

*На правах рукописи*

**КИРСАНОВ КИРИЛЛ ИГОРЕВИЧ**

**УЗКОБОРОЗДОЧНЫЕ ЛИГАНДЫ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И  
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ**

14.01.12 – Онкология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

Москва – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации (директор – академик РАН, доктор медицинских наук, профессор Стилиди Иван Сократович).

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук

**Якубовская Марианна Геннадиевна**

**Официальные оппоненты:**

**Барлев Николай Анатольевич**, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией регуляции экспрессии генов федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт цитологии Российской академии наук».

**Бойчук Сергей Васильевич**, доктор медицинских наук, профессор, декан медико-биологического факультета; заведующий кафедрой общей патологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**Чердынцева Надежда Викторовна**, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией молекулярной онкологии и иммунологии научно-исследовательского института онкологии; заместитель директора по научной работе федерального государственного бюджетного научного учреждения Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук.

**Ведущая организация:**

Московский научно-исследовательский онкологический институт имени П.А.Герцена – филиал федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «4» июня 2020 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115478 г. Москва, Каширское шоссе, д.23).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России (115478, г. Москва Каширское шоссе, д.24) и на сайте [www.ronc.ru](http://www.ronc.ru)

Автореферат разослан «.....» .....2020 года

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

**Кадагидзе Заира Григорьевна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы исследования

Основным достижением современной химиотерапии злокачественных новообразований за последние два десятилетия является развитие таргетной терапии, направленной на элиминацию клона опухолевых клеток с определенным генетическим нарушением. Таргетные препараты, разработка которых является трудоемким и дорогостоящим процессом, созданы лишь для ряда мутантных белков, что определяет ограничение числа онкопациентов, для лечения которых может быть использован данный подход. Кроме того, эффективность данного подхода ограничена быстрым развитием резистентности, связанным с повышенной нестабильностью генома опухолевой клетки. При развитии резистентности к таргетным препаратам, а также для групп онкопациентов с невыявленными мишенями таргетной терапии, используются классические генотоксические химиопрепараты, разработка которых была основана на наличии у всех опухолей общего свойства - интенсивного и не регулируемого размножения клеток. Препараты такого рода ведут свое начало от азотистого аналога иприта, впервые использованного для лечения лимфомы в 1942 г. Созданные вслед за ним многочисленные алкилирующие соединения из ряда хлорэтиламинов, этилениминов, производных платины, равно как и антиметаболиты, противоопухолевые антибиотики и другие препараты, были нацелены на повреждение ДНК любых интенсивно пролиферирующих клеток. Эти препараты оказались способны не только продлевать жизнь больных, но и полностью излечивать некоторые типы неоплазий (лимфогранулематоз, хорионэпителиому и др.). Однако химиотерапия с применением генотоксических агентов способствует генетической нестабильности и высокой мутационной изменчивости как клеток самой опухоли, так и нормальных клеток организма. Это, в свою очередь, увеличивает скорость прогрессии опухоли и стимулирует появление более злокачественных и резистентных клонов опухолевых клеток, а также является причиной возникновения вторых первичных опухолей.

Необходимость преодоления различных побочных эффектов применения высокотоксичных препаратов привела к развитию комбинированной химиотерапии, при которой помимо основного терапевтического средства применяются адъювантные препараты, позволяющие скорректировать направленность действия терапии, увеличить терапевтический интервал для основного препарата, избирательно усилить его эффект на опухолевые клетки. Новым направлением развития комбинированной химиотерапии злокачественных новообразований является использование ДНК-тропных малых молекул, которые взаимодействуют с ДНК нековалентно и за счет образования водородных и ван-дер-ваальсовых связей позиционируются по узкой бороздке ДНК. Взаимодействуя с ДНК соединения данной группы могут изменять геометрические параметры дуплекса и влиять на его гибкость. Кроме

того, они могут экранировать сайты взаимодействия ДНК с ферментами, реализующими процессы репликации, транскрипции, репарации и компактизации ДНК. Так, некоторые из узкобороздочных лигандов (УБЛ) обладают высоким цитотоксическим и цитостатическим потенциалом относительно быстро делящихся клеток благодаря их способности нарушать работу ферментов метаболизма ДНК – ингибирование матричного синтеза (репликации и транскрипции), подавления активности топоизомераз I и II, – а также их способности ингибировать протеинкиназы, вызывая как специфичное, так и широкое неспецифичное снижение активности серин-треониновых и тирозиновых киназ.

Существенно, что антиканцерогенной активностью обладают также и немутагенные ДНК-тропные малые молекулы растительного происхождения (фитонутриенты), которые могут как связываться с узкой бороздкой, так и интеркалировать в спираль ДНК. Отсутствие токсичности и мутагенности у этих соединений (при использовании в физиологических дозах) отличает их как от цитостатиков первого поколения, так и от противоопухолевых таргетных препаратов. Для этих соединений также показана способность модулировать активность ферментов метаболизма ДНК, влиять на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов.

Имеющиеся данные об эффектах малых ДНК-тропных молекул с аффинностью к узкой бороздке позволяют рассматривать их как соединения потенциально способные обладать широким спектром биологической активности. Однако комплексного исследования биологических эффектов и механизмов действия соединений данного класса проведено не было. Современные молекулярно-биологические методы исследования позволяют охарактеризовать механизмы их взаимодействия с ДНК, изучить их влияние на структуру хроматина, а также проанализировать их влияние на функционирование систем репарации и эпигенетической регуляции экспрессии. Нарушение функционирования данных систем имеет непосредственное отношение к механизмам канцерогенеза и эффективности комбинированной химиотерапии. Кроме того, изучение эффектов УБЛ в различных краткосрочных тестах, направленных на выявление потенциально канцерогенных соединений, также необходимо для понимания механизмов действия и определения потенциальных рисков их применения в медицинской практике.

Таким образом, изучение молекулярных механизмов действия УБЛ представляется актуальным как в целях совершенствования химиотерапии злокачественных новообразований, так и для профилактики канцерогенеза.

### **Степень разработанности проблемы**

В области исследования малых ДНК-тропных молекул, которые не связываются с ДНК ковалентно, но взаимодействуют с узкой бороздкой за счет образования электростатических, водородных и ван-дер-ваальсовых связей, наиболее изученными являются узкобороздочные

лиганды. В данное исследование были включены как классические УБЛ, так и производные карбазолов, получившие название «кураксины», - новые низкомолекулярные препараты с потенциальными противоопухолевыми свойствами. Для последних было показано, что по типу взаимодействия с ДНК данные агенты представляют собой бифункциональные соединения, карбазольное ядро которых интеркалирует между пар оснований, а линейная боковая цепь позиционирует молекулу по узкой бороздке. Известно, что узкобороздочные лиганды способны вызывать нарушения метаболизма нуклеиновых кислот (процессов репликации и транскрипции, поддержания оптимальной топологии молекул), поскольку данные соединения осуществляют обратимое связывание с ДНК и предотвращают таким образом взаимодействие с ней ферментов. Для некоторых из этих молекул описано подавление активности хеликаз, ингибирование ДНК- и РНК-полимераз, эндо- и экзонуклеаз, а также продемонстрировано вытеснение из хроматина базального транскрипционного фактора ТВР и белков НМГ. Это приводит к изменению профиля экспрессии генов в клетке и нарушению функционирования систем репарации. Такая активность УБЛ могла бы быть объяснена сиквенс-специфическим взаимодействием и конкурентным ингибированием связывания ферментов метаболизма ДНК с биополимером. Однако такой анализ был проведен лишь для отдельных УБЛ, причем сравнительный анализ полученных данных ограничен использованием различных подходов и условий в экспериментах. Развитие современных технологий визуализации фрагментов ДНК с помощью флуоресцентных маркеров позволяет провести более детальный анализ сиквенс-специфичности УБЛ. Соответственно, в задачи представленной работы входило проведение анализа сиквенс-специфичности УБЛ, изучение их влияния на структуру хроматина, а также выявление биологических эффектов, опосредованных связыванием этих молекул с ДНК. В частности, исследовано их влияние на функциональную активность и локализацию фактора запуска репарации PARP1 *in vitro* и *in vivo*. Другими важнейшими ферментами, которые определяют профиль экспрессии генов в клетке, являются метил- и ацетилтрансферазы. До настоящего времени изучения влияния соединений этой группы на эпигенетическую регуляцию транскрипции не проводили. В литературе имеются лишь несколько работ, посвященные отдельным УБЛ, которые свидетельствуют о целесообразности проведения такого исследования.

В плане безопасности использования УБЛ нами было проведено исследование их возможного мутагенного и канцерогенного действия. Это связано с тем, что помимо обратимых эпигенетических эффектов нарушение работы ферментов «домашнего хозяйства» малыми ДНК-тропными молекулами может приводить к появлению одноцепочечных разрывов и накоплению повреждений ДНК за счет ингибирования систем репарации. Ранее для некоторых УБЛ была изучена их мутагенная активность и способность индуцировать крупные

генетические перестройки. Однако изучение эффектов всей группы УБЛ на их способность проявлять потенциально канцерогенные свойства в батарее краткосрочных тестов, включающих, как тесты на мутагенную и генотоксическую активность, так и исследование рекомбиногенных и бластомогенных свойств опубликовано до настоящего времени не было. Поскольку УБЛ активно изучают в плане их возможного использования в медицинской практике, проведение такого анализа представляется целесообразным.

В последнее время в связи с активным изучением роли пространственной организации генома в его функционировании усилился интерес к молекулярным механизмам действия ДНК-тропных соединений, не обладающих генотоксическим эффектом. Одним из таких препаратов, показавших свою эффективность в ряде предклинических исследований и клинических испытаний в отношении нейробластом, рака молочной железы, является кураксин СВL0137. В медицинской практике нашли свое применение в качестве противопротозойных препаратов такие узкобороздочные лиганды как диминазен и пентамидин. В тоже время антиканцерогенные и противоопухолевые свойства этих соединений и молекулярные механизмы их действия были изучены недостаточно.

Таким образом, анализ степени разработанности проблемы свидетельствует об обоснованности и необходимости дальнейшего изучения молекулярных эффектов УБЛ. Представленная работа основана на результатах исследования отдельных соединений из группы УБЛ и направлена на сравнительный анализ молекулярных эффектов целого ряда соединений УБЛ с целью выявления наиболее активных молекул для последующего анализа их противоопухолевых и антиканцерогенных эффектов. Кроме того, для понимания перспектив использования УБЛ в медицинской практике необходимым является анализ их потенциальной канцерогенной опасности, чему посвящен специальный раздел представленной работы.

### **Цель исследования**

Целью данного исследования являлось изучение молекулярных механизмов противоопухолевой и антиканцерогенной активности ДНК-тропных малых молекул, нековалентно взаимодействующих с узкой бороздкой ДНК.

### **Задачи исследования**

1. Изучить молекулярные механизмы ДНК-опосредованного действия узкобороздочных лигандов:

- провести анализ сиквенс-специфичности исследуемых ДНК-тропных молекул;
- изучить влияние УБЛ на структуру хроматина;
- проанализировать влияние УБЛ на активность топоизомеразы I;

-исследовать механизмы влияния УБЛ на функционирование белка поли-(АДФ-рибозы)-полимеразу I (PARP1), основного фактора запуска эксцизионной репарации.

2. Исследовать молекулярные механизмы эпигенетических эффектов узкобороздочных лигандов:

-разработать модель для оценки интегрального эффекта ксенобиотиков на эпигенетическую регуляцию транскрипции генов;

-провести анализ влияния УБЛ на уровень метилирования ДНК и профиль гистоновых модификаций;

- изучить совместное действие УБЛ и эпигенетических ингибиторов.

3. Изучить канцерогенную безопасность узкобороздочных лигандов путем анализа мутагенных, рекомбиногенных и бластомогенных их свойств *in vitro* и *in vivo*:

- в тесте Эймса на мутагенную активность на *Salmonella typhimurium*

- в тесте по индукции хромосомных aberrаций *in vivo*;

- в тесте на мутагенную, рекомбиногенную и бластомогенную активность на *Drosophila melanogaster*.

4. Исследовать антиканцерогенные и противоопухолевые свойства ДНК-тропных малых молекул, имеющих сродство к узкой бороздке, *in vitro* и *in vivo*:

- исследовать антиканцерогенную активность кураксина CBL0137 *in vivo*;

-изучить влияние УБЛ на эффективность действия противоопухолевых препаратов *in vitro*;

- исследовать противоопухолевую активность УБЛ на моделях *in vivo*.

### **Методы и методология исследования**

В качестве методологической основы исследования были использованы комплексный и системный подходы с применением современных физико-химических и молекулярно-биологических методов исследования, а также моделирования процессов канцерогенеза на лабораторных животных. При исследовании ДНК-опосредованных эффектов УБЛ в качестве объекта исследования выступали реконструированные системы *in vitro*. Изучение особенностей взаимодействия узкобороздочных лигандов с ДНК в зависимости от контекста последовательностей проводили методом ДНК-футпринтинга с использованием олигонуклеотидов, меченых флуоресцентным красителем. Влияние УБЛ на активность топоизомеразы I и белка PARP1 анализировалось по их способности ингибировать образование продуктов реакции, визуализация которых проводилась с помощью гель-электрофореза, либо вестерн-блоттинга после электрофореза в полиакриламидном геле. В качестве модельных систем *in vitro* для изучения влияния ДНК-тропных соединений на структуру хроматина и гистоновый шаперон были использованы клеточные линии HT1080 H1-mCherry, HeLa SSRP1-GFP/H2B-

mCherry и HT1080 SPT16-GFP/H2B-mCherry, несущие флуоресцентно-меченые гистоны и субъединицы белка FACT соответственно. Перераспределение гистонов и субъединиц гистонового шаперона между внутриядерными компартментами регистрировали с помощью прижизненной микроскопии, в качестве альтернативного метода использовался вестерн-блоттинг. Мутагенная активность соединений определялась с помощью теста Эймса на бактериях *Salmonella Typhimurium*. Интегральное мутагенное, рекомбиногенное и бластомогенное действие соединений определялось при помощи теста на соматические мутации и рекомбинации (SMART) на *Drosophila melanogaster*. Выявление рекомбиногенной активности проводилось при введении хромосомы-балансера ТМЗ. Цитогенетическая активность соединений определялась в тесте на хромосомные aberrации на клетках костного мозга мышей-гибридов СВАхС57Bl/6 при введении тестируемых соединений. Влияние УБЛ на локализацию PARP1 *in vivo* на *Drosophila melanogaster* изучалось с помощью конфокальной микроскопии при препаративном окрашивании имагинальных дисков и слюнных желез из личинок дрозофилы. При оценке возможности использования модельной системы HeLa T1 для определения эпигенетических эффектов УБЛ использовались следующие методы: электрофорез нуклеиновых кислот и белков, трансфекция, вестерн-блоттинг, флуоресцентная микроскопия, проточная цитофлуориметрия. При изучении активности метаболической системы активации проканцерогенов клеточной линии HeLa T1 динамику метаболизма проканцерогенов анализировали при помощи спектрально-флуоресцентного метода по квазилинейчатым спектрам, конститутивный и индуцированный уровни экспрессии изоформ цитохрома P450 исследовали методом количественной ПЦР в реальном времени после выделения РНК и проведения реакции обратной транскрипции. Влияние УБЛ на интегральный уровень метилирования ДНК проводили методами метилчувствительной ПЦР и бисульфитного секвенирования. Влияние УБЛ на профиль гистоновых модификаций анализировали методом вестерн-блоттинга. Определение таргетных для УБЛ метил-, ацетилтрансфераз и деацетилаз проводили при миРНК-зависимом нокдауне следующих белков: HDAC1, HDAC2, HDAC3, DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B и DNMT3L. Изучение способности кураксина CBL0137 ингибировать канцерогенное действие 1,2-диметилгидразина в хроническом эксперименте *in vivo* на мышях СВА проводилось с постановкой первичного диагноза и подтверждением результатов с помощью гистологического анализа с дифференциальной окраской препаратов. При изучении влияния кураксина на активность сигнальных путей в качестве модельных системы использовались клеточные линии рака толстой кишки HT29, Caco2, HCT116 и Sw480. Анализ влияния кураксина на экспрессию конкретных генов проводился методами ПЦР реального времени и люциферазного репортерного анализа. При изучении комбинированного действия УБЛ с противоопухолевыми препаратами использовались клеточные линии рака

молочной железы (BT474, MDA-MB-231), рака простаты (PC3), рака яичников (Skov3 и Oвca432), рака толстой кишки (HT29), а также рака почек (PNX). В качестве методов анализа выступали анализ способности опухолевых клеток образовывать колонии в разреженной популяции, а также метод прямого подсчета клеток. Для исследования противоопухолевого эффекта анализируемых соединений *in vivo* были использованы модели перевиваемой аденокарциномы толстой кишки и модель перевиваемой лимфомы P388. Статистическая обработка данных проводилась с использованием современных методов математической статистики.

### Научная новизна

В представленном исследовании продемонстрирован широкий спектр новых биологических активностей малых ДНК-тропных молекул. В частности, впервые было установлено наличие хроматин-дестабилизирующего эффекта УБЛ, а также их влияние на функционирование гистонового шаперона FACT и линкерный гистон H1. Впервые было показано, что узкобороздочные лиганды являются ингибиторами активности поли(АДФ-рибозы)-полимеразы *in vitro* и *in vivo*, разобщая связь фермента с ДНК-активатором по конкурентному механизму и, соответственно, подавляя специфически только ДНК-зависимую активацию PARP1. Также было продемонстрировано, что вытеснение PARP1 из зон конденсированного гетерохроматина, вызванное действием УБЛ, приводит к реактивации молчащих ретротраспозонов и накоплению их мРНК в цитоплазме, что, как известно, является одним из механизмов индукции сигнального пути INF- $\alpha$ , имеющего антипролиферативную и проапоптотическую направленность действия. При исследовании мутагенной рекомбиногенной и генотоксической активности УБЛ в тесте на соматический мутагенез и рекомбинацию впервые было показано, что распространенные бисбензимидазольные ДНК-красители, а также производные карбазолов кураксины, могут оказывать некоторое рекомбиногенное действие. В рамках изучения эпигенетической активности УБЛ впервые была проведена оценка возможности использования клеточной линии HeLa T1, несущей эпигенетически репрессированный ген зеленого флуоресцентного белка, для определения эпигенетических эффектов ксенобиотиков. Впервые продемонстрировано влияние УБЛ на эпигенетическую регуляцию транскрипции, связанную как с процессами метилирования и ацетилирования гистонов, так и метилирования ДНК, а также установлено, что некоторые УБЛ оказывают потенцирующее действие на реактивацию экспрессии генов эпигенетическими ингибиторами ацетилирования гистонов и метилирования ДНК. При изучении действия кураксина на процесс канцерогенеза в экспериментах *in vivo*, впервые установлено, что эти соединения обладают значительным антиканцерогенным действием в отношении индуцированного 1,2-диметилгидрозином рака толстой кишки, что, помимо их способности подавлять воспаление и

активировать апоптоз, обуславливается их ингибирующим действием на активность сигнального пути WNT. Также в работе впервые была продемонстрирована способность диминазена увеличивать чувствительность опухолевых клеток к действию некоторых генотоксических и таргетных препаратов *in vitro* и *in vivo*, а также установлена противоопухолевая активность диминазена в отношении сарком матки и лимфом, а кураксина в отношении опухолей толстой кишки и сарком матки. Полученные данные представляют собой научное обоснование как для разработки новых противоопухолевых и антиканцерогенных препаратов, так и для дальнейших фундаментальных исследований роли малых ДНК-тропных молекул в функционировании генома клетки.

### **Теоретическая и практическая значимость**

При выполнении данного исследования был получен ряд приоритетных научных результатов по молекулярным механизмам действия УБЛ на процесс канцерогенеза, что определяет перспективы использования этих соединений в профилактике канцерогенеза и противоопухолевой терапии. Было установлено, что даже близкие по химической структуре УБЛ имеют сродство к различным последовательностям ДНК и обладают различными эпигенетическими эффектами. Показано, что все УБЛ обладают способностью дестабилизировать структуру нуклеосом, вызывая вытеснение из хроматина линкерного гистона H1 и привлечение гистонового шаперона FACT. Важным полученным результатом являются данные о механизме ингибирования белка-индуктора эксцизионной репарации PARP1 при действии УБЛ путем разобщения взаимодействия белка с ДНК. Такой механизм ингибирования PARP1 кардинально отличается от механизма действия ингибиторов PARP1, которые в настоящий момент используются в клинике и проходят клинические испытания. Эти данные раскрывают перспективы использования определенной категории УБЛ в противоопухолевой терапии в качестве ингибиторов PARP1, причем для повышения эффективности ингибирования репарации ДНК возможно их применение в комбинации с другими ингибиторами PARP1, имеющими отличный механизм действия. Последнее было подтверждено результатами исследований противоопухолевой активности УБЛ *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, продемонстрировано, что взаимодействие УБЛ с ДНК приводит к ингибированию не только PARP1-опосредованного запуска репарации, но и к активации транскрипции молчащих ретротранспозонов, следствием чего является индукция сигнального пути INF- $\alpha$ . В совокупности с результатами исследований эпигенетической активности УБЛ, полученные данные открывают новое направление поиска факторов повышения эффективности химиотерапии путем направленной коррекции экспрессии и активности ферментов «домашнего хозяйства» опухолевой клетки с помощью малых ДНК-тропных молекул.

При исследовании мутагенных, бластомогенных и рекомбиногенных свойств УБЛ впервые было показано, что некоторые из этих молекул, не проявляя в краткосрочных тестах мутагенной и цитогенетической активности, могут выступать в роли рекомбиногенов, увеличивая частоту появления клеток с потерей гетерозиготности *in vivo*. Учитывая, что тесты, наиболее широко используемые при изучении канцерогенной безопасности новых препаратов, выявляют лишь события точечного мутагенеза или крупные генетические перестройки, полученные данные свидетельствуют о необходимости развития и усовершенствования испытаний на рекомбиногенную активность, также их внедрения в повседневный скрининг ксенобиотиков.

В рамках изучения способности УБЛ влиять на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов была разработана тест-система для скрининга интегральной эпигенетической активности ксенобиотиков. Основой для создания данной тест-системы послужили данные об эпигенетической репрессии трансгенного репортерного белка GFP в клеточной популяции путем метилирования ДНК и модификации гистонов. Результаты тестирования широкого круга эпигенетически активных соединений, а также исследование активности микросомных монооксигеназ, продемонстрировали, что HeLa TI может быть использована для скрининга эпигенетической активности ксенобиотиков, в том числе и тех, которые требуют метаболической активации. Также было показано, что все изученные в ходе работы ДНК-тропные малые молекулы обладают способностью реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированных генов, изменяя уровень метилирования ДНК и влияя на гистоновые модификации.

При исследовании ДНК-тропных молекул *in vivo* было показано, что производное карбазола обладает антиканцерогенной активностью относительно индуцированного рака толстого кишечника, что связано с противовоспалительными свойствами этой молекулы и с её способностью ингибировать сигнальный путь WNT. Сильный эффект по снижению частоты появления химически индуцированных злокачественных опухолей у мышей свидетельствует о перспективности развития стратегии профилактики злокачественных новообразований с использованием препаратов с подобным механизмом действия.

Таким образом, полученные результаты могут служить основой для дальнейших исследований роли малых ДНК-тропных молекул в процессах канцерогенеза. Ряд данных может иметь также и прикладное значение при разработке методов экспресс-оценки эпигенетической активности химических агентов и смесей. Помимо этого, полученные данные свидетельствуют о перспективности усовершенствования химиотерапевтических протоколов путем использования в комбинации препаратов ДНК-тропных малых молекул.

### **Личный вклад**

Автор лично провел анализ научной литературы по теме диссертации, принимал непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке плана исследования. Автором проведены экспериментальная реализация плана исследования, анализ и обобщение полученных данных, подготовлены публикации, полностью отражающие все полученные результаты. Доклады по теме диссертации были представлены лично автором на всероссийских и международных научных конференциях.

### **Соответствие паспорту специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – Онкология («Биологические науки») и областям исследований п.1 «Осуществление профилактики возникновения злокачественных опухолей на основе изучения факторов внешней и внутренней среды организма» и п.6 «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов, биологически активных препаратов».

### **Положения, выносимые на защиту**

1. ДНК-тропные малые молекулы, специфически взаимодействуя с узкой бороздкой ДНК, способны нарушать работу ферментов метаболизма ДНК, влияют на структуру ДНК и процессы компактизации хроматина.
2. АТ-специфические ДНК-тропные соединения способны ингибировать *in vitro* и *in vivo* ДНК-зависимую активацию фактора репарации PARP1 путем разобщения связи фермента с ДНК-активатором по конкурентному механизму.
3. При действии некоторых ДНК-тропных агентов происходит исключение PARP1 из зон конденсированного гетерохроматина, что приводит к реактивации молчащих ретротраспозонов и накоплению их мРНК в цитоплазме.
4. Некоторые из ДНК-тропных соединений, не проявляя мутагенных свойств, обладают бластомогенной активностью за счет активации соматической рекомбинации.
5. Популяция клеток HeLa T1, несущая ретровирусный вектор с эпигенетически репрессированным репортерным геном зеленого флуоресцентного белка GFP, является адекватной тест-системой для скрининга химических соединений на способность реактивировать экспрессию генов
6. Большинство соединений, взаимодействующих с малой бороздой ДНК, влияют на эпигенетическую регуляцию транскрипции, связанную с модификацией гистонов и метилированием ДНК.

7. Производное карбазола кураксин обладает значимой антиканцерогенной и противоопухолевой активностью относительно рака кишечника, что связано с его противовоспалительными свойствами и способностью ингибировать сигнальный путь WNT.

8. Диминазен обладает противоопухолевой активностью *in vivo* и *in vitro*, а также способен увеличивать чувствительность опухолевых клеток к действию генотоксических и таргетных препаратов.

### **Внедрение результатов исследования**

Экспериментально-практический материал, полученный в работы вносят существенный вклад в понимание механизмов действия малых ДНК-тропных соединений и являются основой для дальнейших исследований возможности использования агентов этого класса для профилактики канцерогенеза, а также открывают новое направление поиска факторов повышения эффективности химиотерапии путем направленной коррекции экспрессии и активности ферментов «домашнего хозяйства» опухолевой клетки с помощью этих молекул. Методические подходы, разработанные в ходе выполнения работы, внедрены в деятельность сотрудников отдела химического канцерогенеза НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России, а также используются в учебном процессе на кафедре общей врачебной практики ФГАОУ ВО «РУДН» при чтении лекций.

### **Апробация**

Результаты исследования были представлены и обсуждены на 35 научных конференциях, среди которых: 47-я международная конференция по исследованию дрозофилы (Хьюстон, США, 2006 г.); конференция по фундаментальной онкологии «Петровские чтения 2006» (Санкт-Петербург, 2006 г.); 19-я международная конференция «СПИД, рак и общественное здоровье» (Санкт-Петербург, 2010 г.); 52-я международная конференция по исследованию дрозофилы (Сан-Диего, США, 2011 г.); 1-я международная азиатская конференция по исследованию дрозофилы (Тайбей, Тайвань, 2011 г.); 62-ая ежегодная конференция Американского общества генетиков (Сан-Франциско, США, 2012 г.); V Международная школа молодых ученых по молекулярной генетике «Непостоянство генома» (Звенигород, Россия, 2012 г.); конференция «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» (Томск, Россия, 2015 г.); 9-й конгресс онкологов и радиологов России и стран СНГ (Минск, Беларусь, 2016 г.); XII-XV всероссийская научно-практическая конференция «Отечественные противоопухолевые препараты» (Москва, Россия, 2015 г., 2016 г., 2017 г., 2018 г.), международная конференция «Клеточные и молекулярные механизмы взаимоотношения опухоли и микроокружения» (Томск, Россия, 2015 г.), I-IV всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, Россия, 2015 г., 2016

г., 2017 г., 2018 г.), V съезд физиологов СНГ (Дагомыс, Россия, 2017 г.), Петербургский онкологический форум «Белые ночи» (Санкт-Петербург, Россия, 2016 г., 2017г.); 12-я международная конференция и 5-я азиатская конференция по мутагенам окружающей среды (Сеул, Корея, 2017 г.); X съезд онкологов СНГ и Евразии (Сочи, Россия, 2018 г.); конгресс Европейского общества онкологов EACR (Амстердам, Нидерланды, 2018 г.); XXII Российский Онкологический Конгресс (Москва, Россия, 2018 г.).

### **Публикации**

Результаты исследования изложены в 79 научных публикациях, из которых 29 статей опубликованы в журналах, рекомендованных перечнем ВАК при Минобрнауки России.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа изложена на 266 листах машинописного текста, состоит из введения, 7 глав, заключения, выводов, списка литературы, списка сокращений и 8 приложений. Список литературы включает 275 источников, из которых 18 — отечественные и 257 — зарубежные. Текст иллюстрирован 40 таблицами и 81 рисунком.

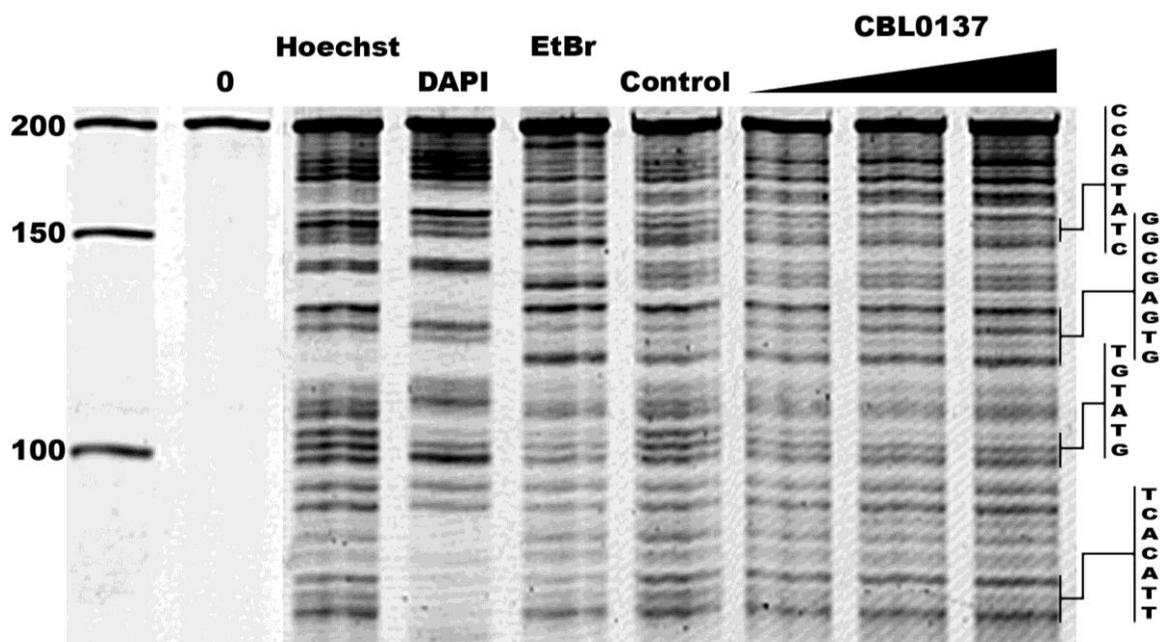
## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ С ДНК И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СТРУКТУРУ ХРОМАТИНА**

#### **1.1. Сиквенс-специфичность узкобороздочных лигандов**

Биологический эффект узкобороздочных лигандов в первую очередь определяется характером их взаимодействия с ДНК. Объектом исследования данной работы является группа соединений, взаимодействующих с ДНК по узкой борозде. Она включает в себя как классические УБЛ (хехст33342, хехст33258, DAPI, пентамидин, диминазен, нетропсин), так и производные карбазолов кураксины CBL0137 и CBL0175.

Целью этой серии экспериментов было изучить аффинность УБЛ к конкретным сиквенсам. Для исследования использовали оптимизированный метод футпринтинга ДНКазой I с использованием флуоресцентного красителя TAMRA.



**Рисунок 1** - ДНКазы футпринтинг флуоресцентно-меченного 200-звенного ПЦР-фрагмента в присутствии хехста, DAPI, бромистого этидия и кураксина. 1 – 100, 150, 200-звенные маркерные ДНК; 2 – исходный 200-звенный ПЦР-фрагмент; 6 - расщепление ДНКазой I в отсутствие тестируемых соединений; 3 - расщепление ДНКазой I в присутствии хехст33258; 4 - расщепление ДНКазой I в присутствии DAPI; 5 - расщепление ДНКазой I в присутствии бромистого этидия (EtBr); 7-9 - расщепление в присутствии кураксина

Было показано (Рисунок 1), что минимальная длина последовательности взаимодействия для каждого из лигандов составляет четыре пары оснований и все исследуемые соединения обладают характерной АТ-специфичностью. Тем не менее для каждой из молекул характерен свой профиль расщепления, что связано с различной аффинностью каждого из агентов к определенным мотивам ДНК. Футпринтинг ДНКазой I выявил сродство кураксина CBL0137 к следующим последовательностям: AGCCG, CAACA, TGTTT, TCATG, GGCATG.

### 1.2. Способность узкобороздочных лигандов ингибировать топоизомеразу I *in vitro*

Ранее было выявлено, что хехст33258 и хехст33343 способны ингибировать топоизомеразу I, что приводит к образованию одноцепочечных разрывов ДНК. В этой работе было продемонстрировано, что классические УБЛ диминазен, пентамидин и DAPI не обладают способностью уменьшать подвижность ДНК и ингибировать топоизомеразу I *in vitro*, в тоже время кураксина уменьшали подвижность ДНК в концентрациях 100-0,8 мкМ, а полное ингибирование топоизомеразы I наблюдалось, начиная с концентрации 4 мкМ.

### 1.3. Влияние узкобороздочных лигандов на структуру хроматина

Взаимодействуя в ДНК нековалентно УБЛ способны нарушать работу внутриядерных белков, препятствуя их взаимодействию с ДНК. При этом может происходить нарушение структуры хроматина и его частичная декомпактизация.

Эксперименты по влиянию УБЛ на расщепление ДНК микрококковой нуклеазой (MNase) проводили на клеточной линии HT1080. Было показано, что при действии соединений хехст33342 и диминазен характер расщепления ДНК не отличается от контрольного. Это демонстрирует отсутствие у данных веществ сильного дестабилизирующего влияния на гистоновый кор. Соединения хехст33258 и DAPI ингибировали активность фермента.

При исследовании влияния УБЛ на локализацию корового гистона H2B и линкерного гистона H1 на клетках, гистоны которых ассоциированы с флуоресцентным белком mCherry, было показано, что ни один из УБЛ не приводит к релокализации корового гистона H2B, тогда как влияние исследуемых ДНК-тропных соединений на линкерный гистон H1 оказалось существенным. При действии каждого из агентов в максимальных нетоксичных концентрациях регистрировали изменение локализации гистона H1. В частности, было выявлено увеличение доли клеток, в которых гистон H1 приобретал ядрышковую локализацию, либо находился на промежуточной стадии – высвобождение из хроматина и релокализация в ядрышки (Рисунок 2)

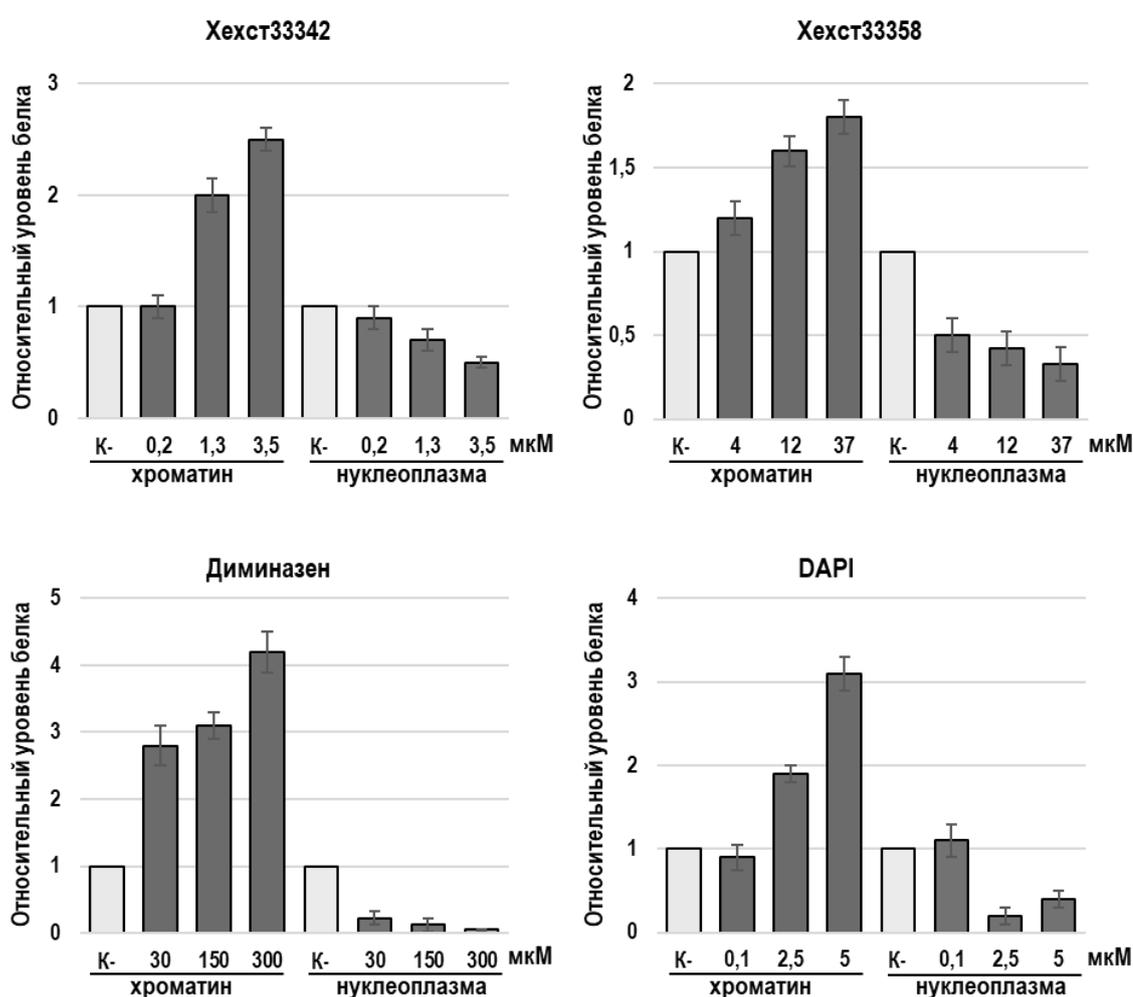
	Доля клеток, соответствующая определенной локализации гистона через 3, 6 и 24 часа после обработки (%)								
	3h			6h			24h		
	3h	6h	24h	3h	6h	24h	3h	6h	24h
<b>Контроль</b>	89			11			0		
<b>Хехст33342</b>	65	60	50	35	40	30	0	0	20
<b>Хехст33258</b>	52	50	25	48	50	45	0	0	30
<b>DAPI</b>	70	52	50	30	48	36	0	0	14
<b>Нетропсин</b>	75	88	92	13	10	8	15	2	0
<b>Диминазен</b>	70	30	15	20	50	13	10	20	72

**Рисунок 2** - Влияние ДНК-тропных АТ-специфичных лигандов на локализацию гистона H1 через 3, 6 и 24 часа после обработки клеток (метод прижизненной микроскопии клеток HT1080 H1-mCherry)

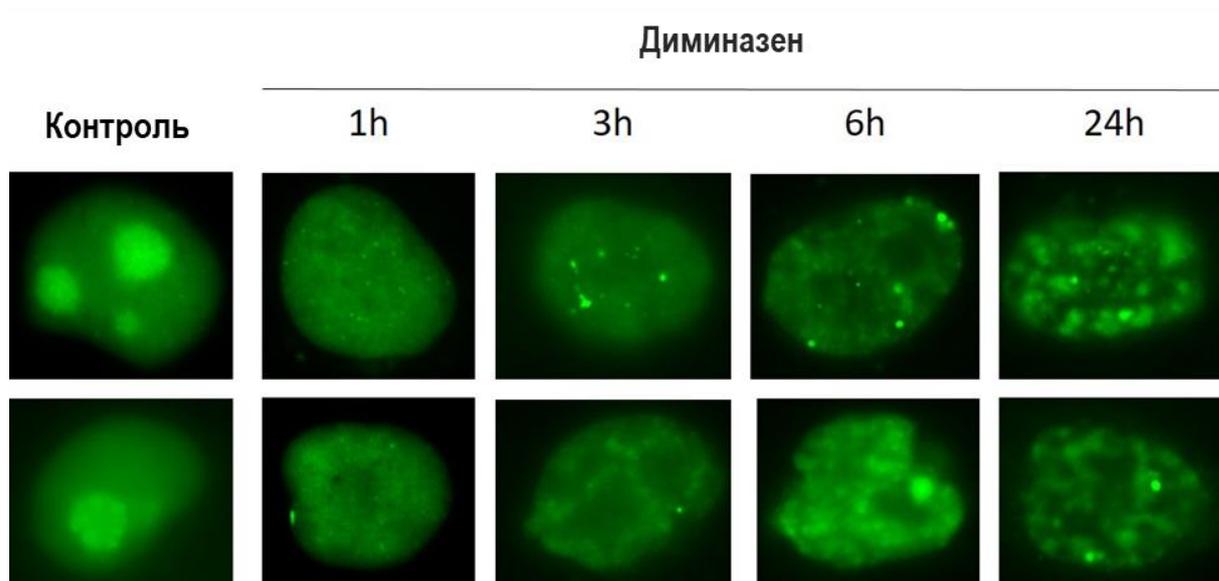
#### 1.4. Влияние узкобороздочных лигандов на локализацию субъединиц SSRP1 и SPT16 гистонового шаперона FACT в ядре

Было изучено влияние АТ-специфичных лигандов на локализацию белка FACT с использованием двух методов. Прижизненная микроскопия клеток, экспрессирующих флуоресцентно-меченые субъединицы белка FACT - SSRP1 и SPT16 (клеточные линии HeLa SSRP1-GFP/H2B-mCherry и HT1080 SPT16-GFP/H2B-mCherry), позволила визуализировать изменения в распределении белков в обработанных соединениями и контрольных клетках, в то время как вестерн-блоттинг использовался для детекции наличия субъединиц гистонового

шаперона FACT в хроматин-связанной и в хроматин-несвязанной (растворимой) фракциях. Анализ влияния УБЛ на локализацию субъединицы SSRP1 гистонового шаперона FACT в 2 клеточных линиях с помощью вестерн-блоттинга выявил дозо-зависимое увеличение количества белковых субъединиц SSRP1 в хроматин-связанной фракции, и, наоборот, уменьшение количества этого белка в растворимой фракции для всех исследуемых соединений (Рисунок 3). Самый сильный эффект на локализацию субъединицы SSRP1 оказали диминазен и DAPI. Полученные данные полностью согласовывались с результатами микроскопии при визуализации живых клеток, обработанных интересующими соединениями. Наиболее яркий эффект был продемонстрирован для диминазена, при действии которого релокализация FACT из ядрышков к хроматину наблюдалась уже спустя 1 час после обработки (Рисунок 4).



**Рисунок 3** - Влияние соединений на распределение субъединицы белкового шаперона FACT SSRP1 между растворимой (хроматин-несвязанной) и хроматин-связанной фракциями при обработке клеток HT1080 различными дозами АТ-специфичных лигандов (данные денситометрического анализа результатов вестерн-блоттинга представлены как  $M \pm m$ )

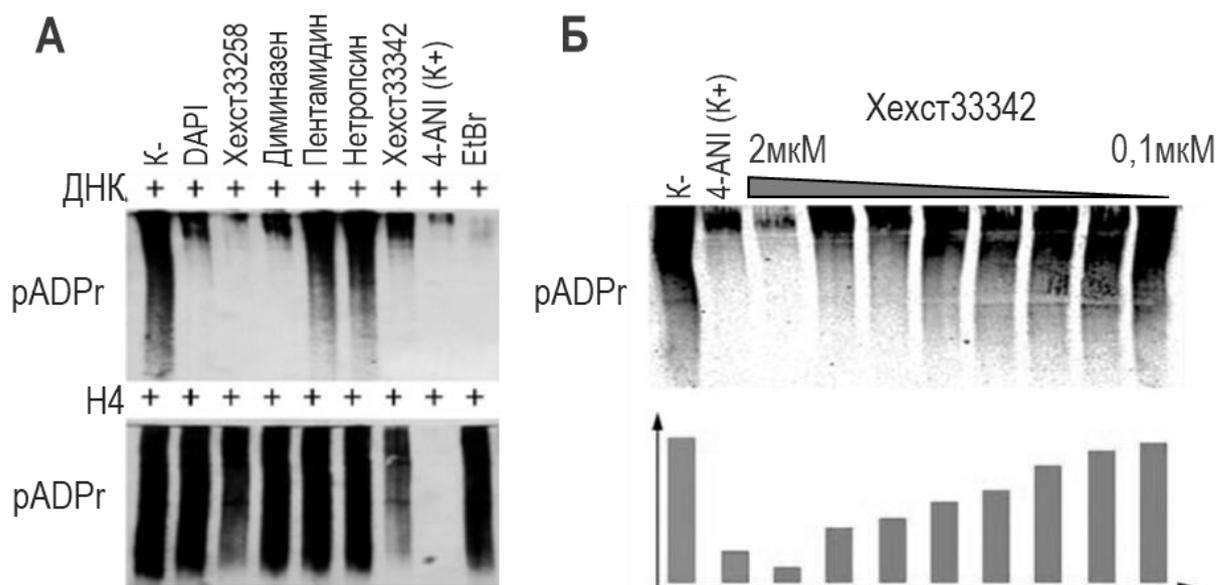


**Рисунок 4** - Влияние соединения диминазен на перераспределение субъединицы белкового шаперона FACT SSRP1 между ядрышковой и хроматин-связанной локализациями при различном времени инкубации клеток HeLa SSRP1-GFP с агентом

## 2. ВЛИЯНИЕ УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ НА ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)- ПОЛИМЕРАЗУ I (PARP I)

### 2.1. Влияние узкобороздочных лигандов на активность PARP1 в реконструированных системах *in vitro*

Было изучено влияние узкобороздочных лигандов на активацию PARP1 *in vitro*. Экспериментальная система определения активности PARP 1 включает в себя: субстраты (NAD и PARP 1), фермент (PARP 1) и активатор ферментативной реакции. Продуктом реакции при этом является комплекс белка с цепями поли-(АДФ)-рибозы различной длины. Выявление продукта реакции проводилось методом вестерн-блоттинга с использованием антител к поли-АДФ-рибозе. В системах *in vitro* существует 2 способа активации PARP 1: (1) добавление в реакционную смесь ДНК с разрывами и (2) добавление гистона H4. В клетке первый путь активации PARP 1 напрямую связан с появлением нарушений в макромолекуле ДНК, H4-зависимая же активация PARP происходит в результате модификации N-конца гистона H4 (либо H2A) в ответ на локальные внутриядерные сигналы. В качестве положительного контроля был использован 4-амино-1,8-нафталимид (4-ANI), который является ингибитором PARP и выступает в роли конкурента NAD<sup>+</sup> при связывании с активным центром PARP 1. Также в исследование был включен интеркалятор бромистый этидий (Рисунок 5).

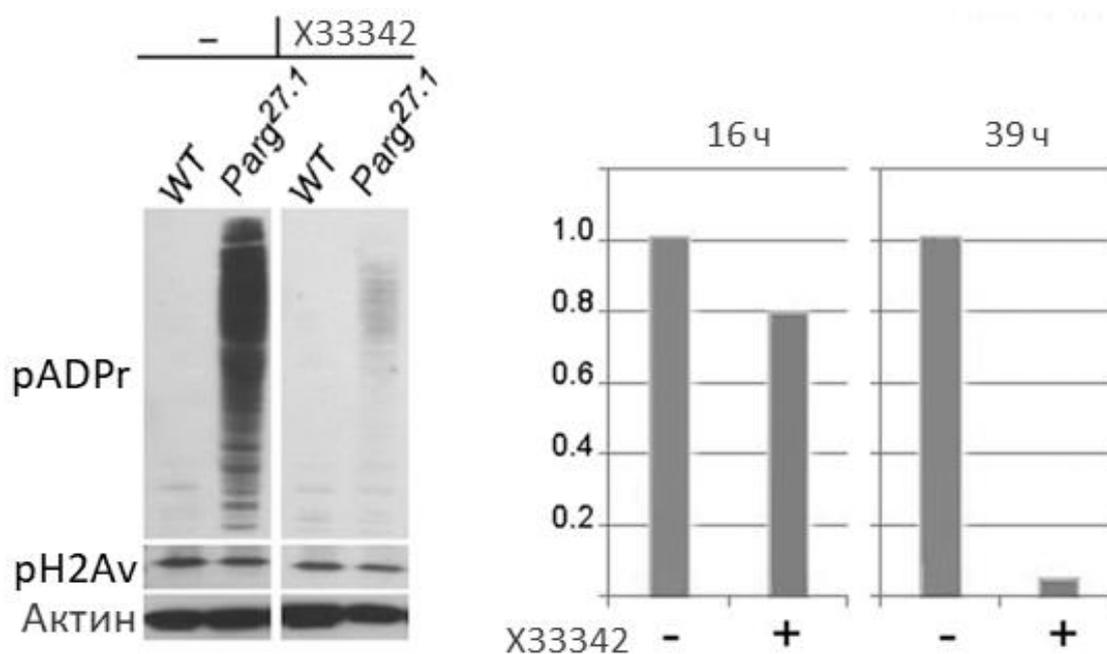


**Рисунок 5** - Влияние ДНК-тропных молекул на активность белка *in vitro*. А. Накопление поли-АДФ-рибозы при инкубации белка PARP 1 с ДНК-тропными молекулами при активации реакции автополи-АДФ-рибозилирования ДНК (сверху) и гистонем H4 (снизу). Б. Хехст33342 дозозависимо ингибирует ДНК-зависимый путь активации PARP1, снизу приведены данные денситометрического анализа)

Было показано, что узкобороздочные лиганды DAPI, хехст33342, хехст33258, диминазен, а также интеркалятор бромистый этидий ингибируют активность PARP *in vitro*, при этом специфически действуют только на ДНК-зависимую активацию фермента. Влияние пентамидина и нетропсина на активность фермента было незначительным. Способность ингибировать реакцию поли-АДФ-рибозилирования убывала в ряду DAPI  $\approx$  Диминазен > Хехст3335 > Пентамидин > Нетропсин. Концентрация полумаксимального ингибирования ферментной реакции для DAPI составила 0,0625 нМ, для Диминазена  $IC_{50}$  оказалась равной 0,132 мкМ.

## 2.2. Влияние УБЛ на активность и локализацию PARP1 *in vivo*

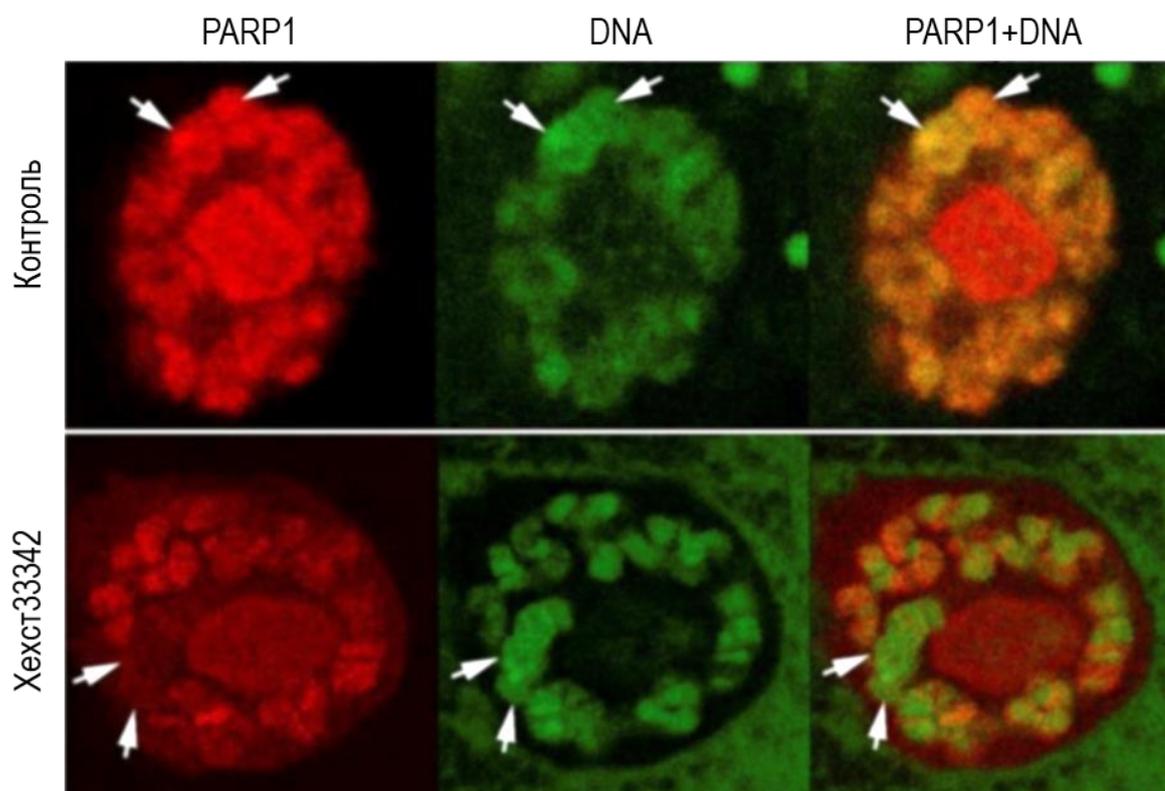
Было исследовано влияние хехст33342 на активность PARP-1 *in vivo* на *Drosophila melanogaster*. Дрозофила является удобной моделью для исследования свойств PARP, так как содержит только одну изоформу этого белка с тремя функциональными доменами, которые консервативны среди всех эукариот. Для измерения уровня pADPr была использована линия дрозофилы, несущая мутацию в гене поли(АДФ-рибоза)-гидролазы (PARG). Раствор хехст33342 добавляли в питательную среду, содержащую личинок дрозофилы линии Parg27.1, через 16 или 39 часов производили отбор личинок 3-го возраста. Уровень поли-АДФ-рибозы анализировали с помощью вестерн-блоттинга (Рисунок 6).



**Рисунок 6** - Влияние хехст33342 на активность PARP 1 у личинок *Drosophila melanogaster* (X33342-хехст33342)

Было показано, что в сравнении с особями дикого типа на одной и той же стадии развития дрозофилы, несущие мутацию в гене *Parg*, накапливают поли-АДФ-рибозу в большем количестве. Однако при обработке личинок узкобороздочным лигандом уровень поли-АДФ-рибозы значительно снижается, что свидетельствует о нарушении функциональной активности PARP 1.

Далее была проведена оценка влияния УБЛ на локализацию PARP1 в ядре при помощи конфокальной микроскопии. В норме PARP1 у дрозофилы распределен по всей хромосоме, демонстрируя особые участки накопления в областях конденсированного неактивного гетерохроматина (Рисунок 7, стрелки). При обработке личинок узкобороздочным лигандом хехст33342 *in vivo* наблюдали исключение PARP 1 из областей гетерохроматина, при этом накопление фермента в зонах эухроматина оставалось неизменным. Это свидетельствует о том, что при действии УБЛ *in vivo* происходит разобщение связывания цинкового пальца PARP-1 с ДНК.

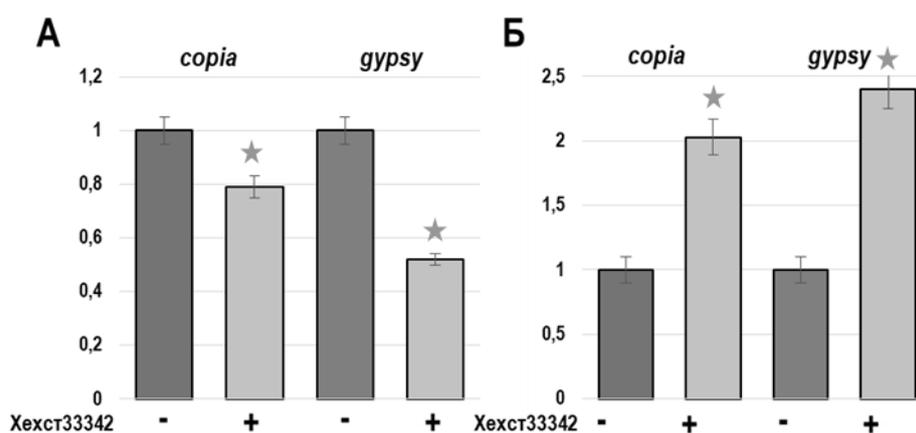


**Рисунок 7** – Влияние хехст33342 на локализацию PARP1 в ядрах клеток слюнных желез дрозофилы (локализация PARP-1 показана красным, ДНК окрашена зеленым, стрелками показаны зоны конденсированного хроматина)

### 2.3. Реактивация экспрессии ретротранспозонов узкоборзодчными лигандами

Связывание цинкового пальца PARP 1 дрозофилы с ДНК в первую очередь необходимо для обеспечения трансрепрессорных функций данного белка, в частности, обеспечения сайленсинга повторяющихся ретротранспозонов, локализованных в зонах гетерохроматина. С помощью метода иммунопреципитации хроматина (ChIP) был проведен анализ локализации PARP 1 в промоторных областях ретроэлементов *gypsy* и *coria* (наиболее типичны для молчащего гетерохроматина дрозофилы) у личинок, обработанных хехст33342, и интактных особей (Рисунок 8).

Показано, что при обработке личинок УБЛ количество молекул PARP 1, связанного с промоторными областями ретротранспозонов, значительно снижается по сравнению с таковым у интактных особей. Более того, используя ПЦР реального времени, было выявлено, что количество мРНК *coria* и *gypsy* после обработки значительно возрастает. Таким образом, хехст33342 нарушает связывание PARP 1 с ДНК в областях гетерохроматина, что приводит к реактивации транскрипции ранее молчащих ретроэлементов.



**Рисунок 8** - Обработка личинок хехст33342 приводит к исключению PARP-1 из промоторных областей ретротраспозонов *Gypsy* и *Copia* (А, метод иммунопреципитации хроматина), при этом количество мРНК *Gypsy* и *Copia* увеличивается (Б, ПЦР реального времени). Данные представлены как  $M \pm m$ , ★ - статистически значимое отличие от контроля,  $p < 0,05$

### 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ НА ЭПИГЕНЕТИЧЕСКУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

#### 3.1. Система скрининга химических соединений на способность реактивировать экспрессию генов

С целью валидации клеточной популяции HeLa T1, несущей эпигенетически репрессированный ген GFP, в качестве тест-системы для изучения эпигенетической активности ксенобиотиков была: (1) исследована способность клеток HeLa T1 к реактивации репортерного гена GFP в ответ на действие известных эпигенетических агентов, (2) проведена оценка способности ферментативной системы клеток HeLa T1 метаболизировать проканцерогены.

##### 3.1.1. Реактивирующее действие эпигенетических препаратов

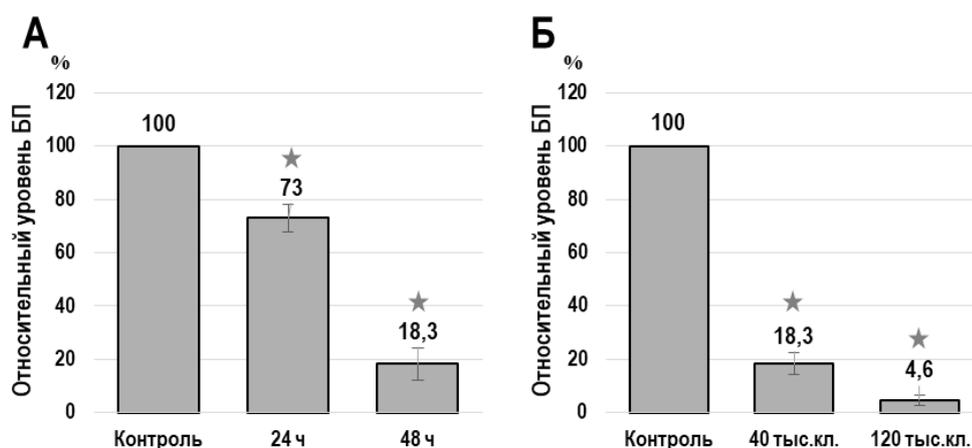
Для исследования чувствительности HeLa T1 к химическим соединениям с эпигенетическими эффектами клетки обрабатывали ингибиторами метилирования ДНК и ингибиторами гистоновых деацетилаз. Все исследуемые соединения проявили способность реактивировать экспрессию эпигенетически репрессированного гена GFP. Так, доля клеток с восстановленной экспрессией зеленого флуоресцентного белка увеличивалась при действии ингибиторов гистоновых деацетилаз Трихостатина А, вориностата, вольпроевой кислоты, депсипептида, помиферина, энтиностата, ингибиторов ДНК метилтрансфераз 5-аза-2'-дезокситидина, 5-азацитина и др. Этот эксперимент продемонстрировал возможность использования модельной системы HeLa T1 для тестирования эпигенетических эффектов ксенобиотиков.

### 3.1.2. Активность метаболической системы активации проканцерогенов клеточной популяции HeLa T1

При разработке скрининговых тест-систем для исследования ксенобиотиков важным параметром является её способность модифицировать соединения, требующие метаболической активации ферментами микросомных монооксигеназ.

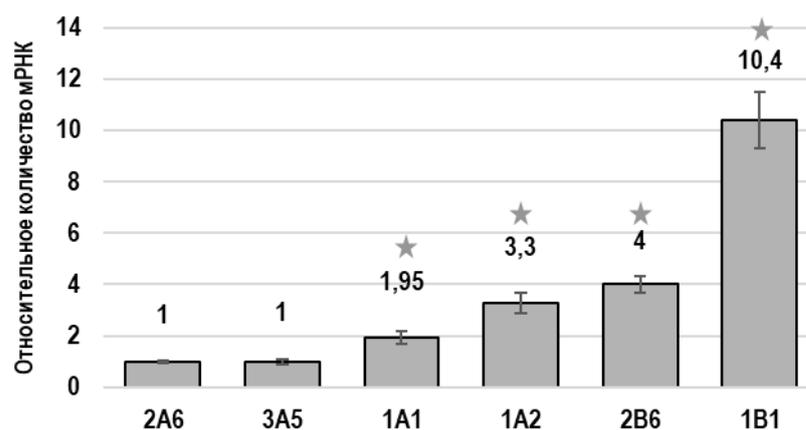
Для выявления способности клеток HeLa T1 активировать проканцерогены при помощи собственной ферментативной системы метаболизма ксенобиотиков была изучена динамика метаболизма классического полициклического ароматического углеводорода – бенз(а)пирена (БП) - в клеточной культуре HeLa T1. Остаточный уровень БП в среде оценивали с использованием спектрально-флуоресцентного метода по квазилинейчатым спектрам, наблюдаемым при температуре жидкого азота, при разной плотности посадки клеток по истечении 24 и 48 часов от начала эксперимента (Рисунок 9).

Зарегистрированное уменьшение количества бенз(а)пирена в исследованных пробах позволило сделать вывод о способности клеток линии HeLa T1 метаболизировать данное соединение. При этом остаточное количество бенз(а)пирена в среде было обратно пропорционально плотности рассадки клеток и времени инкубации клеток с агентом.



**Рисунок 9** - Содержание бенз(а)пирена в среде с клетками HeLaT1 при различном (А) времени инкубации - 24ч и 48ч, и (Б) плотности посадки клеток. Данные представлены как  $M \pm m$ , ★ - статистически значимое отличие от контроля,  $p < 0,05$

Ранее было показано, что регуляция активности экспрессии различных изоформ цитохрома Р-450 происходит в основном на уровне транскрипции. С помощью метода ПЦР в реальном времени в клетках HeLa T1 была выявлена экспрессия следующих изоформ цитохрома: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP3A5. мРНК генов CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 выявить не удалось (Рисунок 10).



**Рисунок 10** - Профиль конститутивной экспрессии генов цитохромов P450 в клетках линии HeLa T1. Данные представлены как  $M \pm m$ , ★ - статистически значимое отличие от контроля,  $p < 0,05$

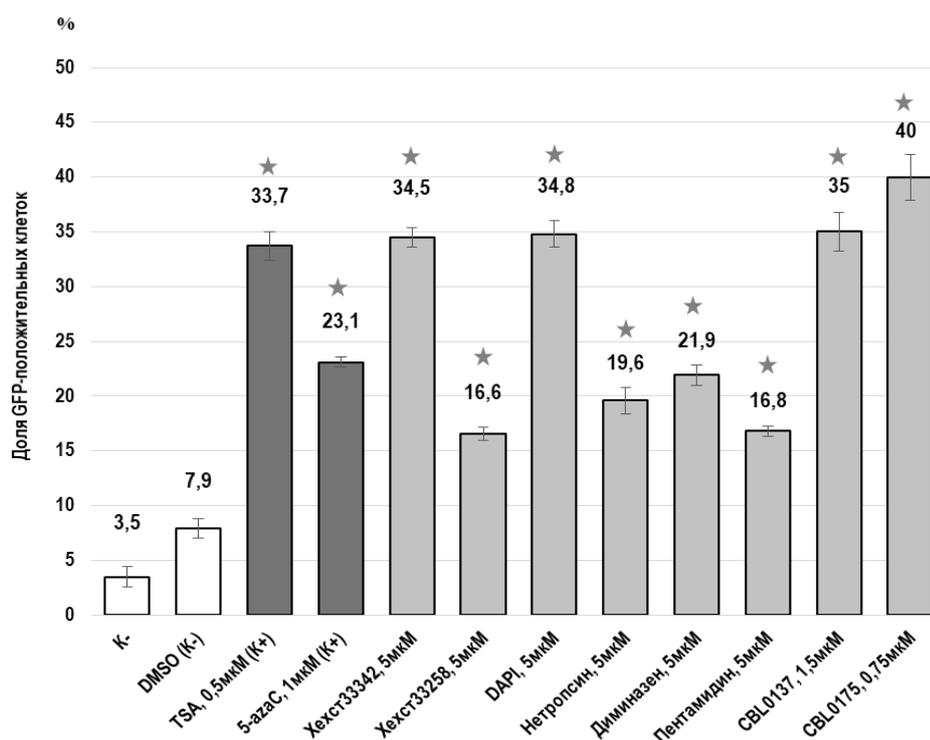
При добавлении индукторов в клеточную культуру HeLa T1 происходило увеличение экспрессии практически всех изученных генов изоформ цитохрома P450. Так, при действии 3-метилхолантрена экспрессия CYP1A1 увеличивалась в 18,5 раз, а CYP1A2 - в 2,7, уровень мРНК CYP2A6 увеличивался в 9,1 раз при добавлении афлатоксина B1 к клеткам. Было зарегистрировано увеличение экспрессии CYP2B6 в 10,9 раз, в 6,8 раз и в 4,6 раз при действии фенобарбитала, афлатоксина B1 и циклофосамида соответственно, а уровень мРНК CYP2C9 возрастал в 8,9 раз при обработке фенобарбиталом. Количество мРНК CYP2C19 увеличилось в 79,4 раза при обработке клеток рифампицином, а CYP2E1 - в 5,2 раза при действии изониазида. После обработки HeLa T1 рифампицином было продемонстрировано слабое, но воспроизводимое увеличение экспрессии CYP3A5. При действии специфического индуктора была выявлена экспрессия изоформ P450 CYP2C9 и CYP2C19, мРНК которых не удалось выявить в интактных клетках. Для гена CYP1B1 уровень мРНК оставался неизменным при действии каждого из специфических индукторов. Последнее может быть объяснено высоким конститутивным уровнем его экспрессии, регистрирующимся как в клетках HeLa, HeLa T1, так и в опухолях различного генеза.

Помимо регуляции экспрессии генов различных изоформ цитохрома P450 важной характеристикой системы метаболизма является функциональная активность самих ферментов. Клетки HeLa T1 обрабатывали проканцерогенами: 3-метилхолантреном, бенз(а)пиреном, циклофосамидом и орто-аминоазотолуолом. Через 24 часа с помощью метода ДНК-комет проводили анализ количества клеток с поврежденной ДНК. Было показано, что доля клеток с повреждениями ДНК возрастала при действии каждого из проканцерогенов. Важно, что метаболическая активация каждого из агентов происходит при действии различных изоформ цитохрома P450. Так, 3-метилхолантреном метаболизируется CYP1A1, CYP1A2 и CYP1B1,

бенз(а)пирен - CYP1A2 и CYP1B1, циклофосфамид – CYP2B6, CYP2C19 и CYP3A4, а орто-аминоазотолуола - CYP1A2, CYP2A6.

### 3.2. Эпигенетические эффекты узкобороздочных лигандов на клетках HeLa T1

Было продемонстрировано, что все УБЛ способны реактивировать экспрессию гена GFP в модельной системе HeLa T1. Наибольшей эпигенетической активностью обладали хехст33342, DAPI, CBL0137 и CBL0175 (35, 35, 35 и 40% соответственно), меньший эффект наблюдался при обработке клеток нетропсином, диминазеном, пентамидином и хехст33258 (20, 22, 17 и 17% соответственно) (Рисунок 11).



**Рисунок 11** - Влияние УБЛ на долю GFP-положительных клеток в популяции HeLa T1. Данные представлены как  $M \pm m$ , ★ - статистически значимое отличие от контроля,  $p < 0,05$

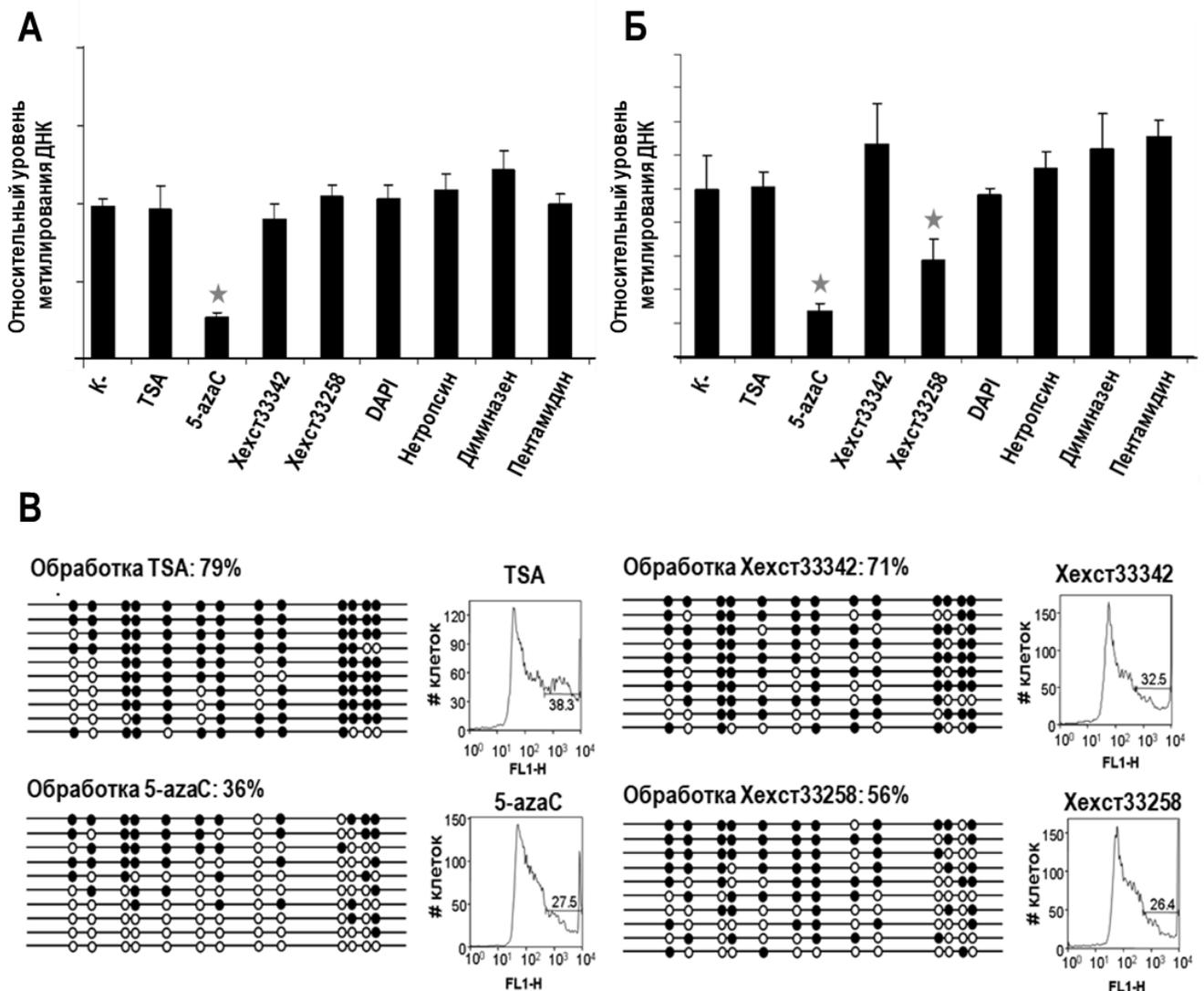
#### 3.2.1 Влияние УБЛ на уровень гистоновых модификаций

Был проведен анализ гистоновых модификаций, которые являются маркерными для активно экспрессируемых генов. Эпигенетическими маркерами транскрипции выступали: ацетилирование гистонов H3 и H4 (acH3/acH4) в промоторных областях генов, а также триметилирование лизина гистона H3 в положении 4 (H3K4me3). Было показано, что обработка HeLa T1 клеток TSA, DAPI и хехст42 приводит к увеличению уровня модификации H3K4me3. При этом уровень ацетилирования гистона H4 не претерпевал существенных изменений за исключением клеток, обработанных TSA. Уровень ацетилирования гистона H3 увеличился во всех образцах. В качестве контроля использовали антитела к гистонам H3 и H4. Далее был проведен анализ гистоновых модификаций, которые характерны

для нетранскрибируемых областей генома - триметилирование лизинов гистонов H4 и H3 в положениях 20 (H4K20me3) и 9 (H3K9me3) соответственно. Снижение уровня H4K20me3 при обработке HeLa T1 по сравнению с интактными клетками наблюдали практически во всех образцах. Исключение составили хехст42 и 5-azaC, а наиболее зачительные изменения наблюдали при действии трихостатина А (TSA). Уровень метилирования H3K9me3 при обработке УБЛ не отличался от контрольного уровня.

### 3.2.2. Изменение уровня метилирования ДНК при действии узкобороздочных лигандов

Важным показателем эпигенетической активности ксенобиотиков является изменение уровня метилирования ДНК.



**Рисунок 12** - Изменение уровня метилирования ДНК при действии УБЛ. (А) Изменение общего уровня метилирования ДНК. Данные ELISA. (Б) Изменение уровня метилирования в области LTR. Результаты ПЦР реального времени (★- уровень метилирования статистически значимо отличен от контроля,  $p < 0,01$ ) (В) Изменение метилирования в области LTR при действии хехст33342 и хехст33258. Данные получены с помощью метода бисульфитного секвенирования. Также показаны проточной цитофлуориметрии с указанием доли GFP-положительных клеток. Метилированные CpG пары обозначены в виде черных кружков, неметилированные – в виде белых

Интегральный уровень метилирования ДНК изучали с помощью метода иммуноферментного анализа ELISA с использованием ДНК-метил-связывающих доменов и антител, которые специфически распознают метилированную ДНК. Данные эксперимента свидетельствовали (Рисунок 12А) о незначительном изменении общего уровня метилирования ДНК в клетках HeLa TI после инкубации с УБЛ.

Поскольку изменение интегрального уровня метилирования ДНК после обработки клеток было незначительным, исследовали изменение уровня метилирования промотора GFP в клетках HeLa TI. Ранее было показано, что основное влияние на экспрессию GFP в HeLa TI оказывает метилирование области LTR.

При использовании метода метилчувствительной ПЦР было показано влияние некоторых из исследуемых агентов на метилирование LTR в области сайта старта транскрипции (Рисунок 12Б). Статистически значимое ( $p < 0,01$ ) снижение метилирования ДНК LTR в локусе старта транскрипции было выявлено при обработке клеток HeLa TI 5-azaC (контроль) и хехст58. Важно, что после обработки клеток хехст42 уровень метилирования LTR оставался неизменным, в то время как инкубация HeLa TI с хехст58 приводила к снижению уровня метилирования. Для подтверждения полученных данных был проведен анализ метилирования области LTR методом бисульфитного секвенирования в образцах HeLa TI, которые были обработаны УБЛ и контрольными препаратами (Рисунок 12В). В анализ было включено 10-20 отдельных клонов для каждого из участков. Параллельно методом проточной цитофлуориметрии контролировали уровень флуоресценции. В качестве положительного контроля выступали соединения с известной эпигенетической активностью: было продемонстрировано снижение уровня метилирования при действии 5-azaC (36%) и отсутствие влияния TSA (79%). Было показано, что обработка хехст42 не приводила к изменению уровня метилирования LTR, что согласуется с данными, полученными методом метилчувствительной ПЦР. При обработке клеток хехст58 наблюдали снижение уровня метилирования до 56%.

#### **4. МУТАГЕННЫЕ, РЕКОМБИНОГЕННЫЕ И БЛАСТОМОГЕННЫЕ СВОЙСТВА УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ**

Поскольку ранее нами было показано, что некоторые из исследуемых узкобороздочных лигандов обладают способностью ингибировать топоизомеразу I, что может являться причиной накопления одноцепочечных разрывов, была исследована потенциальная канцерогенность УБЛ в краткосрочных тестах.

##### **4.1. Отсутствие мутагенных свойств у узкобороздочных лигандов в тесте Эймса**

Для экспериментов были взяты классические узкобороздочные лиганды хехст33342, хехст33258, DAPI, диминазен и пентамидин, а также карбазольное производное CBL0175. Для

тестирования были использованы индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* TA100 (сдвиг рамки считывания) и TA98 (замена пар оснований). В качестве положительных контролей были использованы вещества, индуцирующие мутации у соответствующих штаммов-тестеров при наличии или в отсутствие активации смесью S9. Эксперименты по индукции реверсий у сальмонеллы в основной модификации теста Эймса на штаммах TA98 и TA100 в широком диапазоне концентраций показали, что хехст33258, хехст33342, диминазен, пентамидин, DAPI, а также кураксин CBL0137 не обладают мутагенной активностью. Они не вызывают мутации типа замены пар оснований или сдвига рамки считывания, как в присутствии, так и в отсутствие активирующей микросомальной смеси S9.

#### **4.2. Отсутствие генотоксических свойств узкобороздочных лигандов в тесте на хромосомные aberrации**

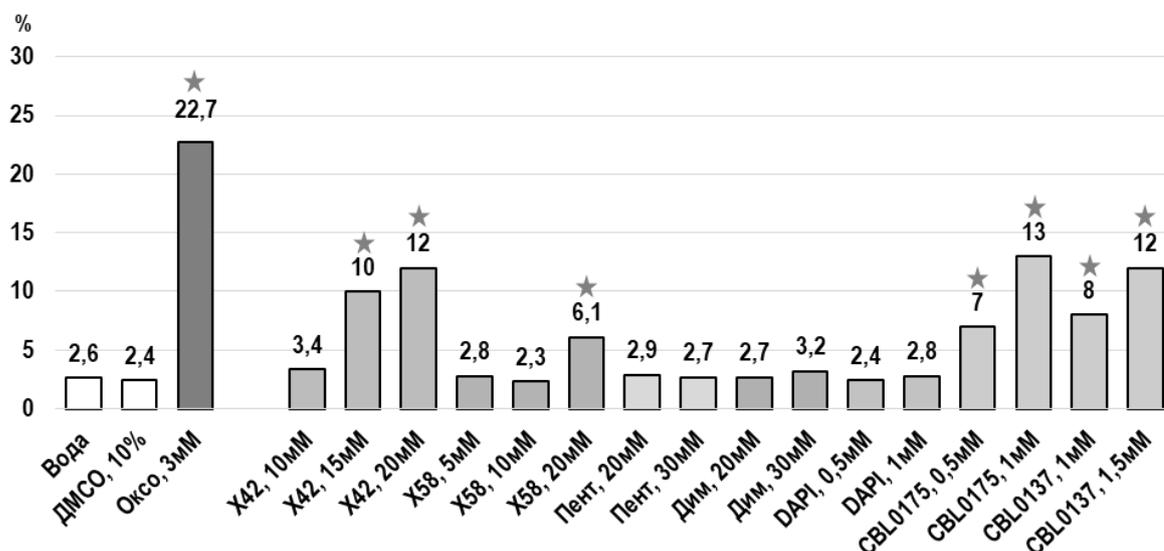
Далее было проведено исследование генотоксического действия УБЛ в тесте по учёту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей *in vivo*. Для эксперимента были использованы мыши линии C57Bl/6. Дозы препаратов рассчитывались исходя из данных о максимально переносимых дозах для этих соединений, полученных их литературных источников. При введении мышам ни один из исследуемых узкобороздочных лигандов статистически значимо не увеличивал частоту появления хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей линии C57Bl/6, в то время как циклофосфамид и доксорубицин вызывали статистически значимое увеличение числа хромосомных аномалий.

#### **4.3. Активность узкобороздочных лигандов в тесте на мутагенную, рекомбиногенную и бластомогенную активность на *Drosophila melanogaster***

Эта серия экспериментов была посвящена исследованию потенциальной канцерогенной активности УБЛ на гетерозиготных по гену *wts* *Drosophila melanogaster*. Соединения добавляли в питательную среду к личинкам, спустя не более чем 48 часов от откладки яйца. В качестве отрицательного контроля использовали дистиллированную воду или 10% DMSO. В качестве положительного контроля был использован оксоплатин в концентрации 3мМ. Концентрации тестируемых веществ были подобраны на основании предварительных экспериментов, исходя из токсических свойств агента.

Частота спонтанного мозаицизма в контрольной группе составила: для воды – 2,4%, для 10% ДМСО – 2,6% (Рисунок 13). Частота появления опухолевых клонов у гетерозигот по *wts*<sup>P4</sup> при индукции раствором оксоплатина составила 22,7%. Статистически значимое увеличение частоты образования опухолевых клонов в сравнении с контролем было зарегистрировано для некоторых УБЛ. Так, при обработке личинок растворами хехст33342 и хехст33258 больших концентраций частота появления опухолевых клонов по сравнению с контролем выросла в 4,6 и

в 2,3 раза и составила 12% и 6,1% соответственно. Кураксины также индуцировали опухолевые клоны, частота которых по сравнению с контролем возрастала в 4,6-5 раз. При действии таких УБЛ как DAPI, диминазен и пентамидин увеличения уровня соматического мозаицизма зарегистрировано не было.



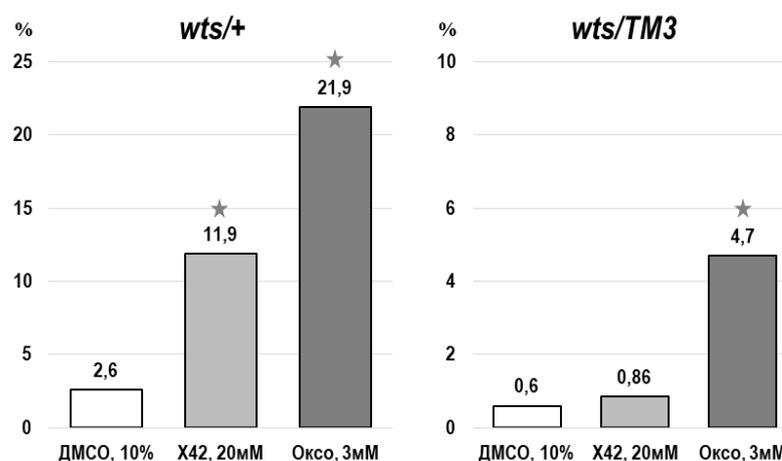
**Рисунок 13** - Частота появления опухолевых клонов при индуцированном узкобороздочными лигандами у гетерозигот по гену-супрессору *wts* (Оксо – оксоплатин, X42–Хехст33342, X58–Хехст33258, Пент–Пентамидин, Дим–Диминазен, ★-частота образования опухолей значимо выше частоты появления клонов у контрольной группы при использовании критерия Фишера,  $p < 0,01$ )

#### 4.4. Влияние узкобороздочных лигандов на запуск гомологичной рекомбинации

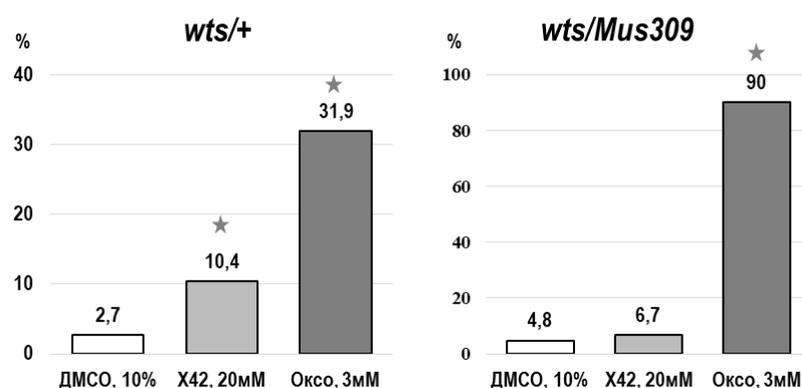
Для блокирования соматической рекомбинации была использована хромосома-балансер ТМЗ. Такая хромосома имеет многочисленные инвертированные повторы, что при рекомбинации приводит к образованию хромосом с двумя центромерами или ее отсутствию, препятствуя дальнейшему делению клетки. В качестве мутагенного агента использовался оксоплатин, вызывающий появление межмолекулярных и внутрицепочечных сшивок ДНК. Оксоплатин проявляет активность как в тестах на мутагенез (тест Эймса), так и в тесте на соматические мутации и рекомбинации (SMART).

Было продемонстрировано, что использование балансерной хромосомы подавляет бластомогенную активность хехст33342. Количество опухолей при обработке этим агентом оставалось на уровне контроля, в то же время при индукции опухолей оксоплатином, их количество возрастало (Рисунок 14). Также было показано, что наличие мутации по гену *Mus309*, который кодирует один из основных белков соматической рекомбинации и репарации у *Drosophila*, частота появления опухолей возрастает. При обработке особей оксоплатином частота появления опухолевых клонов возрастает в несколько раз, тогда как действие хехст33342 не оказывает такого эффекта (Рисунок 15). Эти результаты демонстрируют, что

причиной увеличения частоты появления опухолевых клонов при действии УБЛ является индукция соматической рекомбинации.



**Рисунок 14** - Частота появления опухолевых клонов у гетерозигот *wts/+* и *wts/TM3*. (Оксо – оксоплатин, X42–Хехст33342, ★-частота образования опухолей значимо выше частоты появления клонов у контрольной группы при использовании критерия Фишера,  $p < 0,01$ )

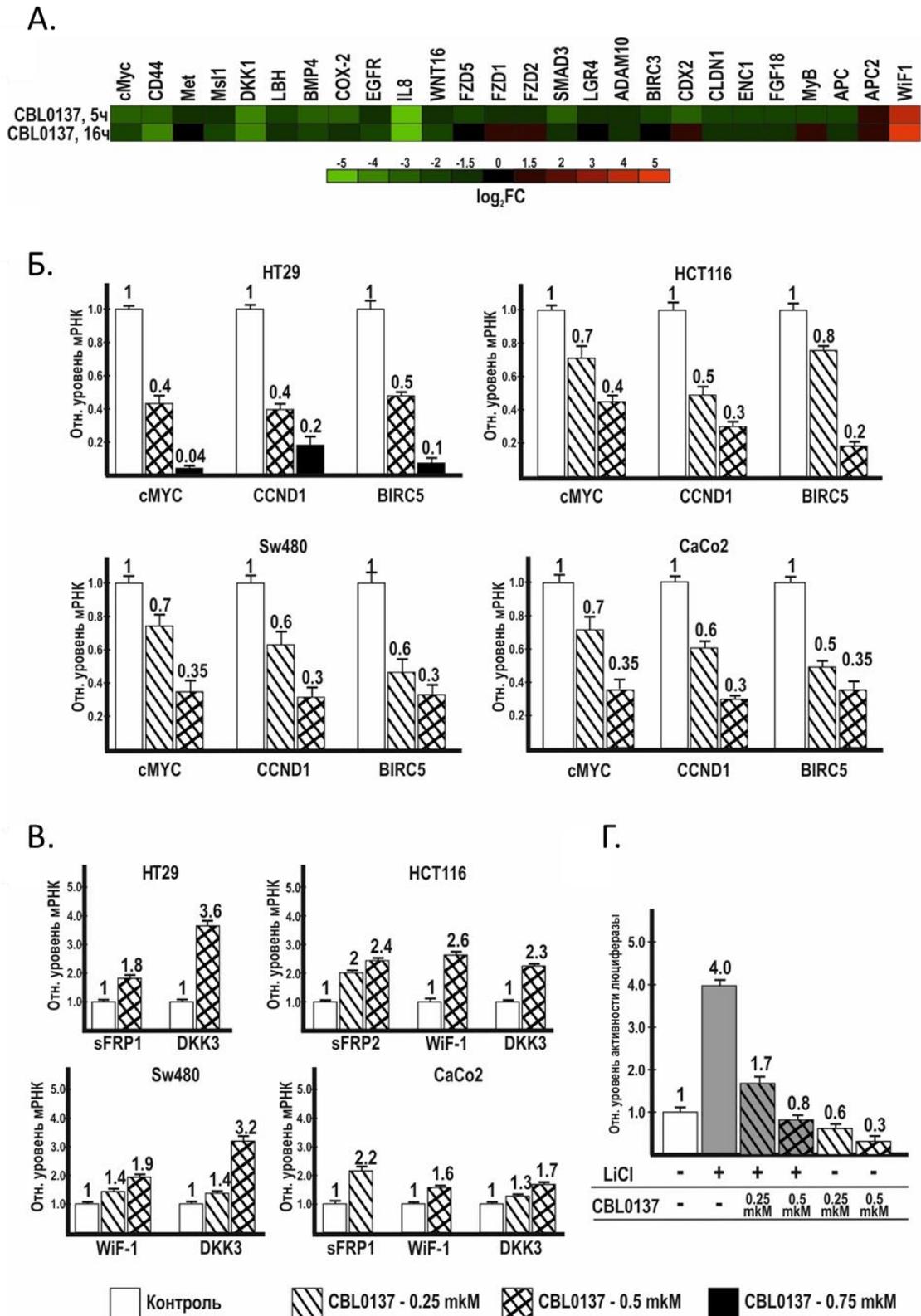


**Рисунок 15** - Влияние мутации в гене RecQ-хеликазы *dmBLM* (*mus309*) на частоту образования опухолей при индукции Оксоплатином и Хехст33342 и без неё (Оксо – оксоплатин, X42–Хехст33342, ★-частота образования опухолей значимо выше частоты появления клонов у контрольной группы при использовании критерия Фишера,  $p < 0,01$ )

## 5. АНТИКАНЦЕРОГЕННЫЕ СВОЙСТВА КУРАКСИНА СВL0137

### 5.1. Влияние кураксина СВL0137 на активность сигнального пути WNT

На клетках НСТ116 был изучен профиль экспрессии генов, ассоциированных с сигнальным путем WNT, в интактных клетках и клетках, которые инкубировались с кураксином (0, 5мкМ) в течение 5 и 16 часов. Было продемонстрировано, что при обработке соединением происходит снижение экспрессии рецепторов WNT-сигнального пути FZD1, FZD2 и FZD5, а также 18 таргетных генов этого сигнального пути. Напротив, уровень мРНК генов, белки которых осуществляют негативную регуляцию этого сигналинга, возрастало. Так, относительное количество мРНК генов APC и WIF1 увеличилось в 2,8 и в 37 раз соответственно (Рисунок 16А).

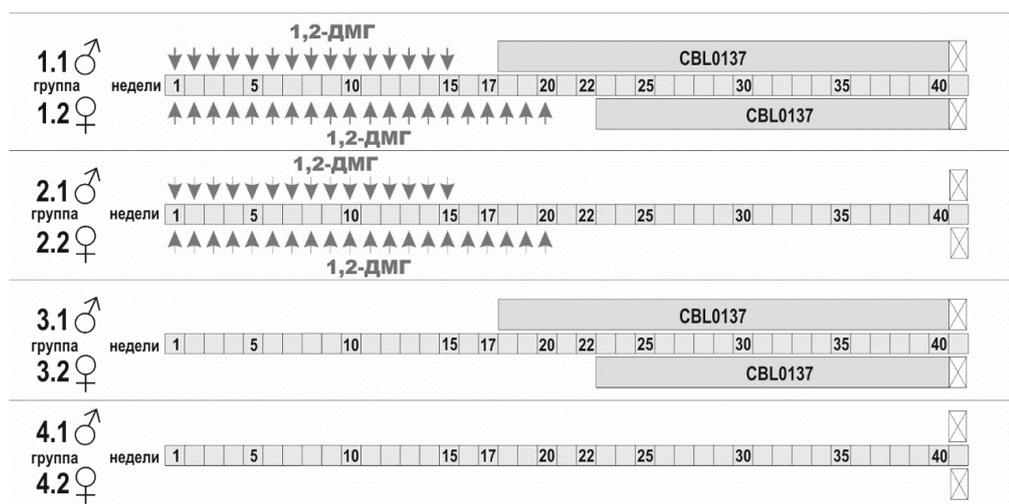


**Рисунок 16** - Влияние кураксина CBL0137 на активность сигнального пути. А. Влияние кураксина CBL0137 (0, 5 мкМ, клетки HCT116, обработка в течение 5 и 16 часов); Б, В. Влияние кураксина на уровень экспрессии основных таргетных генов сигнального пути WNT на клеточных линиях HT29, HCT116, SW480, CaCo2 (0,25-0,75 мкМ, 24 часа); Г. Влияние кураксина на экспрессию гена люциферазы под контролем промотора, содержащего TCF/LEF-респонсивные последовательности.

Для дальнейшего изучения влияния кураксина на активность сигнального пути WNT была проанализирована экспрессия основных таргетных генов этого сигналинга на клеточных линиях HT29, HCT116, SW480, Caco2. Клетки инкубировали в среде с различными концентрациями CBL0137 (0,25 мкМ, 0,5 мкМ или 0,75 мкМ) в течение 48 часов. Анализ экспрессии проводили с помощью метода ПЦР реального времени. Дозозависимое ингибирование экспрессии было показано для трех транскрипционных мишеней  $\beta$ -катенина: *Cyclin D1* (активация пролиферации), *CMYC* (активация пролиферации, ингибирование апоптоза) и *Survivin (Birc5)* (ингибирование апоптоза) (Рисунок 16Б). С другой стороны, для генов, которые являются негативными регуляторами этого сигнального пути, *DKK3*, *SFRP1* и *WIF-1*, было зарегистрировано увеличение экспрессии (Рисунок 16В). Для того, чтобы подтвердить, что наблюдаемое снижение экспрессии генов опосредовано влиянием кураксина на сигнальный путь WNT, мы использовали линию клеток HCT116, в геном которой был интегрирован вектор, несущий ген люциферазы под контролем промотора, содержащего TCF/LEF-респонсивные последовательности. При обработке клеток кураксином мы наблюдали дозозависимое падение уровня экспрессии люциферазы (Рисунок 16Г). При активации сигнального пути WNT с помощью LiCl (ингибитор GSK3 $\beta$ ) обработка клеток кураксином приводила к снижению сигнала в 5 раз.

## 5.2. Анतिकанцерогенная активность кураксина CBL0137 *in vivo*

В хроническом эксперименте *in vivo* на мышах CBA была изучена способность кураксина CBL0137 ингибировать канцерогенное действие 1,2-диметилгидразина (1,2-ДМГ) на клетки кишечника и других органов. Схема эксперимента представлена на рисунке 17.



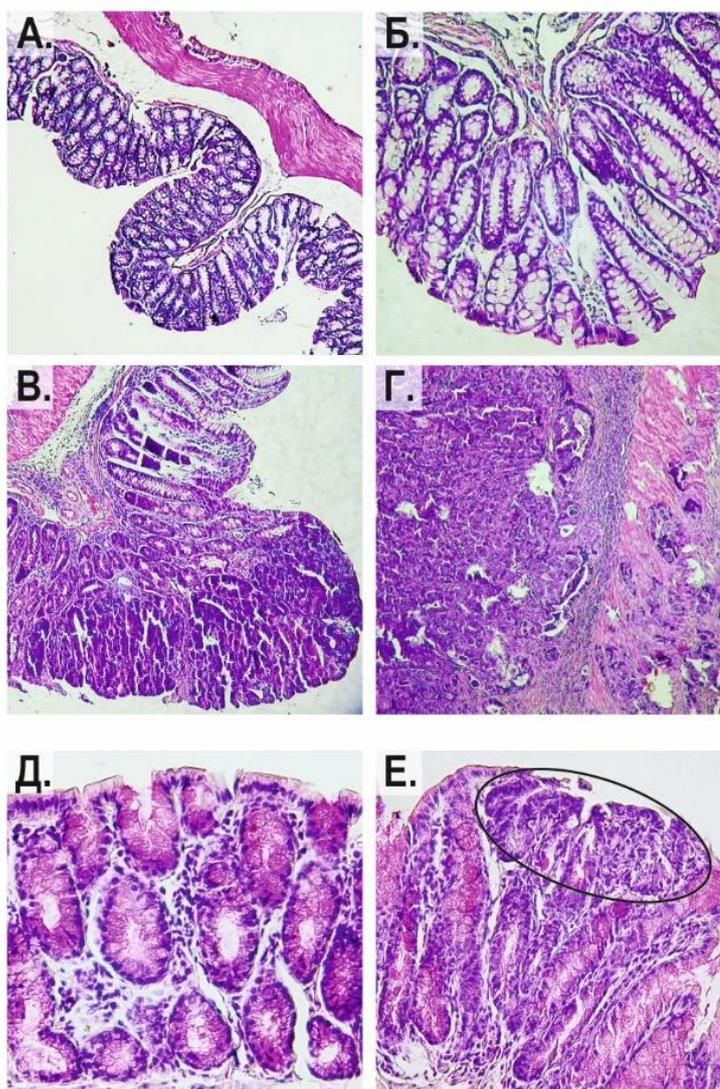
**Рисунок 17** - Общая схема эксперимента

В ходе эксперимента общее состояние животных, оцениваемое по их двигательной активности и реакции на раздражители, было одинаковым для мышей всех четырех экспериментальных групп. К моменту окончания эксперимента статистически значимой

разницы в средней массе мышей группы 1 в сравнении с группой 2, а также мышей группы 3 в сравнении с животными группы 4 обнаружено не было. Таким образом, сам по себе CBL0137 не оказывал никакого влияния на массу тела животного.

По истечении 40 недель животных вскрывали и проводили макроскопическое обследование внутренних органов и их взвешивание, затем все ткани фиксировали для дальнейшего гистологического освидетельствования.

**Толстая кишка.** Полученные гистологические срезы анализировали на наличие аденом и аденокарцином, регистрировали множественность опухолей, а также оценивали частоту появления фокусов с нарушенной секрецией муцина. Фокусы с нарушенной секрецией муцина представляют собой участки кишки, которые состоят из нескольких бокаловидных клеток, не продуцирующих муцин; они считаются проявлением высокой степени дисплазии и относятся к пренеопластическим изменениям (Рисунок 18).

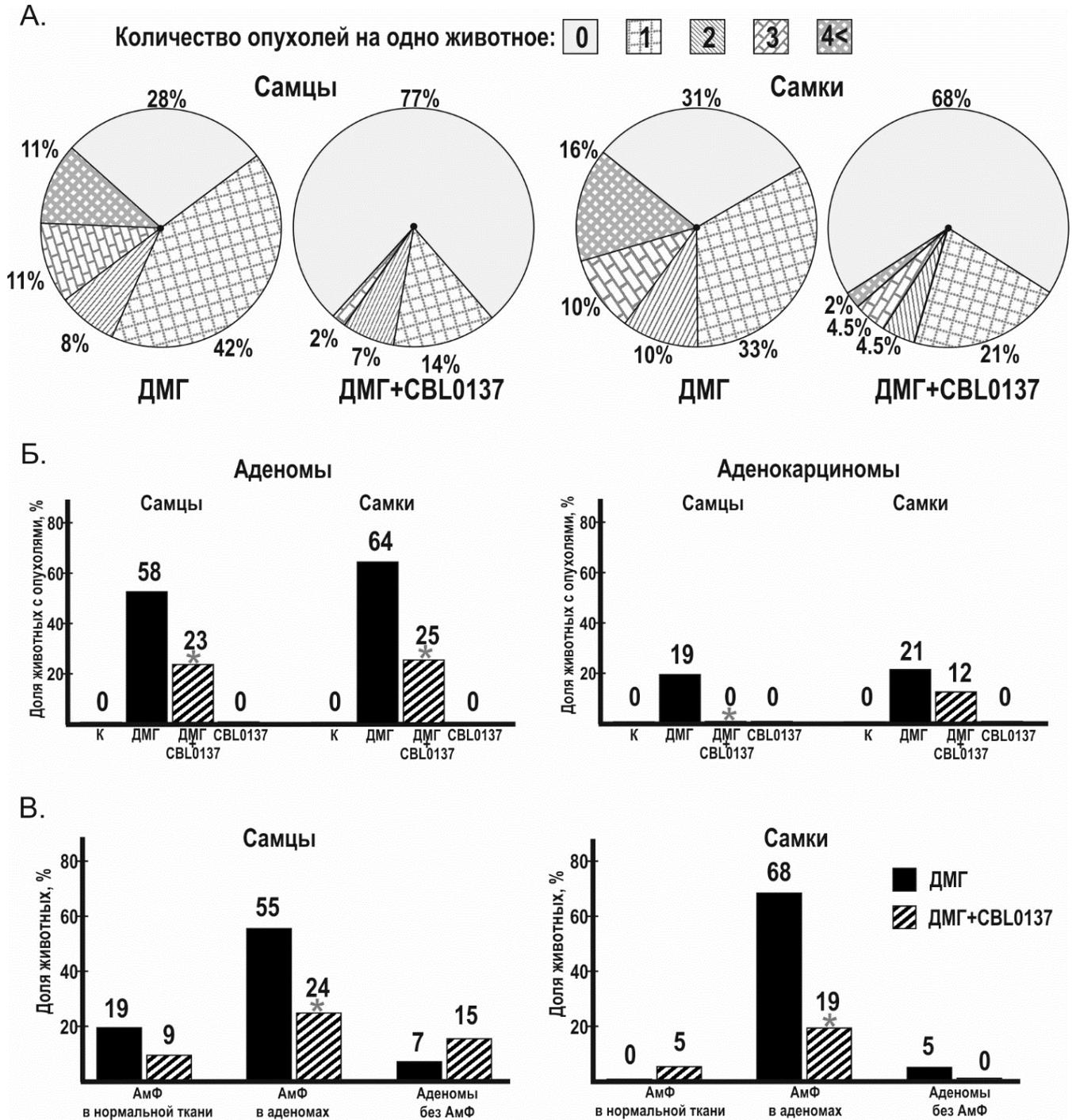


**Рисунок 18** - Микрофотографии срезов кишечника. (А-Г) Окраска гематоксилин-эозином (А, Б) Нормальный эпителий кишечника (х40; х200) (В) Аденома (х200) (Г) Аденокарцинома (х200) (Д,Е) Окраска муцикармином. (Д) Нормальный муцин-продуцирующий эпителий (х400) (Е) Фокус с нарушением продукции муцина в аденоме (х400)

В исследованных образцах, полученных от мышей групп 3 и 4, признаков пренеопластических или неопластических изменений эпителия кишечника обнаружено не было. Таким образом, аденомы, аденокарциномы толстой кишки и фокусы, обедненные муцином, были обнаружены только в тканях животных, получавших 1,2-ДМГ.

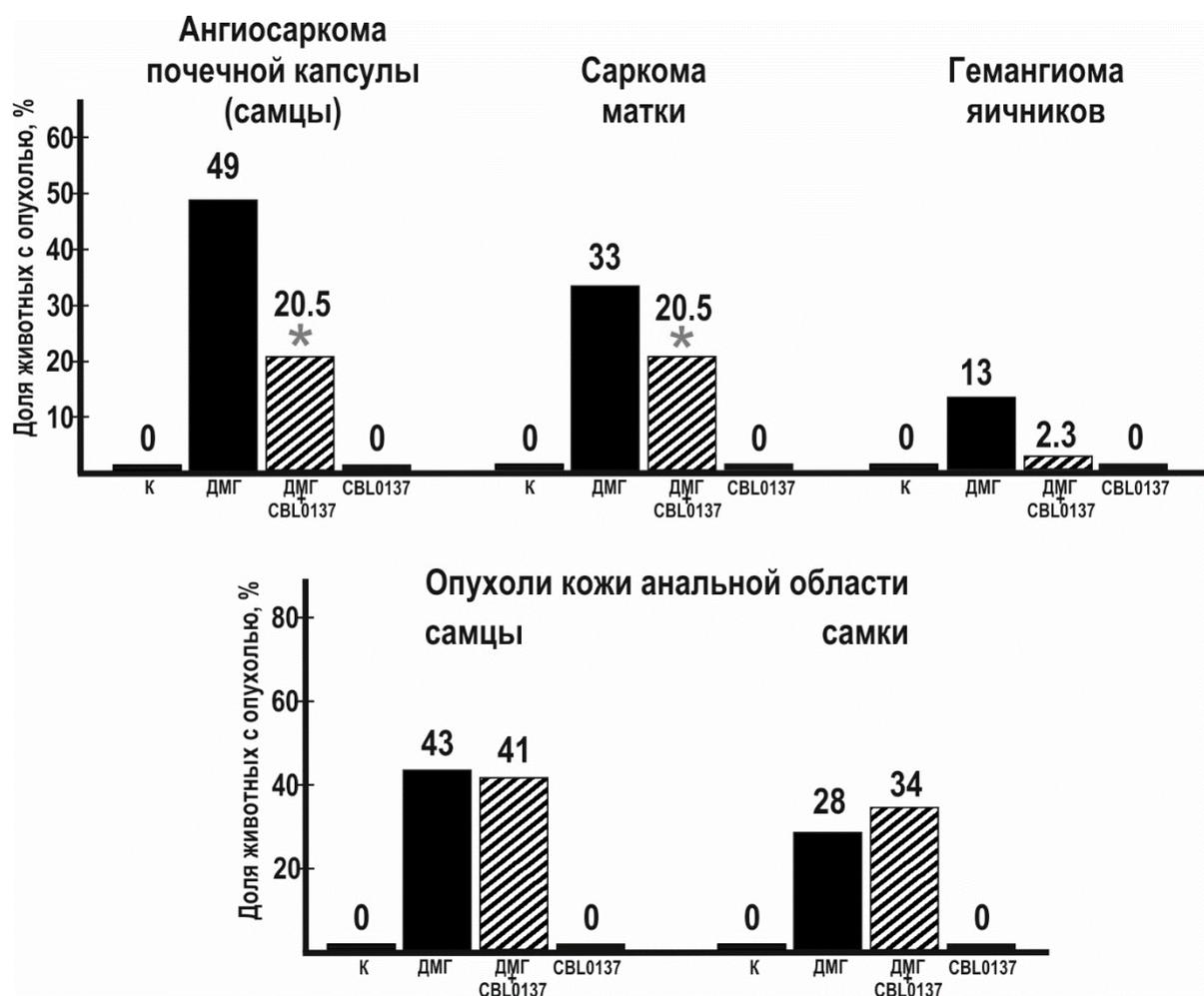
Сравнения частоты появления аденом и аденокарцином, а также множественность этих новообразований у животных групп 1 и 2 выявили значительное антиканцерогенное действие кураксина на данной модели (Рисунок 19). Среди 37 самцов, получавших 1,2-ДМГ, опухоли не были обнаружены у 28% животных, у 42% развилась единичная опухоль, а у 30% было найдено более 2 опухолей (Рисунок 19А). Тогда как среди 44 самцов, получавших 1,2-ДМГ и СВL0137, опухоли не развивались у 77% животных, у 14% была 1 опухоль, и только у 4 животных (9%) было более 2 опухолей. Аналогичный антиканцерогенный эффект был зарегистрирован в группе самок. В группе из 39 мышей, которым давали только 1,2-ДМГ, у 28% мышей не развивались опухоли толстой кишки, у 33% развивалась одна опухоль и у 36% развивалось более 2 опухолей. Из 44 самок, получавших и 1,2-ДМГ и СВL0137, 69% животных не имели опухолей, у 21% животных развилась 1 опухоль и только у 11% были обнаружены 2 или более опухолей. Множественность аденом у самок группы 1,2-ДМГ+СВL0137 уменьшилась в 3,7 раз по сравнению с множественностью аденом у мышей группы 1,2-ДМГ (6,1 аденомы/мышь против 1,6). Таким образом, потребление кураксина СВL0137 мышами после инъекций 1,2-ДМГ значительно увеличила долю животных без опухолей и уменьшила множественность новообразований. При этом разница в доле животных с аденомами между группами 1,2-ДМГ и группами 1,2-ДМГ+СВL0137 была статистически значимой ( $p < 0,01$ ) как для самцов (54% и 23% соответственно), так и для самок (64% и 25% соответственно) (Рисунок 19Б). Введение СВL0137 аналогичным образом изменило пропорции животных с аденокарциномами, но статистически значимая разница была зарегистрирована только между группами самцов. Примечательно, что у самцов при введении СВL0137 после 1,2-ДМГ аденокарцином не образовывалось, тогда как в группе ДМГ злокачественные новообразования были зарегистрированы у 19% животных. У самок доля животных с аденокарциномами уменьшалась с 21% (1,2-ДМГ) до 12% (1,2-ДМГ+СВL0137). Мы показали, что частота аденом с амуциновыми фокусами у мышей, получавших и СВL0137 и 1,2-ДМГ значительно снижена по сравнению с мышами группы ДМГ (24% против 55% у самцов и 19% против 68% у самок) (Рисунок 19В). Помимо этого, введение СВL0137 привело к снижению доли самцов с такими фокусами в нормальной ткани (9% - в группе 1,2-ДМГ+СВL0137 против 19% - в группе 1,2-ДМГ), однако эта разница не носила статистически значимый характер. У самок таких закономерностей выявить не удалось. Это связано с тем, что из проанализированных срезов нормальной ткани толстой кишки у самок, получавших 1,2-ДМГ+СВL0137, фокусы с

нарушенной секрецией муцина были найдены у 1 животного, а в группе 1,2-ДМГ таких изменений найдено не было.



**Рисунок 19** - Антиканцерогенная активность CBL0137 относительно РТК, индуцированного 1,2-ДМГ. (А) Множественность новообразований кишечника (Б) Доля животных с опухолями (В) Частота выявления фокусов с нарушенной секрецией муцина (ДМГ – 1,2-ДМГ; \* - частота события в данной группе статистически значимо отличается от частоты соответствующих событий в группе 1,2-ДМГ ( $\chi^2$ ;  $p < 0,01$ ))

В ходе эксперимента также были получены данные по влиянию CBL0137 на частоту образования таких опухолей, как ангиосаркома почеченой капсулы, саркома матки, гемангиома яичников, опухоли кожи анальной области (Рисунок 20). Статистически значимые различия в количестве опухолей, индуцированных 1,2-ДМГ, между группами, получавшими и не получавшими кураксин, были получены для ангиосарком почечной капсулы у самцов и сарком матки у самок.



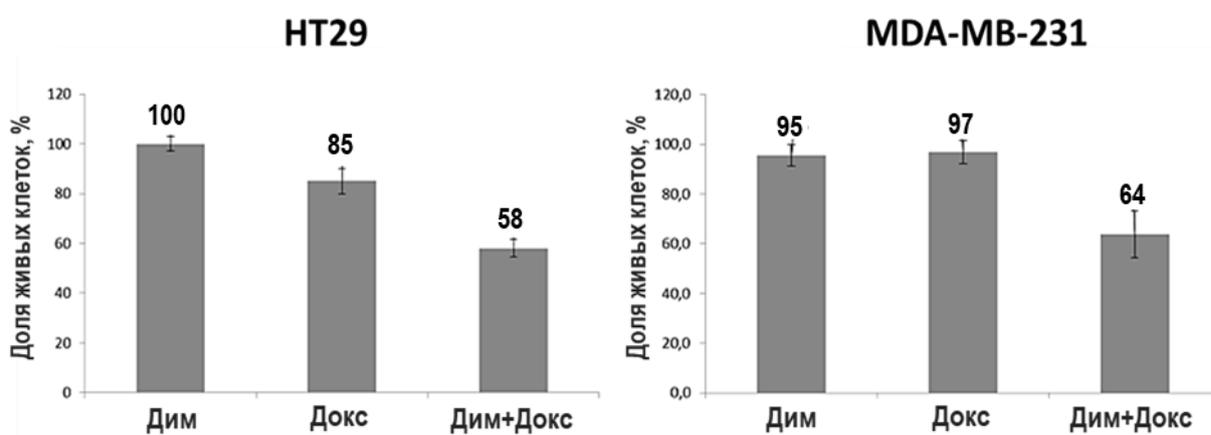
**Рисунок 20** - Влияние CBL0137 на частоту опухолей при индукции канцерогенеза 1,2-ДМГ (ДМГ – 1,2-ДМГ; \* - частота появления опухолей в данной группе статистически значимо отличается от частоты появления опухолей в группе 1,2-ДМГ ( $\chi^2$ ;  $p < 0,05$ ))

В целом, наши результаты показывают, что CBL0137 является эффективным ингибитором сигнального пути WNT в клетках рака толстой кишки. Вместе с ранее продемонстрированной способностью ингибировать NF $\kappa$ B и противовоспалительной активностью CBL0137, подавление сигнального пути WNT объясняет высокую антиканцерогенную активность кураксина относительно рака толстой кишки, наблюдаемую при индукции опухолей у мышей. Помимо этого, полученные данные подчеркивают высокий потенциал CBL0137 в качестве противоопухолевого агента относительно широкого круга опухолей, развитие которых ассоциировано с aberrантной активацией сигнального пути WNT.

## 6. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ *IN VITRO* И *IN VIVO*

### 6.1. Влияние УБЛ на эффективность действия цитостатиков на культурах опухолевых клеток

Оценку влияния УБЛ на эффективность действия цитостатиков проводили на клетках линий рака молочной железы MDA-MB-231 и рака толстой кишки HT29. Цитотоксичность препаратов и их комбинаций определяли с помощью теста МТТ (Рисунок 21). Было показано, что при действии диминазена и доксорубина на клетки рака толстой кишки и рака молочной железы наблюдается синергический эффект действия препаратов (для HT29 –  $0+15 \neq 42$ , для MDA-MB 231 –  $5+3 \neq 36$ ), тогда как при совместном действии диминазена и цисплатина эффект был близок к аддитивному.



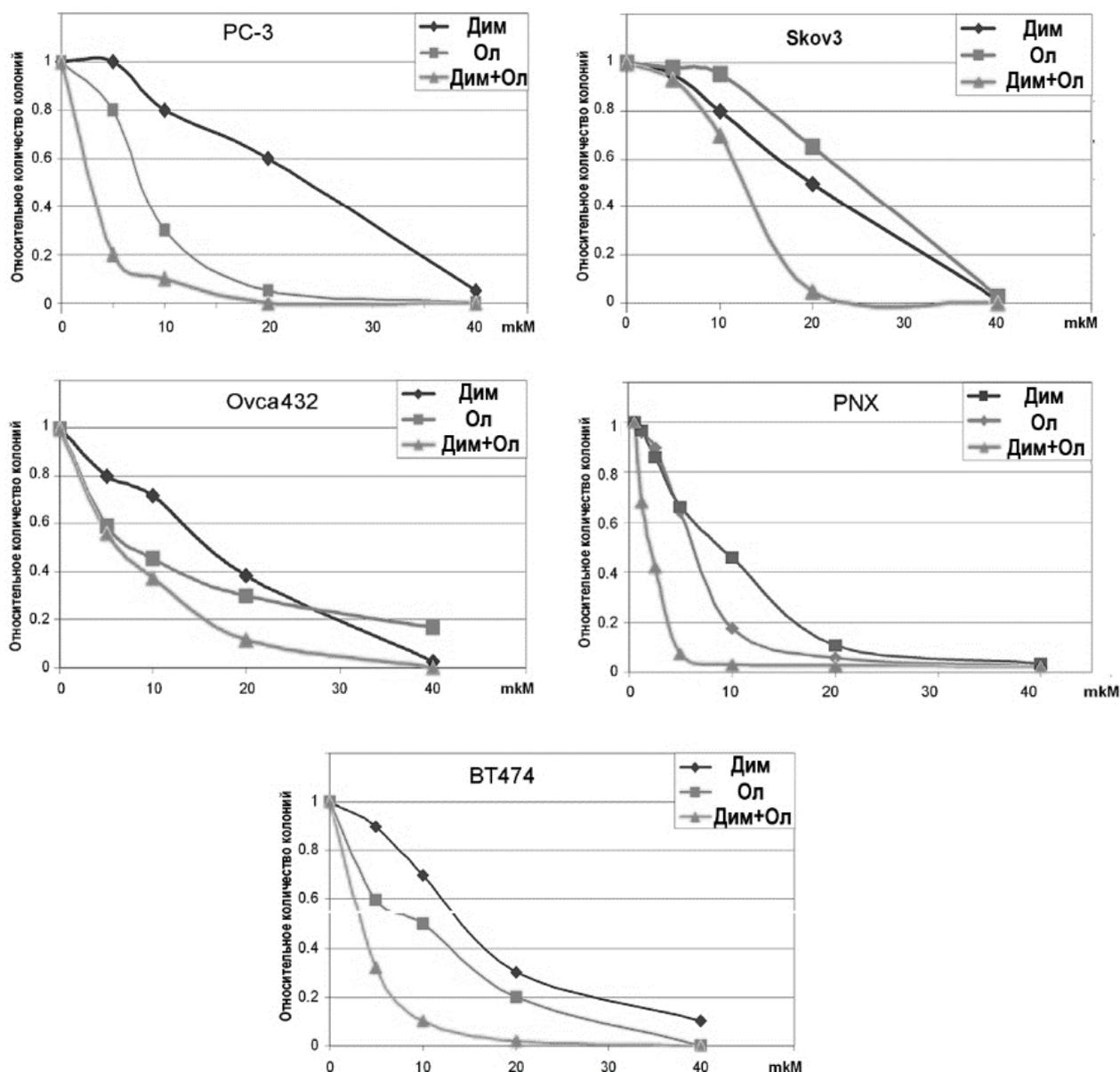
**Рисунок 21** - Цитотоксическая активность препаратов и их комбинаций при действии на клетки линий HT29 и MDA-MB-231 (Дим – диминазен, ЦП – цисплатин, Докс – доксорубин). Данные представлены как  $M \pm m$

### 6.2. Комбинированные эффекты диминазена и олапариба

Поскольку ингибирование фермента PARP1 узкобороздочными лигандами происходит по механизму, отличному от действия препаратов, которые используются в настоящее время, одним из подходов к увеличению эффективности терапии может являться совместное применение УБЛ, разобщающих связь фермента с ДНК, и соединений, которые блокируют активный центр PARP1 (4-амино-1,8-нафталимид, олапариб, рукабариб и т.д.).

Было проведено исследование влияния совместного действия олапариба и диминазена на онкогенный потенциал опухолевых клеток методом анализа способности опухолевых клеток образовывать колонии (clonogenic assay) в разреженной популяции (Рисунок 22). На линиях клеток рака молочной железы (BT474), рака простаты (PC3), рака яичников (Skov3 и Ovca432), а также рака почек (PNX) было показано, что каждая из линий имеет индивидуальную чувствительность к ингибиторам PARP1, но, несмотря на это, совместное применение

препаратов приводит к синергическому уменьшению количества колоний, а, следовательно, снижает онкогенный потенциал опухолевых клеток всех изученных линий.



**Рисунок 22** - Влияние диминазена (Дим), олапариба(Ол), а также их комбинации на способность опухолевых клеток формировать колонии

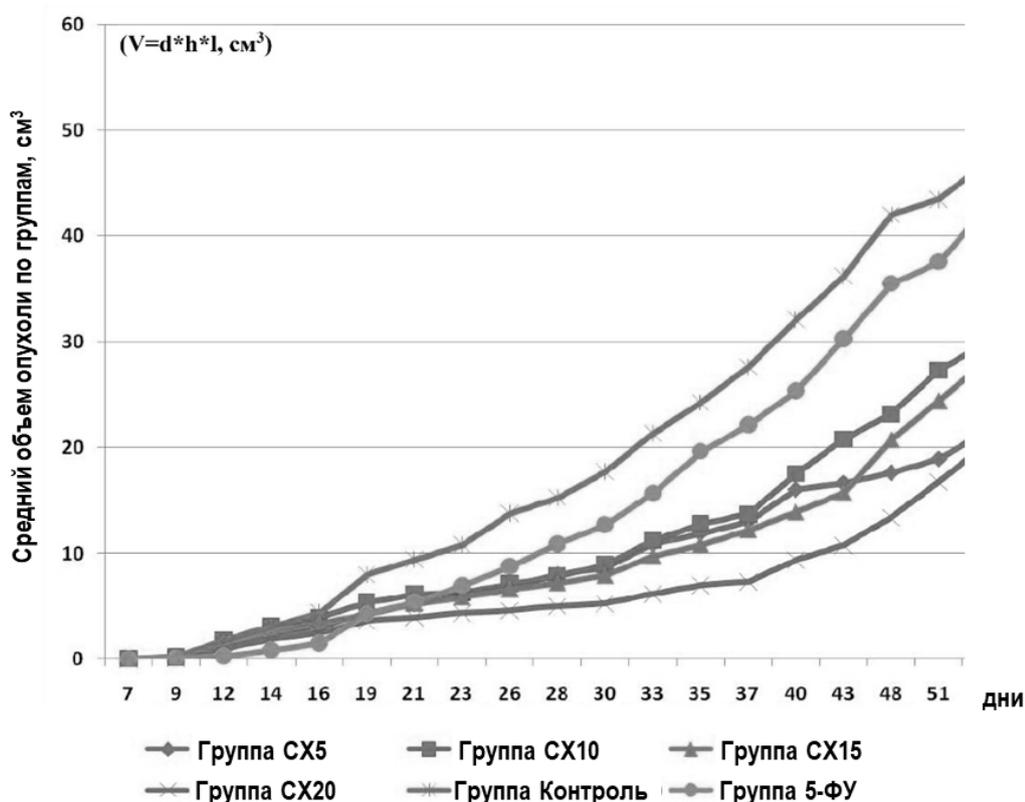
### 6.3. Влияние кураксина на рост перевиваемой аденокарциномы толстой кишки Акатол

В настоящем эксперименте были исследованы противоопухолевые эффекты кураксина в различных дозах (с определением зависимости доза-эффект) относительно перевиваемой опухоли кишечника Акатол.

Опухолевую массу вводили подкожно в правую подмышечную впадину всем самцам линии BALB/c одновременно. Животные были разделены на 6 групп по 25 особей: (1) Мышам группы К была перевита опухоль, далее вместо препарата вводился физраствор; (2-5) Мыши групп CX5, CX10, CX15 и CX20 получали кураксин CBL0137 в дозах 5, 10, 15, 20 мг/кг

соответственно, перорально с помощью гастрального зонда ежедневно до конца жизни; (6) Мышам группы 5-ФУ внутрибрюшинно вводили антиметаболит 5'-фторурацил в дозе 25 мг/кг ежедневно в течение 5 суток после перевивки. Оценку экспериментальных данных проводили по следующим критериям: (1) торможение роста опухоли; (2) продолжительность жизни животных.

**Торможение роста опухоли.** Данные по измерению объема перевиваемой опухоли представлены на рисунке 23. Сравнительный анализ данных по объему показал, что в течение первых 9 суток достоверных различий между опытными и контрольной группами не наблюдалось.



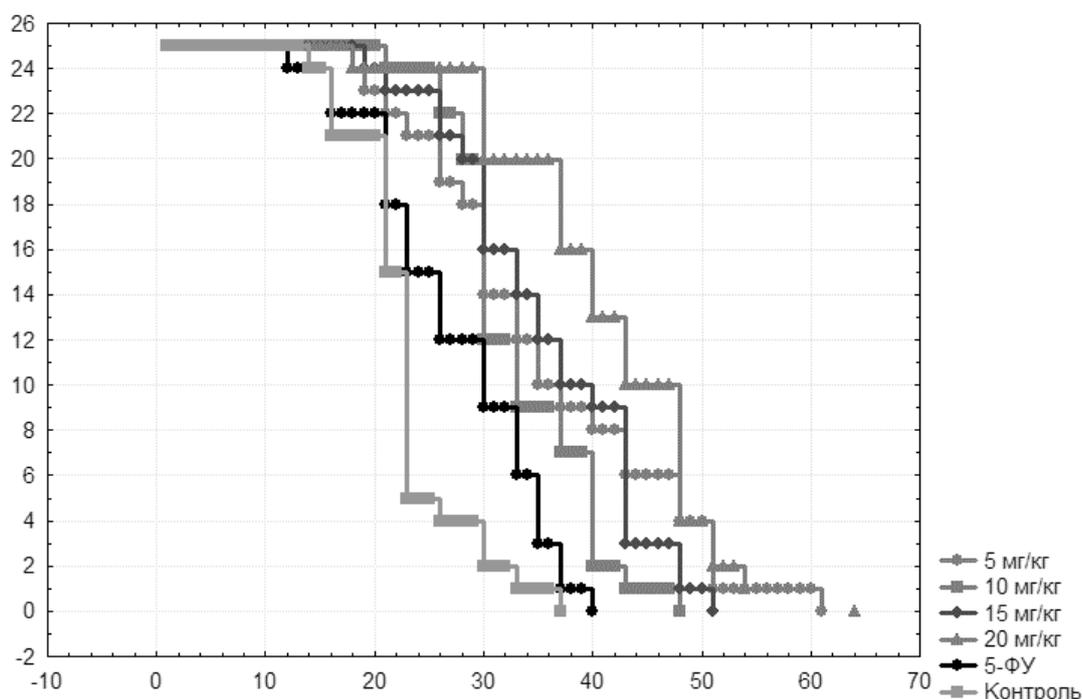
**Рисунок 23** - Динамика роста объема опухолевого узла по группам

К 12 суткам статистически значимое торможение роста опухоли по объему отмечалось только у мышей, получавших СВЛ0137 в дозе 20 мг/кг (43%) и 5-фторурацил (84%). С 19 суток и до завершения эксперимента у мышей, получавших СВЛ0137 наблюдалось статистически значимое торможение роста опухоли по объему. При этом наибольшая задержка в росте опухолевого узла в период с 12 по 54 сутки отмечалась в группе CX20 (на 37 сутки отмечено максимальное торможение роста опухоли – 74%).

**Продолжительность жизни животных.** Согласно современным документам, регламентирующим работу с экспериментальными животными, размер перевиваемой опухоли определяет выбывание экспериментального животного из группы. При этом учитываются 2 фактора: перевитая подкожно опухоль не должна вызывать нарушений жизненных функций

организма, а с другой стороны при чрезмерном увеличении объема модель теряет адекватность ситуации в клинической практике по соотношению массы опухоли и организма. В связи с этим при обработке результатов животное исключалось из экспериментальной группы при достижении опухолью определенного объема ( $V=d \cdot l \cdot h=10 \text{ см}^3$ ).

Статистически значимое увеличение продолжительности жизни при использовании такого подхода было показано для всех экспериментальных групп (Рисунок 24, Таблица 1). Максимальное увеличение продолжительности жизни наблюдалось для группы мышей, получавших 20 мг/кг СВL0137, и составило 81,7%. Даже при использовании наименьшей дозы препарата (5 мг/кг) было зафиксировано значительное увеличение продолжительности жизни. Эффект 5-ФУ при использованном в данном эксперименте был слабее.



**Рисунок 24** - Продолжительность жизни при выживании животного из группы по достижению объема опухоли  $10 \text{ см}^3$

**Таблица 1** - Продолжительность жизни мышей при выживании животного из группы по достижению объема опухоли  $10 \text{ см}^3$  (\* – статистически значимые различия по отношению к контрольной группе: \*\* –  $p < 0,01$ ; \* –  $p < 0,05$ )

Группа	Средняя продолжительность жизни мышей (сутки)	% увеличения продолжительности жизни
Группа К	$23 \pm 1$	
Группа СХ5	$35,6 \pm 2,2^{**}$	55
Группа СХ10	$33,3 \pm 1,2^{**}$	45
Группа СХ15	$35,7 \pm 1,7^{**}$	55
Группа СХ20	$41,7 \pm 1,9^{**}$	82
Группа 5-ФУ	$27,3 \pm 1,5^*$	19

Таким образом, на аллогraftной модели рака толстого кишечника Акатол было установлено противоопухолевое действие препарата.

#### **6.4. Противоопухолевое действие диминазена относительно перевиваемой саркомы матки 322**

Получив данные о способности Диминазена (Дим) сенситизировать опухолевые клетки к цитостатическим химиопрепаратам, было исследовано влияние диминазена при монотерапии и в комбинации с цисплатином (ЦП) или циклофосфамидом (ЦФ) на рост перевиваемой саркомы матки См 322.

Измельченная опухолевая масса вводилась подкожно в правую подмышечную впадину всем мышам-самкам линии СВА одновременно. Животные были разделены на 6 групп по 8-10 особей: (1) Группа К являлась отрицательным контролем, этим мышам была перевита опухоль и вводился физраствор; (2) Мыши группы ЦП внутрибрюшинно получали цисплатин в дозе 2,5 мг/кг на 3 и 6 день после перевивки; (3) Мышам группы ЦФ внутрибрюшинно вводился циклофосфамид в дозе 100 мг/кг на 3 и 6 день после перевивки; (4) Группа Дим получала диминазен в дозе 100 мг/кг на 1,3 и 5 дни после перевивки; (5) Мыши группы Дим+ЦП получали препараты в соответствии со схемами для групп Дим и ЦП; (6) Мышам группы Дим+ЦФ вводили соединения в соответствии со схемами для групп Дим и ЦФ. В ходе эксперимента оценивали: (1) торможение роста опухолей по объему; (2) продолжительность жизни животных.

**Торможение роста опухолей по объему.** Противоопухолевое действие Дим, ЦП и ЦФ оценивалось по результатам сопоставления среднего объема опухолей в контрольной и опытных группах. Введение одного диминазена вызвало статистически значимое торможение роста опухоли по сравнению с контрольной группой начиная с 6-х суток эксперимента. При комбинированном введении диминазена и цисплатина (Группа 5) отмечалось статистически значимое торможение роста опухолевого узла по сравнению с ЦП на 6, 8, 10, 15, 17, 29, 31 и 34 сутки. Таким образом, комбинированное действие диминазена и цисплатина было эффективнее, чем действие одного цисплатина. Дополнительное введение диминазена (группа Дим+ЦФ) не оказало существенного влияния на рост опухоли по сравнению с монотерапией одним циклофосфаном.

**Продолжительность жизни животных.** Продолжительность жизни у выживших мышей считалась на момент завершения эксперимента – 60 дней. В контрольной группе продолжительность жизни мышей составила 18,9 дней. При применении цисплатина и циклофосфана продолжительность жизни мышей увеличилась до 27,2 дня ( $p \leq 0,05$ ) и 53,4 дня ( $p \leq 0,001$ ) соответственно, при этом циклофосфан эффективнее тормозил рост опухоли, чем цисплатин.

Введение экспериментальным животным только Диминазена статистически значимо ( $p \leq 0,01$ ) увеличивало продолжительность жизни мышей (26,4 дня) по сравнению с контрольной

группой (18,9 дней). Комбинированное введение диминазен + цисплатин (35,3 дня) и диминазен + циклофосфан (45,6 дней) не увеличивало продолжительность жизни мышей по сравнению с мышами, получавшими только цисплатин (27,2 дней) или циклофосфан (53,4 дня).

### **6.5. Противоопухолевое действие диминазена относительно перевиваемой лимфомы P388**

Мы изучили влияние диминазена на рост перевиваемой лимфомы P388. В эксперименте использовалась перевивная лимфоцитарная лейкемия P388. Используемая опухоль P388 является солидной формой лимфоцитарной лейкемии.

Измельченная опухолевая масса вводилась подкожно в правую подмышечную впадину всем мышам линии BDF<sub>1</sub> одновременно. Введение тестируемых препаратов было начато во всех группах на момент появления первых узелков (12 сутки). Животные были разделены на 4 группы по 8-9 особей: (1) Группа К являлась отрицательным контролем, этим мышам была перевита опухоль и вводился физраствор; (2) Мыши группы ЦП получали цисплатин внутривентриально 3 раза в неделю в течение 1 недели в дозе 1,5 мг/кг (на 12, 14 и 16 сутки по перевивке); (3) Мышам группы Дим внутривентриально вводили диминазен 3 раза в неделю в течение 1 недели в дозе 100 мг/кг (на 12, 14 и 16 сутки по перевивке).

Противоопухолевое действие исследуемых соединений оценивалось по результатам сопоставления среднего объема опухолей в контрольной и опытных группах.

Анализ роста опухоли удалось провести только на 14 и 16 сутки, так как на 19 сутки в контрольной группе пали 6 животных из 9. На 14 сутки эксперимента наблюдалась тенденция к торможению роста опухолевого узла по сравнению с контролем в группе ЦП, тогда как в группе Дим эта разница была статистически значимой. На 16 сутки эксперимента тенденция к торможению роста опухолевого узла по сравнению с контролем также наблюдалась в обеих группах.

В группах ЦП и Дим продолжительность жизни мышей (21,9 и 23,7 дней соответственно) имела тенденцию к увеличению по сравнению продолжительностью жизни мышей контрольной группы К (19,4 дня), однако отличия были статистически не значимыми.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В последние десятилетия теория канцерогенеза подверглась определенному пересмотру. Ранее считалось, что динамика этого процесса определяется накоплением таких генетических изменений, как драйверные мутации в онкогенах и инактивирующие мутации в генах супрессоров опухолевого роста. К настоящему моменту стало понятно, что на процесс канцерогенеза может оказывать существенное влияние эпигенетическая регуляция транскрипции генов. Эпигенетический механизм канцерогенеза предполагает возможность

злокачественной трансформации клеток в результате наследуемых изменений экспрессии генов без изменения последовательности ДНК. Эпигенетически детерминированный профиль экспрессии генов представляет собой результат «настройки» уровня их транскрипции в зависимости от стадии дифференцировки клетки, от типа ткани, к которому эта клетка принадлежит, а также от воздействия эпигенетически активных факторов микроокружения и внешней среды. В качестве экзогенных агентов, способных оказывать влияние на основные компоненты системы эпигенетической регуляции транскрипции генов, могут выступать как различные компоненты питания и фармакологические препараты, так и экологические факторы. При этом, в отличие от мутагенов, их воздействие на эпигенетическую регуляцию до определенного момента обратимо. Связь генетических и эпигенетических изменений в процессе канцерогенеза представляется дорогой с двухсторонним движением. С одной стороны, генетические изменения могут влиять на эпигенетику, а с другой эпигеномные модификации могут служить основой для структурных изменений ДНК.

Эти данные требуют переосмысления и поиска новых направлений в профилактике онкологических заболеваний и терапии уже образовавшихся опухолей.

Несмотря на активное развитие исследований механизмов эпигенетической регуляции транскрипции, широкий скрининг эффектов как проканцерогенов, так и антиканцерогенов на реактивацию эпигенетически репрессированных генов не проводился ввиду отсутствия модельных систем, позволяющих выявлять такую активность интегрально, а не по отдельным типам изменений в определенных участках генома. Одним из первых решений, удовлетворяющих этим требованиям и позволяющим проводить массовое тестирование ксенобиотиков, стала разработанная нами система скрининга эпигенетически активных соединений на основе модифицированной клеточной системы HeLa. Результаты тестирования широкого круга эпигенетически активных соединений, а также исследование активности микросомных монооксигеназ, продемонстрировали, что HeLa TI может быть использована для скрининга эпигенетической активности ксенобиотиков, в том числе и тех, которые требуют метаболической активации. Ее использование открывает возможность отбора активных соединений, способных ингибировать в первую очередь действие убиквитарно распространенных не мутагенных канцерогенов типа пестицидов, гербицидов и фунгицидов.

Использование малых молекул с эпигенетической активностью может внести существенный вклад в терапию злокачественных опухолей.

Одним из основных компонентов лечения онкологических больных является противоопухолевая химиотерапия, в основе которой в настоящее время лежат два подхода. Первый основан на том, что опухолевые клетки размножаются более интенсивно, чем

соответствующие им нормальные, второй – таргетный, направлен на атипичные белковые структуры, возникающие в злокачественных клетках в результате генетических нарушений.

Генотоксические химиопрепараты первого поколения действуют на все активно размножающиеся клетки организма и направлена на уничтожение аберрантных клеток. В результате их действия происходит гибель как опухолевых клеток, так и нормальных клеток активно пролиферирующих тканей. Это определяет развитие таких побочных эффектов как нарушение гемопоэза, развитие гастроинтестинальной токсичности, появление алопеции. Более того, химиотерапия с применением генотоксических агентов не только является причиной возникновения вторых первичных опухолей, но также способствует генетической нестабильности и высокой мутационной изменчивости клеток самой опухоли. Это, в свою очередь, увеличивает скорость прогрессии опухоли и стимулирует появление более злокачественных и резистентных клонов.

Действие таргетных химиотерапевтических препаратов направлено на специфические мишени опухолевой клетки – белки, определяющие активацию пролиферации в результате возникших в опухолевых клетках генетических нарушений. Однако эти препараты оказались эффективными лишь для небольшой доли онкологических пациентов, в опухолях которых имеются соответствующие мутации и транслокации. При этом для многих таргетных препаратов проявился другой тканеспецифичный профиль токсичности. Это связано с высокой экспрессией таргетного белка не только в опухолях, но и в определенных тканях организма. Кроме того, одной из наиболее серьезных проблем современной химиотерапии опухолей является развитие резистентности к применяемым препаратам.

Новое направление, теоретическое и экспериментальное обоснование которого приводится в данной работе, предполагает использование специфических свойств малых ДНК-тропных молекул для направленной коррекции эпигенетической экспрессии генов путем модулирования активности ферментов метаболизма ДНК, её репарации, а также за счет изменений структуры хроматина. В этом исследовании продемонстрирована эффективность использования ДНК-тропных молекул в плане увеличения чувствительности опухолевых клеток к действию химиопрепаратов, а также перспективность их использования для химиопрофилактики канцерогенеза.

При выполнении данного исследования был получен ряд приоритетных научных результатов по молекулярным механизмам действия узкобороздочных лигандов на процесс канцерогенеза. В частности, удалось продемонстрировать, что все УБЛ обладают способностью дестабилизировать структуру нуклеосом, вызывая вытеснение из хроматина линкерного гистона H1 и привлечение гистонового шаперона FACT. Важным полученным результатом являются данные о способности УБЛ ингибировать белок-индуктор эксцизионной репарации

PARP1 путем разобщения взаимодействия белка с ДНК. Такой механизм ингибирования PARP1 был описан впервые и открывает перспективы использования этого класса соединений в противоопухолевой терапии в качестве ингибиторов PARP1, причем для повышения эффективности ингибирования репарации ДНК возможно их применение в комбинации с другими ингибиторами PARP1, имеющими отличный механизм действия. Кроме того, показано, что ингибирование PARP1 малыми ДНК-тропными молекулами приводит к активации транскрипции молчащих ретротранспозонов, следствием чего является индукция сигнального пути  $\text{INF-}\alpha$ . При исследовании канцерогенной безопасности использования УБЛ впервые было показано, что некоторые из ДНК-тропных молекул, не проявляя в краткосрочных тестах мутагенной и цитогенетической активности, могут выступать в роли рекомбиногенов, увеличивая частоту появления клеток с потерей гетерозиготности *in vivo*. Разработанная нами тест-система скрининга интегральной эпигенетической активности ксенобиотиков позволила протестировать широкий круг соединений, часть которых может быть использована для химиотерапии в качестве самостоятельных или вспомогательных препаратов.

При исследовании эффектов ДНК-тропных молекул *in vivo* было показано, что кураксин CBL0137 обладает антиканцерогенной активностью относительно рака толстого кишечника и саркомы матки, что связано с противовоспалительным действием этой молекулы и с её способностью ингибировать сигнальный путь WNT. Эффект по снижению частоты появления химически индуцированных злокачественных опухолей у мышей свидетельствует о перспективности развития стратегии профилактики злокачественных новообразований с использованием препаратов, обладающих аналогичным механизмом действия. Также в работе впервые была продемонстрирована способность диминазена увеличивать чувствительность опухолевых клеток к действию некоторых генотоксических и таргетных препаратов *in vitro* и *in vivo*, а также установлена противоопухолевая активность диминазена в отношении сарком матки и лимфом и кураксина в отношении опухолей толстой кишки и сарком матки.

Таким образом, полученные данные вносят существенный вклад в понимание механизмов действия малых ДНК-тропных соединений и являются основой для дальнейших исследований возможности использования агентов этого класса для профилактики канцерогенеза, а также открывают новое направление поиска факторов повышения эффективности химиотерапии путем направленной коррекции экспрессии и активности ферментов «домашнего хозяйства» опухолевой клетки с помощью этих молекул.

## ВЫВОДЫ

1. Узкобороздочные лиганды влияют на структуру и процессы компактизации хроматина, вызывая исключение линкерного гистона H1 из хроматина и релокализацию гистонового шаперона FАСТ.

2. АТ-специфические ДНК-тропные соединения способны ингибировать *in vitro* и *in vivo* ДНК-зависимую активацию фактора репарации PARP1 путем разобщения связи фермента с ДНК-активатором по конкурентному механизму.

3. При действии некоторых ДНК-тропных агентов происходит исключение PARP1 из зон конденсированного гетерохроматина, что приводит к реактивации экспрессии молчащих ретротраспозонов.

4. Некоторые из ДНК-тропных соединений, не проявляя мутагенных свойств, обладают потенциальной бластомогенной активностью за счет активации соматической рекомбинации.

5. Популяция клеток HeLa, несущая ретровирусный вектор с эпигенетически репрессированным репортерным геном зеленого флуоресцентного белка GFP, является адекватной тест-системой для скрининга химических соединений на способность реактивировать экспрессию генов.

6. Большинство соединений, взаимодействующих с малой бороздой ДНК, влияют на эпигенетическую регуляцию транскрипции.

7. Малые ДНК-тропные молекулы оказывают существенное влияние на профиль метилирования ДНК и модификации гистонов, что свидетельствует о перспективности дальнейшего системного изучения особенностей их эпигенетической активности.

8. Производное карбазола кураксин обладает значимой антиканцерогенной и противоопухолевой активностью относительно рака кишечника, что связано с его противовоспалительным действием и способностью ингибировать сигнальный путь WNT.

9. Диминазен обладает противоопухолевой активностью *in vivo* и *in vitro*, а также способен увеличивать чувствительность опухолевых клеток к действию генотоксических и таргетных препаратов.

10. Малые ДНК-тропные молекулы обладают широким спектром ДНК-опосредованной биологической активности, что позволяет рассматривать эти соединения в качестве перспективных модуляторов действия канцерогенов с целью профилактики канцерогенеза и модуляторов действия противоопухолевых препаратов с целью совершенствования противоопухолевой терапии.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Kirsanov, K.I. Prevention of colorectal carcinogenesis by DNA binding small molecule curaxin CBL0137 involves suppression of Wnt signaling / K.I. Kirsanov, T. Fetisov, E.A. Lesovaya, V. Maksimova, L.Trukhanova, E.Antoshina, T.Gor'kova, O.Morozova, A.Safina, D.Fleyshman, R.Salimov, E.Shipaeva, R.Ivanov, A.Leonov, A.A.Purmal, G.A.Belitsky, A.V.Gudkov, K.V.Gurova, M.G.Yakubovskaya // *Cancer Prevention Research*. – 2019. – Т. 13. – №1. – С. 53-64
2. Фетисов, Т.И. Противоопухолевая активность кураксина CBL0137 на моделях острых лейкозов *in vitro*/ Т.И. Фетисов, К.И. Кирсанов, А.А. Борунова, М.Н. Зацепина, Е.А. Лесовая, Т.Н. Заботина, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская // *Успехи молекулярной онкологии* – 2019. – Т. 6 - №4. – С. 58-68.
3. Власова, О.А. Активация сигнального пути интерферона-альфа ресвератролом, генистеином и кверцетином / О.А. Власова, А.А. Борунова, А. Сафина, И.В. Сметанина, Е.А. Лесовая, Г.А. Белицкий, Т.Н. Заботина, К. Гурова, К.И. Кирсанов, М.Г. Якубовская // *Сибирский онкологический журнал*. – 2019. – Т.18. – №1. – С. 50-55.
4. Belitsky, G.A. Prevention of therapy-related malignancies in cancer survivors / G.A. Belitsky, K.I. Kirsanov, E.A. Lesovaya, M.G. Yakubovskaya // *Oncotarget*. – 2019. – Т.10. - №22. – С. 2114-2115.
5. Кирсанов, К.И. Влияние ДНК-тропных антиканцерогенных соединений на механизмы регуляции экспрессии генов / К.И. Кирсанов, О.А. Власова, Т.И. Фетисов, Р.Г. Зенков, Е.А. Лесовая, Г.А. Белицкий, К. Гурова, М.Г. Якубовская // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2018. – Т.5. - №4. - С.41-63.
6. Leonova, E. TRAIN in response to chromatin destabilization induced with anti-cancer small molecules / E. Leonova, A. Safina, E. Nesher, P. Sandlesh, R. Pratt, C. Burkhart, B. Lipchick, C. Frangou, I. Koman, J. Wang, K. Kirsanov, M. Yakubovskaya, A. Gudkov, K. Gurova // *eLIFE Journal*. – 2018. - №7. – e30842.
7. Фетисов, Т.И. Роль нарушений сигнального пути WNT в патогенезе лейкозов / Т.И. Фетисов, Е.А. Лесовая, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий // *Биохимия*. – 2018. – Т.83. - №12. – С. 1779-1790.
8. Савинкова, А.В. Варианты и перспективы перепрофилирования лекарственных препаратов для использования в терапии онкологических заболеваний / А.В. Савинкова, Е.М. Жидкова, Л.Р. Тилова, М.Д. Лаврова, Е.С. Лылова, К.А. Кузин, А.Ю. Портянникова, В.П. Максимова, А.В. Холодова, О.А. Власова, Т.И. Фетисов, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая // *Сибирский онкологический журнал*. – 2018. – Т.17. - №3. – С. 77-87.
9. Safina, A. FACT is a sensor of DNA torsional stress in eukaryotic cells / A. Safina, P. Cheney, M. Pal, L. Brodsky, A. Ivanov, K. Kirsanov, E. Lesovaya, D. Naberezhnov, E. Nesher, I. Koman, D.

Wang, J. Wang, M. Yakubovskaya, D. Winkler, K. Gurova // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Т.45. - №4. – С. 1925-1945.

10. Фетисов, Т.И. Противоопухолевое действие кураксина CBL0137 на моделях аденокарциномы толстой кишки / Т.И. Фетисов, Л.Р. Тилова, Е.А. Лесовая, Е.Е. Антошина, Т.Г. Горькова, Л.С. Труханова, О.В. Морозова, Е.В. Шипаева, Р.В. Иванов, А.А. Пурмаль, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, А.В. Гудков, К.В. Гурова, К.И. Кирсанов // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2016. – Т.3. - №3. - С. 67-72.

11. Kirsanov, K. Minor groove binding ligands disrupt PARP-1 activation pathways / K. Kirsanov, E. Kotova, P. Makhov, K. Golovine, E. Lesovaya, V. Kolenko, M. Yakubovskaya, A. Tulin // *Oncotarget*. – 2014. – Т.5. - №2. – С.428-437.

12. Шалгинских, Н.А Эпигенетические эффекты узкобороздочных лигандов / Н.А. Шалгинских, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, Г.А. Белицкий, Р.А. Кац, М.Г. Якубовская // *Молекулярная медицина*. – 2014. – Т.3. – С.43-48.

13. Kirsanov K.I. SYBR Gold and SYBR Green II are not mutagenic in the Ames test / K.I. Kirsanov, E.A. Lesovaya, M.G. Yakubovskaya, G.A. Belitsky. // *Mutation Research*. – 2010. – Т.699. - №1. – С.1-4.