsuno, Y. Notch signaling regulates cell density-dependent apoptosis of NIH 3T3 through an IL-6/STAT3 dependent mechanism / Y. Matsuno, T. Kiwamoto, Y. Morishima et al. // *Eur. J. Cell Biol.* – 2018. – Vol. 97, N 7. – P. 512-522.

80. Cheng, H.T. Notch2, but not Notch1, is required for proximal fate acquisition in the mammalian nephron / H.T. Cheng, M. Kim, M.T. Valerius et al. // *Development.* – 2007. – Vol. 134, N 4. – P. 801-811.

81. Cordle, J. Localization of the delta-like-1-binding site in human Notch-1 and its modulation by calcium affinity / J. Cordle, C. Redfieldz, M. Stacey et al. // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, N 17. – P. 11785-11793.

82. Malecki, M.J. Leukemia-associated mutations within the NOTCH1 heterodimerization domain fall into at least two distinct mechanistic classes / M.J.

Malecki, C. Sanchez-Irizarry, J.L. Mitchell et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2006. – Vol. 26, N 12. – P. 4642-4651.

83. Jorissen, E. Gamma-secretase and the intramembrane proteolysis of Notch / E. Jorissen, B. De Strooper // *Curr. Top Dev. Biol.* – 2010. – Vol. 92. – P. 201-230.

84. Kopan, R. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism / R. Kopan, M.X. Ilagan // *Cell.* – 2009. – Vol. 137, N 2. – P. 216-233.

85. Kopan, R. Notch signaling / R. Kopan // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2012. – Vol. 4, N 10.

86. Milner, L.A. A human homologue of the *Drosophila* developmental gene, Notch, is expressed in CD34+ hematopoietic precursors / L.A. Milner, R. Kopan, D.I. Martin et al. // *Blood.* – 1994. – Vol. 83, N 8. – P. 2057-2062.

87. Varnum-Finney, B. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling / B. Varnum-Finney, L. Xu, C. Brashem-Stein et al. // *Nat. Med.* – 2000. – Vol. 6, N 11. – P. 1278-1281.

88. Bigas, A. The Notch pathway in the developing hematopoietic system / A. Bigas, A. Robert-Moreno, L. Espinosa // *Int. J. Dev. Biol.* – 2010. – Vol. 54, N 6-7. – P. 1175-1188.

89. Izon, D.J. Deciphering the role of Notch signaling in lymphopoiesis / D.J. Izon, J.A. Punt, W.S. Pear // *Curr. Opin. Immunol.* – 2002. – T. 14, N 2. – P. 192-199.

90. Fernandez-Sanchez, V. In vitro effects of stromal cells expressing different levels of Jagged-1 and Delta-1 on the growth of primitive and intermediate CD34(+) cell subsets from human cord blood / V. Fernandez-Sanchez, R. Pelayo, P. Flores-Guzman et al. // *Blood Cells Mol. Dis.* – 2011. – Vol. 47, N 4. – P. 205-213.

91. Han, H. Inducible gene knockout of transcription factor recombination signal binding protein-J reveals its essential role in T versus B lineage decision / H. Han, K. Tanigaki, N. Yamamoto et al. // *Int. Immunol.* – 2002. – Vol. 14, N 6. – P. 637-645.
92. Ellisen, L.W. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms / L.W. Ellisen, J. Bird, D.C. West et al. // *Cell.* – 1991. – Vol. 66, N 4. – P. 649-661.
93. Sportoletti, P. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL / P. Sportoletti, S. Baldoni, L. Cavalli et al. // *Br. J. Haematol.* – 2010. – Vol. 151, N 4. – P. 404-406.
94. Ghoshal, P. Loss of the SMRT/NCoR2 corepressor correlates with JAG2 overexpression in multiple myeloma / P. Ghoshal, A.J. Nganga, J. Moran-Giuati et al. // *Cancer Res.* – 2009. – Vol. 69, N 10. – P. 4380-4387.
95. Zweidler-McKay, P.A. Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies / P.A. Zweidler-McKay, Y. He, L. Xu et al. // *Blood.* – 2005. – Vol. 106, N 12. – P. 3898-3906.
96. Arai, M.A. The Notch inhibitor cowanin accelerates nicastrin degradation / M.A. Arai, R. Akamine, A. Tsuchiya et al. // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. 5376.
97. Zhang, Y.E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling / Y.E. Zhang // *Cell Res.* – 2009. – Vol. 19, N 1. – P. 128-139.
98. Derynck, R. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling / R. Derynck, Y.E. Zhang // *Nature.* – 2003. – Vol. 425, N 6958. – P. 577-584.
99. Harrison, C.A. Prodomains regulate the synthesis, extracellular localisation and activity of TGF-beta superfamily ligands / C.A. Harrison, S.L. Al-Musawi, K.L. Walton // *Growth Factors.* – 2011. – Vol. 29, N 5. – P. 174-186.

100. ten Dijke, P. New insights into TGF-beta-Smad signalling / P. ten Dijke, C.S. Hill // Trends Biochem. Sci. – 2004. – Vol. 29, N 5. – P. 265-273.

101. Pardali, E. Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor beta1 responsiveness to human germ-line IgA genes / E. Pardali, X.Q. Xie, P. Tsapogas et al. // J. Biol. Chem. – 2000. – Vol. 275, N 5. – P. 3552-3560.

102. Sano, Y. ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling / Y. Sano, J. Harada, S. Tashiro et al. // J. Biol. Chem. – 1999. – Vol. 274, N 13. – P. 8949-8957.

103. Soma, T. Maintenance of murine long-term repopulating stem cells in ex vivo culture is affected by modulation of transforming growth factor-beta but not macrophage inflammatory protein-1 alpha activities / T. Soma, J.M. Yu, C.E. Dunbar // Blood. – 1996. – Vol. 87, N 11. – P. 4561-4567.

104. Dao, M.A. Molecular mechanism of transforming growth factor beta-mediated cell-cycle modulation in primary human CD34(+) progenitors / M.A. Dao, J. Hwa, J.A. Nolte // Blood. – 2002. – Vol. 99, N 2. – P. 499-506.

105. Ducos, K. p21(cip1) mRNA is controlled by endogenous transforming growth factor-beta1 in quiescent human hematopoietic stem/progenitor cells / K. Ducos, B. Panterne, N. Fortunel // J. Cell Physiol. – 2000. – Vol. 184, N 1. – P. 80-85.

106. Langer, J.C. Quantitative trait analysis reveals transforming growth factor-beta2 as a positive regulator of early hematopoietic progenitor and stem cell function / J.C. Langer, E. Henckaerts, J. Orenstein et al. // J. Exp. Med. – 2004. – Vol. 199, N 1. – P. 5-14.

107. Henckaerts, E.. The positive regulatory effect of TGF-beta2 on primitive murine hemopoietic stem and progenitor cells is dependent on age, genetic background,

and serum factors / E. Henckaerts, J.C. Langer, J. Orenstein et al. // *J. Immunol.* – 2004. – Vol. 173, N 4. – P. 2486-2493.

108. Challen, G.A. Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF-beta1 / G.A. Challen, N.C. Boles, S.M. Chambers et al. // *Cell Stem Cell.* – 2010. – Vol. 6, N 3. – P. 265-278.

109. Bataller, A. The role of TGFbeta in hematopoiesis and myeloid disorders / A. Bataller, G. Montalban-Bravo, K.A. Soltysiak et al. // *Leukemia.* – 2019. – Vol. 33, N 5. – P. 1076-1089.

110. Jakubowiak, A. Inhibition of the transforming growth factor beta 1 signaling pathway by the AML1/ETO leukemia-associated fusion protein / A. Jakubowiak, C. Pouponnot, F. Berguido et al. // *J. Biol. Chem.* – 2000. – Vol. 275, N 51. – P. 40282-40287.

111. Kurokawa, M. The t(3;21) fusion product, AML1/Evi-1, interacts with Smad3 and blocks transforming growth factor-beta-mediated growth inhibition of myeloid cells / M. Kurokawa, K. Mitani, Y. Imai et al. // *Blood.* – 1998. – Vol. 92, Vol. 11. – P. 4003-4012.

112. Kurokawa, M. The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3 / M. Kurokawa, K. Mitani, K. Irie et al. // *Nature.* – 1998. – Vol. 394, N 6688. – P. 92-96.

113. Mori, N. Human T-cell leukemia virus type I oncoprotein Tax represses Smad-dependent transforming growth factor beta signaling through interaction with CREB-binding protein/p300 / N. Mori, M. Morishita, T. Tsukazaki et al. // *Blood.* – 2001. – Vol. 97, N 7. – P. 2137-2144.

114. Le Bousse-Kerdiles, M.C. Differential expression of transforming growth factor-beta, basic fibroblast growth factor, and their receptors in CD34+ hematopoietic progenitor cells from patients with myelofibrosis and myeloid metaplasia / M.C. Le Bousse-Kerdiles, S. Chevillard, A. Charpentier et al. // *Blood*. – 1996. – Vol. 88, N 12. – P. 4534-4546.

115. Zhou, L. Reduced SMAD7 leads to overactivation of TGF-beta signaling in MDS that can be reversed by a specific inhibitor of TGF-beta receptor I kinase / L. Zhou, C. McMahon, T. Bhagat et al. // *Cancer Res*. – 2011. – Vol. 71, N 3. – P. 955-963.

116. Zhu, X. TGF-beta1-induced PI3K/Akt/NF-kappaB/MMP9 signalling pathway is activated in Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukaemia hemangioblasts / X. Zhu, L. Wang, B. Zhang et al. // *J. Biochem*. – 2011. – Vol. 149, N 4. – P. 405-414.

117. Matveeva, A. The TGF-beta - SMAD pathway is inactivated in chronic lymphocytic leukemia cells / A. Matveeva, L. Kovalevska, I. Kholodnyuk et al. // *Exp. Oncol*. – 2017. – Vol. 39, N 4. – P. 286-290.

118. Mangelsdorf, D.J. The nuclear receptor superfamily: the second decade / D.J. Mangelsdorf, C. Thummel, M. Beato et al. // *Cell*. – 1995. – Vol. 83, N 6. – P. 835-839.

119. Hashimoto, T. Defect in peroxisome proliferator-activated receptor alpha-inducible fatty acid oxidation determines the severity of hepatic steatosis in response to fasting / T. Hashimoto, W.S. Cook, C. Qi et al. // *J. Biol. Chem*. – 2000. – Vol. 275, N 37. – P. 28918-28928.

120. Mukherjee, R. Novel peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists lower low-density lipoprotein and triglycerides, raise high-density lipoprotein,

and synergistically increase cholesterol excretion with a liver X receptor agonist / R. Mukherjee, K.T. Locke, B. Miao et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2008. – Vol. 327, N 3. – P. 716-726.

121. Peters, J.M. Growth, adipose, brain, and skin alterations resulting from targeted disruption of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta(delta) / J.M. Peters, S.S. Lee, W. Li et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2000. – Vol. 20, N 14. – P. 5119-5128.

122. Rosen, E.D. PPARgamma : a nuclear regulator of metabolism, differentiation, and cell growth / E.D. Rosen, B.M. Spiegelman // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, N 41. – P. 37731-37734.

123. Grygiel-Gorniak, B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review / B. Grygiel-Gorniak // *Nutr J.* – 2014. – Vol. 13. – P. 17.

124. Berger, J. The mechanisms of action of PPARs / J. Berger, D.E. Moller // *Annu. Rev. Med.* – 2002. – Vol. 53. – P. 409-435.

125. Viswakarma, N. Coactivators in PPAR-Regulated Gene Expression / N. Viswakarma, Y. Jia, L. Bai // *PPAR Res.* – 2010. – Vol. 2010.

126. Lee, H.Y. PPAR-alpha and glucocorticoid receptor synergize to promote erythroid progenitor self-renewal / H.Y. Lee, X. Gao, M.I. Barrasa et al. // *Nature.* – 2015. – Vol. 522, N 7557. – P. 474-477.

127. Li, Y.J. PPAR-delta promotes survival of chronic lymphocytic leukemia cells in energetically unfavorable conditions./ L. Sun, Y. Shi, G. Wang, X. Wang, S.E. Dunn, C. Iorio, R.A. Screaton, D.E. Spaner // *Leukemia.* - 2017. - vol.31. - №9. - C. 1905-1914.

128. Guo, B. Antagonism of PPAR-gamma signaling expands human hematopoietic stem and progenitor cells by enhancing glycolysis / B.Guo, X. Huang, M.R. Lee et al. // Nat. Med. – 2018. – Vol. 24, N 3. – P. 360-367.

129. Tung, S. PPAR α and fatty acid oxidation mediate glucocorticoid resistance in chronic lymphocytic leukemia. / Y. Shi, K. Wong, F. Zhu, R. Gorczynski, R.C. Laister, M. Minden, A.K. Blechert, Y. Genzel, U. Reichl, D.E. Spaner // 2013. - vol.122. - № 6. - C. 969-980.

130. Ito, K. Self-renewal of a purified Tie2⁺ hematopoietic stem cell population relies on mitochondrial clearance / K. Ito, R. Turcotte, J. Cui et al. // Science. – 2016. – Vol. 354, N 6316. – P. 1156-1160.

131. Stravodimou, A. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and regulations by the ubiquitin-proteasome system in pancreatic cancer / A. Stravodimou, G. Mazzoccoli, I.A. Voutsadakis // PPAR Res. – 2012. – Vol. 2012. – P. 367450.

132. Garcia-Bates, T.M. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma overexpression suppresses growth and induces apoptosis in human multiple myeloma cells / T.M. Garcia-Bates, S.H. Bernstein, R.P. Phipps // Clin. Cancer Res. – 2008. – Vol. 14, N 20. – P. 6414-6425.

133. Ray, D.M. Human multiple myeloma cells express peroxisome proliferator-activated receptor gamma and undergo apoptosis upon exposure to PPARgamma ligands / D.M. Ray, S.H. Bernstein, R.P. Phipps // Clin. Immunol. – 2004. – Vol. 113, N 2. – P. 203-213.

134. Konopleva, M. Novel triterpenoid CDDO-Me is a potent inducer of apoptosis and differentiation in acute myelogenous leukemia / M. Konopleva, T. Tsao, P. Ruvolo et al. // Blood. – 2002. – Vol. 99, N 1. – P. 326-335.

135. Morales, J. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases / J. Morales, L. Li, F.J. Fattah et al. // *Crit. Rev. Eukaryot Gene Expr.* – 2014. – Vol. 24, N 1. – P. 15-28.

136. Gottschalk, A.J. Poly(ADP-ribosyl)ation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler / A.J. Gottschalk, G. Timinszky, S.E. Kong et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – Vol. 106, N 33. – P. 13770-13774.

137. Altmeyer, M. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites / M. Altmeyer, S. Messner, P.O. Hassa et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – Vol. 37, N 11. – P. 3723-3738.

138. Ahel, I. Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins / I. Ahel, D. Ahel, T. Matsusaka et al. // *Nature.* – 2008. – Vol. 451, N 7174. – P. 81-85.

139. Alemasova, E.E. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins / E.E. Alemasova, O.I. Lavrik // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – Vol. 47, N 8. – P. 3811-3827.

140. Newman, E.A. Alternative NHEJ Pathway Components Are Therapeutic Targets in High-Risk Neuroblastoma / E.A. Newman, F. Lu, D. Bashllari et al. // *Mol. Cancer Res.* – 2015. – Vol. 13, N 3. – P. 470-482.

141. Newman, R.E. Poly(ADP-ribose) polymerase turnover alterations do not contribute to PARP overexpression in Ewing's sarcoma cells / R.E. Newman, V.A. Soldatenkov, A. Dritschilo et al. // *Oncol. Rep.* – 2002. – Vol. 9, N 3. – P. 529-532.

142. Rojo, F. Nuclear PARP-1 protein overexpression is associated with poor overall survival in early breast cancer / F. Rojo, J. Garcia-Parra, S. Zazo et al. // *Ann. Oncol.* – 2012. – Vol. 23, N 5. – P. 1156-1164.

143. Tomoda, T. Enhanced expression of poly(ADP-ribose) synthetase gene in malignant lymphoma / T. Tomoda, T. Kurashige, T. Moriki et al. // *Am. J. Hematol.* – 1991. – Vol. 37, N 4. – P. 223-227.

144. Lord, C.J. Synthetic lethality and cancer therapy: lessons learned from the development of PARP inhibitors / C.J. Lord, A.N. Tutt, A. Ashworth // *Ann. Rev. Med.* – 2015. – Vol. 66. – P. 455-470.

145. Scardocci, A. Reduced BRCA1 expression due to promoter hypermethylation in therapy-related acute myeloid leukaemia / A. Scardocci, F. Guidi, F. D'Alo et al. // *Br. J. Cancer.* – 2006. – Vol. 95, N 8. – P. 1108-1113.

146. Krishnakumar, R. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets / R. Krishnakumar, W.L. Kraus // *Mol. Cell.* – 2010. – Vol. 39, N 1. – P. 8-24.

147. Murai, J. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors / J. Murai, S.Y. Huang, B.B. Das et al. // *Cancer Res.* – 2012. – Vol. 72, N 21. – P. 5588-5599.

148. Terasawa, M. Canonical non-homologous end joining in mitosis induces genome instability and is suppressed by M-phase-specific phosphorylation of XRCC4 / M. Terasawa, A. Shinohara, M. Shinohara // *PLoS Genet.* – 2014. – Vol. 10, N 8. – P. e1004563.

149. Fardi, M. Epigenetic mechanisms as a new approach in cancer treatment: An updated review / M. Fardi, S. Solali, M. Farshdousti Hagh // *Genes. Dis.* – 2018. – Vol. 5, N 4. – P. 304-311.

150. Asamitsu, S. Recent Progress of Targeted G-Quadruplex-Preferred Ligands Toward Cancer Therapy / S. Asamitsu, S. Obata, Z. Yu et al. // *Molecules.* – 2019. – Vol. 24, N 3.

151. Anderson, P. Stress granules, P-bodies and cancer / P. Anderson, N. Kedersha, P. Ivanov // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2015. – Vol. 1849, N 7. – P. 861-870.
152. Baraldi, P.G. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents / P.G. Baraldi, A. Bovero, F. Fruttarolo et al. // *Med. Res. Rev.* – 2004. – Vol. 24, N 4. – P. 475-528.
153. Mukherjee, A. Drug-DNA intercalation: from discovery to the molecular mechanism / A. Mukherjee, W.D. Sasikala // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol.* – 2013. – Vol. 92. – P. 1-62.
154. Gustafson, D.L. Doxorubicin pharmacokinetics: Macromolecule binding, metabolism, and excretion in the context of a physiologic model / D.L. Gustafson, J.C. Rastatter, T. Colombo et al. // *J. Pharm. Sci.* – 2002. – Vol. 91, N 6. – P. 1488-1501.
155. Hilmer, S.N. The hepatic pharmacokinetics of doxorubicin and liposomal doxorubicin / S.N. Hilmer, V.C. Cogger, M. Muller et al. // *Drug Metab. Dispos.* – 2004. – Vol. 32, N 8. – P. 794-799.
156. Ashley, N. Mitochondrial DNA is a direct target of anti-cancer anthracycline drugs / N. Ashley, J. Poulton // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2009. – Vol. 378, N 3. – P. 450-455.
157. Yokochi, T. Doxorubicin inhibits DNMT1, resulting in conditional apoptosis / T. Yokochi, K.D. Robertson // *Mol. Pharmacol.* – 2004. – Vol. 66, N 6. – P. 1415-1420.
158. Hertzberg, R.P. On the mechanism of topoisomerase I inhibition by camptothecin: evidence for binding to an enzyme-DNA complex / R.P. Hertzberg, M.J. Caranfa, S.M. Hecht // *Biochemistry.* – 1989. – Vol. 28, N 11. – P. 4629-4638.

159. Puyo, S. From old alkylating agents to new minor groove binders / S. Puyo, D. Montaudon, P. Pourquier // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2014. – Vol. 89, N 1. – P. 43-61.

160. Shrivastav, N. Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation / N. Shrivastav, D. Li, J.M. Essigmann // *Carcinogenesis.* – 2010. – Vol. 31, N 1. – P. 59-70.

161. Tudek, B. Biological properties of imidazole ring-opened N7-methylguanine in M13mp18 phage DNA / B. Tudek, S. Boiteux, J. Laval // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – Vol. 20, N 12. – P. 3079-3084.

162. Ng, S.F. N,N',N''-triethylenethiophosphoramidate (thio-TEPA) oxygenation by constitutive hepatic P450 enzymes and modulation of drug metabolism and clearance in vivo by P450-inducing agents / S.F. Ng, D.J. Waxman // *Cancer Res.* – 1991. – Vol. 51, N 9. – P. 2340-2345.

163. Gnewuch, C.T. A Critical Appraisal of the Evolution of N-Nitrosoureas as Anticancer Drugs / C.T. Gnewuch, G. Sosnovsky // *Chem. Rev.* – 1997. – Vol. 97, N 3. – P. 829-1014.

164. Ponti, M. DNA interstrand crosslinking and sequence selectivity of dimethanesulphonates / M. Ponti, R.L. Souhami, B.W. Fox et al. // *Br. J. Cancer.* – 1991. – Vol. 63, N 5. – P. 743-747.

165. Newlands, E.S. Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials / E.S. Newlands, M.F. Stevens, S.R. Wedge et al. // *Cancer Treat. Rev.* – 1997. – Vol. 23, N 1. – P. 35-61.

166. Chaney, S.G. Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts / S.G. Chaney, S.L. Campbell, E. Bassett et al. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2005. – Vol. 53, N 1. – P. 3-11.
167. Raymond, E. Cellular and molecular pharmacology of oxaliplatin / E. Raymond, S. Faivre, S. Chaney et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2002. – Vol. 1, N 3. – P. 227-235.
168. Bailly, C. Sequence-specific DNA minor groove binders. Design and synthesis of netropsin and distamycin analogues / C. Bailly, J.B. Chaires // *Bioconjug. Chem.* – 1998. – Vol. 9, N 5. – P. 513-538.
169. Haq, I. Drug-DNA recognition: energetics and implications for design / I. Haq, J. Ladbury // *J. Mol. Recognit.* – 2000. – Vol. 13, N 4. – P. 188-197.
170. Coll, M. Molecular structure of the netropsin-d(CGCGATATCGCG) complex: DNA conformation in an alternating AT segment / M. Coll, J. Aymami, G.A. van der Marel et al. // *Biochemistry.* – 1989. – Vol. 28, N 1. – P. 310-320.
171. Ueno, A. Netropsin specifically enhances RNA polymerase II termination at terminator sites in vitro / A. Ueno, K. Baek, C. Jeon et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1992. – Vol. 89, N 9. – P. 3676-3680.
172. Snounou, G. Production of positively supercoiled DNA by netropsin / G. Snounou, A.D. Malcom // *J. Mol. Biol.* – 1983. – Vol. 167, N 1. – P. 211-216.
173. Wang, C. Alkyne-substituted diminazene as G-quadruplex binders with anticancer activities / C. Wang, B. Carter-Cooper, Y. Du et al. // *Eur. J. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 118. – P. 266-275.

174. Boitte, N. Synthesis, DNA-binding and cytotoxic properties of a bis(netropsin)-anthracenedione conjugate / N. Boitte, N. Pommery, P. Colson et al. // *Anticancer Drug Des.* – 1997. – Vol. 12, N 6. – P. 481-501.

175. Kraut, E.H. Phase II study of pibenzimol in pancreatic cancer. A Southwest Oncology Group study / E.H. Kraut, T. Fleming, M. Segal et al. // *Invest. New Drugs.* – 1991. – Vol. 9, N 1. – P. 95-96.

176. Mann, J. A new class of symmetric bisbenzimidazole-based DNA minor groove-binding agents showing antitumor activity / J. Mann, A. Baron, Y. Opoku-Boahen et al. // *J. Med. Chem.* – 2001. – Vol. 44, N 2. – P. 138-144.

177. Greenidge, P.A. DNA minor groove recognition properties of pentamidine and its analogs: a molecular modeling study / P.A. Greenidge, T.C. Jenkins, S. Neidle // *Mol. Pharmacol.* – 1993. – Vol. 43, N 6. – P. 982-988.

178. Nguewa, P.A. Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin / P.A. Nguewa, M.A. Fuertes, V. Cepeda et al. // *Chem. Biodivers.* – 2005. – Vol. 2, N 10. – P. 1387-1400.

179. Markowitz, J. Identification and characterization of small molecule inhibitors of the calcium-dependent S100B-p53 tumor suppressor interaction / J. Markowitz, I. Chen, R. Gitti et al. // *J. Med. Chem.* – 2004. – Vol. 47, N 21. – P. 5085-5093.

180. Pathak, M.K. Pentamidine is an inhibitor of PRL phosphatases with anticancer activity / M.K. Pathak, D. Dhawan, D.J. Lindner et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2002. – Vol. 1, N 14. – P. 1255-1264.

181. Wang, C. Alkyne-substituted diminazene as G-quadruplex binders with anticancer activities./ B. Carter-Cooper, Y. Du, J. Zhou, M.A. Saeed, J. Liu, M. Guo, B.

Roembke, C. Mikek, E.A. Lewis, R.G. Lapidus, H.O. Sintim // *European Journal of Medicinal Chemistry*. - 2016. - vol.118. - C.266-275.

182. Barcelo, F. Heterogeneous DNA binding modes of berenil / F. Barcelo, M. Ortiz-Lombardia, J. Portugal // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2001. – Vol. 1519, N 3. – P. 175-184.

183. Kirsanov, K.I. Minor groove binding ligands disrupt PARP-1 activation pathways / K.I. Kirsanov, E. Kotova, P. Makhov et al. // *Oncotarget*. – 2014. – Vol. 5, N 2. – P. 428-437.

184. Dermawan, J.K. Quinacrine overcomes resistance to erlotinib by inhibiting FACT, NF-kappaB, and cell-cycle progression in non-small cell lung cancer / J.K. Dermawan, K. Gurova, J. Pink et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2014. – Vol. 13, N 9. – P. 2203-2214.

185. Khurana, A. Quinacrine promotes autophagic cell death and chemosensitivity in ovarian cancer and attenuates tumor growth / A. Khurana, D. Roy, E. Kalogera et al. // *Oncotarget*. – 2015. – Vol. 6, N 34. – P. 36354-3669.

186. Preet, R. Quinacrine has anticancer activity in breast cancer cells through inhibition of topoisomerase activity / R. Preet, P. Mohapatra, S. Mohanty et al. // *Int. J. Cancer*. – 2012. – Vol. 130, N 7. – P. 1660-1670.

187. Di Bussolo, V. Curaxins: a new family of non-genotoxic multitargeted anticancer agents / V. Di Bussolo, F. Minutolo // *ChemMedChem*. – 2011. – Vol. 6, N 12. – P. 2133-2136.

188. Neshar, E. Role of Chromatin Damage and Chromatin Trapping of FACT in Mediating the Anticancer Cytotoxicity of DNA-Binding Small-Molecule Drugs / E. Neshar, A. Safina, I. Aljahdali et al. // *Cancer Res*. – 2018. – Vol. 78, N 6. – P. 1431-1443.

189. Safina, A. FACT is a sensor of DNA torsional stress in eukaryotic cells / A. Safina, P. Cheney, M. Pal et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Vol. 45, N 4. – P. 1925-1945.
190. Leonova, K. TRAIN (Transcription of Repeats Activates INterferon) in response to chromatin destabilization induced by small molecules in mammalian cells / K. Leonova, A. Safina, E. Neshet et al. // *Elife.* – 2018. – Vol. 7. doi: 10.7554/eLife.30842.
191. Chang, H.W. Mechanism of FACT removal from transcribed genes by anticancer drugs curaxins / H.W. Chang, M.E. Valieva, A. Safina et al. // *Sci. Adv.* – 2018. – Vol. 4, N 11. – P. eaav2131.
192. Winkler, D.D. Histone chaperone FACT coordinates nucleosome interaction through multiple synergistic binding events / D.D. Winkler, U.M. Muthurajan, A.R. Hieb et al. // *J. Biol. Chem.* – 2011. – Vol. 286, N 48. – P. 41883-41892.
193. Hondele, M. Structural basis of histone H2A-H2B recognition by the essential chaperone FACT / M. Hondele, T. Stuwe, M. Hassler et al. // *Nature.* – 2013. – Vol. 499, N 7456. – P. 111-114.
194. Fleyshman, D. Level of FACT defines the transcriptional landscape and aggressive phenotype of breast cancer cells / D. Fleyshman, L. Prendergast, A. Safina et al. // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8, N 13. – P. 20525-20542.
195. Belotserkovskaya, R. Transcription through chromatin: understanding a complex FACT / R. Belotserkovskaya, A. Saunders, J.T. Lis et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2004. – Vol. 1677, N 1-3. – P. 87-99.
196. Kolundzic, E. FACT Sets a Barrier for Cell Fate Reprogramming in *Caenorhabditis elegans* and Human Cells / E. Kolundzic, A. Ofenbauer, S.I. Bulut et al. // *Dev. Cell.* – 2018. – Vol. 46, N 5. – P. 611-626 e12.

197. Suggs, B.Z. FACT complex gene duplicates exhibit redundant and non-redundant functions in *C. elegans* / B.Z. Suggs, A.L. Latham, A.T. Dawes et al. // *Dev. Biol.* – 2018. – Vol. 444, N 2. – P. 71-82.

198. Barone, T.A. Anticancer drug candidate CBL0137, which inhibits histone chaperone FACT, is efficacious in preclinical orthotopic models of temozolomide-responsive and -resistant glioblastoma / T.A. Barone, C.A. Burkhart, A. Safina et al. // *Neuro Oncol.* – 2017. – Vol. 19, N 2. – P. 186-196.

199. Ding, Q. SSRP1 Contributes to the Malignancy of Hepatocellular Carcinoma and Is Negatively Regulated by miR-497 / Q. Ding, K. He, T. Luo et al. // *Mol. Ther.* – 2016. – Vol. 24, N 5. – P. 903-914.

200. Gasparian, A.V. Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF-kappaB and activate p53 by targeting FACT / A.V. Gasparian, C.A. Burkhart, A.A. Purmal et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2011. – Vol. 3, N 95. – P. 95ra74.

201. Kim, M. Preclinical Validation of a Single-Treatment Infusion Modality That Can Eradicate Extremity Melanomas / M. Kim, N. Neznanov, C.D. Wilfong et al. // *Cancer Res.* – 2016. – Vol. 76, N 22. – P. 6620-6630.

202. Carter, D.R. Therapeutic targeting of the MYC signal by inhibition of histone chaperone FACT in neuroblastoma / D.R. Carter, J. Murray, B.B. Cheung et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 7, N 312. – P. 312ra176.

203. Danovi, S. Neuroblastoma: As a matter of FACT / S. Danovi // *Nat. Rev. Cancer.* – 2016. – Vol. 16, N 1. – P. 2.

204. De, S. The FACT inhibitor CBL0137 Synergizes with Cisplatin in Small-Cell Lung Cancer by Increasing NOTCH1 Expression and Targeting Tumor-Initiating Cells / S. De, D.J. Lindner, C.J. Coleman et al. // *Cancer Res.* – 2018. – Vol. 78, N 9. – P. 2396-2406.

205. Lambertini, C. Differential control of Notch1 gene transcription by Klf4 and Sp3 transcription factors in normal versus cancer-derived keratinocytes / C. Lambertini, S. Pantano, G.P. Dotto // PLoS One. – 2010. – Vol. 5, N 4. – P. e10369.

206. Kirsanov, K. Prevention of Colorectal Carcinogenesis by DNA-Binding Small-Molecule Curaxin CBL0137 Involves Suppression of Wnt Signaling / K. Kirsanov, T. Fetisov, E.A. Lesovaya et al. // Cancer Prev. Res (Phila). – 2020. – Vol. 13, N 1. – P. 53-64.

207. Burkhart, C. Curaxin CBL0137 eradicates drug resistant cancer stem cells and potentiates efficacy of gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer / C. Burkhart, D. Fleyshman, R. Kohn et al. // Oncotarget. – 2014. – Vol. 5, N 22. – P. 11038-11053.

208. Chou, T.C. Drug combination studies and their synergy quantification using the Chou-Talalay method / T.C. Chou // Cancer Res. – 2010. – Vol. 70, N 2. – P. 440-446.

209. Фетисов, Т.И. Противоопухолевое действие кураксина CBL0137 на моделях аденокарциномы толстой кишки / Т.И. Фетисов, Л.Р. Тилова, Е.А.Лесовая и др. // Успехи молекулярной онкологии. - 2016. - Т. 3, № 3. - С. 6.

210. Fetisov, T.I. The novel small molecule CBL0137 (curaxin) exhibits antileukemic activity. / K.A. Kuzin, R.G. Zenkov, A. Safina, E.A. Lesovaya, L.S. Trukhanova, E.E. Antoshina, T.G. Gorkova, K. Gurova, M.G. Yakubovskaya, K.I. Kirsanov // Proceedings of 22nd International Charles Heidelberger Symposium on Cancer Research. - 2018. - С. 29-30.

211. Фетисов, Т.И. Противоопухолевая активность кураксина CBL0137 на моделях острых лейкозов *in vitro*. / К.И. Кирсанов, А.А. Борунова, М.Н. Зацепина, Е.А. Лесовая, Т.Н. Заботина, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовска // Успехи молекулярной онкологии. — 2019. — №4. — С. 58-68.

212. Vlasova, O. Molecular Mechanisms of Tumor Preventive and Anticancer Effects of DNA Binding Small Molecule Curaxin. / O. Vlasova, T. Fetisov, A. Ivanov, D. Naberezhnov, N. Karpechenko, E. Antoshina, T. Gorkova, O. Morosova, L. Trukhanova, I. Khitrovo, E. Lesovaya, G. Belitsky, K. Gurova, K. Kirsanov, M. Yakubovskaya // Abstract book «the 12th International Conference & 5th Asian Congress on Environmental Mutagens with the 33rd Annual Meeting of KSOT/KEMS». - 2017. - C. 183

213. Sak, K. Established Human Cell Lines as Models to Study Anti-leukemic Effects of Flavonoids / K. Sak, H. Everaus // Curr. Genomics. – 2017. – Vol. 18, N 1. – P. 3-26.

214. Teoh, G. CD40 activation mediates p53-dependent cell cycle regulation in human multiple myeloma cell lines / G. Teoh, Y.T. Tai, M. Urashima et al. // Blood. – 2000. – Vol. 95, N 3. – P. 1039-1046.

215. Masutani, M. Role of poly(ADP-ribose) polymerase in cell-cycle checkpoint mechanisms following gamma-irradiation / M. Masutani, T. Nozaki, K. Wakabayashi et al. // Biochimie. – 1995. – Vol. 77, N 6. – P. 462-465.

216. Jelinic, P. New insights into PARP inhibitors' effect on cell cycle and homology-directed DNA damage repair / P. Jelinic, D.A. Levine // Mol. Cancer Ther. – 2014. – Vol. 13, N 6. – P. 1645-1654.

217. Eustermann, S. The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger / S. Eustermann, H. Videler, J.C. Yang et al. // J. Mol. Biol. – 2011. – Vol. 407, N 1. – P. 149-170.

218. Fu, J. Wnt/betacatenin inhibition reverses multidrug resistance in pediatric acute lymphoblastic leukemia / J. Fu, L. Si, Y. Zhuang et al. // Oncol. Rep. – 2019. – Vol. 41, N 2. – P. 1387-1394.

219. Spaan, I. Wnt signaling in multiple myeloma: a central player in disease with therapeutic potential / I. Spaan, R.A. Raymakers, A. van de Stolpe et al. // *J. Hematol. Oncol.* – 2018. – Vol. 11, N 1. – P. 67.
220. Huang, K. Suppressing Hedgehog signaling reverses drug resistance of refractory acute myeloid leukemia / K. Huang, Z. Sun, B. Ding et al. // *Onco Targets Ther.* – 2019. – Vol. 12. – P. 7477-7488.
221. Alonso, S. Hedgehog and retinoid signaling alters multiple myeloma microenvironment and generates bortezomib resistance / S. Alonso, D. Hernandez, Y.T. Chang et al. // *J. Clin. Invest.* – 2016. – Vol. 126, N 12. – P. 4460-4468.
222. Petit, C. Hypoxia promotes chemoresistance in acute lymphoblastic leukemia cell lines by modulating death signaling pathways / C. Petit, F. Gouel, I. Dubus et al. // *BMC Cancer.* – 2016. – Vol. 16, N 1. – P. 746.
223. Wu, J. PARP inhibitor resensitizes Adriamycin resistant leukemia cells through DNA damage and apoptosis / J. Wu, S. Xiao, M. Yuan et al. // *Mol. Med. Rep.* – 2019. – Vol. 19, N 1. – P. 75-84.
224. Dzobo, K. Targeting the Versatile Wnt/beta-Catenin Pathway in Cancer Biology and Therapeutics: From Concept to Actionable Strategy / K. Dzobo, N.E. Thomford, D.A. Senthebane // *OMICS.* – 2019. – Vol. 23, N 11. – P. 517-538.
225. Shallis, R.M. Hedgehog pathway inhibition as a therapeutic target in acute myeloid leukemia / R.M. Shallis, J.P. Bewersdorf, P.C. Boddu et al. // *Expert Rev. Anticancer Ther.* – 2019. – Vol. 19, N 8. – P. 717-729.
226. Reya, T. Wnt signalling in stem cells and cancer / T. Reya, H. Clevers // *Nature.* – 2005. – Vol. 434, N 7035. – P. 843-850.

227. Jia, Y. The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation / Y. Jia, Y. Wang, J. Xie // *Arch. Toxicol.* – 2015. – Vol. 89, N 2. – P. 179-191.
228. Cortes, J.E. Hedgehog signaling inhibitors in solid and hematological cancers / J.E. Cortes, R. Gutzmer, M.W. Kieran et al. // *Cancer Treat. Rev.* – 2019. – Vol. 76. – P. 41-50.
229. Mullor, J.L. Wnt signals are targets and mediators of Gli function / J.L. Mullor, N. Dahmane, T. Sun et al. // *Curr. Biol.* – 2001. – Vol. 11, N 10. – P. 769-773.
230. Varnat, F. Hedgehog pathway activity is required for the lethality and intestinal phenotypes of mice with hyperactive Wnt signaling / F. Varnat, G. Zacchetti, A. Ruiz i Altaba // *Mech. Dev.* – 2010. – Vol. 127, N 1-2. – P. 73-81.
231. Sengupta, A. Deregulation and cross talk among Sonic hedgehog, Wnt, Hox and Notch signaling in chronic myeloid leukemia progression / A. Sengupta, D. Banerjee, S. Chandra et al. // *Leukemia.* – 2007. – Vol. 21, N 5. – P. 949-955.
232. Wang, B. Evidence for the direct involvement of β TrCP in Gli3 protein processing / B. Wang, Y. Li // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2006. – Vol. 103, N 1. – P. 33-38.
233. Meng, X. Suppressor of fused negatively regulates beta-catenin signaling / X. Meng, R. Poon, X. Zhang et al. // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 276, N 43. – P. 40113-40119.
234. Li, X. Gli1 acts through Snail and E-cadherin to promote nuclear signaling by beta-catenin / X. Li, W. Deng, S.M. Lobo-Ruppert et al. // *Oncogene.* – 2007. – Vol. 26, N 31. – P. 4489-4498.
235. Varnat, F. Loss of WNT-TCF addiction and enhancement of HH-GLI1 signalling define the metastatic transition of human colon carcinomas / F. Varnat, I.

Siegl-Cachedenier, M. Malerba et al. // *EMBO Mol. Med.* – 2010. – Vol. 2, N 11. – P. 440-457.

236. Griessinger, E. A niche-like culture system allowing the maintenance of primary human acute myeloid leukemia-initiating cells: a new tool to decipher their chemoresistance and self-renewal mechanisms / E. Griessinger, F. Anjos-Afonso, I. Pizzitola et al. // *Stem Cells Transl. Med.* – 2014. – Vol. 3, N 4. – P. 520-529.

237. Deynoux, M. Hypoxia and Hypoxia-Inducible Factors in Leukemias / M. Deynoux, N. Sunter, O. Herault et al. // *Front. Oncol.* – 2016. – Vol. 6. – P. 41.

238. Dong, M. Role of transforming growth factor-beta in hematologic malignancies / M. Dong, G.C. Blobe // *Blood.* – 2006. – Vol. 107, N 12. – P. 4589-4596.

239. Chapuis, N. Rationale for Targeting Deregulated Metabolic Pathways as a Therapeutic Strategy in Acute Myeloid Leukemia / N. Chapuis, L. Poulain, R. Birsen et al. // *Front. Oncol.* – 2019. – Vol. 9. – P. 405.

240. Abdulkadyrov, K.M. Sotatercept in patients with osteolytic lesions of multiple myeloma / K.M. Abdulkadyrov, G.N. Salogub, N.K. Khuazheva et al. // *Br. J. Haematol.* – 2014. – Vol. 165, N 6. – P. 814-823.

241. Pichiorri, F. Downregulation of p53-inducible microRNAs 192, 194, and 215 Impairs the p53/MDM2 Autoregulatory Loop in Multiple Myeloma Development / F. Pichiorri, S.S. Suh, A. Rocci et al. // *Cancer Cell.* – 2016. – Vol. 30, N 2. – P. 349-351.

242. Sharma, A. A novel Monoclonal Antibody against Notch1 Targets Leukemia-associated Mutant Notch1 and Depletes Therapy Resistant Cancer Stem Cells in Solid Tumors / A. Sharma, R.A. Gadkari, S.V. Ramakanth et al. // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 11012.

243. McCann, K.E. Advances in the use of PARP inhibitor therapy for breast cancer / K.E. McCann, S.A. Hurvitz // *Drugs Context*. – 2018. – Vol. 7. – P. 212540.

244. Mittica, G. PARP Inhibitors in Ovarian Cancer / G. Mittica, E. Ghisoni, G. Giannone et al. // *Recent Pat. Anticancer Drug Discov*. – 2018. – Vol. 13, N 4. – P. 392-410.

245. Dellomo, A.J. Partnering with PARP inhibitors in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD / A.J. Dellomo, M.R. Baer, F.V. Rassool // *Cancer Lett*. – 2019. – Vol. 454. – P. 171-178.

246. Pawlyn, C. Loss of heterozygosity as a marker of homologous repair deficiency in multiple myeloma: a role for PARP inhibition? / C. Pawlyn, A. Loehr, C. Ashby et al. // *Leukemia*. – 2018. – Vol. 32, N 7. – P. 1561-1566.

247. Turk, A.A. PARP inhibitors in breast cancer: Bringing synthetic lethality to the bedside / A.A. Turk, K.B. Wisinski // *Cancer*. – 2018. – Vol. 124, N 12. – P. 2498-2506.

248. Mao, Y. PARP inhibitor olaparib sensitizes cholangiocarcinoma cells to radiation / Y. Mao, X. Huang, Z. Shuang et al. // *Cancer Med*. – 2018. – Vol. 7, N 4. – P. 1285-1296.

249. Набережнов, Д.С. Сравнительный анализ влияния узкобороздочных лигандов на активацию белка PARP1 / Д.С. Набережнов, В.Ю. Глазунов, Г.А. Белицкий и др. // *Современные проблемы науки и образования*. – 2016. – Т. 6. – С. 8.

250. Thomas, C. Hit and run versus long-term activation of PARP-1 by its different domains fine-tunes nuclear processes / C. Thomas, Y. Ji, C. Wu et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2019. – Vol. 116, N 20. – P. 9941-9946.

251. Ray Chaudhuri, A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling / A. Ray Chaudhuri, A. Nussenzweig // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2017. – Vol. 18, N 10. – P. 610-621.

252. Lai, J. MiR-7-5p-mediated downregulation of PARP1 impacts DNA homologous recombination repair and resistance to doxorubicin in small cell lung cancer / J. Lai, H. Yang, Y. Zhu et al. // *BMC Cancer.* – 2019. – Vol. 19, N 1. – P. 602.

253. Mohammed, M.K. Wnt/beta-catenin signaling plays an ever-expanding role in stem cell self-renewal, tumorigenesis and cancer chemoresistance / M.K. Mohammed, C. Shao, J. Wang et al. // *Genes Dis.* – 2016. – Vol. 3, N 1. – P. 11-40.

254. Briscoe, J. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease / J. Briscoe, P.P. Therond // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2013. – Vol. 14, N 7. – P. 416-429.

255. Begicevic, R.R. ABC Transporters in Cancer Stem Cells: Beyond Chemoresistance / R.R. Begicevic, M. Falasca // *Int. J. Mol. Sci.* – 2017. – Vol. 18, N 11.

256. Safa, A.R. Resistance to Cell Death and Its Modulation in Cancer Stem Cells / A.R. Safa // *Crit. Rev. Oncog.* – 2016. – T. 21, № 3-4. – C. 203-219.

257. Peixoto, J. Metabolic traits of cancer stem cells / J. Peixoto, J. Lima // *Dis. Model Mech.* – 2018. – Vol. 11, N 8.

258. Vahidian, F. Interactions between cancer stem cells, immune system and some environmental components: Friends or foes? / F. Vahidian, P.H.G. Duijf, E. Safarzadeh et al. // *Immunol. Lett.* – 2019. – Vol. 208. – P. 19-29.

259. Mutlu, P. Determination of the relationship between doxorubicin resistance and Wnt signaling pathway in HeLa and K562 cell lines / P. Mutlu, S. Yalcin Azarkan, N. Taghavi Pourianazar et al. // *EXCLI J.* – 2018. – Vol. 17. – P. 386-398.

260. Bidet, M. The Hedgehog receptor patched functions in multidrug transport and chemotherapy resistance / M. Bidet, A. Tomico, P. Martin et al. // *Mol. Cancer Res.* – 2012. – Vol. 10, N 11. – P. 1496-1508.

261. Li, X. High PARP-1 expression predicts poor survival in acute myeloid leukemia and PARP-1 inhibitor and SAHA-bendamustine hybrid inhibitor combination treatment synergistically enhances anti-tumor effects / X. Li, C. Li, J. Jin et al. // *EBioMedicine.* – 2018. – Vol. 38. – P. 47-56.

262. Yang, S. HMGA2 regulates acute myeloid leukemia progression and sensitivity to daunorubicin via Wnt/beta-catenin signaling / S. Yang, Y. Gu, G. Wang et al. // *Int. J. Mol. Med.* – 2019. – Vol. 44, N 2. – P. 427-436.

263. Somers, K. Potent antileukemic activity of curaxin CBL0137 against MLL-rearranged leukemia./ A. Kosciolk, A. Bongers, A. El-Ayoubi, M. Karsa, C. Mayoh, C. Wadham, S. Middlemiss, N. Neznanov, U.R.Kees, R.B. Lock, A. Gudkov, R. Sutton, K. Gurova, M. Haber, M.D. Norris, M.J. Henderson // *International Journal of Cancer.* - 2019. [Epub ahead of print. doi: 10.1002/ijc.32582.]