

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

На правах рукописи

КИРСАНОВ КИРИЛЛ ИГОРЕВИЧ

**УЗКОБОРОЗДОЧНЫЕ ЛИГАНДЫ В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ И
ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ**

14.01.12 – Онкология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук
Марианна Геннадиевна Якубовская

Москва – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. МЕХАНИЗМЫ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ С ДНК И ИХ ВЛИЯНИЕ НА СТРУКТУРУ ХРОМАТИНА.....	20
1.1. Соединения, осуществляющие нековалентное связывание ДНК, и их применение в противоопухолевой терапии.....	20
1.1.1. Интеркалирующие соединения	20
1.1.2. Узкобороздочные лиганды	26
1.2. Собственные результаты.....	35
1.2.1. Сиквенс-специфичность узкобороздочных лигандов.....	35
1.2.2. Способность узкобороздочных лигандов ингибировать топоизомеразу I <i>in vitro</i>	38
1.2.3. Влияние узкобороздочных лигандов на структуру хроматина.....	42
1.2.4. Влияние узкобороздочных лигандов на локализацию субъединиц SSRP1 и SPT16 гистонового шаперона FACT в ядре	45
1.3. Обсуждение	49
ГЛАВА 2. ВЛИЯНИЕ УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ НА ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА)-ПОЛИМЕРАЗУ I (PARP I).....	55
2.1. Обзор литературы	55
2.1.1. Семейство белков PARP.....	55
2.1.2. PARP 1: строение и свойства.....	56
2.1.3. Роль PARP 1 в процессах жизнедеятельности клетки	58
2.2. Собственные результаты.....	63
2.2.1. Влияние узкобороздочных лигандов на активность белка PARP 1	63
2.2.1.1. Влияние узкобороздочных лигандов на активность PARP1 в реконструированных системах <i>in vitro</i>	63
2.2.1.2. Влияние УБЛ на активность и локализацию PARP1 <i>in vivo</i>	69
2.2.1.3. Реактивация экспрессии ретротранспозонов узкобороздочными лигандами	72
2.3. Обсуждение	73
ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ НА ЭПИГЕНЕТИЧЕСКУЮ РЕГУЛЯЦИЮ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ	76
3.1. Обзор литературы	76
3.1.1. Механизмы эпигенетической регуляции экспрессии генов	77

3.1.1.1. Метилирование ДНК	77
3.1.1.2. Модификации гистонов.....	79
3.2. Собственные результаты.....	82
3.2.1. Система скрининга химических соединений на способность реактивировать экспрессию генов	82
3.2.1.1. Реактивирующее действие эпигенетических препаратов.....	85
3.2.1.2. Активность метаболической системы активации проканцерогенов клеточной линии HeLa TI	86
3.2.2. Молекулярные механизмы эпигенетических эффектов узкобороздочных лигандов на клетках HeLa TI.....	92
3.2.2.1. Реактивация узкобороздочными лигандами экспрессии эпигенетически репрессированных генов	92
3.2.2.2. Влияние химических соединений на общий уровень гистоновых модификаций	93
3.2.2.3. Изменение общего уровня метилирования при действии узкобороздочных лигандов	95
3.2.2.4. Комбинированное действие узкобороздочных лигандов и эпигенетических ингибиторов.....	98
3.3. Обсуждение	102
ГЛАВА 4. МУТАГЕННЫЕ, РЕКОМБИНОГЕННЫЕ И БЛАСТОМОГЕННЫЕ СВОЙСТВА УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ.	113
4.1. Обзор литературы	113
4.1.1. Основные типы нарушений ДНК и возможности их выявления при краткосрочном тестировании	113
4.1.2. Принципы формирования наборов (батарей) краткосрочных тестов	116
4.1.3. Стратегия исследования химических соединений	118
4.1.4. Краткий обзор тестов для прогноза канцерогенной опасности ксенобиотиков ...	120
4.2. Собственные результаты.....	127
4.2.1. Отсутствие мутагенных свойств у узкобороздочных лигандов в тесте Эймса	127
4.2.2. Отсутствие генотоксических свойств узкобороздочных лигандов в тесте на хромосомные аберрации	129
4.2.3. Активность узкобороздочных лигандов в тесте на мутагенную, рекомбиногенную и бластомогенную активность на <i>Drosophila melanogaster</i>	130

4.2.4. Влияние узкобороздочных лигандов на запуск гомологичной рекомбинации.....	132
4.3. Обсуждение	135
ГЛАВА 5. АНТИКАНЦЕРОГЕННЫЕ СВОЙСТВА КУРАКСИНА CBL0137	141
5.1. Обзор литературы	141
5.2. Собственные результаты.....	146
5.2.1. Влияние кураксина CBL0137 на активность сигнального пути WNT	146
5.2.2. Анतिकанцерогенная активность кураксина CBL0137 in vivo.....	150
5.3. Обсуждение	160
ГЛАВА 6. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ IN VITRO И IN VIVO	166
6.1. Обзор литературы	166
6.2. Собственные результаты.....	167
6.2.1. Влияние УБЛ на эффективность действия цитостатиков на культурах опухолевых клеток	167
6.2.2. Комбинированные эффекты диминазена и олапариба	169
6.2.3. Влияние кураксина на рост перевиваемой аденокарциномы толстой кишки Акатол	170
6.2.4. Противоопухолевое действие диминазена относительно перевиваемой саркомы матки 322	176
6.2.5. Противоопухолевое действие диминазена относительно перевиваемой лимфомы P388	178
6.3. Обсуждение	180
ГЛАВА 7. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	184
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	202
ВЫВОДЫ.....	207
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	209
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	211
ПРИЛОЖЕНИЯ	240

ВВЕДЕНИЕ

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 вандер-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 в физиологических дозах и мутагенности у этих соединений 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, а также ингибировать канцерогенез *in vivo* и *in vitro*.

Имеющиеся данные об эффектах малых ДНК-тропных молекул с аффинностью к узкой борозде 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 бороздой 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 TBP и белков HMG. 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, исследуется 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 возможности их 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 CBL0137. 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. Представленное исследование основано на результатах исследования отдельных соединений из группы УБЛ и направлено 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

В соответствии с указанной целью были поставлены следующие экспериментальные задачи:

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*.

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- α , 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 TI, 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 FАСТ. 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- α . 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.

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 TM3. Цитогенетическая активность соединений определялась в тесте на хромосомные aberrации на клетках костного мозга мышей-гибридов CBAx C57Bl/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 мышах 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 Ovca432), 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, перевиваемой саркомы матки См322, модель перевиваемой лимфомы Р388. Статистическая обработка данных проводилась с использованием современных методов математической статистики.

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 TI, 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.

Степень достоверности и апробация результатов

Работа выполнена в соответствии с принятыми стандартами молекулярно-биологических исследований, полученные автором новые данные согласуются с имеющимися в литературе отдельными данными по изучению биологических свойств малых ДНК-тропных молекул. Достоверность полученных данных основана на адекватном выборе и корректном использовании в исследовании современных методов анализа, полученные результаты обработаны с использованием современных методов математической статистики. По материалам диссертации опубликовано 24 статьи в зарубежных и отечественных журналах из списка ВАК.

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.).

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

1.1. Соединения, осуществляющие нековалентное связывание ДНК, и их применение в противоопухолевой терапии

Соединения, которые взаимодействуют с ДНК нековалентно, можно разделить на две группы: интеркаляторы и лиганды, связывающиеся с бороздками макромолекулы. Интеркалирующие соединения взаимодействуют с нуклеиновыми кислотами, встраиваясь ароматическим хромофором между двумя соседними парами оснований, при этом плоскость хромофора располагается относительно оси спирали ДНК перпендикулярно. Представители второго типа соединений располагаются в широкой или узкой бороздке за счет водородных связей с экспонированными в них акцепторами и донорами (Рисунок 1).

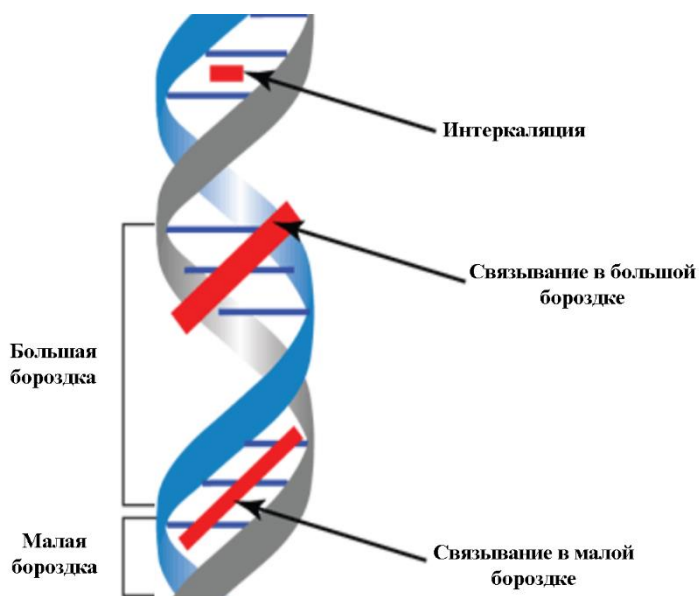


Рисунок 1 - Схематичное изображение различных типов нековалентного взаимодействия ДНК-связывающих соединений с молекулой ДНК

1.1.1. Интеркалирующие соединения

В 1961 году гипотеза, описывающая интеркаляционный тип связывания, и сам термин “интеркаляция” были предложены Л.С.Лерманом. Именно встраиванием между парами оснований он объяснил повышение вязкости раствора нуклеиновой кислоты и снижение коэффициента седиментации молекул ДНК в присутствии акридина оранжевого и профлавина [1]. Образование

интеркаляционного комплекса происходит за счет стэкинг-взаимодействий между сопряженными π -облаками интеркалятора и гетероциклов азотистых оснований, а его стабилизация – благодаря Ван-дер-Ваальсовым взаимодействиям. В основе интеркаляции лежат гидрофобные взаимодействия, при которых полициклическое гидрофобное ядро молекулы имеет более высокое сродство к гидрофобному пространству между парами оснований, чем к гидрофильному водному окружению. Показано, что такие связи обеспечивают большую часть энтальпийной составляющей свободной энергии интеркаляции. У большинства интеркаляторов в хромофоре или на боковых группах располагается положительный заряд, который в значительной степени влияет на стабилизацию интеркаляционного комплекса. Он способствует формированию ионной связи с негативно заряженным атомом кислорода фосфодиэфирной группы. Кроме того, что эти связи являются дополнительным компонентом взаимодействия макромолекулы и интеркалятора, также они нейтрализуют заряд сахара-фосфатного остова. Это ведет к вытеснению ионов Na^+ и K^+ , что способствует повышению энтропийной составляющей свободной энергии связывания [2].

Интеркаляционное взаимодействие в большинстве случаев сопряжено с конформационными изменениями в макромолекуле. Так, при встраивании хромофора расстояния между парами оснований увеличивается – стандартное для В-формы расстояние 3,4 Å возрастает на 1,8 – 4,5 Å. Увеличение контурной длины макромолекулы сопряжено с локальным раскручиванием дуплекса и уменьшением угла 36° на $11 - 48^\circ$. Удлинение и повышение жесткости дуплекса является причиной повышения вязкости раствора ДНК и является одним из признаков интеркаляционных взаимодействий. Сиквенс-специфичность, которая может значительно варьировать даже для веществ, принадлежащих к одному химическому классу, определяет сайты встраивания интеркалятора. Так, акларубицин (Рисунок 2, з) связывается с CG-богатыми участками ДНК, тогда как доксорубицин (Рисунок 2, е), также относящийся к антрациклинам, интеркалирует в регионах макромолекулы, обогащенных АТ-парами. Это говорит о важной роли заместителей, формирующих электростатические и водородные связи в бороздках

ДНК. Для некоторых интеркаляторов определяющим фактором сиквенс-специфичности является не столько наличие конкретных пар оснований, сколько определенный порядок их чередования: 5'-пиримидин-пурин-3' или 5'-пурин-пиримидин-3'[2, 3].

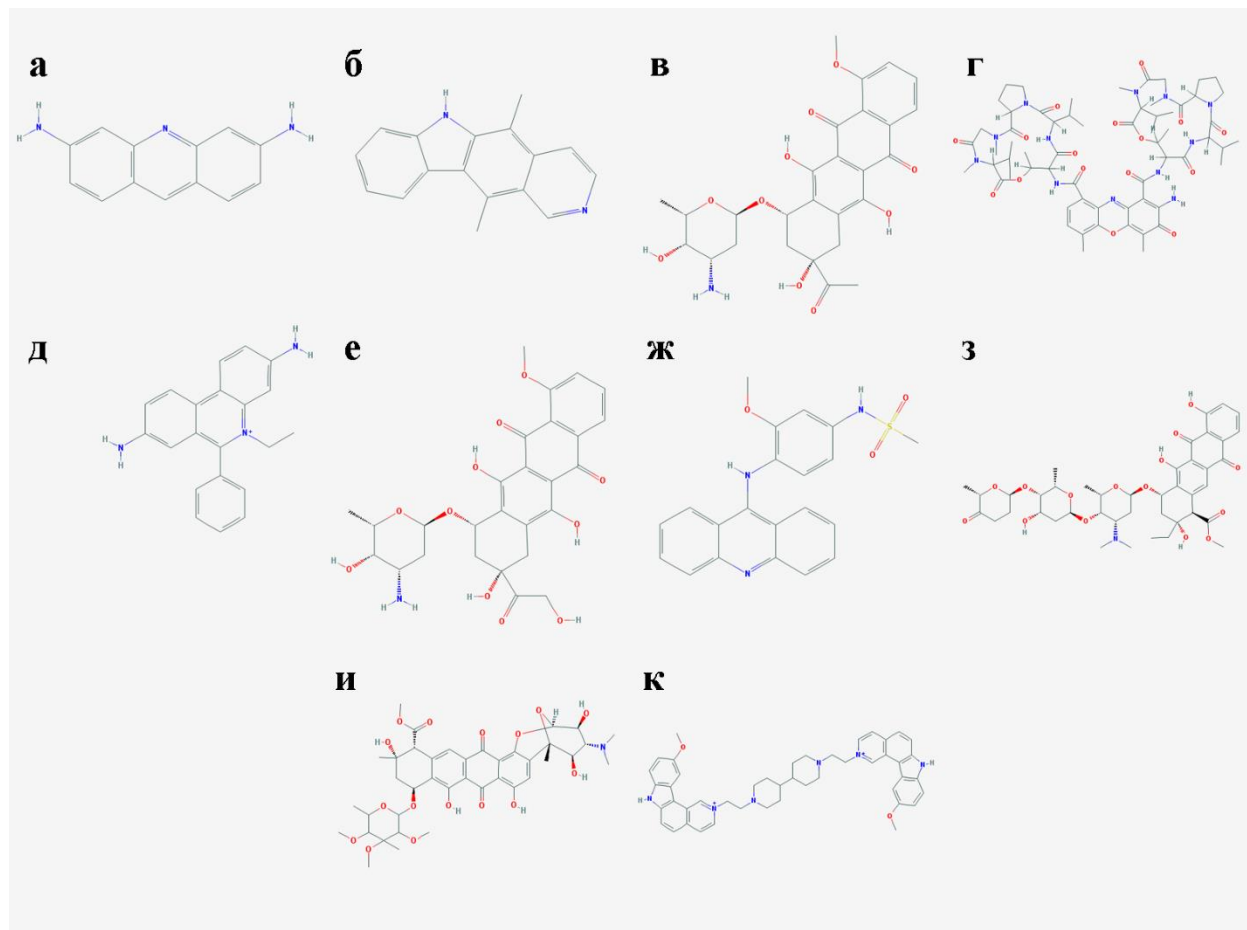


Рисунок 2 - Структурные формулы интеркаляторов: (а) профлавин; (б) эллиптицин; (в) даунорубин; (г) актиномицин D; (д) этидий; (е) доксорубин; (ж) амсакрин; (з) акларубин; (и) ногаламицин; (к) дитеркалиний

Существует несколько типов классификации интеркаляторов. В основе одной из них лежат структурные особенности интеркалирующих содинений. По этой классификации агенты разделяются на моно-интеркаляторы, бис-интеркаляторы и пронизывающие интеркаляторы ('threading intercalators'). Молекулы моно-интеркаляторов несут в своей структуре одно плоское ароматическое ядро, обеспечивающее интеркаляцию. Бис-интеркаляторы состоят из двух хромофоров, которые соединены в одну молекулу с помощью смыкающего элемента, укладывающегося в узкую или широкую бороздку. Моно-

интеркаляторами являются, например, доксорубицин, даунорубицин (Рисунок 2, в) и профлавин (Рисунок 2, а). Бис-интеркаляторы представлены такими соединениями как бис-дауномицин, триостин и дитеркалиниум (Рисунок 2, к). Пронизывающие интеркаляторы (например, ногаламицин (Рисунок 2, и) и нафталин диимид) подобно моно-интеркаляторам имеют один хромофор, который встраивается между парами оснований, но также несут в своей структуре две крупные боковые цепи с обеих сторон от ароматического ядра. Эти боковые заместители взаимодействуют в обеими бороздками макромолекулы.

Основным критерием второго типа классификации интеркаляторов является ориентация длинной оси ароматического ядра относительно пары оснований ДНК. По этой классификации интеркалирующие соединения делятся на две группы. Первая группа – параллельные интеркаляторы – соединения, состоящие из плоского ароматического ядра без крупных боковых заместителей вдоль длинной оси (например, акридин оранжевый и профлавин). Эти агенты способны индуцировать значительные конформационные изменения в макромолекуле – удлинение дуплекса и раскручивание, что необходимо для увеличения площади контактов между интеркалятором и парами оснований. При этом пары оснований приобретают плоскую форму, что также способствует расширению поверхностей соприкосновения. В группу перпендикулярных интеркаляторов входят моно-интеркаляторы с объемными боковыми заместителями, которые расположены на длинной оси хромофора (даунорубицин) и пронизывающие интеркаляторы (ногаламицин). Их встраивание в ДНК не вызывает раскручивания дуплекса, но при этом пары оснований приобретают изогнутую форму для лучшего «охвата» интеркалирующей молекулы (Рисунок 3) [4].

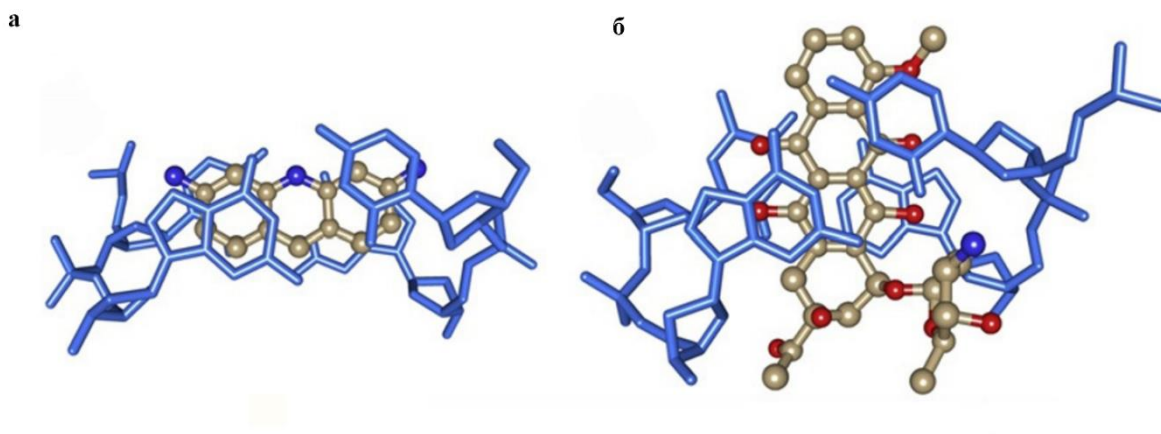


Рисунок 3 - Интеркаляция между парами оснований, осуществляемая: (а) параллельным интеркалятором (профлавин) и (б) перпендикулярным интеркалятором (даунорубин) [4]

Вследствие связывания интеркаляторов с ДНК происходит подавление и нарушение активности ряда ферментов, участвующих в матричном синтезе – репликации и транскрипции. Это связано с появлением стерических препятствий для функционирования белков в виде интеркаляционных комплексов. В ряде случаев нарушение работы ферментов обусловлено конформационными перестройками макромолекулы, которые сопровождают интеркаляцию. Способность подавлять активность ДНК-полимеразы была продемонстрирована для актиномицина D, эллиптицина и профлавина. Актиномицин D и профлавин также ингибируют РНК-полимеразу, поскольку их интеркаляция в ДНК препятствует движению транскрипционного комплекса и процессу элонгации [5-7]. Ряд интеркаляторов (например, бромистый этидий) не только подавляют репликацию, но и способны индуцировать мутации со сдвигом рамки считывания [8]. В некоторых случаях интеркаляция является причиной нарушения взаимодействия ферментов с нуклеиновой кислотой, поскольку интеркалятор конкурирует с ними за сайты связывания и вытесняет их из ДНК. Так, интеркаляция доксорубина, дауномицина и акларубина приводит к вытеснению гистонов из хроматина [9]. Наконец, доксорубин, дауномицин, эллиптицин (рис. 2, б) и амсакрин препятствуют сшиванию временных разрывов,

вносимых топоизомеразами, что опосредует образование множественных разрывов в ДНК [10].

Производные акридина - хорошо изученные и одни из наиболее эффективных интеркаляторов, применяются в терапии из-за их противовирусной, антибактериальной, антимикробной и противоопухолевой активностей. Эти агенты ингибируют процессы репликации, транскрипции, репарации, и подавляют активность топоизомераз I и II [8]. Одним из первых производных акридина, разработанных для противоопухолевой терапии, был амсакрин. Он применяется с 1976 г. для лечения острого лейкоза. На основе его структуры было синтезировано большое количество производных [11, 12]. Однако несмотря на успешное использование амсакрина, другие акридины не нашли применения в противоопухолевой терапии. Это обусловлено значительными побочными эффектами, высокой токсичностью, низкой биодоступностью и неселективным действием (например, профлавина).

Интеркаляторы антрациклины являются сильными противоопухолевыми препаратами, активность которых нашла применение при терапии наибольшего числа видов опухолей в сравнении с представителями других химических классов. Даунорубицин и доксорубицин – два ключевых соединения этой группы, были выделены из бактерий вида *Streptomyces peucetius* [13, 14]. Оба препарата используются при лечении острых лейкозов, хронического миелобластного лейкоза и саркомы Капоши. Доксорубицин помимо этого применяется при терапии рака желудка, рака яичников, молочной железы, лимфомы Ходжкина. Липосомальные формы дауномицина и доксорубицина используются при лечении ВИЧ-ассоциированной саркомы Капоши. Идарубицин – еще один антрациклиновый антибиотик и производное даунорубицина, также образует интеркаляционные комплексы с макромолекулой и препятствует сшиванию разрывов, в норме вносимых топоизомеразой II. Идарубицин применяется при терапии острого миелоидного лейкоза [15]. В качестве примера интеркалирующего соединения и противоопухолевого препарата антрациклинового типа нужно упомянуть акларубицин (аклациномицин А). Этот агент был выявлен как

вторичный метаболит *Streptomyces galilaeus* [16] и показал противоопухолевую и цитотоксическую активности, основанные на его способности подавлять активность топоизомеразы II. Однако в отличие от других антрациклинов, он ингибирует фермента не на стадии лигирования разрывов, а на этапе его нековалентного связывания с макромолекулой. Примечательно, что в зависимости от концентрации этот агент нарушает работу топоизомеразы I либо через стабилизацию ковалентного комплекса ДНК-фермент (1 – 100 мкМ), либо через нарушение взаимодействия топоизомеразы I с ДНК (наномолярные концентрации), что объясняется различными типами связывания. Для ряда сильных интеркаляторов продемонстрировано, что в зависимости от отношения числа молекул агента к количеству пар оснований эти соединения могут или интеркалировать, или взаимодействовать только с фосфатными группами, препятствуя связыванию белка с нуклеиновой кислотой. Акларубицин способен вызывать остановку клеточного цикла и апоптоз [17].

К интеркаляторам, которые применяются в химиотерапии, также относится актиномицин D (дактиномицин). Эта молекула была выделена в 1940 году из культуры почвенных бактерий *Streptomyces antibioticus* [18]. Актиномицин D интеркалирует феноксазиновым ядром между основаниями, а пептидные боковые заместители взаимодействуют с узкой бороздкой ДНК, образуя водородные связи с гуанином. Было продемонстрировано, что это соединение может связываться с β -ДНК – интермедиатом на границе между В-ДНК и одноцепочечными участками ДНК, образующимися при диссоциации дуплекса. Этот интермедиат присутствует в транскрипционном комплексе, и встраивание актиномицина D в эти участки блокирует синтеза РНК [6]. Актиномицин D применяется при терапии нефробластомы, меланомы, сарком и рака яичников.

1.1.2. Узкобороздочные лиганды

Второй группой соединений, образующих нековалентные связи с ДНК, являются лиганды, которые взаимодействуют с борозками дуплекса. Большинство бороздочных лигандов связываются с узкой бороздкой (Рисунок 4), хотя для

некоторых представителей этого класса характерно взаимодействие с большой бороздкой (такой тип связывания был показан для полиаминов). Такое предпочтение обусловлено соответствием ширины малой бороздки размеру лиганда, что обеспечивает энергетический вклад в стабилизацию комплекса за счет гидрофобных и Ван-дер-Ваальсовых сил. Основным фактором, который позволяет агенту «закрепиться» в бороздке, является формирование водородных связей с азотистыми основаниями (атомом кислорода во второй позиции тимина и атомом азота в третьем положении аденина). Сиквенс-специфичность по отношению к АТ-богатым регионам - важная особенность узкобороздочных лигандов (УБЛ). Это обуславливается стерическими препятствиями в GC-участках – аминогруппой гуанина и карбонильным кислородом цитозина, экспонированными в бороздке. АТ-области малой бороздки более энергетически выгодны для взаимодействия из-за их меньшей ширины, что облегчает формирование Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий, а также возможности формирования гидрофобной связи между агентом и атомом углерода во втором положении аденина. В состав УБЛ, как правило, входят нескольких ароматических гетероциклов, которые между собой соединены линейными линкерными участками. Такая структура позволяет молекулам вращаться вокруг этих участков и принимать форму в соответствие с кривизной малой бороздки. Благодаря этому связывание УБЛ с ДНК не вызывает сильных конформационных изменений ДНК, что отличает УБЛ от интеркаляторов. И хотя взаимодействие УБЛ с макромолекулой не сопровождается изменением угла между парами оснований или удлинением молекулы, в ряде случаев может приводить к увеличению ширины бороздки и образованию локального изгиба. Так, было показано, что при связывании нетропсина с дуплексом ДНК происходит расширение малой бороздки на $0,5 - 2 \text{ \AA}$ и изгиб спирали ДНК на 8° . [2, 19, 20].

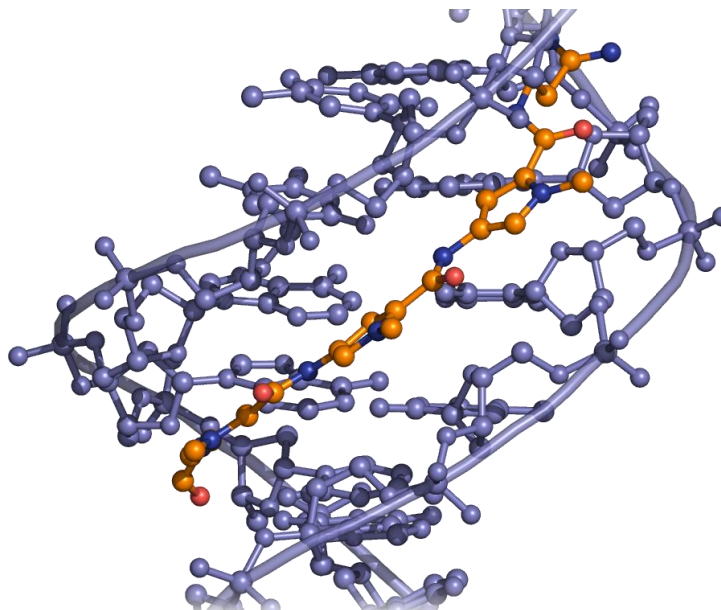


Рисунок 4 - Трехмерная структура комплекса узкобороздочного лиганда и ДНК. Встраивание в узкую бороздку показано на примере дистамицина А [21]

Ряд соединений, обладающих структурой, характерной для УБЛ, способны не только взаимодействовать с малой бороздкой, но и интеркалировать в ДНК при определенных условиях [22]. Такое бифункциональное связывание было показано для 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) (Рисунок 5, в). При наличии трех и более следующих друг за другом АТ-пар этот агент укладывается в узкую бороздку. При меньшем числе АТ-пар и в GC-богатых участках он проявляет себя как интеркалятор [23]. Связывание в АТ-участках и интеркаляция в GC-регионах также характерны для таких соединений, как хехст 33342 (Рисунок 5, д) и хехст 33258 (Рисунок 5, г), для которых предпочтительный тип связывания определяется их концентрацией. При низких концентрациях происходит взаимодействие по малой бороздке; при высоких – интеркаляция и стабилизация комплекса за счет стэкинг-взаимодействий между соседними интеркалирующими молекулами [24].

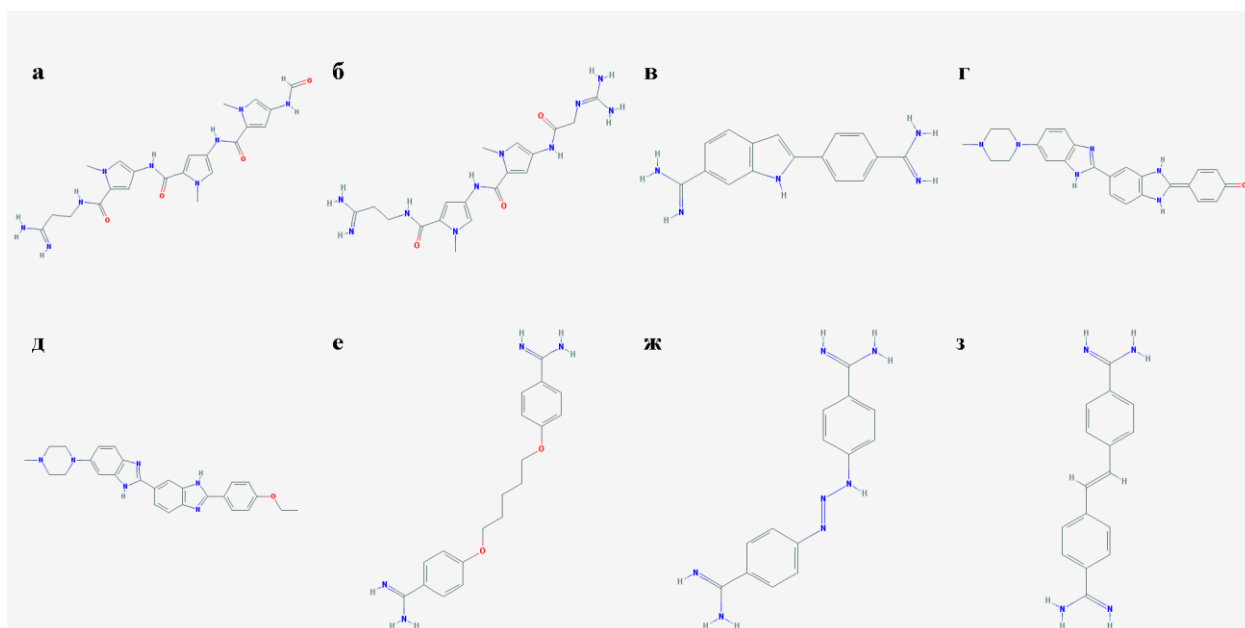


Рисунок 5 - Структурные формулы соединений, взаимодействующих с ДНК путем встраивания в узкую бороздку молекулы: (а) дистамицин А; (б) нетропсин; (в) DAPI; (г) хехст33258; (д) хехст33342; (е) пентамидин; (ж) беренил; (з) стилбамидин

УБЛ вызывают нарушения метаболизма нуклеиновых кислот – препятствуют процессам репликации, транскрипции и поддержания топологии макромолекул), что связано со способностью этих агентов обратимо связываться с ДНК. Показано, что дистамицин А (Рисунок 5, а) ингибирует РНК-полимеразу II, препятствуя процессу транскрипции на стадии инициации; нетропсина (Рисунок 5, б) и дистамицин А подавляют активность хеликаз WRN и BLM. Ингибирование РНК- и ДНК-полимераз продемонстрировано для DAPI. Хехст 33342 и хехст 33258 ингибируют топоизомеразу I; нетропсин и дистамицин А ингибируют топоизомеразы I и II. Пентамидин (Рисунок 5, е) нарушает работу эндо-экзонуклеазы – фермента, вовлеченного в репарацию разрывов и рекомбинацию. УБЛ также могут препятствовать связыванию с ДНК и РНК других белков, участвующих в регуляции уровня транскрипции и экспрессии генов. Например, дистамицин А предотвращает связывание базального фактора транскрипции ТВР (TATA-binding protein) с макромолекулой. Из-за его сродства к АТ-регионам он также способен вытеснять белки семейства HMG (High mobility group), которые

участвуют в модулировании уровня экспрессии большого количества генов, в том числе и генов, белковые продукты которых играют роль в инвазии и метастазировании трансформированных клеток. Аналогичный эффект в отношении HMG был показан для хехст33258.

Ряд УБЛ используется в терапии в связи с их антибактериальной активностью. Диминазен (беренил) (Рисунок 5, ж) применяется для лечения трипаносомозов; стилбамидин (Рисунок 5, з) – актиномикозов, лейшманиозов и бластомикозов; пентамидин – при терапии пневмонии, вызванной аскомицетами *Pneumocystis jiroveci*. Не используются в клинике, но обладают антибактериальными свойствами дистамицин А, нетропсин и DAPI. Дистамицин А и нетропсин обладает цитотоксической активностью в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Дистамицин А оказался эффективным при борьбе с простейшими вида *Plasmodium falciparum*. DAPI токсичен в отношении *Trypanosome congolese* [25]. Наиболее интенсивно исследуемым свойством УБЛ остается их противоопухолевая активность. Соединения, связывающиеся нековалентно с ДНК, до настоящего момента не нашли широкого применения в химиотерапии поскольку демонстрировали недостаточную эффективность в доклинических и клинических испытаниях при монотерапии. Более успешными оказались производные этих соединений, включающие модификации, которые позволяют ковалентно связываться с ДНК, что позволило совместить сиквенс-специфичность УБЛ с высокой цитотоксичностью алкиляторов.

Синтетический УБЛ бис-бензимидазол хехст33258 продемонстрировал противоопухолевую активность *in vivo* относительно перевиваемых мышинных лейкозов L1210 и P388. Этот агент достиг второй стадии клинических испытаний при терапии рака поджелудочной железы. Однако клинические исследования на выборке из двадцати трех пациентов не выявили терапевтического эффекта – ни у одного человека не было зарегистрировано ответа на лечение. Кроме того, хехст 33258 обладал высокой токсичностью, вызвав у 11 пациентов гипергликемию. Испытания были прекращены [26]. На основе УБЛ хехст 33258

было синтезировано большое количество производных, в том числе и алкилирующих агентов. Одно из таких соединений состоит из фенил-бис- β -хлорэтиламина (алкилирующий элемент), соединенного через пропильный мостик с бис-бензимидазольной частью. Это соединение также достигло второй фазы клинических исследований [25].

Природный полиамид нетропсин в 1951 году был выделен из бактерий *Streptomyces netropsis*. В 1962 году из этого же вида был получен дистамицин А. Эти УБЛ нашли применение в качестве антибактериальных и противовирусных средств. Однако в противоопухолевой терапии эти агенты оказались неэффективными в связи с их низкой цитотоксичностью и большим количеством вызываемых ими побочных эффектов. Тем не менее, их структура легла в основу разработки широкого круга алкилирующих соединений; ряд из которых исследовались в клинических испытаниях при терапии злокачественных новообразований (Рисунок 6) [27-31].

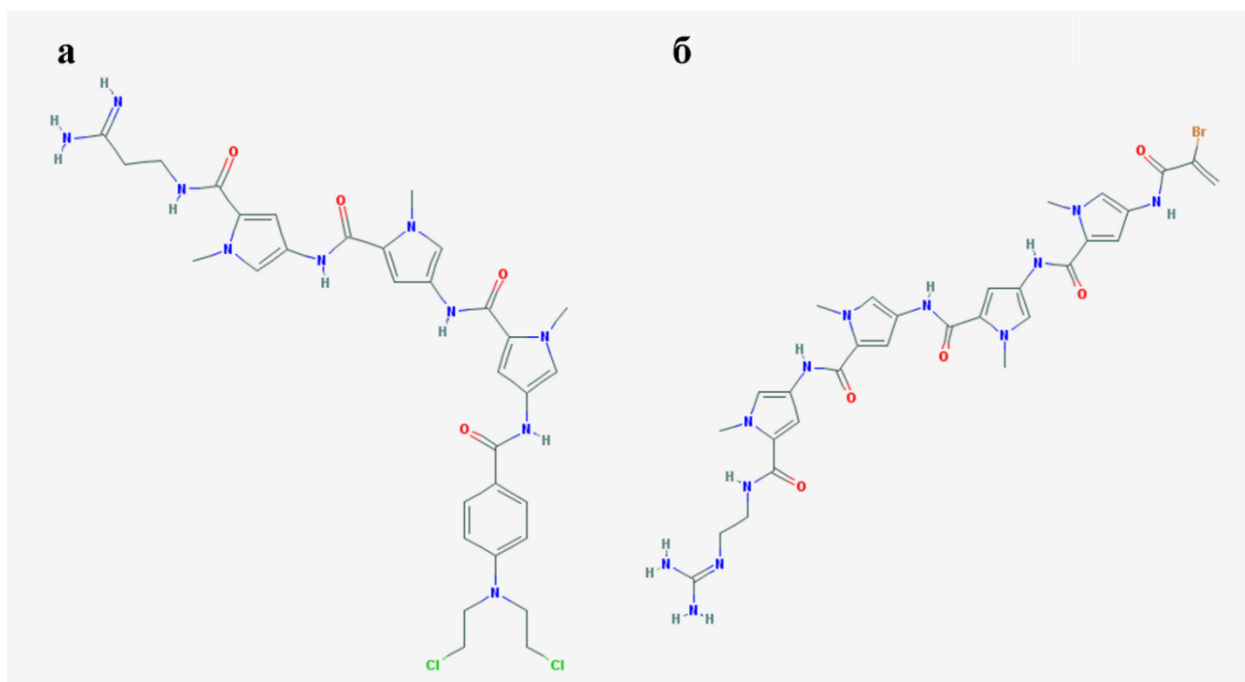


Рисунок 6 - Структурные формулы соединений, представляющих собой производные узкобороздочного лиганда дистамицина А: (а) таллимустин; (б) бросталлицин

Наиболее эффективным производных дистамицина А является таллимустин — агент, совмещающий в своей структуре ДНК-связывающий фрагмент

дистамицина А с алкилирующим заместителем β -хлорэтиламином. Такое соединение обладает сиквенс-специфичностью в отношении последовательности 5'-TTTTGPr-3', а также способностью к алкилированию в узкой бороздке макромолекулы, что ведет к накоплению повреждений и остановке клеточного цикла в фазе G2. Таллимустин достиг второй стадии клинических исследований при терапии пациентов с раком толстой и прямой кишки, а также с раком легкого. Однако этот УБЛ был признан неэффективным, поскольку не оказывал значительного влияния на течение процесса у пациентов с опухолями этих локализаций. Лечение сопровождалось такими побочными эффектами как нейтропения и тромбоцитопения. В связи с этим клинические исследования таллимустина были прекращены [32-35].

Еще одно соединение, бросталлицин, является производным дистамицина с бромакрилоильным заместителем. Этот агент является пролекарством, переходящим в форму алкилирующего метаболита при нуклеофильном присоединении глутатиона к винилбромидному участку при действии глутатионтрансфераз и замене хлором атома брома. Этот агент достиг второй стадии клинических исследований. Бросталлицин оказался неэффективным при терапии опухолей желудочно-кишечного тракта, однако вызвал ответ при лечении неоперабельной саркомы мягких тканей – была зарегистрирована остановка роста опухоли двадцати пациентов и полный ответ – у двух. Исследования продолжались до 2014 года, однако впоследствии препарат был признан неэффективным и не вошел в клиническую практику [36-38]. В последнее время большое внимание привлекает к себе нековалентно связывающийся УБЛ пентамидин. В терапии этот агент применяется при лечении трипаносомозов, лейшманиозов и пневмоцистоза, вызываемого аскомицетами *Pneumocystis jiroveci*. На линиях клеток меланомы, рака легкого, рака молочной железы, рака яичников и рака простаты *in vitro* было показано, что этот УБЛ обладает антипролиферативной активностью. Для пентамидина была продемонстрирована способность сенситизировать резистентные клетки лейкозов к действию цитокинов посредством активации рецептора смерти DR5 и ингибирования антиапоптотических белков XIAP и Mcl-1

[39]. Помимо этого, пентамидин ингибировал экспрессию HIF-1 α в опухолевых клетках [40], а также проявил противоопухолевую активность относительно меланомы и рака легкого в экспериментах *in vivo*. Для этого агента также продемонстрирован синергизм с алкилирующими препаратами, интеркаляторами и ингибиторами топоизомераз *in vivo*. Помимо этого, этот УБЛ увеличивал чувствительность клеток к ДНК-повреждающему действию радиотерапии [40-43].

Другой группой агентов, сочетающих в себе свойства УБЛ и интеркаляторов являются кураксины, новые низкомолекулярные препараты с потенциальными противоопухолевыми свойствами. К ним относят производные 9-аминоакридина (в том числе противомаларийный агент акрихин), на основе которых были синтезированы соединения второго поколения кураксины - более активные молекулы с карбазольным ядром. У разных представителей кураксинов боковая цепь, связанная с карбазольным атомом азота, является линейным или разветвлённым алкиламином и содержит вторичные и третичные аминогруппы. Для кураксина CBL0137 (Рисунок 7) было показано, что по типу взаимодействия с ДНК данное соединение представляет собой бифункциональное соединение, карбазольное ядро которого интеркалирует между пар оснований, а линейная боковая цепь позиционирует молекулу по узкой бороздке. Кураксины с другой структурой бокового заместителя (длиннее или короче) теряют способность взаимодействовать с узкой бороздкой макромолекулы, что в значительной степени снижает их биологическую активность.

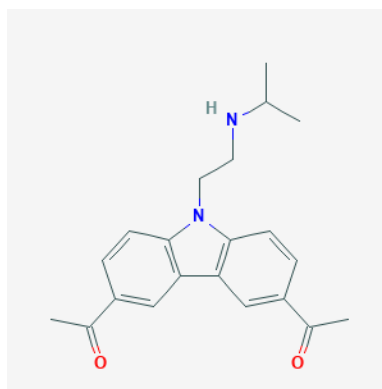


Рисунок 7 - Химическое строение кураксина CBL0137

Из всех представителей семейства кураксинов вариант CBL0137 был отобран за его способность на молекулярном уровне одновременно влиять на несколько сигнальных путей в направлениях, требуемых для противоопухолевых эффектов [44]. Связываясь с ДНК по типу интеркаляции CBL0137 способен ингибировать работу топоизомераз, влиять на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов [45], а также изменять степень компактизации хроматина [46]. Противоопухолевая активность CBL0137 была продемонстрирована в многочисленных исследованиях как *in vitro* (на различных клеточных линиях опухолей), так и *in vivo* (на животных). На модели нейробластомы, индуцируемой мутантным геном *MYCN* было показано, что кураксин снижает уровень экспрессии *MYCN* в первичных опухолях у мышей TH-MYCN +/+ и ингибирует рост опухолей [47]. На ксенографтах мелкоклеточного рака легких применение данного препарата в комбинации с цисплатином приводит к увеличению экспрессии *NOTCH1* в клетках опухоли и значительно усиливает действие цисплатина [48]. В нашем недавнем исследовании была выявлена способность кураксина активировать интерфероновый сигналинг [45]. Таким образом, молекулярные механизмы действия кураксина основаны на его способности нековалентно связываться с ДНК и, как следствие, влиять на взаимодействие ДНК-белок, тем самым модулируя функции ДНК-опосредованных ферментов. Считается, что одной из мишеней CBL0137 является белковый шаперон FАСТ.

Таким образом, общим свойством ДНК-тропных молекул, взаимодействующих с узкой бороздой, является их способность модулировать активность белков метаболизма ДНК и менять профиль экспрессии генов. Молекулярные механизмы такого обратимого влияния к настоящему моменту практически не изучены. В связи с этим, первый экспериментальный раздел данной работы посвящен изучению сиквенс-специфичности связывания УБЛ с ДНК и влияния этих соединений на структуру хроматина, анализу их эпигенетической активности, исследованию их бластомогенных, рекомбиногенных и мутагенных свойств, а также тестирование их антиканцерогенных и противоопухолевых свойств.

1.2. Собственные результаты

1.2.1. 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. Ранее для исследуемых классических УБЛ была показана их АТ-специфичность. Характеристики соединений хехст33342, хехст33258, DAPI, диминазен, пентамидин ранее анализировали при помощи метода футпринтинга ДНКазой I с использованием радиоактивной метки, однако модельные ДНК-дуплексы при их изучении использовались разные, и сравнительного анализа влияния УБЛ на профиль их расщепления ранее не проводили.

Для исследования был использован оптимизированный метод футпринтинга ДНКазой I с использованием флуоресцентного красителя TAMRA, разработанный в отделе химического канцерогенеза Набережновым Д.С. и соавт.

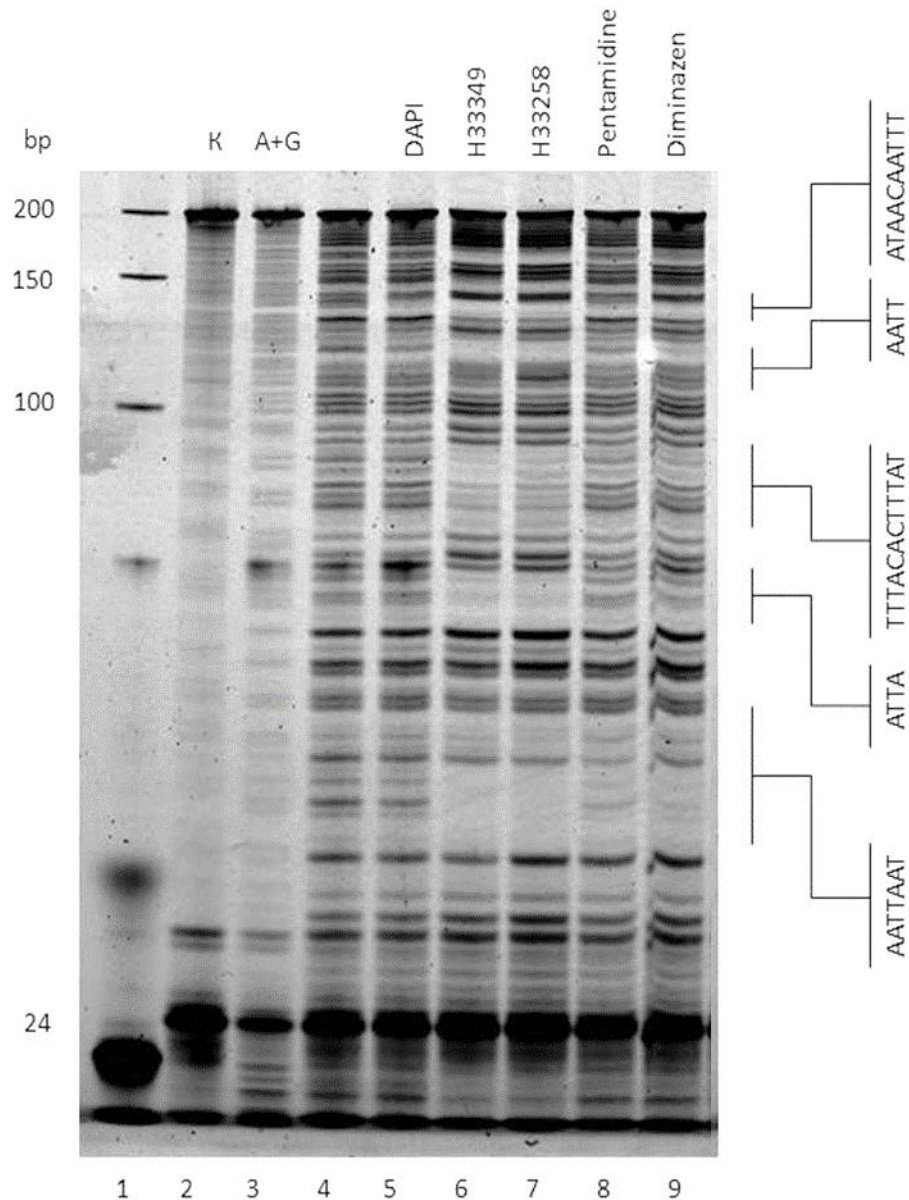


Рисунок 8 - ДНКазы футпринтинг флуоресцентно-меченного 200-звенного ПЦР-фрагмента в присутствии различных узкоборозчатых лигандов. 1 – 24, 100, 150, 200-звенные маркерные ДНК; 2 – исходный 200-звенный ПЦР-фрагмент; 3 – химическое расщепление по пуринам; 4 – расщепление ДНКазой I в отсутствии узкоборозчатых лигандов; 5 – расщепление в присутствии DAPI; 6 – расщепление в присутствии хехст33342; 7 – расщепление в присутствии хехст33258; 8 – расщепление в присутствии пентамидина; 9 – расщепление в присутствии диминазена

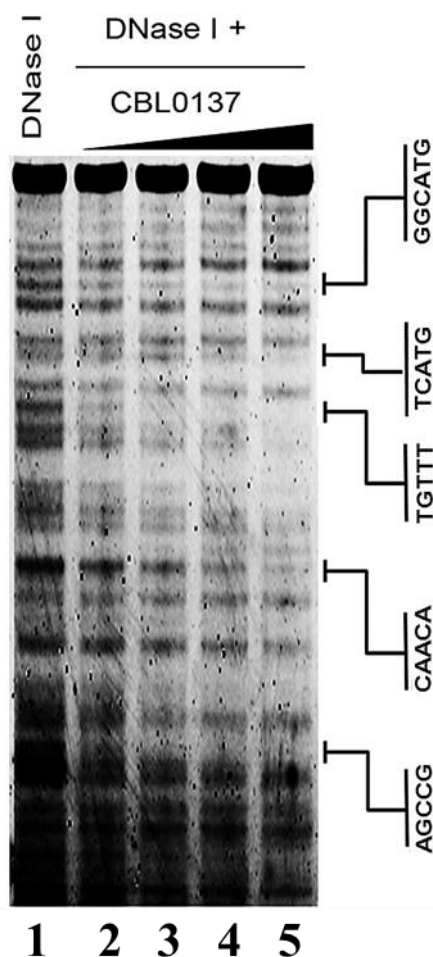


Рисунок 9 - ДНКазы футпринтинг флуоресцентно-меченного 200-звенного ПЦР-фрагмента в присутствии кураксина CBL0137. 1 – расщепление ДНКазой I; 2-4 – расщепление в присутствии CBL0137 (2, 5, 10, 20 μ M)

Было показано (Рисунок 8), 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 (Рисунок 9) к следующим последовательностям: AGCCG, CAACA, TGTTT, TCATG, GGCATG.

1.2.2. Способность узкобороздочных лигадов ингибировать топоизомеразу I *in vitro*

В связи с высоким уровнем пролиферации клетки злокачественных опухолей нуждаются в активной работе топоизомераз, что обуславливает увеличение экспрессии данных ферментов в трансформированных клетках. Ввиду этого, одним из направлений развития противоопухолевой химиотерапии стала разработка ингибиторов топоизомераз. Ранее было показано, что хехст33258 и хехст33343 способны ингибировать топоизомеразу I, что приводит к образованию одноцепочечных разрывов ДНК. В данной серии экспериментов мы провели исследование способности диминазена, пентамидина, DAPI, CBL0137 и CBL0175 ингибировать действие клеточной топоизомеразы I *in vitro* (Рисунки 10-14). В качестве отрицательного контроля использовали плазмидную ссДНК. В отсутствии ингибитора внесение в реакцию очищенной топоизомеразы I приводит к релаксации ссДНК с образованием ряда топоизомеров. В качестве положительного контроля использовали известный ингибитор топоизомеразы I камптотецин в концентрации 100 мМ, который препятствует нормальной работе фермента путем связывания с комплексом ДНК-топоизомеразы I и приводит к появлению в ДНК одноцепочечных разрывов. Эффект ингибирования топоизомеразы I выявляли по способности исследуемых соединений задерживать реакцию релаксации ссДНК, то есть по уменьшению мигрирующих топоизомеров и сохранению ссДНК. Для определения способности малых ДНК-тропных молекул уменьшать подвижность суперскрученной плазмидной ДНК УБЛ инкубировали с суперскрученной плазмидной ДНК рНОТ, затем продукты реакции разделяли электрофоретически в агарозном геле.

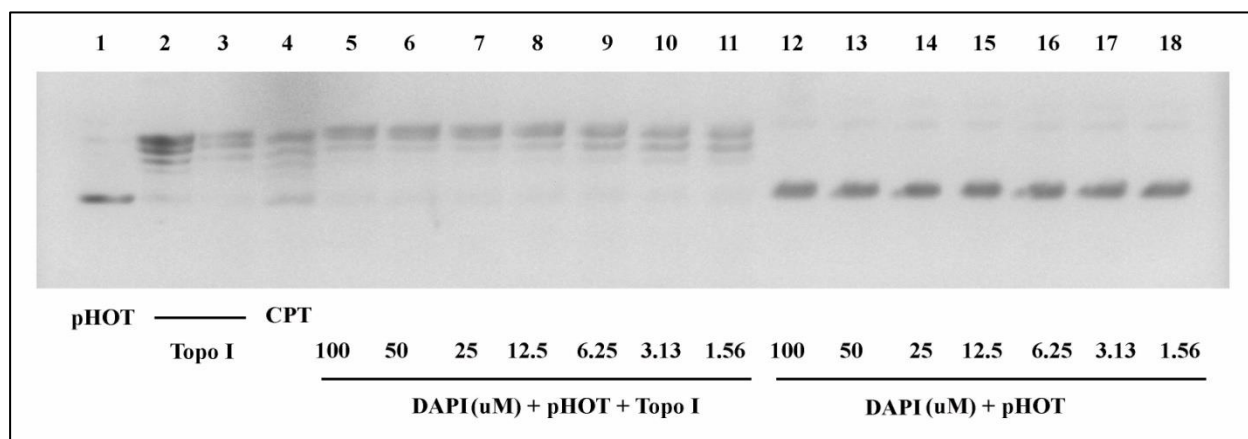


Рисунок 10 - Влияние DAPI на активность эукариотической топоизомеразы I. Дорожка 1: плазмида pHOT; дорожка 2,3: плазмида pHOT+ топоизомераза I; дорожка 4: плазмида pHOT+ топоизомераза I+ камптотецин; дорожки 5-11: pHOT+ топоизомераза I+ DAPI (100 – 1,56 uM); дорожки 12-18: pHOT + DAPI (100 – 1,56 uM)

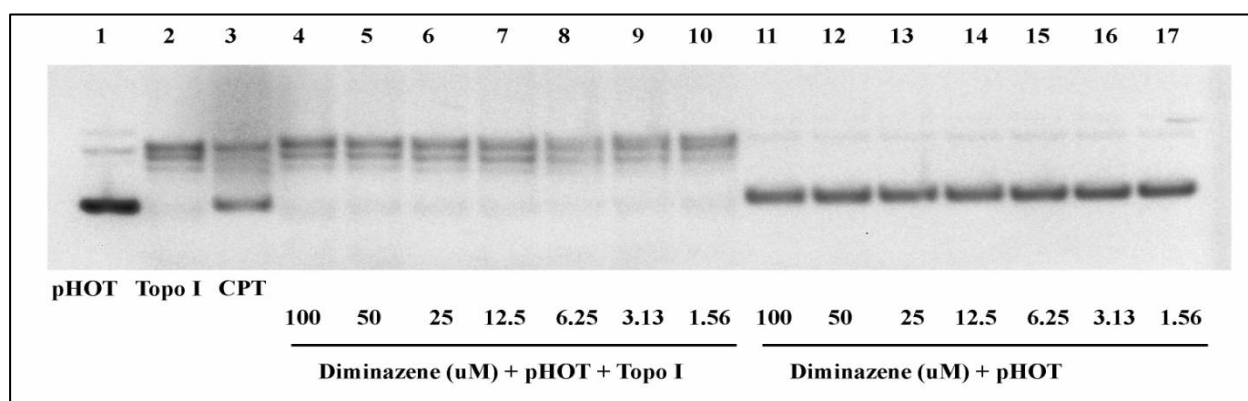


Рисунок 11 – Отсутствие влияние диминазена на активность эукариотической топоизомеразы I. Дорожка 1: плазмида pHOT; дорожка 2: плазмида pHOT+ топоизомераза I; дорожка 3: плазмида pHOT+ топоизомераза I+ камптотецин; дорожки 4-10: pHOT+ топоизомераза I+ диминазен (100 – 1,56 uM); дорожки 12-18: pHOT + диминазен (100 – 1,56 uM)

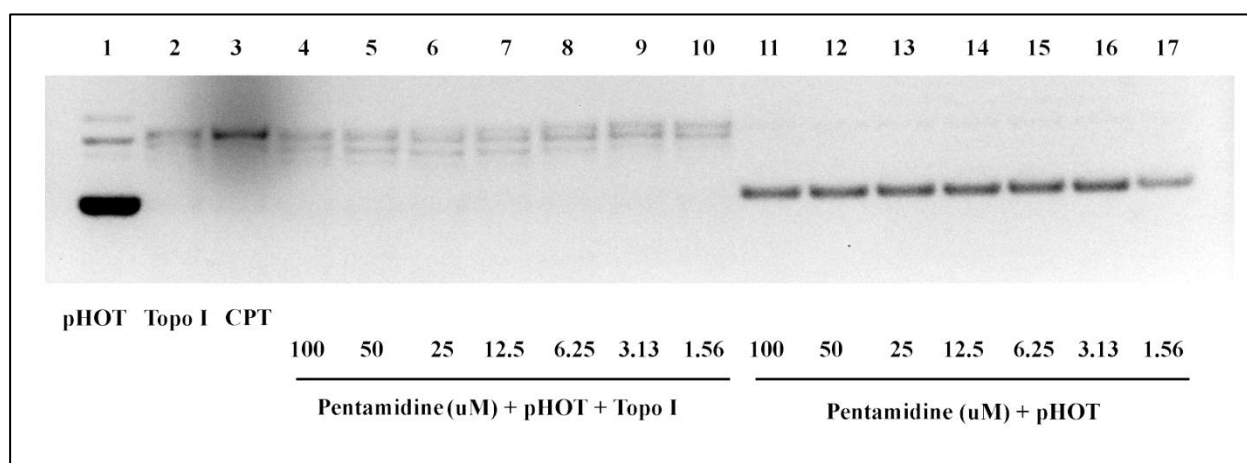


Рисунок 12 – Отсутствие влияния пентамидина на активность эукариотической топоизомеразы I. Дорожка 1: плазмида pHOT; дорожка 2: плазмида pHOT+ топоизомераза I; дорожка 3: плазмида pHOT+ топоизомераза I+ камптотецин; дорожки 4-10: pHOT+ топоизомераза I+ пентамидин (100 – 1,56 uM); дорожки 12-18: pHOT + пентамидин (100 – 1,56 uM)

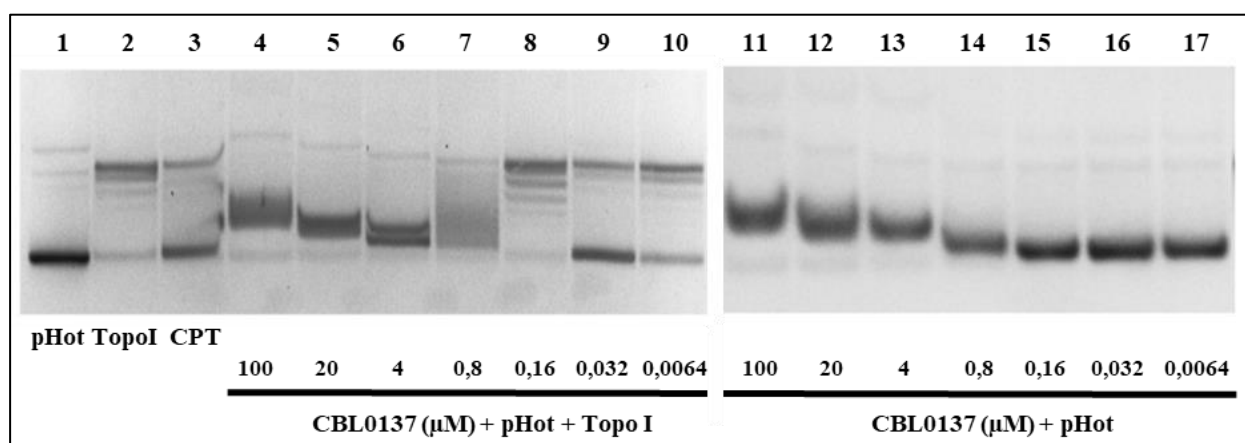


Рисунок 13 - Влияние CBL0137 на активность эукариотической топоизомеразы I. Дорожка 1: плазмида pHOT; дорожка 2: плазмида pHOT+ топоизомераза I; дорожка 3: плазмида pHOT+ топоизомераза I+ камптотецин; дорожки 4-10: pHOT+ топоизомераза I+ CBL0137 (100 – 0,0064 uM); дорожки 12-18: pHOT + CBL0137 (100 – 0,0064 uM)

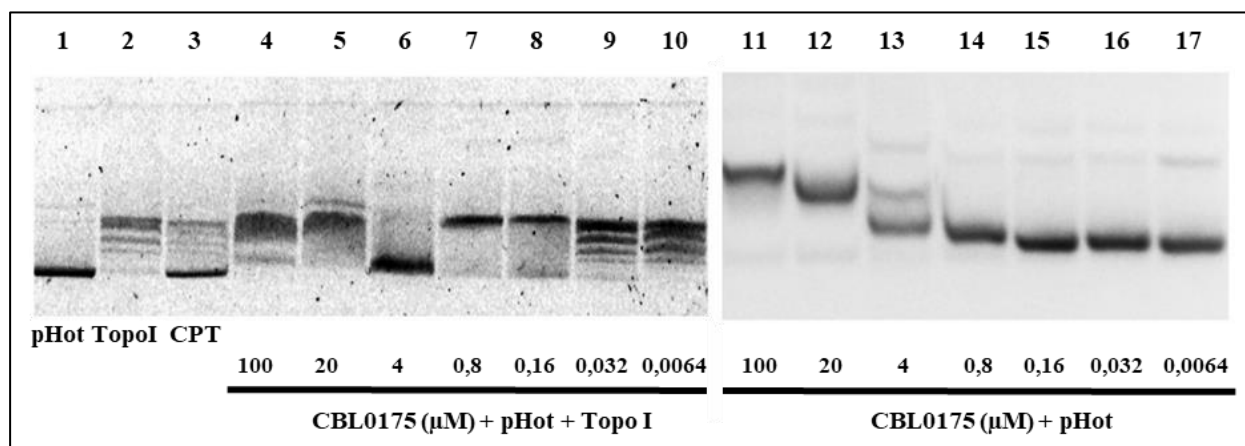


Рисунок 14 - Влияние CBL0175 на активность эукариотической топоизомеразы I. Дорожка 1: плазмида pHOT; дорожка 2: плазмида pHOT+ топоизомераза I; дорожка 3: плазмида pHOT+ топоизомераза I+ камптотецин; дорожки 4-10: pHOT+ топоизомераза I+ CBL0175 (100 – 0,0064 μM); дорожки 12-18: pHOT + CBL0175 (100 – 0,0064 μM)

Показано, что ни один из исследованных классических УБЛ, за исключением хехстов, не обладает способностью уменьшать подвижность ДНК и ингибировать топоизомеразу I *in vitro*. Для кураксинов продемонстрировали, что данные соединения уменьшают подвижность ДНК в концентрациях 100-0,8 мкМ. При действии этих агентов полное ингибирование топоизомеразы I наблюдалось, начиная с концентрации 4 мкМ. Восстановление активности фермента наблюдали при концентрации CBL0175 в 0,032 мкМ, а CBL0137 – 0,16 мкМ. Мы предполагаем, что эффект полной релаксации ссДНК при действии CBL0175 (Рисунок 14, дорожки 7,8) представляет собой процесс неполного подавления активности топоизомеразы I. Известно, что механизм действия этого фермента состоит из двух стадий – разрезания ДНК с образованием одноцепочечного разрыва, и репарацией этого разрыва после релаксации. Куполообразный эффект Кураксина на активность топоизомеразы I позволяет предположить, что ингибирование 2-ой фазы (лигирования разрыва после релаксации) происходит более интенсивно, чем внесение одноцепочечного разрыва, как это было показано для хехстов 33258 и 33342 [49].

1.2.3. 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. Ранее способность дестабилизировать нуклесомы была показана для кураксина CBL0137. В данной части работы мы исследовали влияние классических УБЛ на структуру хроматина следующими методами: (1) расщепление ядерной ДНК микроккоковой нуклеазой и (2) микроскопия живых клеток с флуоресцентно меченными гистонами H1 и H2B.

Эксперименты по влиянию УБЛ на расщепление ДНК микроккоковой нуклеазой (MNase) проводили на клеточной линии HT1080 (Рисунок 15). В качестве одного из контролей использовали пробу, в которой расщепление нуклеазой было остановлено сразу после её добавления. В качестве положительного контроля использовался кураксин CBL0137. При действии этого агента наблюдается сильная дестабилизация нуклеосом в ядрах клеток, что приводит к активному расщеплению ДНК нуклеазой без формирования полос, соответствующих более специфичному расщеплению ДНК, упакованной на нуклеосомах. Отрицательным контролем при этом служила ДНК, выделенная из ядер интактных клеток, после расщепления нуклеазой. 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, причем уменьшение времени инкубации с MNase с 15 минут до 5-ти не повлияло на результат. Дестабилизирующее влияние на гистоновый кор данным методом было показано для нетропсина. При концентрациях 40мкМ, 20 мкМ нетропсин так же ингибировал активность MNase, однако при уменьшении концентрации с 10 мкМ до 2,5 мкМ картина расщепления менялась с полностью неспецифичной (отсутствие полос, соответствующих расщеплению ДНК на нуклеосомах) до профиля расщепления, соответствующего контролю. Таким образом, уже при

концентрации 10 мкМ нетропсин оказывает существенное влияние на структуру хроматина в ядрах клеток.

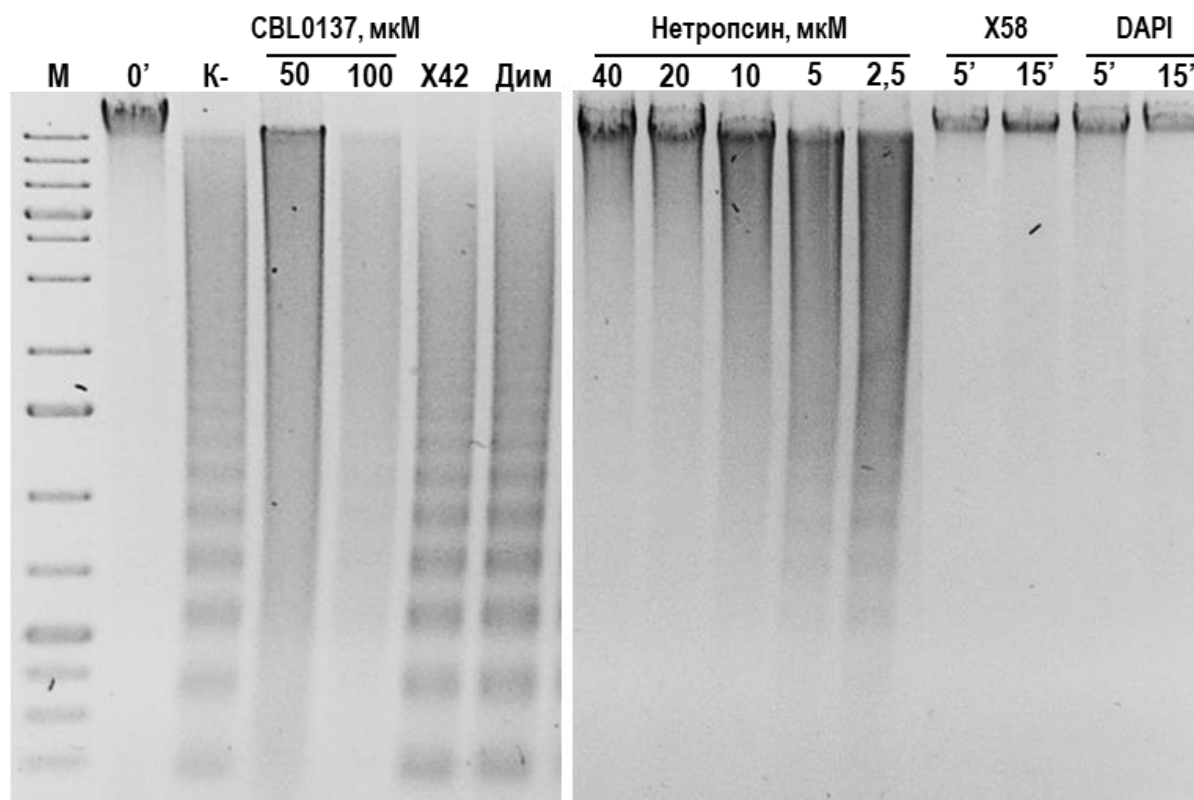


Рисунок 15 - Влияние УБЛ на профиль расщепления ядерной ДНК микрококковой нуклеазой (М- маркер молекулярного веса, 0 – контроль (расщепление нуклеазой остановлено сразу после добавления фермента, К- - контроль без обработки клеток веществами, X42 – хехст33342, X58 – хехст33258)

Далее было исследовано влияние УБЛ на локализацию корового гистона H2B и линкерного гистона H1. Для этого использовались клетки, гистоны которых были ассоциированы с флуоресцентным белком mCherry. Было показано, что при действии кураксина с течение первых 15 минут происходит перераспределение гистонов H2B (Рисунок 16) и H1 при этом основная их часть релокализуется в ядрышки. Мы продемонстрировали, 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 наблюдалось изменение локализации гистона H1. В частности, было выявлено увеличение доли клеток, в которых гистон H1 приобретал ядрышковую

локализацию, либо находился на промежуточной стадии – высвобождения из хроматина и релокализации в ядрышки (Рисунок 17).

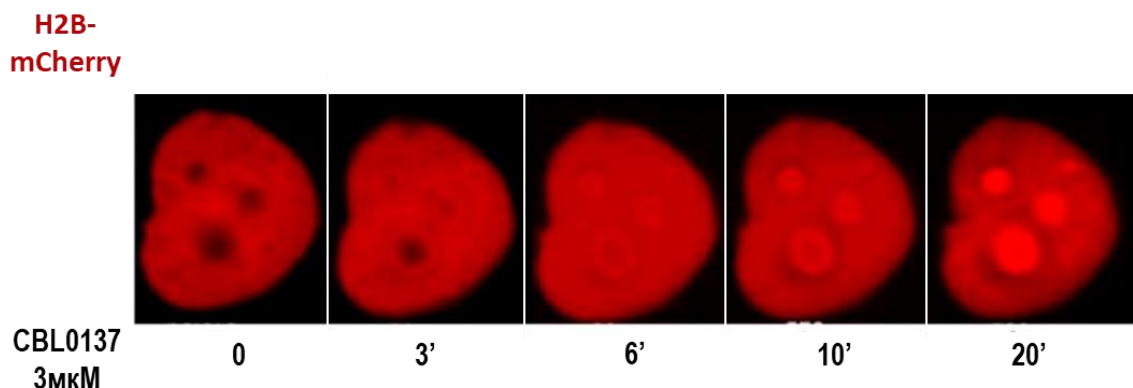


Рисунок 16 - Динамика релокализации гистона H2B между хроматиновой и ядрышковой фракциями при действии кураксина. Классические УБЛ такого эффекта не вызывают

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

Рисунок 17 - Влияние ДНК-тропных АТ-специфичных лигандов на локализацию гистона H1 через 3, 6 и 24 часа после обработки клеток (метод прижизненной микроскопиии клеток HT1080 H1-mCherry)

В популяции клеток HT1080 H1-mCherry 89% клеток имеют хроматин-связанную локализацию гистона H1. При обработке клеток УБЛ хехст33342, хехст33258, DAPI, диминазен, нетропсин наблюдается исключение линкерного гистона из хроматина и его релокализация в ядрышки. Самый сильный эффект регистрировали для диминазена, при действии которого в течение 24 часов происходила релокализация гистона в 72% клеток, а доля клеток с хроматиновой локализацией гистона была обратно пропорциональна времени обработки. Для нетропсина, напротив, показано, что с увеличением времени обработки доля клеток с ядрышковой локализацией гистона H1 становится меньше, вплоть до полного соответствия контрольным клеткам через 24 часа после добавления УБЛ.

Полученные результаты по наблюдению изменения локализации линкерного гистонового белка H1 после обработки клеток исследуемыми ДНК-тропными соединениями позволяют сделать выводы о наличии слабого хроматин-дестабилизирующего эффекта УБЛ и отметить этот метод как наиболее чувствительный для детекции изменений структуры хроматина при слабых модифицирующих воздействиях.

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

Было показано, что в основе дестабилизации нуклеосом кураксином лежит его способность модулировать активность белкового шаперона FACT, функцией которого является поддержание и изменение структуры хроматина в ходе различных процессов с участием ДНК.

FACT состоит из двух субъединиц – SPT16 (suppressor of Ty16) с молекулярной массой около 140 кДа и SSRP1 (structure-specific recognition protein 1) с молекулярной массой около 80 кДа. SPT16 – высоко консервативная субъединица FACT, которая состоит из нескольких доменов и с высокой аффинностью связывается с димером гистонов H2A-H2B [50], а также с N-концевыми участками гистонов H3 и H4. Субъединица SSRP1 принадлежит к белкам семейства HMG (High Mobility Group) [51]. Этот белок содержит четыре домена - N-концевой,

средний домен, ответственный за димеризацию, ДНК-связывающий HMGB-домен и С-концевой домен [52].

В этой части работы мы исследовали влияние ряда 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 второй метод- 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 (Рисунки 18, 19). Самый сильный эффект на локализацию субъединицы SSRP1 оказали диминазен и DAPI. Также было продемонстрировано, что эффект каждого соединения регистрировался уже через 1 час после обработки и нарастал в течение следующих 23 часов.

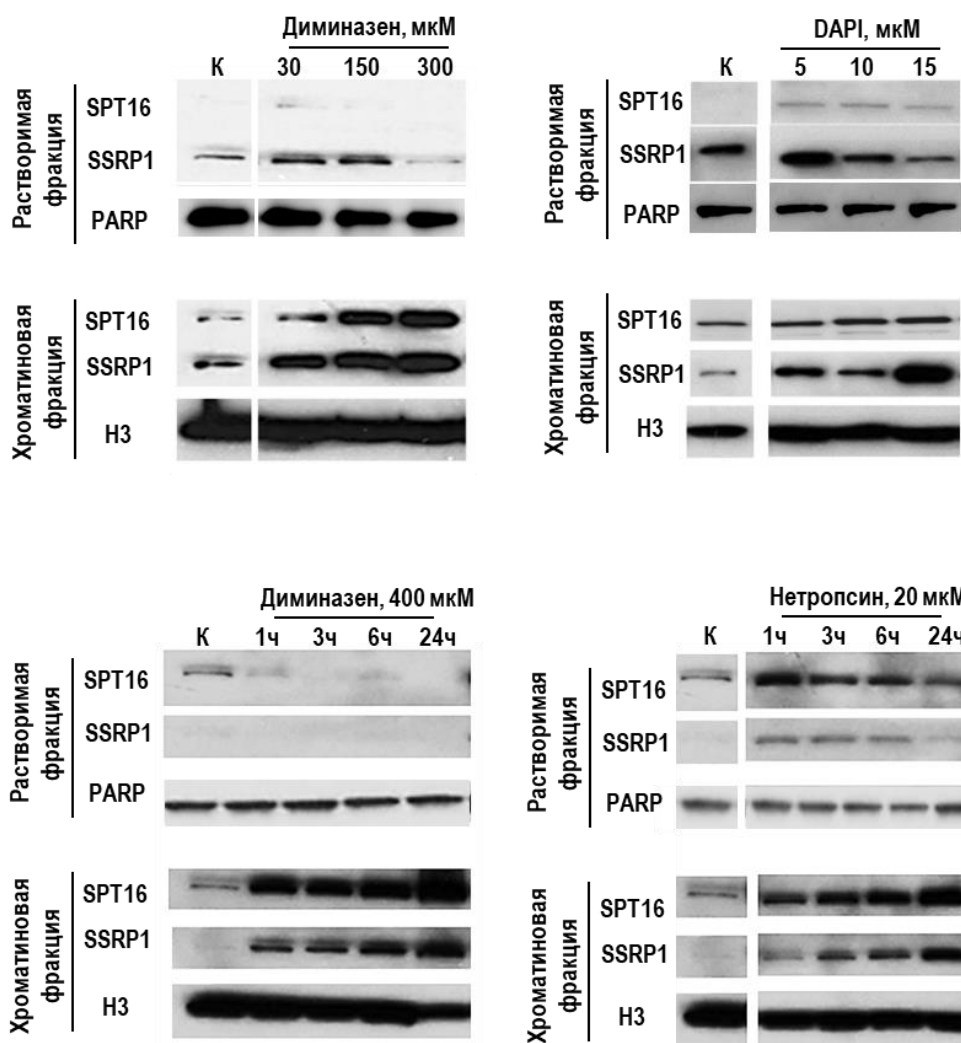


Рисунок 18 - Влияние соединений на распределение субъединицы белкового шаперона FACT SSRP1 между растворимой (хроматин-несвязанной) и хроматин-связанной фракциями при обработке клеток HeLa SSRP1-GFP H2B mCherry в зависимости от дозы УБЛ и времени обработки

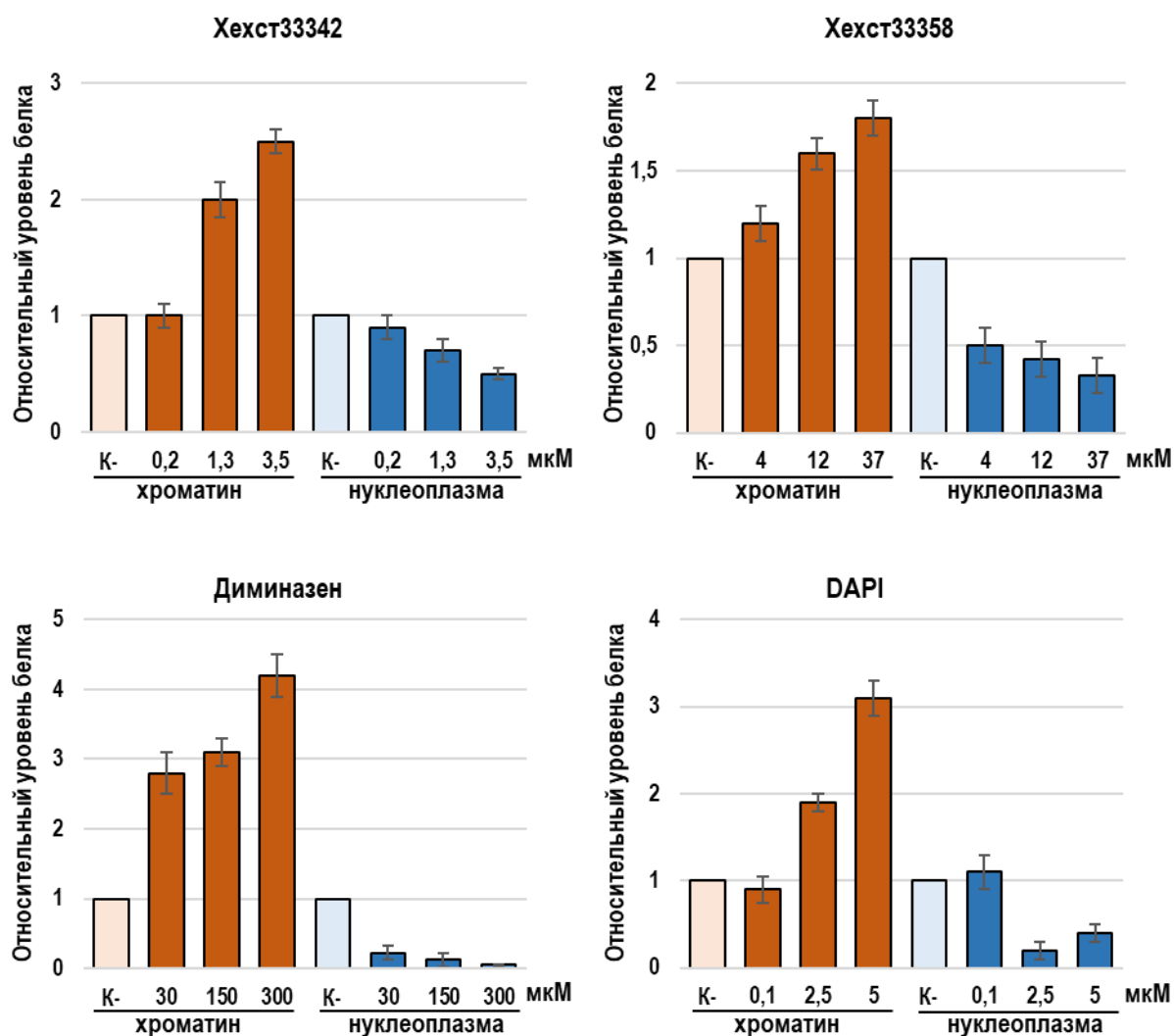


Рисунок 19 - Влияние соединений на распределение субъединицы белкового шаперона FACT SSRP1 между растворимой (хроматин-несвязанной) и хроматин-связанной фракциями при обработке клеток HT1080 различными дозами АТ-специфичных лигандов (данные денситометрического анализа результатов вестерн-блоттинга представлены как $M \pm m$).

Полученные данные полностью согласуются 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 20).

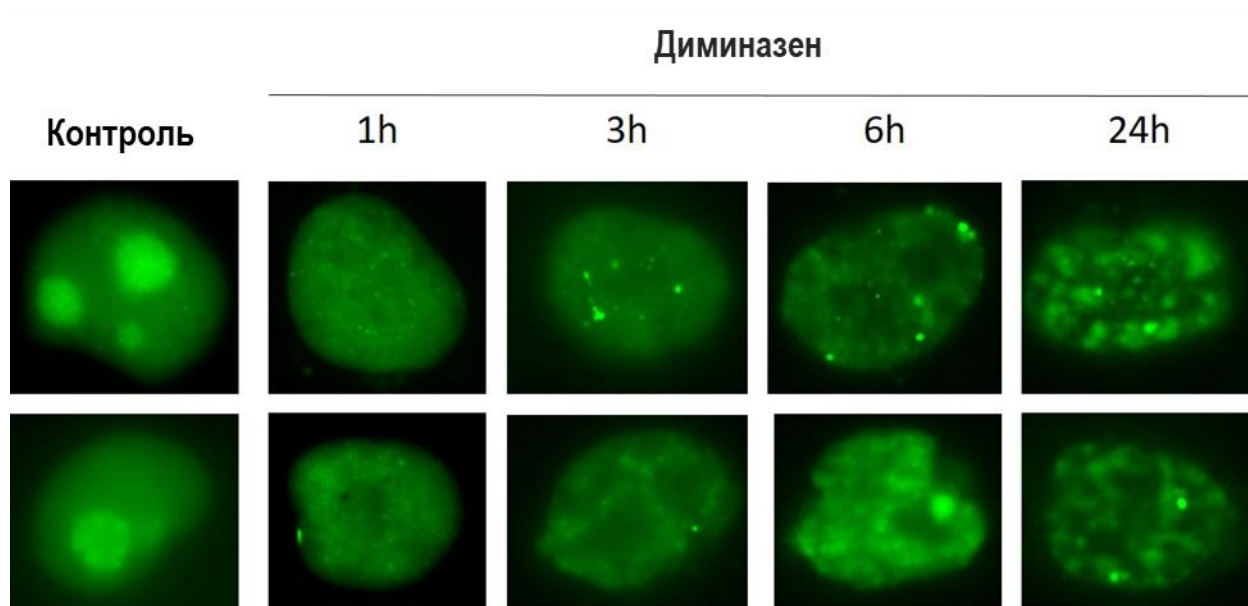


Рисунок 20 - Влияние соединения диминазен на перераспределение субъединицы белкового шаперона FACT SSRP1 между ядрышковой и хроматин-связанной локализациями при различном времени инкубации клеток HeLa SSRP1-GFP с агентом

1.3. Обсуждение

УБЛ связываются с узкой бороздкой ДНК посредством водородных, ионных сил и Ван-дер-ваальсовых, и рассматриваются в качестве перспективных регуляторов экспрессии генов. В качестве основы для создания новых УБЛ часто используются фрагменты хехста, диокармицина, нетропсина и других. Несмотря на то, что по структуре соединения относятся к разным химическим классам, все УБЛ обладают рядом общих качеств, к которым относятся планарность, «форма полумесяца» и расстояния между атомами водорода, которые образуют водородные связи с основаниями ДНК. Этот фактор играет важную роль для производных нетропсина и хехста, так как обуславливает их специфичность и величину константы связывания.

Самым широкоиспользуемым методом определения предпочтительных сайтов связывания является футпринтинг, который позволяет выявить сиквенс-специфичность лигандов, а также установить их константы связывания.

Используя оптимизированную методику футпринтинга, мы исследовали свойства как УБЛ и кураксина CBL0137. Предпочтительной последовательностью

нуклеотидов сайта связывания малых молекул являются АТ-богатые последовательности. Это обуславливается образованием водородных связей между атомом кислорода тимина, не участвующим в образовании связей в ДНК. В случае взаимодействия с большой бороздкой ДНК предпочтительные сайты узнавания зависят от структуры агентов. Ранее методом футпринтинга с ДНКазой I и гидроксил радикалами [53, 54] была продемонстрирована специфичность УБЛ к сиквенсам AAATTACG, TTCTCA, TTTCTCAA и др. При изучении сиквенс-специфичности узкобороздочных лигандов методом футпринтинга при использовании флуоресцентной метки показано, что диминазен и пентамидин проявляют специфичность к АТААСААТТТ. Ранее методом рентгеноструктурного анализа была продемонстрирована природа специфичности диминазена к коротким последовательностям АТ [55]. Установлено, что азиридиновая группа этого агента формирует водородную связь с атомом кислорода тимина, а его имидамидные группы в комплексе с водой формируют водородные связи с гетероциклическими основаниями. Аналогичные комплексы с ДНК формирует DAPI [56]. В основе структуры хехст33342 и хехст33258 лежит бисбензимидазольная группа, а отличаются они друг от друга одним боковым заместителем. Водород при атоме азота бензимидазольного остатка обуславливает сиквенс-специфичность этих агентов [57]. Представители этого класса также имеют сродство к АТ-богатым сиквенсам, однако их специфичность к АТААСААТТТ различна.

В ходе исследования сиквенс-специфичности кураксина было показано, что данный агент обладает сродством к последовательностям AGCCG, CAACA, TGTTT, TCATG, GGCATG. Анализ литературы не позволил выявить специфические белки, для которых данные сиквенсы являются консенсусными, однако наличие предпочтительных сайтов связывания для данной молекулы было продемонстрировано впервые.

В целом, различия в сродстве узкобороздочных лигандов к сиквенсу макромолекулы могут определять их способность нарушать работу ферментов метаболизма ДНК, таких как полимеразы, хеликазы, топоизомеразы и т.д.

Топоизомеразы были описаны Дж. Вангом в 1978 г.[58]. Эти ферменты вызывают обратимое изменение степени сверхспирализации молекулы ДНК. В частности, топоизомераза I снимает напряжение путем разрыва фосфодиэфирной связи в одной из цепей и таким образом позволяет спирали ДНК вращаться. После релаксации топоизомераза соединяет разорванные концы. Для выполнения этой реакции топоизомераза I образует динамический комплекс с ДНК, как бы оборачиваясь вокруг нее. В настоящей работе мы исследовали влияние DAPI, пентамидина, диминазена на активность топоизомеразы *in vitro*. Было показано, что ни один из исследуемых классических УБЛ не оказывает влияния на работу фермента *in vitro*. Наши данные согласуются с результатами экспериментов Chen et al [49], которые изучили влияние УБЛ на частоту появления одноцепочечных разрывов ДНК при действии топоизомеразы I. В работе этих исследователей было продемонстрировано, что только хехст33258 и хехст33342 вызывают нарушение второй стадии работы фермента, ингибируя его лигазную активность, позднее эти данные были подтверждены [59]. Для кураксинов была впервые продемонстрирована способность ингибировать активность топоизомеразы I.

До недавнего времени противоопухолевый потенциал ДНК-тропных молекул рассматривался исключительно с точки зрения их способности вызывать повреждения макромолекулы. Такая стратегия поиска препаратов основана на том, что высокая скорость пролиферации, а также нестабильность генома вследствие инактивации репарационных систем в опухолевых клетках делает их более уязвимыми к накоплению разрывов ДНК по сравнению с нормальными клетками. Генотоксические ДНК-тропные молекулы либо ковалентно связываются с ДНК, образуя многочисленные сшивки или аддукты (цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин и митомицин C), либо алкилируют основания макромолекулы (метилметансульфонат, темозоломид), либо вызывают разрывы ДНК путем стабилизации комплекса ДНК-белок (камптотецин, этопозид) [60, 61]. При этом влияние ДНК-тропных соединений на структуру хроматина находилось на периферии зрения молекулярных онкологов и не считалось перспективным в контексте противоопухолевой терапии. Тем не менее к настоящему моменту

накоплено много данных, свидетельствующих о том, что такие малые молекулы, не связываясь ковалентно с ДНК, способны модулировать профиль экспрессии генов и активность внутриядерных белков, проявляя при этом противоопухолевые и антиканцерогенные свойства [62], [63-66], [46, 67, 68]. ДНК-тропные молекулы могут изменять стерические характеристики дуплекса, влиять на его гибкость, экранировать определенные позиции по малой бороздке ДНК, конкурентно ингибируя работу ферментов «домашнего хозяйства», а также участвовать в стабилизации альтернативные структур ДНК, например, G-квадруплексов (Рисунок 21) [69]. Механизм цитотоксического действия молекул, вызывающих нарушение структуры хроматина, к настоящему моменту до конца не изучен.

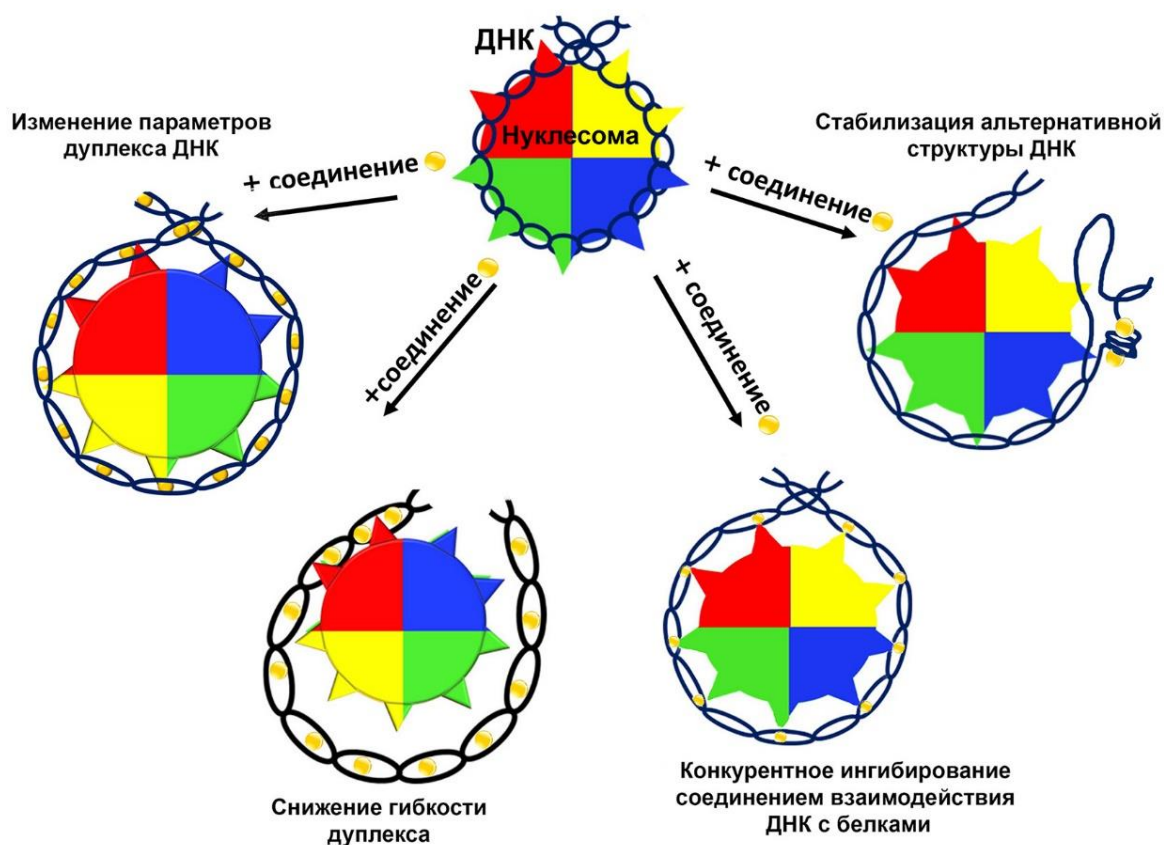


Рисунок 21 - Возможные механизмы влияния ДНК-тропных молекул на процесс компактизации ДНК

Эукариотическая ДНК упакована в хроматин, который представляет собой высокоупорядоченный комплекс ДНК и гистонов. Вокруг нуклеосомного ядра, которое состоит из четырех пар гистонов - центрального тетрамера (H3/H4) и двух

боковых димеров (H2A/H2B), ДНК делает 1,67 оборота. Линкерный гистон H1 соединяет между собой соседние нуклеосомы и, видимо, задействован в формировании более высоких уровней компактизации хроматина [70, 71].

Ранее было показано, что кураксин CBL0137, который обладает противоопухолевой и антиканцерогенной активностью, взаимодействуя с ДНК нековалентно, способен изменять стерические характеристики дуплекса, что приводит к нарушению взаимодействия ДНК с гистонами, вследствие чего происходит частичная (при малых дозах кураксина) или полная (при высоких его дозах) «разборка» нуклеосомы [68].

Одним из основных сенсоров нарушения структуры хроматина является гистоновый шаперон FACT, функции которого заключаются в поддержании и изменении структуры хроматина в ходе репликации, транскрипции и трансляции. FACT практически не взаимодействует с интактной нуклеосомой. Ослабление взаимодействия между гистонами и макромолекулой обеспечивает субъединице FACT SPT16 доступ к сайтам связывания, расположенным на коровых гистонах H3/H4. При этом освобожденная от гистонов ДНК подвергается отрицательной сверхспирализации, что приводит к появлению большого числа альтернативных структур, с том числе участков левозакрученной спирали Z-ДНК. Такие структуры узнаются и связываются другой субъединицей FACT SSRP1. Массовое связывание гетеродимеров FACT с различными компонентами «разобранного» хроматина получило название «хроматинового захвата» (chromatin trapping) [46, 68]. Истощение нуклеоплазматического пула FACT приводит к резкому снижению экспрессию генов сигнального пути NF- κ B и HSF-1, а также к активации белка p53 [44].

В нашей работе мы провели исследование влияния хехст33342, хехст33258, диминазена, пентамидина и нетропсина на структуру хроматина и локализацию белка FACT. Было показано, что в нетоксических концентрациях ни один из агентов не вызывает исключение коровых гистонов H2A/H2B из нуклеосомы, однако все они способствуют вытеснению линкерного гистона H1 из хроматина. Наибольший эффект регистрировался при действии Диминазена, так, доля клеток

с релокализацией линкерного гистона из хроматин-связанного состояния в ядрышки после обработки этим агентом составила 72%. Несмотря на то, что мы выявили слабый дестабилизирующий эффект УБЛ, этого влияния оказалось достаточно для того, чтобы инициировать перераспределение гистонового шаперона между внутриядерными компартментами. Так, при действии всех УБЛ мы наблюдали процесс перехода FАСТ из ядрышков в хроматин.

Таким образом, в данной части работы мы установили, что даже близкие по химической структуре УБЛ имеют сродство к различным последовательностям ДНК. Также было показано, что все УБЛ обладают способностью дестабилизировать структуру нуклеосом, вызывая вытеснение из хроматина линкерного гистона Н1 и привлечение гистонового шаперона FАСТ.

Помимо этого, было установлено, что некоторые УБЛ способны влиять на активность топоизомеразы I, обеспечивающей снятие сверхспирализации ДНК. Нарушение двухтактного режима работы фермента и ингибирование его лигазной активности должно приводить к накоплению одонитевых разрывов и активации белков репарации. Белок поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1 (PARP1) является ядерным белком, который одним из первых связывается с местом разрыва ДНК и модулирует функциональную активность многих белков репарации. В связи с этим, дальнейшим направлением исследования было изучение влияния УБЛ на активность PARP I *in vitro* и *in vivo*.

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

2.1. Обзор литературы

2.1.1. Семейство белков PARP

Поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) — класс белков, которые катализируют поли-АДФ-рибозилирование (PAR), один из видов посттрансляционной модификации белков, необходимой для белок-белковых взаимодействий и связывания со специфичными мишенями. Суть реакции, заключается в переносе АДФ-рибозила на поли-АДФ-рибозильную цепь, которая связана с модифицируемым субстратом, в котором донором АДФ-рибозы выступает никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺) (Рисунок 22).

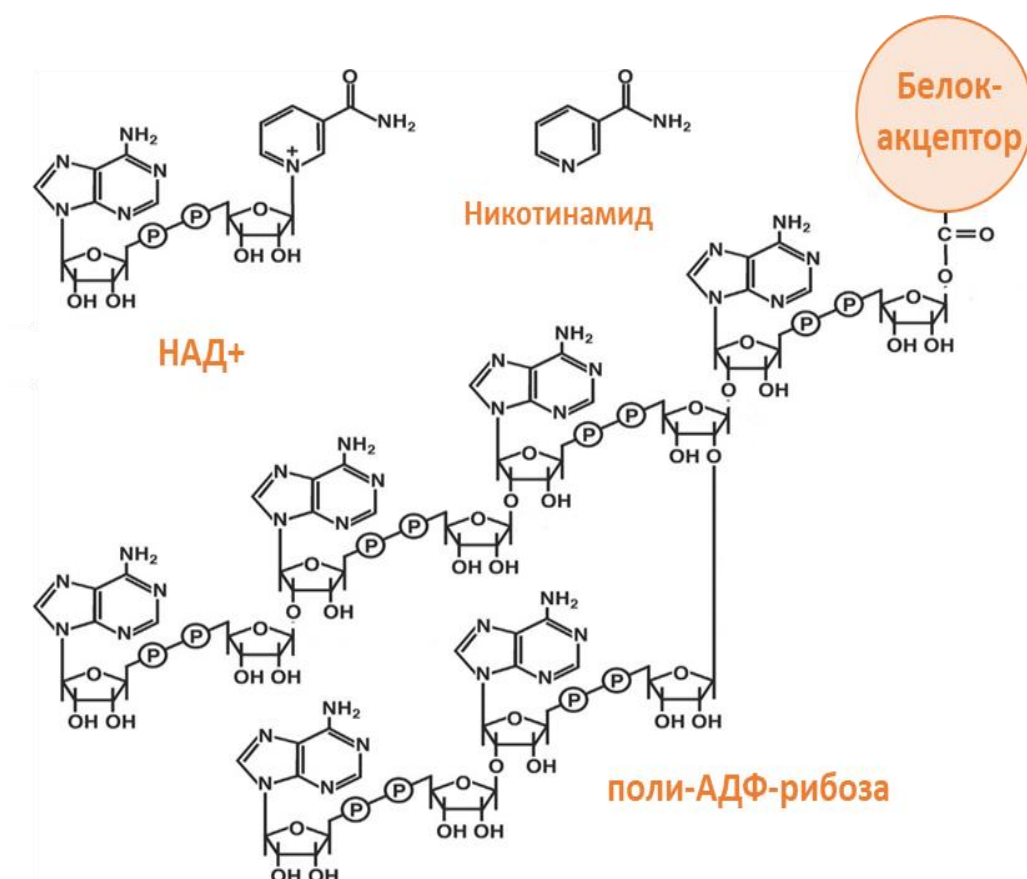


Рисунок 22 - Реакция поли-АДФ-рибозилирования [72]

Эта реакция важна для протекания большого числа процессов, таких как репарация ДНК, митоз, апоптоз, регуляция транскрипции, сборка хроматина и

др. [73]. Поли-АДФ-рибозилирование, в ходе которого формируется полимер длиной до 200 звеньев (средняя длина – 20-25 звеньев)[72] весьма энергозатратно. Отрицательный заряд поли-АДФ-рибозы (pADPr) и ее крупные размеры препятствуют функционированию таких ферментов, как топоизомеразы, протеинкиназы, а также способствуют изменению структуры хроматина [74].

Одной из основных функций данной группы белков является регуляция процессов репарации. Считается, что основным событием, которое активирует реакцию PAR, является разрыв ДНК. Для PARP также была выявлена способность регулировать экспрессию генов при воздействии на инсуляторы. Более того, представители этого класса белков способны ингибировать активность метилтрансферазы DNMT1, предотвращая метилирование *de novo*. Помимо этого, для ферментов PARP 1, PARP 2, PARP 9/BAL1 и PARP 14/Coast6 была показана способность выступать в роли транскрипционных ко-факторов, регулируя процессы синтеза РНК [75, 76].

У человека известно 17 ферментов, принадлежащих к семейству PARP, все они в структуре имеют гомологичный каталитический домен и эволюционно, по всей видимости, происходят от одного белка. Первым подробно исследованным ферментом данного семейства стал PARP 1. Он ответственен за протекание 85-90 % реакций поли-АДФ-рибозилирования, которые происходят в клетке. Активность PARP 2 ниже, несмотря на то, что их каталитические домены гомологичны; это, возможно, объясняется значительными различиями в структуре ДНК-связывающих доменов этих ферментов. Остальные представители семейства PARP тоже способны катализировать реакцию поли-АДФ-рибозилирования, однако зачастую гены этих ферментов несут мутации в каталитическом домене, что в значительной степени снижает их активность [77].

2.1.2. PARP 1: строение и свойства

В состав белка PARP 1 (молекулярная масса 113 кДа) входит 1014 аминокислотных остатков, и состоит он из 3 доменов: (1) N- концевое (42 кДа), который включает в себя сайт связывания с ДНК и сайт, определяющий

локализацию фермента в ядре (NLS), (2) центрального- автомодификационного домена (16 кДа) и (3) С-концевого-каталитического домена (55 кДа).

ДНК-связывающий домен (DBD) содержит в своем составе три цинковых пальца: первый необходим для активации фермента при появлении одноцепочечных разрывов в ДНК, второй - при фомировании двухцепочечных. Третий цинковый палец не является обязательным для связывания PARP-1 с ДНК, он необходим для восстановления структуры ДНК-связывающего домена, который перестраивается при изменении каталитической активности фермента.

Автомодификационный домен (AD) содержит много остатков глутаминовой кислоты – последовательность из 10-28 остатков располагается в центре домена и является акцептором ADPr. Домен включает мотив BRCT, который был также обнаружен в ферментах, активирующихся при повреждении ДНК. Этот домен является посредником между системами репарации и белками сверточных точек клеточного цикла. Помимо этого домен BRCT отвечает за димеризацию белка [78]. Каталитический домен (CD) включает аминокислотные остатки, которые необходимы при связывании НАД⁺ с гистоном H4 [79].

Исследования *in vitro* продемонстрировали, что удаление PARP-1 с ДНК открывает доступ ферментам репарации, при этом уровня синтеза рADPr снижается [80]. Дальнейший рост рADPr ингибируется двумя белками, которые гидролизуют полимер – АДФ-рибозил-гидролаза (ARNH3) и поли(АДФ-рибоза)-гликогидролаза (PARG). Эти ферменты участвуют в удалении полимера с PARP-1, при этом способность распознавать разрывы цепи ДНК у PARP1 восстанавливается [81]. У дрозофилы PARG локализуется в нуклеоплазме [82], у млекопитающих местоположение PARG варьирует в зависимости от фазы цикла [83]. PARP 1 располагается вдоль хроматина и в ядрышках.

PARP 1 является одним из самых распространенных белков ядра, бóльшая часть белка либо связана с хроматином, либо накапливается в ядрышках [84], в свободном виде в ядре этого фермента практически нет.

2.1.3. Роль PARP 1 в процессах жизнедеятельности клетки

Долгое время активация PARP 1 рассматривалась только как компонент распознающей системы репарационного комплекса. Образование разрывов в макромолекуле индуцирует накопление pADPr в зоне хроматина с повреждением ДНК [85]. В исследованиях Bryant и соавт. [86] показана корреляция между уровнем фосфорилирования H2Ax и количеством полимера pADPr, который образуется в тех же зонах хроматина, что и при повреждении макромолекулы. Непосредственное взаимодействие между H2Ax и PARP 1 в клетках происходит в ответ на ионизирующее облучение. Ингибирование активности PARP 1 способствует накоплению фосфорилированного белка H2Ax [87].

При исследовании рекомбинации ДНК у дрозофилы были получены данные о механизмах функционального связывания H2Av и PARP 1. Эффективная репарация двунитевых разрывов путем гомологичной рекомбинации у дрозофилы ассоциирована с фосфорилированием H2Av по Ser137. После репарации гистоновая ацетилтрансфераза Tip60 в составе хроматин-ремоделирующего комплекса ацетилюет Ser137 в фосфорилированном гистоне H2Av. При этом происходит АТФ-зависимое ремоделирование хроматина, которое включает в себя обмен фосфорилированного H2Av на его нефосфорилированный аналог [88]. У человека Tip60 (KAT5) также вовлечен в процесс ремоделирования хроматина и участвует в репарации ДНК [89]. Как и многие ремоделирующие комплексы Tip60 не взаимодействует с хроматином при наличии линкерного гистона H1 в нуклеосоме. Тогда как при активации PARP 1 происходит удаление H1 из хроматина [90]. На основании этих данных была построена модель взаимодействия H2Av – PARP-1 (Рисунок 23).

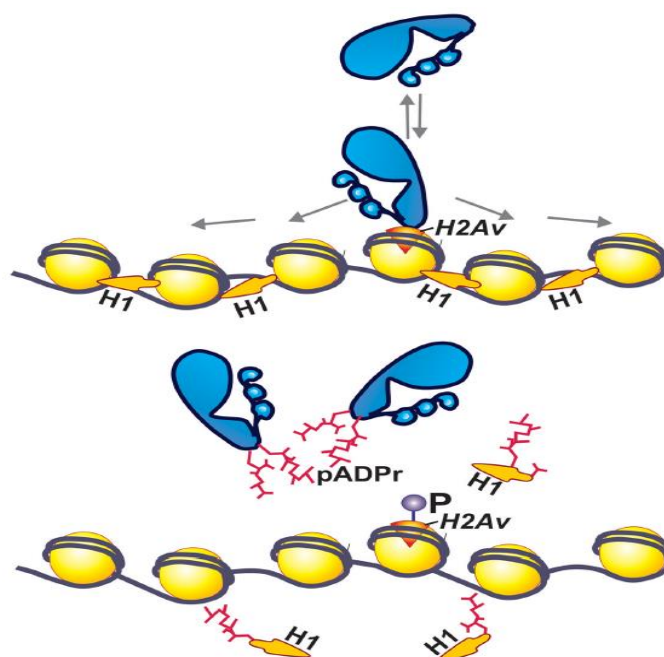


Рисунок 23 - Модель взаимодействия PARP 1 с гистонем H2Av [85]

На первой стадии при образовании разрыва в ДНК происходит активация комплекса H2Av-PARP1. Фосфорилирование H2Av блокирует ингибирование ферментативной активности PARP 1. Далее происходит поли-АДФ-рибозилирование гистона H1 активированным ферментом PARP 1, что способствует удалению гистона из поврежденной области. На следующей стадии с помощью комплекса Tip60 происходит ремоделирование этого участка хроматина, что облегчает связывание ферментов репарации с поврежденным участком. После репарации Tip60 удаляет Ser137-фосфо-H2Av из хроматина.

Одной из функций PARP 1 является модификация модификации белков. В результате присоединения pADPr активность белка меняется. Всего известно шестидесяти белков-мишеней для ковалентного присоединения поли-АДФ-рибозы [91]. Эти белки участвуют в ключевых ядерных процессах: синтезе и репарации ДНК, модулировании структуры хроматина, транскрипции и др. Из множества белков, связывающихся с поли-АДФ-рибозой нековалентно, отдельно можно выделить гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиды (hnRNPs), гистоны и белки, которые вовлечены в репарацию и регуляции клеточного цикла [92]. Нековалентное связывание белков с поли-АДФ-рибозой напрямую зависит от

длины рADPr: при увеличении длины возрастает электростатическое отталкивание между фосфатными остатками рADPr и ДНК [93].

Супрессор опухолевого роста p53 был одним из первых белков, для которого было продемонстрировано наличие рADPr-связывающего домена [94]. Длина такого домена - двадцать аминокислотных остатков, которые перекрываются с участками белка, которые ответственны за связывание с ДНК и прочими белками. Позднее в структуре ферментов, которые активируются при появлении разрывов в ДНК, были выявлены два рADPr-связывающих домена: макродомен (190 аминокислотных остатков) [95] и домен с цинковым пальцем, который связывается с рADPr (PBZ).

Для инициации процессов репарации или транскрипции в этом участке должно произойти ремоделирование хроматина, чтобы обеспечить доступ ферментам к ДНК. Взаимодействие между гистонами и ДНК происходит за счет отрицательно заряженных остатков фосфорной кислоты в ДНК и алкильными группами в составе гистонов. Было показано, что гистоны обладают высокой аффинностью к рADPr, а сила нековалентных взаимодействий между H1 и рADPr выше, чем при связывании гистона H1 с ДНК [90]. Гистон H1 конкурирует с PARP 1 за места связывания в промоторных областях генов [96], при этом удаление H1 из нуклеосомы в ходе реакции поли-АДФ-рибозилирования является необходимым для декомпактизации хроматина для транскрипции и репарации ДНК [97, 98] (Рисунок 24).

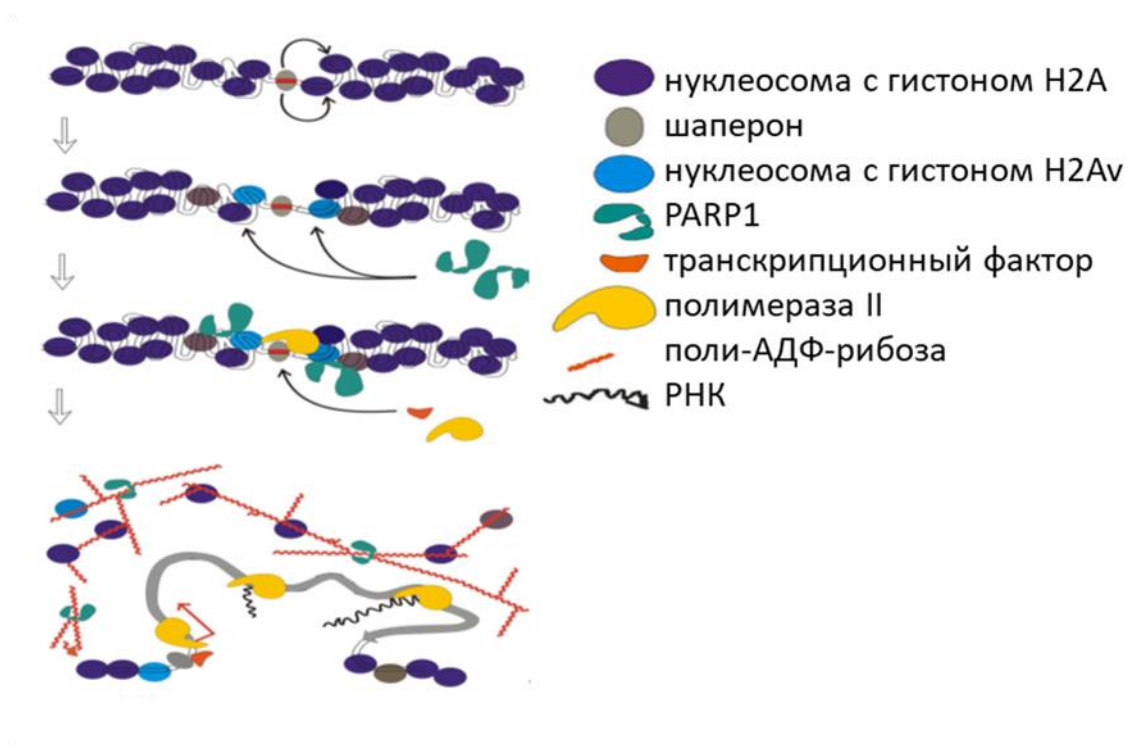


Рисунок 24 - Роль белка PARP-1 в процессе транскрипции [85]

Но этим участие PARP 1 в функционировании клетки не ограничивается. Одним из регуляторов сплайсинга мРНК являются гетерогенные ядерные рибонуклеопротеиды (hnRNPs), которые связываются с пре-мРНК, участвуя в процессе ее «созревания». Активность hnRNPs при этом модулируется при помощи реакции поли-АДФ-рибозилирования [91, 99]. Помимо этого, PARP 1 участвует в регуляции ферментов метилирования ДНК [100]. Так, при локальном поли-АДФ-рибозилировании PARP1 ДНК-метилтрансфераза I (Dnmt1) связывается с рADPr. Так как константа связывания рADPr и Dnmt1 гораздо выше константы связывания ДНК и Dnmt1, прямая функция метилтрансферазы I блокируется [101]. Инактивация ассоциированных с хроматином белков за счет их разобщения с ДНК и связывания с поли-АДФ-рибозой происходит и при репарации ДНК [102].

Одной из основных функций PARP1 является распознавание повреждений ДНК и участие в их репарации (Рисунок 25).

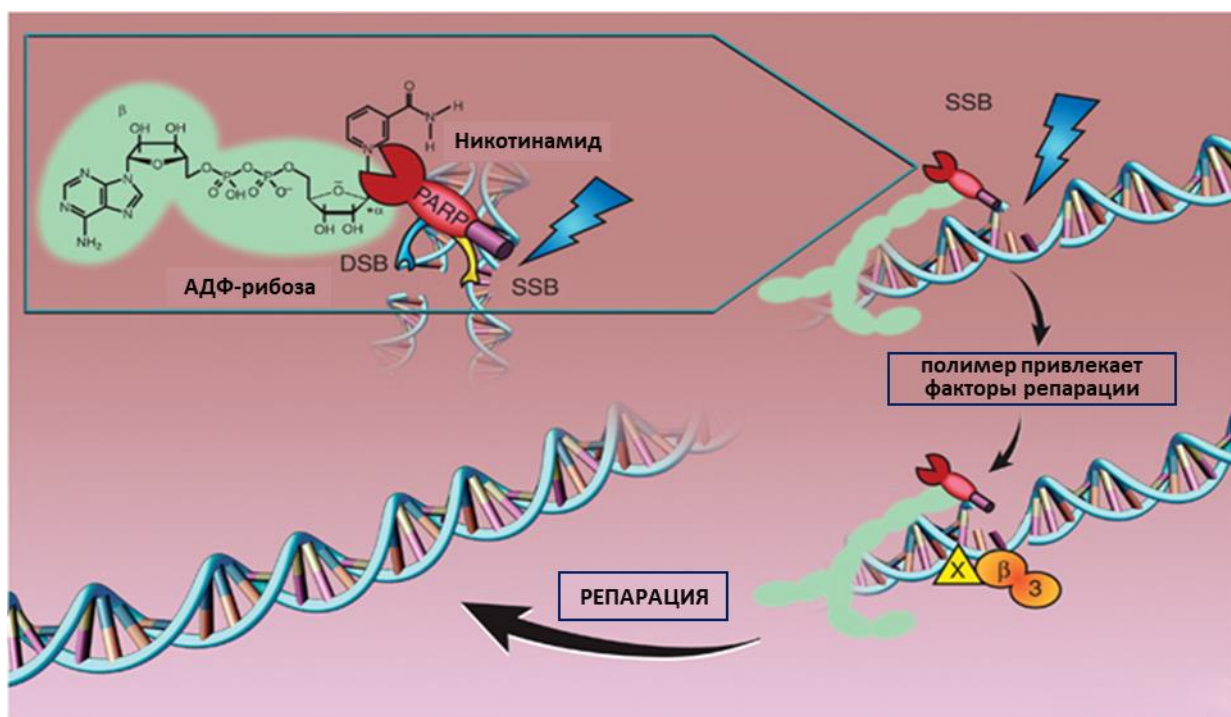


Рисунок 25 - Роль PARP-1 в устранении повреждений ДНК [99]

При образовании одно- и двунитевых разрывов (SSB и DSB, соответственно) белок PARP 1 связывается с концами нарушенной молекулы посредством цинковых пальцев (Zn1 и Zn2), при этом происходят конформационные изменения в других доменах PARP 1, в частности, сайт связывания с NAD⁺ становится более доступен для субстрата и активируется автополи-АДФ-рибозилирование [103]. Это служит сигналом для ферментов репарации. Одноцепочечные разрывы чаще всего образуются при эксцизионной репарации. Поврежденные основания узнаются и удаляются с помощью ДНК-гликозилаз. В результате этого формируются апуриновые/апиримидиновые сайты, которые расщепляются АП-эндонуклеазами. Это приводит к активации PARP 1 и привлечению ферментов репарации. В случае эксцизионной репарации оснований к месту одноцепочечного разрыва рекрутируются белки PNKP, APTX, XRCC1 и APLF; в случае эксцизионной репарации нуклеотидов - DDB2 и ALC1. При репарации двуцепочечных разрывов по механизму нехомологичного соединения концов привлекаются белки XRCC4 и ДНК-полимераза IV, при гомологичной рекомбинации – комплексы BRCA1–BARD1, MRN.

Было показано [104], что при образовании двунитевого разрыва, PARP 1 связывается с ДНК как мономер и принимает компактную конформацию с центром на домене WGR (консервативная последовательность триптофан-глицин-аргинин). В этой конформации WGR-домен образует междоменные контакты с первым и третьим цинковыми пальцами. Такое перераспределение запускает молекулярный переключатель в регионе HD каталитического домена, изменяет гибкость и динамику домена ART, что запускает реакцию поли-АДФ-рибозилирования в активном центре фермента.

Таким образом, PARP1 играет важную роль таких процессах как поддержание целостности генома, транскрипция, компактизация хроматина, метилирование ДНК, митоз и апоптоз.

2.2. Собственные результаты

2.2.1. Влияние узкобороздочных лигандов на активность белка PARP 1

Поскольку результатом непрямого генотоксического действия узкобороздочных лигандов являются одностранные разрывы ДНК (как результат нарушения работы топоизомеразы I), мы предполагали, что инициация молекулярного ответа на действие УБЛ осуществляется через поли(АДФ-рибоза)-полимеразу 1.

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

Первая серия экспериментов была направлена на изучение влияния 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 проводится 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 классическим ингибитором PARP и выступает в роли конкурента NAD⁺ при связывании с активным центром PARP 1. Также в исследование был включен интеркалятор бромистый этидий (Рисунок 26).

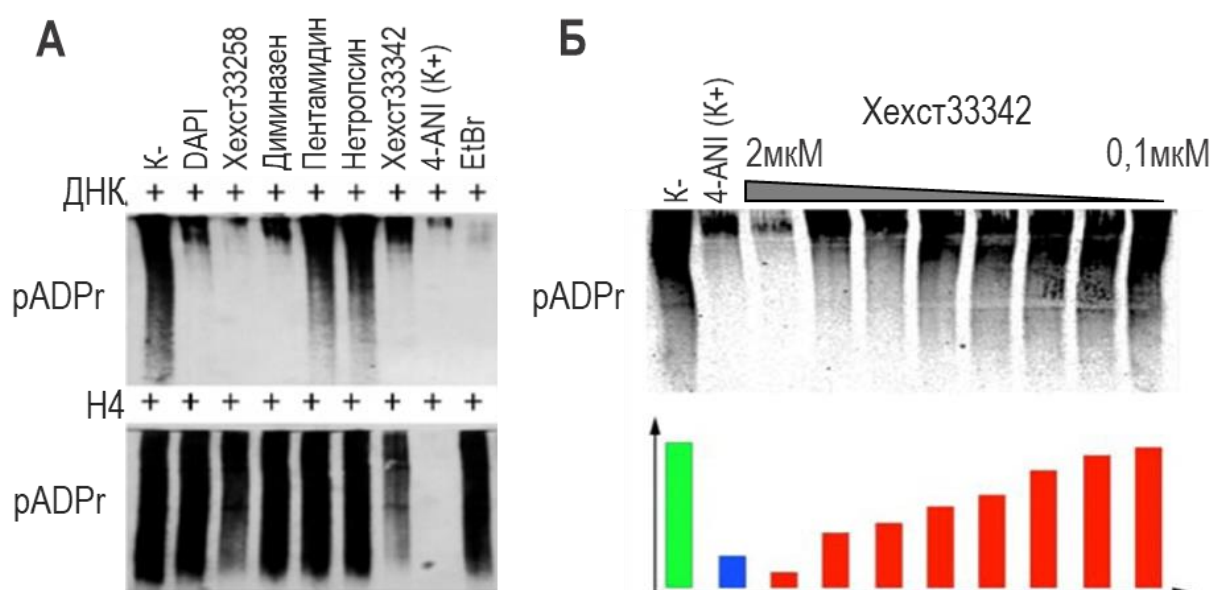


Рисунок 26 - Влияние ДНК-тропных молекул на активность белка *in vitro*. А. Накопление поли-АДФ-рибозы при инкубации белка PARP 1 с ДНК-тропными молекулами при активации реакции автополи-АДФ-рибозилирования ДНК (сверху) и гистонем H4 (снизу). Б. Хехст33342 дозозависимо ингибирует ДНК-зависимый путь активации PARP1, снизу приведены данные денситометрического анализа)

Мы обнаружили, 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. Далее на этой же системе *in vitro* мы

продемонстрировали, что ингибирование ДНК-зависимой активации PARP УБЛ носит дозозависимый характер (Рисунок 26, б).

Мы предположили, что специфическое ингибирование одного из путей активации связано с тем, что УБЛ физически препятствуют взаимодействию фермента с ДНК, но не с гистоном Н4. Для проверки этой гипотезы был проведен следующий эксперимент. Гистон Н4 или ДНК ковалентно привязывались к сефарозным частицам. Каждый из активаторов инкубировали с различными концентрациями хехст33342 или диминазена (см. [105]), далее в раствор добавляли белок PARP1. После инкубации сефарозные частицы осаждали, разделяли супернатант и осадок и исследовали каждую из фракций на наличие PARP1 с помощью вестерн-блоттинга (Рисунок 27). При инкубировании гистона Н4 и УБЛ с последующим добавлением PARP1 фермент связывается с гистоном Н4 и оказывается распределенным между супернатантом и осадком. При добавлении PARP1 к буферу, содержащему ДНК и УБЛ связывания фермента с ДНК не происходит и весь белок остается в супернатанте. Это подтверждает наше предположение о том, что механизмом ингибирования PARP1 при действии УБЛ является нарушение его взаимодействия с ДНК.

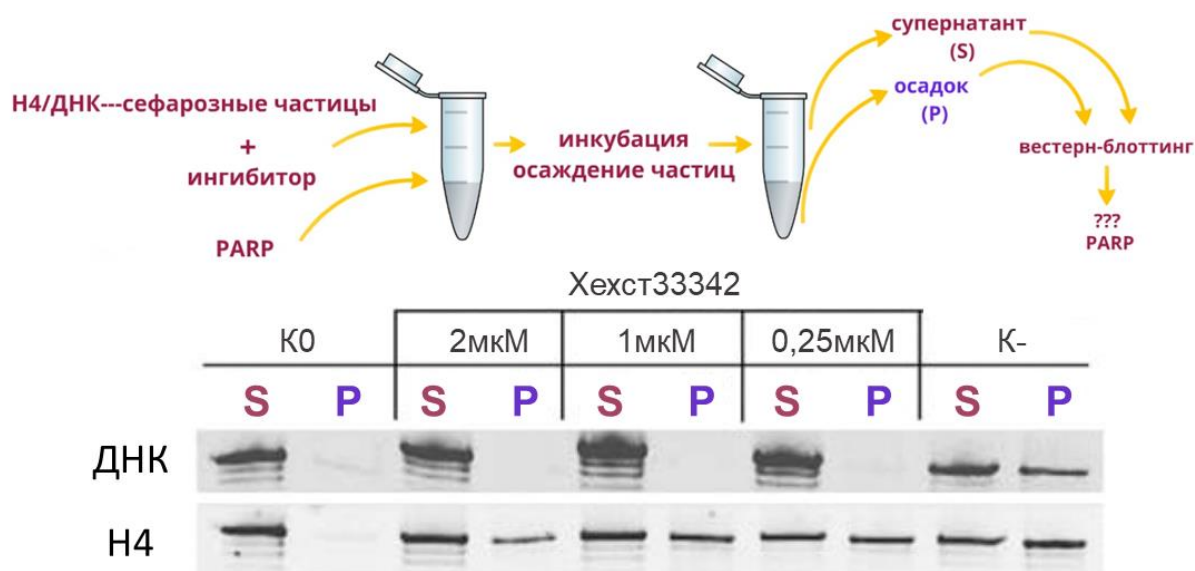


Рисунок 27 - Влияние хехст33342 на взаимодействие белка PARP1 с активатором - ДНК или гистоном Н4 (P – осадок, S – супернатант). Объяснение в тексте

Поскольку нам впервые удалось установить способность ДНК-тропных молекул разобщать связь фермента с ДНК-активатором по конкурентному механизму, вызывая ингибирование активности PARP1 *in vivo* и *in vitro*, следующими задачами исследования были: (1) установить константы полумаксимального ингибирования для каждого из УБЛ, а также (2) изучить влияние сиквенса ДНК-активатора на ингибирующую способность УБЛ.

В системе *in vitro* качестве активатора был использован 44-звенный олигонуклеотид с двумя взаимно комплементарными областями, которые могут формировать двухцепочечную молекулу ДНК из 18 пар оснований с одноцепочечным разрывом (Рисунок 28). Молекулы такого дизайна ранее применялись [106] в качестве модели со следующими свойствами: (1) количество пар оснований достаточно для взаимодействия с белком PARP 1 (не менее 7 оснований) [107]; (2) в олигонуклеотиде нет двухцепочечных концов; (3) четырехзвенные шпильки образуют конформации, не позволяющие ДНК димеризоваться. Для максимального сходства модели с интермедиатами при репарации в ДНК была добавлена концевая фосфатная группа на 5'-конце разрыва.

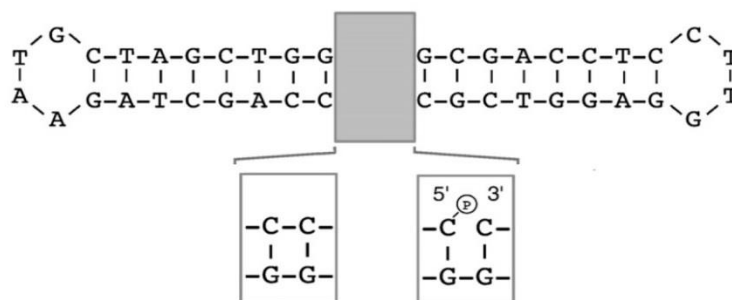


Рисунок 28 - Структура использованного модельного гантелеобразного дуплекса ДНК

Был проведен сравнительный анализ количества образующейся рADPr как продукта активации PARP1 при отсутствии и наличии одноцепочечного разрыва в молекуле h44.

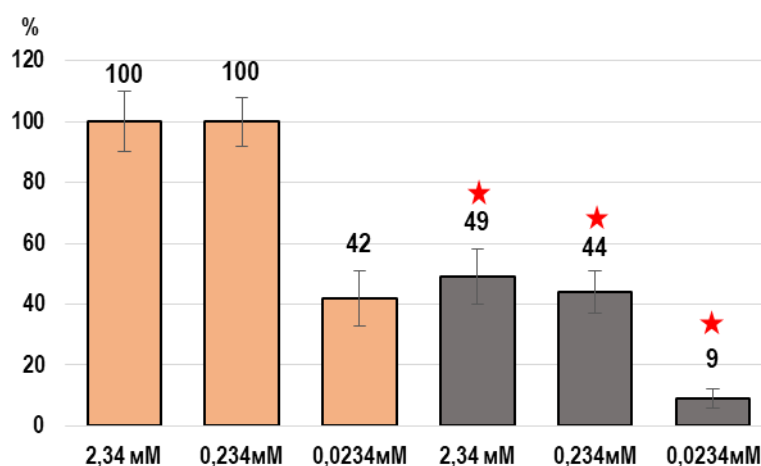


Рисунок 29 - Зависимость количества поли-АДФ-рибозы от концентрации ДНК-дуплекса h44 с одноцепочечным разрывом (показано оранжевым) и без него (показано серым) (★– значения относительной интенсивности полос статистически значимо отличны от интенсивности полос при активации реакции эквимоллярными количествами дуплекса без разрыва, $p < 0,05\%$)

Показано (Рисунок 29), что при эквимоллярных концентрациях ДНК с разрывом и без него поли-АДФ-рибозилирование проходит значительно активнее при наличии одноцепочечного разрыва в ДНК.

При проведении сравнительного анализа УБЛ было показано, что их способность ингибировать реакцию поли-АДФ-рибозилирования убывает в ряду DAPI $\approx$ Диминазен > Хехст3335 > Пентамидин > Нетропсин (Рисунок 30).

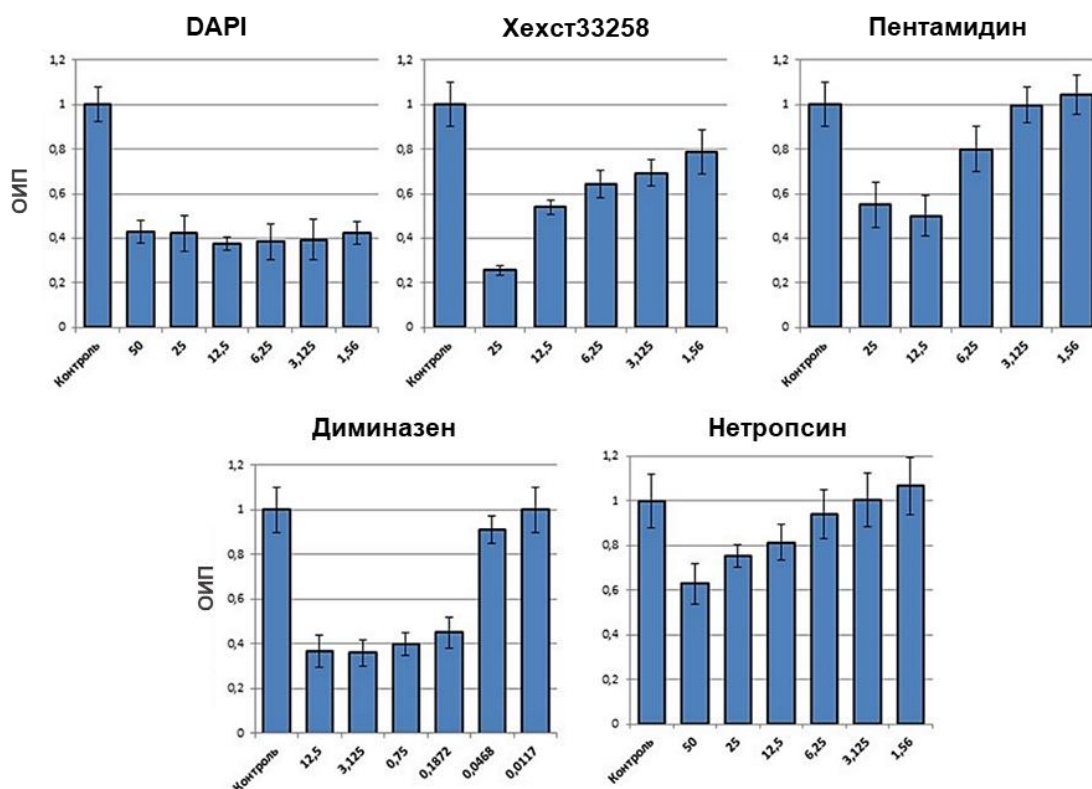


Рисунок 30 - Влияние различных УБЛ на активность PARP1 *in vitro* (данные денситометрического анализа). Значения нормированы на количество поли-АДФ-рибозы в отсутствии УБЛ. Данные представлены как $M \pm m$.

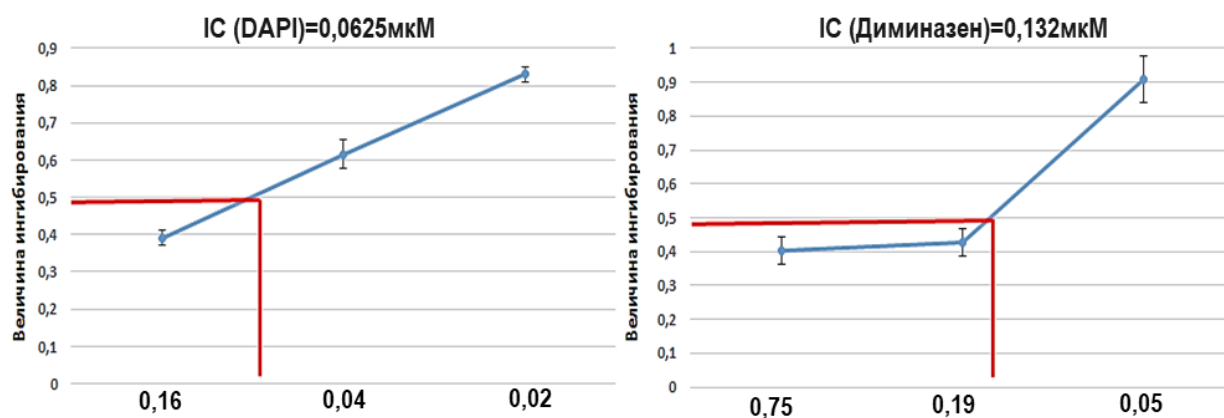


Рисунок 31 - Зависимость количества поли-АДФ-рибозы от концентрации DAPI и диминазена при активации реакции реакции 0,0117 мкМ дуплекса h44p с одноцепочечным разрывом. Данные представлены как $M \pm m$

Для определения IC50 были подобраны концентрации диминазена и DAPI, при которых эффективность ингибирования реакции составляет 30-90% (Рисунок 31).

Концентрация полумаксимального ингибирования ферментной реакции для DAPI составила 0,0625 нМ. При такой концентрации на 1 молекулу УБЛ приходится 3,4 пары оснований, что соответствует 5,3 молекулам DAPI на 1 молекулу h44. IC₅₀ для Диминазена оказалась равной 0,132 мкМ, что соответствует 11,3 молекулам на один гантелеобразный дуплекс h44. Это, по всей видимости, связано с тем, что диминазен обладает бóльшей сиквенс-специфичностью и избирательностью связывания с ДНК (в том числе и с h44) по сравнению с DAPI.

Таким образом, мы продемонстрировали, что УБЛ способны ингибировать PARP1 *in vitro* и *in vivo* на дрозофиле. Для исследования влияния хехста33342 и диминазена на активность PARP1 в клетках человека мы использовали клетки рака молочной железы BT474. В отличие от других, в клетках этой линии уровень экспрессии PARG (антагониста PARP) значительно снижен, что позволяет визуализировать активность поли-АДФ-рибозилирования методом вестерн-блоттинга. Обработка таких клеток классическими ингибиторами (конкурентами NAD⁺: 4-амино-1,8-нафталимид и Олапариб) приводит к снижению активности поли-АДФ-рибозилирования. Такой же дозозависимый эффект был продемонстрирован для хехст 33258 и хехст33342 (Рисунок 32).

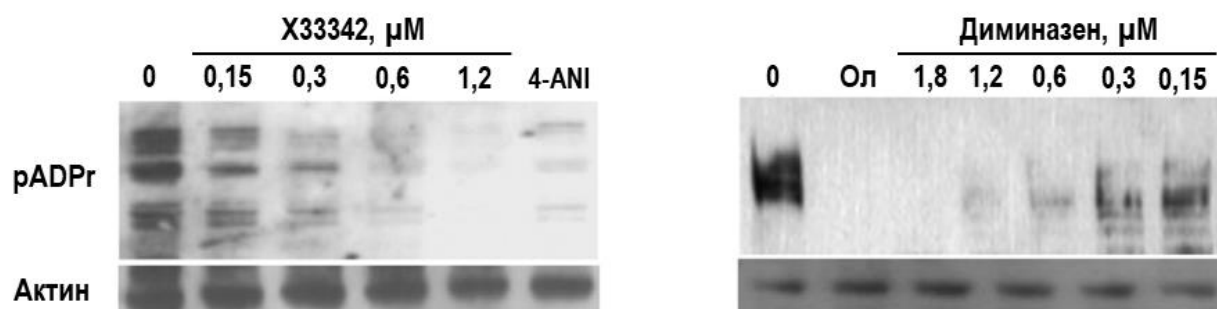


Рисунок 32 - Влияние ингибиторов PARP 1 на активность поли-АДФ-рибозилирования в клетках BT474 (X33342 – хехст33342, Ол-олапариб, 4-ANI - 4-амино-1,8-нафталимид)

2.2.1.2. Влияние УБЛ на активность и локализацию PARP1 *in vivo*

На следующем этапе мы исследовали 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 Parg27.1, несущая мутацию в гене поли(АДФ-рибоза)-гидролазы (PARG). Это связано с тем, что прямое измерение уровня поли-АДФ-рибозы у особей дикого типа затруднено из-за высокой активности PARG, которая быстро расщепляет поли-АДФ-рибозу, тем самым возвращая PARP 1 в активное состояние. 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 33).

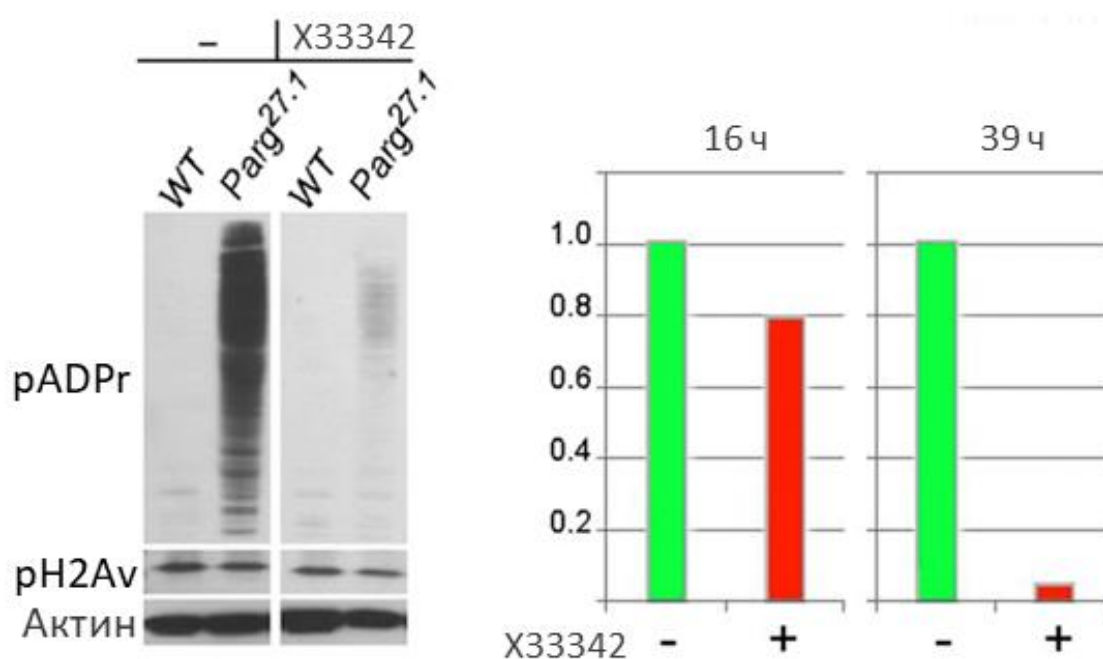


Рисунок 33 - Влияние хехст33342 на активность PARP 1 у личинок *Drosophila melanogaster* (X33342-хехст33342).

Мы показали, 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 мы провели оценку 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 34, стрелки). Ранее было показано, что за связывание PARP 1 с областями гетерохроматина отвечает функциональный домен, содержащий 3-й ДНК-связывающий цинковый палец. При обработке личинок узкобороздочным лигандом хехст33342 *in vivo* мы 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.

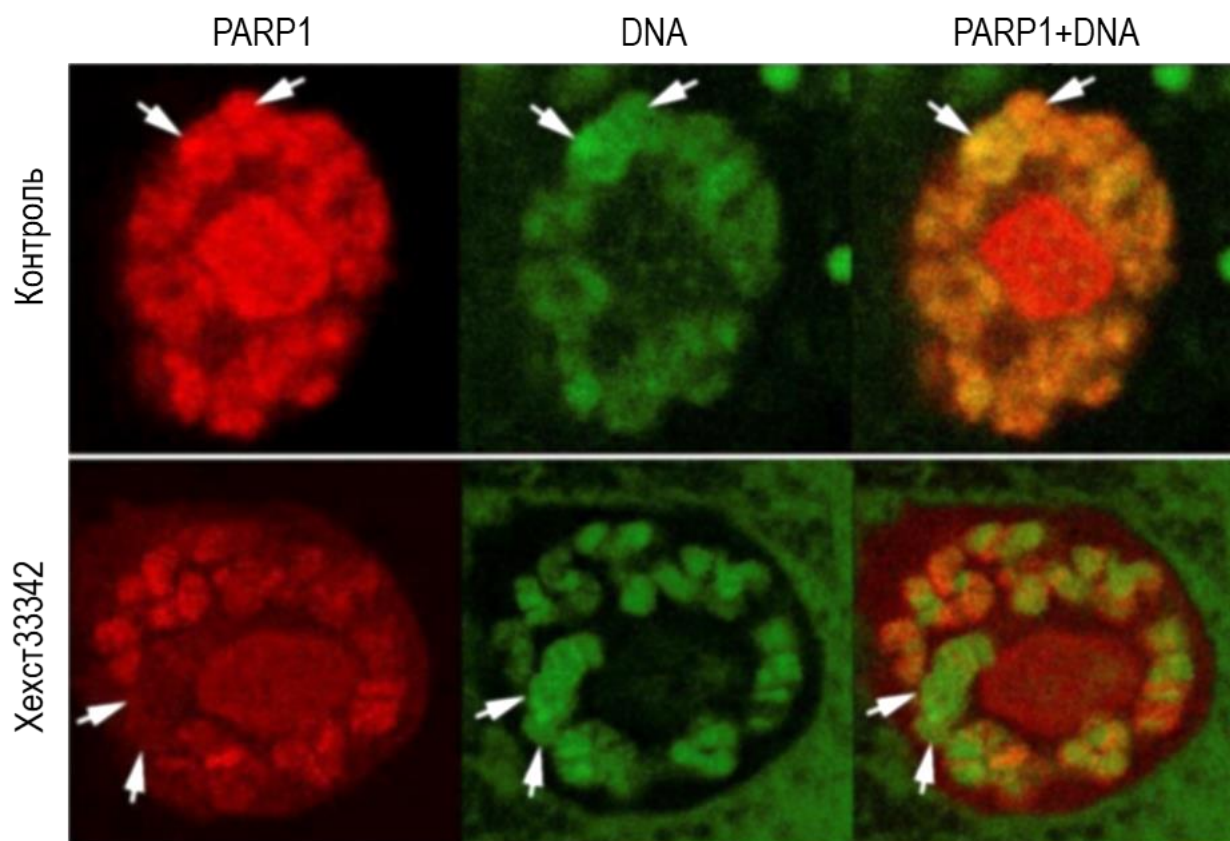


Рисунок 34 - Влияние хехст33342 на локализацию PARP1 в ядрах клеток слюнных желез дрозофилы (локализация PARP-1 показана красным, ДНК окрашена зеленым, стрелками показаны зоны конденсированного хроматина)

2.2.1.3. Реактивация экспрессии ретротранспозонов узкобороздочными лигандами

Ранее было показано[108], что связывание цинкового пальца PARP 1 с ДНК в первую очередь необходимо для обеспечения транскрепрессорных функций данного белка, в частности, обеспечения сайленсинга повторяющихся ретротранспозонов, локализованных в зонах гетерохроматина. При помощи метода иммунопреципитации хроматина (ChIP) мы провели 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 35).

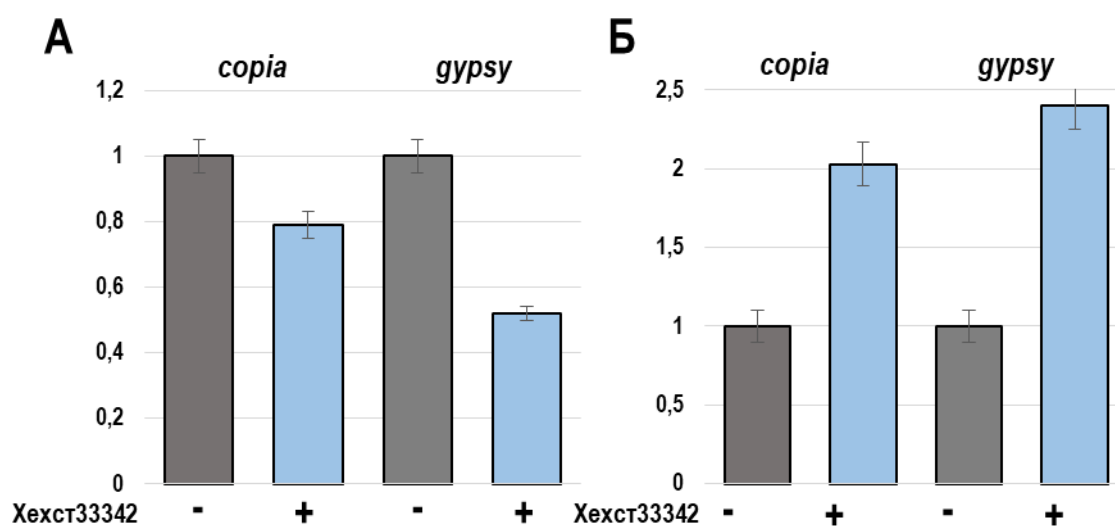


Рисунок 35 - Обработка личинок хехст33342 приводит к исключению PARP-1 из промоторных областей ретротраспозонов *Gypsy* и *Coria* (А, метод иммунопреципитации хроматина), при этом количество мРНК *Gypsy* и *Coria* увеличивается (Б, ПЦР реального времени). Данные представлены как $M \pm m$.

Мы показали, что при обработке личинок УБЛ количество молекул PARP 1, связанного с промоторными областями ретротранспозонов, значительно снижено по сравнению с интактными особями. Более того, используя ПЦР реального времени мы продемонстрировали, 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.

2.3. Обсуждение

В ходе наших исследований нам впервые удалось продемонстрировать *in vivo* и *in vitro*, что узкобороздочные лиганды способны ингибировать активность PARP1, разобщая связь фермента к ДНК-активатором.

Функции PARP1 достаточно хорошо изучены[107], однако нет полных данных о субстратах, которые этот фермент активируют. Показано, что PARP1 связывается с липкими и тупыми концами ДНК, АТ-богатыми участками ДНК, одноцепочечными разрывами, нуклеосомами и гистонами. Для некоторых субстратов показана способность активировать PARP1 [109]. Для исследования функционирования PARP1 *in vitro* D. Neuhaus и соавт. предложили модель дуплекса с одноцепочечным разрывом и без него. В их работе было показано, что PARP1 взаимодействует с дуплексом ДНК посредством цинковых пальцев ДНК-связывающего домена только при наличии ника[106], однако активация реакции поли-АДФ-рибозилирования не изучалась. Мы впервые показали, что при наличии ника активация фермента происходит активнее, чем при его отсутствии. Эти результаты полностью согласуются с данными вышеупмянутых авторов.

С помощью гантелеобразного дуплекса с разрывом, исследовано ингибирование белка узкобороздочными лигандами (DAPI, хехст33258, диминазен, пентамидин, нетропсин). Все исследованные соединения оказывали ингибирующее действие на фермент. Установлено, что способность соединений ингибировать реакцию увеличивается в ряду: нетропсин $\approx$ пентамидин < хехст33258 << диминазен < DAPI. Низкая ингибирующая способность нетропсина, по всей видимости, объясняется размером его молекулы. В случае пентамидаина низкая эффективность, по-видимому, обуславливается невысокой константой связывания с ДНК. Большая ингибирующая способность выявлена для DAPI и диминазена. Концентрация полумаксимального ингибирования ферментной реакции для DAPI составила 62,5 нМ (на 1 молекулу УБЛ приходилось 3,4 п.о., что

соответствует соотношению в 5,3 молекулы агента на 1 молекулу h44). Для диминазена IC₅₀ составила 0,132 мкМ (11,3 молекулы соединения на 1 молекулу h44). Это объясняется большей сиквенс-специфичностью и избирательностью связывания диминазена с ДНК по сравнению с DAPI. IC₅₀ для DAPI и диминазена были достаточно высокими, это позволяет рассматривать их в качестве перспективных ингибиторов PARP1[110].

При исследовании влияния УБЛ на локализацию белка PARP1 *in vivo* мы показали, что фермент исключается из зон конденсированного хроматина. В 2010 году было показано, что одной из функций PARP является обеспечение сайленсинга повторяющихся ретротранспозонов, локализованных в зонах гетерохроматина, за счет связывания с ДНК посредством цинкового пальца [108]. Используя методы иммунупреципитации хроматина и ПЦР реального времени, мы продемонстрировали, что УБЛ нарушает связывание PARP 1 с ДНК в промоторных областях ретроэлементов, что приводит к реактивации их транскрипции.

Около половины генома млекопитающих составляют повторяющиеся последовательности ДНК. Подавляющее большинство таких повторяющихся последовательностей представлено мобильными генетическими элементами, которые делятся на два больших класса: ДНК-транспозоны и ретротранспозоны [111]. У млекопитающих наиболее распространенным семейством ретротранспозонов является длинный диспергированный повтор первого типа LINE-1 (Long interspersed element type 1), который составляет около 17% генома человека [112-114]. Несмотря на свою распространенность в геноме, у человека экспрессируются лишь около 100 из 500000 копий.

Инсерции LINE-1 могут приводить к двуцепочечным разрывам ДНК, структурному изменению генов необходимых в жизнедеятельности клетки, что может служить причиной ряда генетических и онкологических заболеваний [113, 115, 116]. В основе поддержания сайленсинга лежит метилирование участков 5'-области LINE-1[117]. Помимо этого, в сайленсинг ретротранспозонов вовлечен PARP13, который напрямую связывается с РНК LINE-1 или LINE-1 ORF1p [118], а

также Rb и E2F, которые активируют гистоновые деацетилазы HDAC1 и HDAC2 [119]. Основным механизмом защиты от спонтанной экспансии ретроэлементов является интерфероновый сигналинг ($IFN\alpha$ и $IFN\beta$) [120-122].

Интерфероны представляют собой группу цитокинов, синтезируемых клеткой в ответ на присутствие в организме ряда патогенов, таких как вирусы, бактерии или опухолевые клетки. Интерфероны первого и второго классов вовлечены в патогенез различных новообразований, при этом их сигнал может носить как опухоль-промотирующий, так и опухоль-ингибирующий характер. За счет взаимодействия продуктов таргетных генов IFN с белками p21, p38 MAPK, CRKL и RAP1A интерфероны принимают участие в регулировке клеточного цикла, а также запуска апоптоза [123, 124]. Кроме прямого действия на опухолевые клетки интерфероны способны активировать иммунные клетки (дендритные клетки, НК-клетки, Т- и В-лимфоциты), опосредуя непрямой противоопухолевый эффект. Таким образом интерфероновый сигналинг может играть существенную роль в процессах ангиогенеза, метастазирования и остеокластогенеза [125-127].

Поскольку основную роль в защите от спонтанной экспансии ретроэлементов играют интерфероны ($IFN\alpha$ и $IFN\beta$), а также гены, стимулируемые интерфероном (ISG), мы предполагаем, что дальнейшее исследование механизма активации интерферонового сигналинга через десайленсинг мобильных ретроэлементов может иметь большое практическое значение для развития нового направления противоопухолевой терапии и профилактики рака с помощью ДНК-тропных малых молекул [128].

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

В предыдущей главе было продемонстрировано, что все классические УБЛ ингибируют PARP1, блокируя его взаимодействие с ДНК. Другими важнейшими ферментами, связывающимися с узкой бороздкой ДНК, являются метил- и ацетилтрансферазы, которые определяют профиль экспрессии генов в клетке. До настоящего времени изучения эффектов соединений класса узкобороздочных лигандов на метилирование ДНК не проводилось. В литературе имеются лишь несколько работ, посвященные отдельным представителям этого класса соединений, которые свидетельствуют о целесообразности проведения такого исследования. Представленная глава посвящена исследованию влияния УБЛ на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов[129].

3.1. Обзор литературы

Метилирование ДНК и химические модификации гистонов являются основными способами эпигенетической регуляции (ЭР) транскрипции генов (ТГ) [130]. Также к факторам ЭРТГ относят микроРНК [131] и образование неканонических структур ДНК в промоторных областях генов (G-квадруплексы) [132]. Эпигенетические механизмы регуляции ТГ вовлечены в такие процессы, как клеточная дифференцировка, пролиферация, апоптоз и пр., и играют важную роль в развитии патологических процессов, включающих канцерогенез и прогрессию опухоли [133].

Эпигенетические эффекты химических канцерогенов, промоторов канцерогенеза и антиканцерогенных препаратов приводят к изменениям процессов регуляции ЭГ на всех этапах передачи генетической информации [134, 135]. В результате чего появляются новые паттерны экспрессируемых белков, которые могут определять последующие эффекты действующих ксенобиотиков (Рисунок 36).



Рисунок 36 - Генотоксические и эпигенетические эффекты химических канцерогенов, промоторов канцерогенеза и антиканцерогенных препаратов [129]

3.1.1. Механизмы эпигенетической регуляции экспрессии генов

3.1.1.1. Метилирование ДНК

Метилирование ДНК – это наследуемая эпигенетическая модификация, которая заключается в присоединении метильной группы к цитозину в позиции С-5 [136]. У млекопитающих метилирование ДНК, как правило, происходит в областях, насыщенных CpG-динуклеотидами – CpG-островках (Рисунок 37). В основном CpG-островки располагаются в промоторных областях генов и гетерохроматине [137].

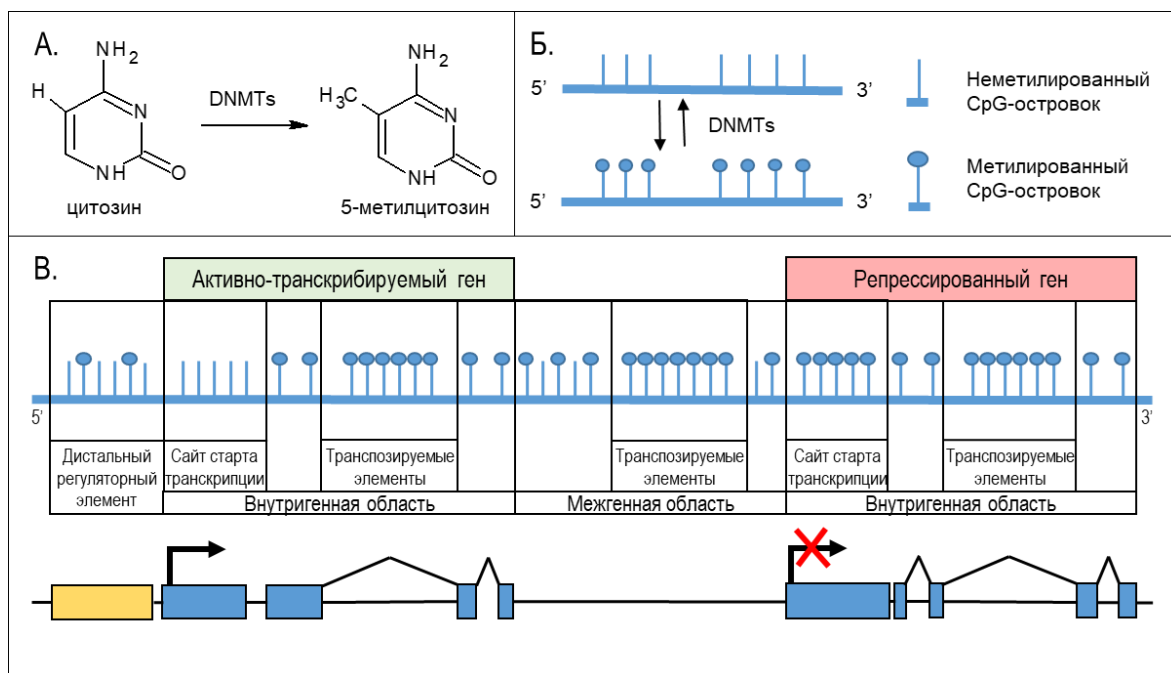


Рисунок 37 - Метилирование ДНК. А. Химическая модификация ДНК. Б. Схема метилирования ДНК в CpG-островках. В. Распределение метилирования ДНК в хроматине

Биологическая функция метилирования ДНК заключается в регуляции генов на уровне транскрипции, построении архитектуры ядра клетки и обеспечении нормального онтогенеза. Данная модификация играет ключевую роль в таких процессах, как репрессия онкогенов, геномный импринтинг, инактивация X-хромосомы и подавление экспрессии повторяющихся геномных элементов [138].

Метилирование ДНК регулируется семейством ферментов ДНК-метилтрансфераз (DNMTs), из которых DNMT1 метилирует ДНК во время репликации, DNMT3A и DNMT3B выполняют метилирование de novo, а DNMT3L, в свою очередь, отвечает за связывание перечисленных метилтрансфераз с донором метильной группы – S-аденозил-L-метионином. Существует два основных механизма эпигенетической регуляции транскрипции посредством метилирования ДНК: прямой и опосредованный (Рисунок 38).

Механизм действия соединений основан на стерическом препятствии метильных групп взаимодействию ДНК с транскрипционными факторами. В случае опосредованного механизма метилированные области взаимодействуют с метил-связывающими белками (methyl-binding proteins, MBPs) MeCP-1 и MeCP-2,

которые присоединяются к ДНК в сайте симметричной посадки групп CH₃ [139]. MeCP-1 стерически блокирует связывание ДНК с транскрипционным аппаратом, что ведет к репрессии транскрипции [140]. MeCP-2, в свою очередь, рекрутирует гистоновые деацетилазы (histone deacetylases, HDACs) совместно с транскрипционными корепрессорами, что приводит к уплотнению структуры хроматина и репрессии транскрипции [141].

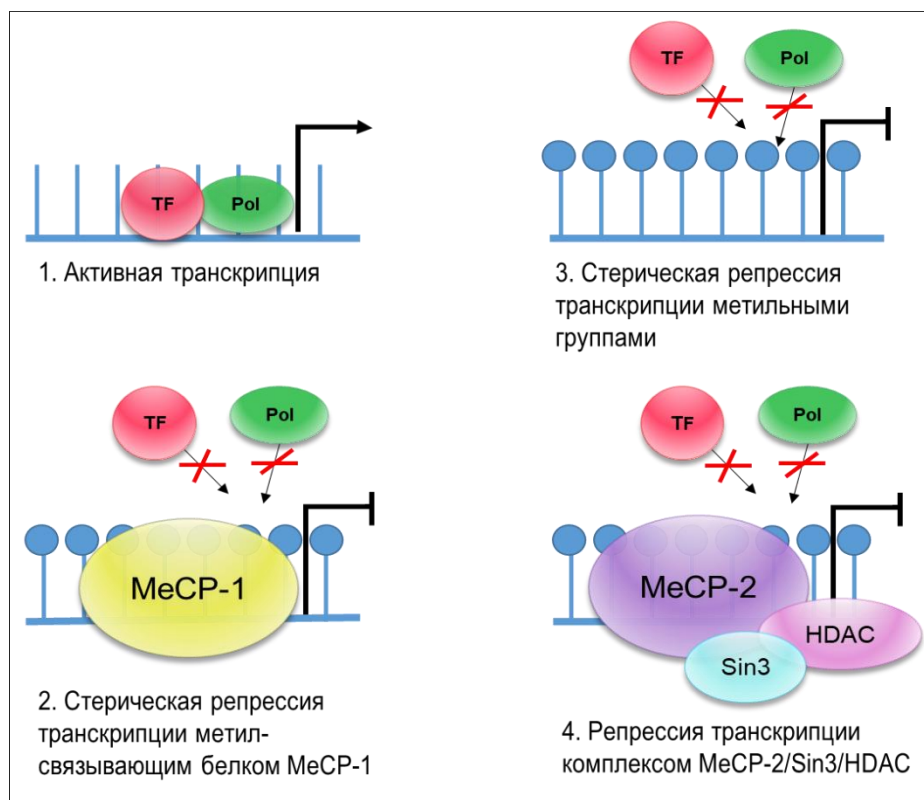


Рисунок 38 - Метилирование ДНК: механизмы регуляции транскрипции

3.1.1.2. Модификации гистонов

Пост-трансляционные модификации гистонов играют важную роль в регуляции клеточного цикла, эмбриогенезе и обеспечении геномной стабильности [142]. Среди наиболее распространенных модификаций гистонов выделяют 7 типов: ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, АДФ-рибозилирование, гликозилирование, сумоилирование и убиквитинирование [143]. Наибольший вклад в эпигенетическую регуляцию транскрипции вносят

ацетилирование и метилирование гистонов H3 и H4, которое происходит на N-концах гистонов в лизиновых и аргининовых аминокислотных остатках [144].

Существует два основных механизма, обуславливающих действие гистоновых модификаций на функции хроматина. Первым является нарушение контактов между соседними нуклеосомами или между гистонами и ДНК из-за изменения заряда, например, при ацетилировании лизинов гистонов. Благодаря отрицательному заряду ацетильных групп, при данной модификации происходит ослабление сродства между гистоном и ДНК, в результате которого структура хроматина становится более открытой и доступной для транскрипции.

Второй механизм заключается в привлечении посредством гистоновых модификаций или их комбинаций эффекторных белков, которые обеспечивают формирование специфических функциональных состояний хроматина. Установлено, что хромоподобные домены (chromo, MBT, Tudor) специфически связывают метилированные лизины, тогда как ацетилирование специфически распознается бромодоменами и фосфорилируется семейством белков 14-3-3 [145].

В механизме ацетилирования гистонов основную роль играют модифицирующие ферменты – гистоновые ацетилтрансферазы (histone acetyltransferases, HATs) и гистоновые деацетилазы (histone deacetylases, HDACs). HATs отвечают за перенос ацетильной группы от ацетил-кофермента А к лизину, в результате чего происходит изменение общего заряда гистона с положительного до нейтрального, что способствует активации транскрипции. В то же время, члены семейства ферментов HDACs осуществляют удаление ацетильных групп с лизиновых остатков амино-конца гистонов, что приводит к восстановлению взаимодействия между ДНК и гистонами, конденсации хроматина и репрессии транскрипции (Рисунок 39) [146].

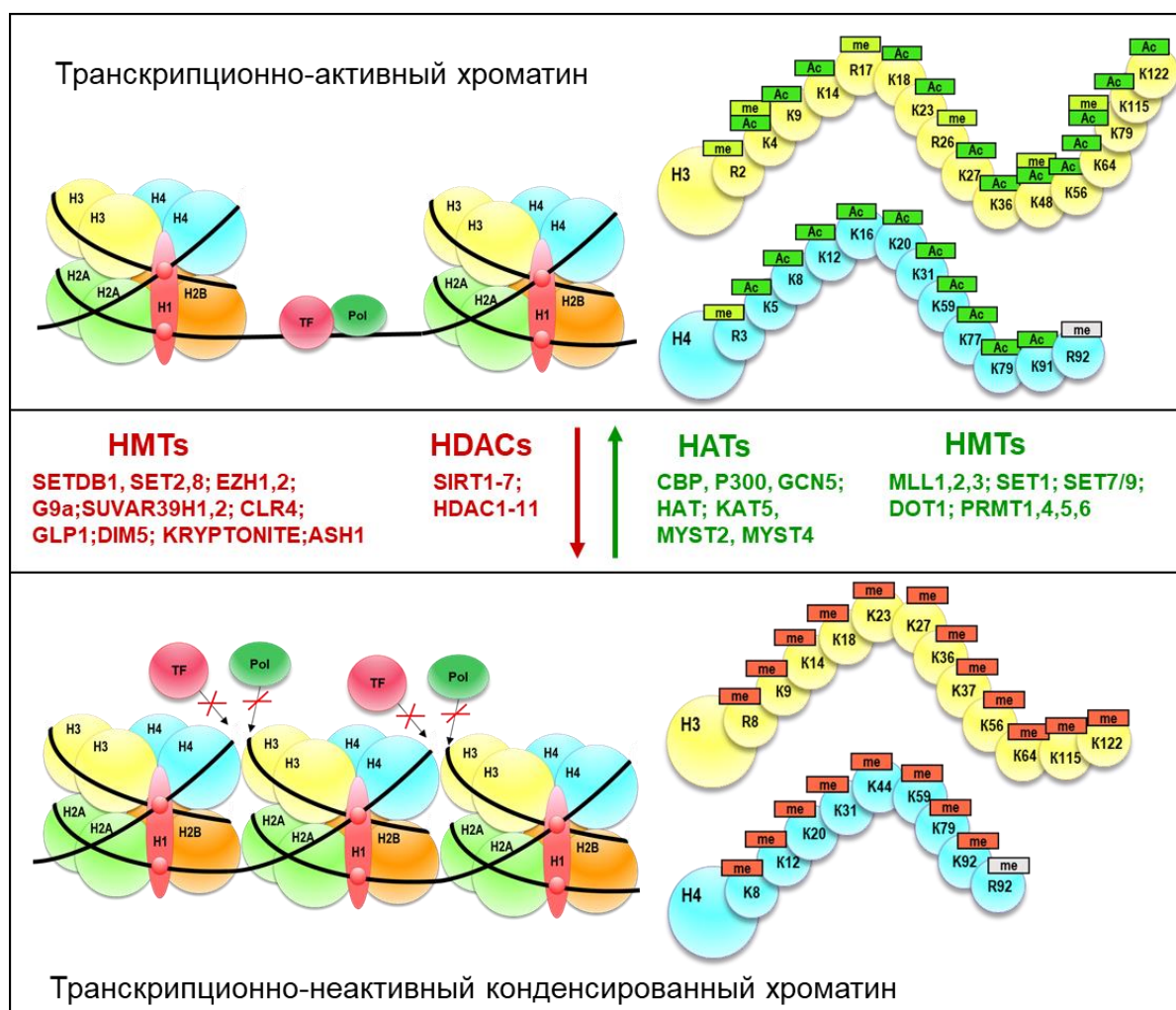


Рисунок 39 - Ацетилирование и метилирование гистонов: механизм активации и репрессии транскрипции

Метилирование гистонов осуществляется гистоновыми метилтрансферазами (histone methyl transferases, HMTs). В качестве донора метильной группы, как и в случае с метилированием ДНК выступает S-аденозил-L-метионин. Активация или репрессия транскрипции происходит за счет изменения доступности ДНК для транскрипционных факторов в зависимости от того, какой из аминокислотных остатков метилируется. Известно, что с активацией транскрипции ассоциированы сайты метилирования H3K4, H3K48, H3K79, а с ингибированием – H3K9 и H3K27 и др. [137].

3.2. Собственные результаты

3.2.1. Система скрининга химических соединений на способность реактивировать экспрессию генов

Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов являются связующим звеном между окружающей средой и геномом. Эпигенетическая репрессия транскрипции является важным механизмом регуляции экспрессии генов, особенно в таких процессах как ингибирование экспрессии ретротранспозонов, компенсация дозы в половых хромосомах, импринтинг и контроль экспрессии генов в различные периоды онтогенеза [147]. Воздействие неблагоприятных условий на эпигеном может нарушить основные клеточные процессы, и привести, в конечном счете, к неопластической трансформации клеток. К таким условиям, в частности, относится влияние негеноотоксических экзогенных агентов, среди которых различные компоненты питания, фармакологические препараты, а также экологические факторы. С этой точки зрения, проведение скрининга химических канцерогенов, промоторов канцерогенеза, противоопухолевых препаратов и различных фитонутриентов на эпигенетическую активность является актуальной задачей. Однако, несмотря на интенсивное развитие эпигенетики как науки, на настоящий момент эпигенетические эффекты изучены для узкого круга химиотерапевтических препаратов, канцерогенных веществ, в частности, алкилирующих агентов и металлов, и ряда фитонутриентов. Одной из основных причин этого является то, что существующие модельные системы для изучения эпигенетических механизмов специфичны к определенному механизму эпигенетической активности и имеют высокую стоимость [148]. Создание тест-системы, позволяющей изучить влияние ксенобиотиков на механизмы регуляции экспрессии генов интегрально, а не по отдельным типам изменений в определенных участках генома, позволит получить массив данных об эпигенетической активности ксенобиотиков, которые задействованы в различных производствах, используются в сельском хозяйстве, встречаются в составе пищевых добавок, являются лекарственными средствами и т.д. Одной из

перспективных систем для изучения механизмов эпигенетической регуляции экспрессии клеточных генов являются клеточные культуры с интегрированной в геном вирусной последовательностью, содержащей репортерный ген.

При использовании репортерных генов на основе ретровирусных векторов зачастую наблюдается эпигенетическая репрессия транскрипции генов. При эффективной трансдукции репортера его экспрессия может снижаться вплоть до полного подавления. Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии таких генов направлены на ингибирование транскрипции, что является защитным механизмом против встраивания в геном чужеродной ДНК, однако эпигенетические процессы, которые участвуют в контроле над молчанием ретровирусов, в большой степени перекрываются с механизмами, которые регулируют экспрессию генов во время эмбриогенеза и дифференцировки клеток [130, 149]. Поскольку для большинства ретровирусов экспрессия осуществляется с помощью белков и факторов клетки-хозяина, исследование эпигенетических механизмов регуляции экспрессии на модельных системах при использовании ретровирусных векторов получило распространение.

Клеточная линия HeLa T1 является моделью эпигенетической репрессии, маркером которого является встроенный в геном ретровирусный вектор, содержащий репортерный ген зеленого флуоресцентного белка GFP. Так как эпигенетические механизмы регуляции ретровирусных генов аналогичны механизмам экспрессии клеточных генов, линия клеток HeLa T1 является адекватной моделью для исследования механизмов эпигенетической репрессии транскрипции.

Для создания клеточной линии с репрессированным репортерным геном клеточная линия HeLa была инфицирована вектором на основе вируса саркомы птиц (ASV), содержащим репортерный GFP [150]. После инфицирования GFP-отрицательные клетки были отсортированы. Полученная популяция содержала неинфицированные клетки и клетки с репрессированным репортерным GFP геном. Далее клетки инкубировали с 0,5 мкМ Трихостатином А (TSA) в течение 24 часов с целью реактивации молчащего гена GFP. Через 48 часов после начала обработки

GFP-положительные клетки были отсортированы. Полученная популяция пассировалась в течение 10 дней, в ходе которых в ряде клеток произошло восстановления эпигенетического молчания ретровирусного вектора и, соответственно, репортерного гена GFP. Затем GFP-отрицательные клетки снова были отсортированы.

В результате таких манипуляций была получена субпопуляция клеток HeLa, названная «Трихостатин А Индуцируемая» [150], содержащая интегрированный транскрипционно-репрессированный репортерный ген GFP. Позднее в работах Шалгинских и соавт. было продемонстрировано, что эпигенетическое молчание гена GFP в поликлональной линии HeLa TI обуславливается более чем 20 различными механизмами эпигенетической репрессии.

Основным признаком репрессии транскрипции гена в модельной системе клеток HeLa TI является сохранение GFP-негативного фенотипа клеток, в то время как реактивация экспрессии приводит к накоплению флуоресцентного белка GFP в цитоплазме клеток. Анализ изменения экспрессии GFP может проводиться как с помощью флуоресцентной микроскопии, так и проточной цитофлуориметрии.

Целью нашего исследования была валидация HeLa TI в качестве тест-системы для изучения эпигенетической активности ксенобиотиков. Для этого необходимо было (1) изучить способность клеточной линии HeLa TI к реактивации репортерного гена GFP в ответ на действие известных эпигенетических агентов, (2) оценить способность ферментативной системы клеток HeLa TI метаболизировать проканцерогены.

3.2.1.1. Реактивирующее действие эпигенетических препаратов

Для исследования чувствительности HeLa TI к химическим соединениям с эпигенетическими эффектами были проведены эксперименты с использованием ингибиторов метилирования ДНК и ингибиторов гистоновых деацетилаз. Эффекты каждого из соединений изучали в двух концентрациях (1 и 5 мкМ) при следующих условиях инкубации: одни образцы обрабатывали в течение 24 часов и анализировали через следующие 24 часа с помощью проточной цитофлуориметрии (FACS) (48 часов от момента начала эксперимента), а другие – через 48 часов (72 часа от момента начала эксперимента). Все исследуемые соединения проявили способность реактивировать экспрессию GFP. Наиболее информативные результаты были получены при изучении доли GFP-положительных клеток через 48 часов после начала опыта, при втором варианте постановки эксперимента эффекты реактивации были менее значительными. Описание использованных соединений и данные проточной цитофлуориметрии (через 48 часов после начала опыта) представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Список химических соединений, представленных в тесте на реактивационную способность, их влияние на уровень GFP-положительных клеток в популяции HeLa TI

№	Название препарата	Описание препарата	Реактивация в % GFP $\pm$ стандартное отклонение	
			Концентрация	
			1мкМ	5мкМ
1	Трихостатин А (TSA)	Ингибитор гистоновых деацетилаз I-го и II-го классов	33,7 $\pm$ 1,3	34,1 $\pm$ 1,7
2	SAHA (вориностат)	Субероланилидгидроксамовая кислота. Ингибитор гистоновых деацетилаз I-го и II-го классов	8,3 $\pm$ 0,9	19,4 $\pm$ 0,9
3	Вальпроевая кислота (VPA)	Ингибитор гистоновых деацетилаз	9,9 $\pm$ 1,1	18,8 $\pm$ 1,1
4	Депсипептид	Бициклический пептид, изолированный из <i>Chromobacterium violaceum</i> . Ингибитор гистоновых деацетилаз	13,1 $\pm$ 0,5	21,4 $\pm$ 0,9
5	Помиферин	Флаваноид, изолированный из <i>Maclura pomifera</i> . Ингибитор гистоновых деацетилаз	11,3 $\pm$ 0,5	28,1 $\pm$ 1,3
6	MS275 (энтиностат)	Специфический ингибитор гистоновой деацетилазы I	9,9 $\pm$ 1,4	15,9 $\pm$ 1,6
7	5-аза-2'-дезокситидин (d-azaC или Видаза)	Химический аналог цитидина. Ингибитор ДНК метилтрансфераз.	19,2 $\pm$ 0,4	24,1 $\pm$ 1,1
8	5-азацитидин (5-azaC)	Химический аналог цитидина. Ингибитор ДНК метилтрансфераз.	23,1 $\pm$ 0,5	26,9 $\pm$ 0,9

9	3-диазенплатоцин А (DZNep)	Ингибитор H3K27me3 и H4K20me3 триметилирования	$12,4 \pm 0,9$	$14,4 \pm 0,7$
10	N-фталил-L-триптофан (RG108)	Ингибитор ДНК метилтрансфераз	$13,4 \pm 0,7$	$14,9 \pm 0,7$
11	HeLa TI без обработки		$3,5 \pm 0,9$	

Этот эксперимент продемонстрировал возможность использования модельной системы HeLa TI для тестирования эпигенетических эффектов ксенобиотиков.

3.2.1.2. Активность метаболической системы активации проканцерогенов клеточной линии HeLa TI

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

Нами был проведен анализ активности микросомных монооксигеназ в клетках HeLa-TI, который включал в себя: (1) анализ интенсивности метаболизма известных проканцерогенов, требующих активации микросомными монооксигеназами и (2) определение влияния проканцерогенов на уровень экспрессии изоформ цитохрома P-450.

Ранее при изучении внепланового репаративного синтеза ДНК в клетках линии HeLa, на основе которой была получена рассматриваемая в данной работе субпопуляция клеток, был продемонстрирован генотоксический эффект ряда соединений, в число которых были включены проканцерогены. Эти данные позволили сделать предположение о наличии активных ферментов метаболизма ксенобиотиков в данной клеточной системе.

Для выявления способности клеточной линии HeLa TI активировать проканцерогены при помощи собственной ферментативной системы метаболизма ксенобиотиков изучена динамика метаболизма классического полициклического ароматического углеводорода – бенз(а)пирена (БП) - в клеточной культуре HeLa TI. Остаточный уровень БП в среде оценивали с использованием спектрально-флуоресцентного метода по квазилинейчатым спектрам, наблюдаемым при температуре жидкого азота, при разной плотности посадки клеток (40 тысяч и 120

тысяч клеток на лунку) по истечении 24 и 48 часов от начала эксперимента (Рисунок 40 и Таблица В1 Приложения В).

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

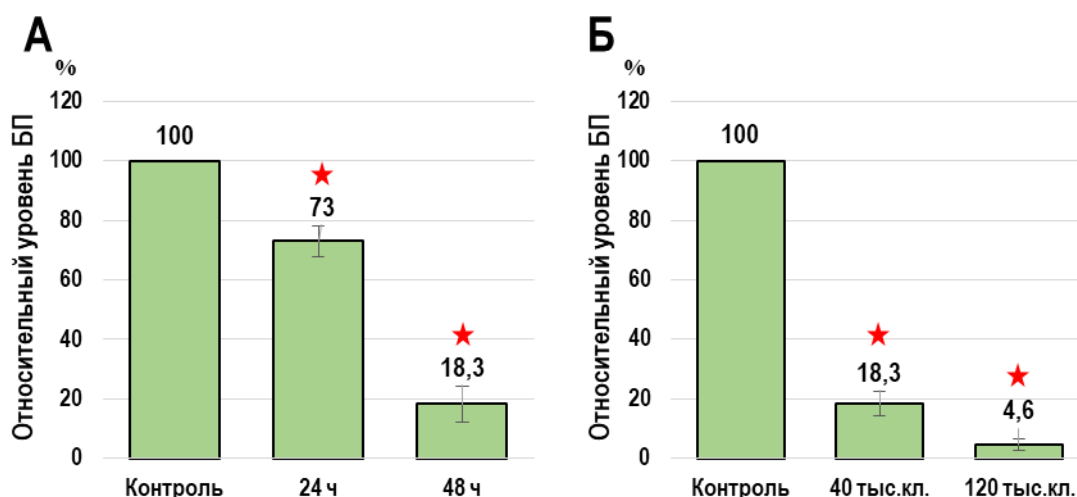


Рисунок 40 - Содержание бенз(а)пирена в среде с клетками HeLaTI при различном (А) времени инкубации - 24ч и 48ч, и (Б) плотности посадки клеток. Данные представлены как $M \pm m$, ★ - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$

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 мы изучили конститутивный и индуцированный уровень экспрессии генов, кодирующих изоформы цитохрома Р450 (CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A5) в клетках линии HeLa TI.

В ходе исследования в клеточной линии HeLa TI была выявлена экспрессия следующих изоформ цитохрома: CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP3A5. мРНК генов CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 выявить не удалось. На рисунке 42 представлен сравнительный анализ уровней экспрессии генов различных

изоформ P450. Нормализация образцов проводилась по отношению к количеству мРНК гена Rpl27 (Δ СТ), а также по отношению к количеству мРНК CYP2A6 ($\Delta\Delta$ СТ), которое оказалось наименьшим. Самая высокая экспрессия была зарегистрирована для гена CYP1B1, уровень его экспрессии был выше в 10-30 раз уровня экспрессии генов остальных ферментов.

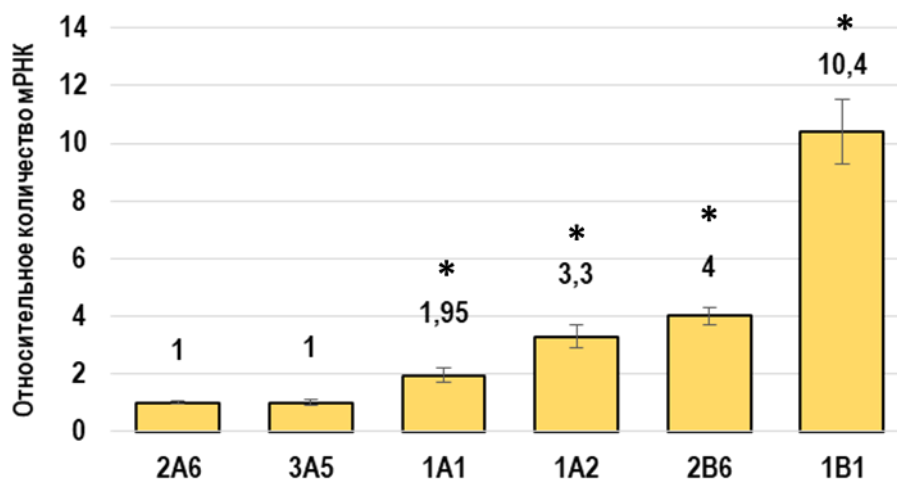


Рисунок 41 - Профиль конститутивной экспрессии генов цитохромов P450 в клетках линии HeLa T1. Данные представлены как $M \pm m$, * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$

Для индукции микросомных оксигеназ в клеточной линии HeLa T1 на основе опубликованных данных по влиянию ксенобиотиков на экспрессию и активность различных изоформ цитохрома P-450 был подобран ряд активаторов (Таблица 2).

Таблица 2 - Вещества, использованные в качестве индукторов экспрессии генов изоформ цитохрома P450

Вещество-индуктор	Таргетный цитохром P450
Фенобарбитал	2A6, 2C9, 3A5, 2B6
Рифампицин	2C9, 2C19, 3A5, 2B6
3-метилхолантрен	1A1, 1A2, 1B1

Изониазид	2E1
Циклофосфамид	2B6
Афлатоксин В1	1A2, 2A6, 2B6, 3A5
3', 3 - диаминобензидин	1A2, 1B1

Было показано, что при добавлении индукторов в клеточную культуру HeLa TI происходит 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 В1 к клеткам. Было зарегистрировано увеличение экспрессии CYP2B6 в 10,9 раз, в 6,8 раз и в 4,6 раз при действии фенобарбитала, афлатоксина В1 и циклофосфамида 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 (Рисунок 42). После обработки HeLa TI 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 TI, так и в опухолях различного генеза.

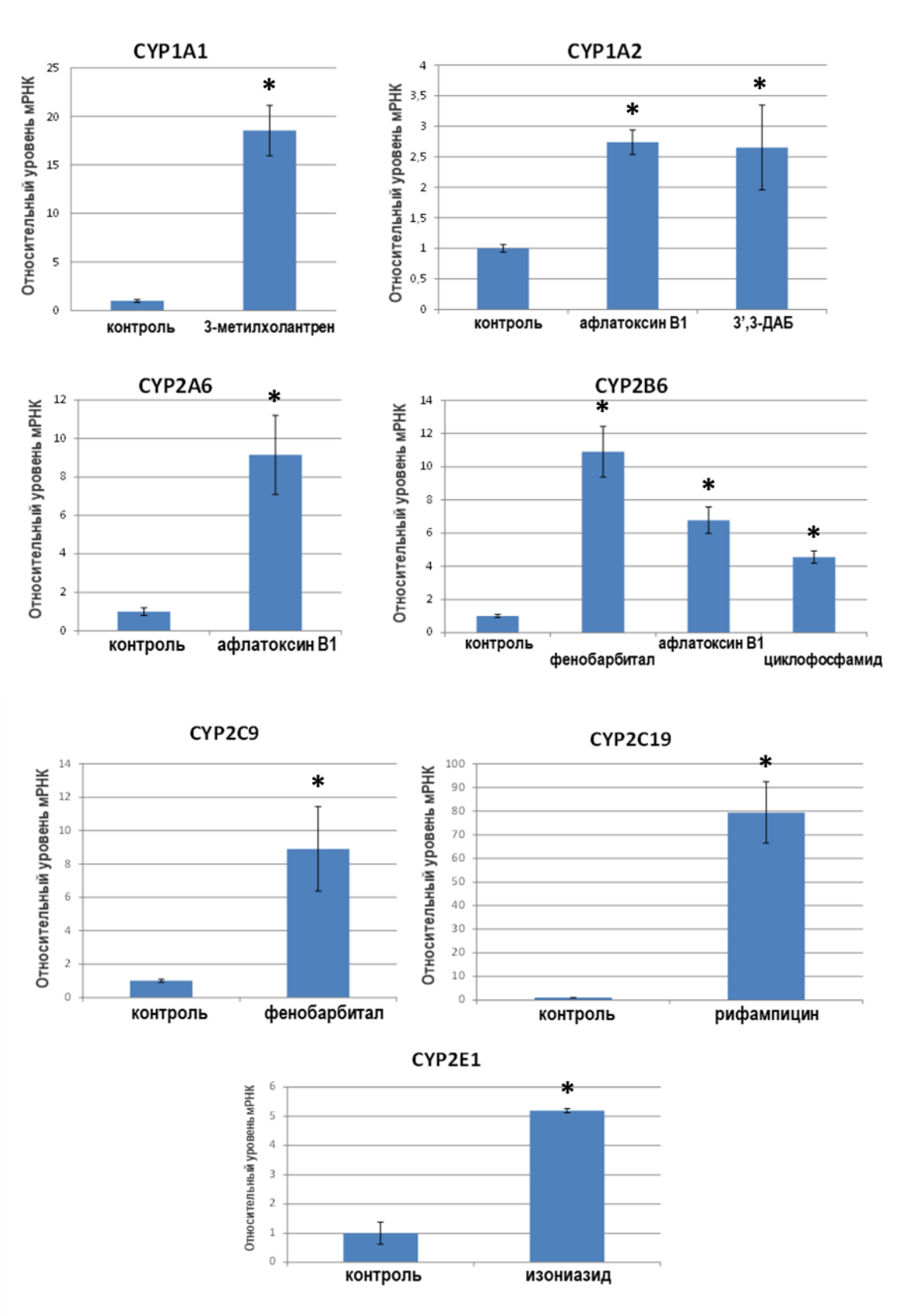


Рисунок 42 - Влияние различных индукторов на уровень экспрессии генов изоформ цитохрома Р450 (3',3-ДАБ – 3',3-диаминобензидин). Данные представлены как $M \pm m$, * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$

Помимо регуляции экспрессии генов различных изоформ цитохрома P450 важной характеристикой системы метаболизма является функциональная активность самих ферментов. Мы изучили способность проканцерогенов вызывать нарушение ДНК в клетках HeLa T1 с помощью теста ДНК-комет. Наличие генотоксической активности проканцерогенов свидетельствует о том, что в клетках происходит активация соединения с образованием высокореактивного метаболита.

Клетки HeLa T1 обрабатывали следующими проканцерогенами: 3-метилхолантрен, бенз(а)пирен, циклофосфамид и орто-аминоазотолуол. Через 24 часа проводили анализ количества клеток с поврежденной ДНК. Было показано, что доля клеток с повреждениями ДНК возрастала при действии каждого из проканцерогенов более чем в 30 раз (Рисунок 43). Важно, что метаболическая активация каждого из агентов происходит при действии различных изоформ цитохрома P450. Так, 3-метилхолантрен метаболизируется CYP1A1, CYP1A2 и CYP1B1, бенз(а)пирен - CYP1A2 и CYP1B1, циклофосфамид – CYP2B6, CYP2C19 и CYP3A4, а орто-аминоазотолуола - CYP1A2, CYP2A6.

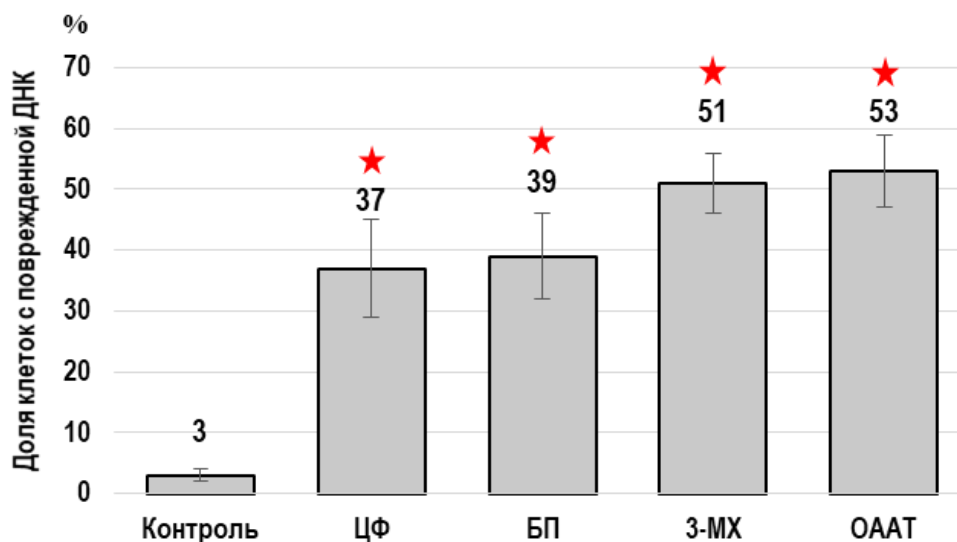


Рисунок 43 - Доля клеток HeLa T1 с повреждениями в ДНК при действии различных проканцерогенов (ЦФ-циклофосфамид, БП – бенз(а)пирен, 3-МХ – 3-метилхолантрен, ОААТ – ортоаминоазотолуол). Данные представлены как $M \pm m$, ★ - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$

3.2.2. Молекулярные механизмы эпигенетических эффектов узкобороздочных лигандов на клетках HeLa TI

3.2.2.1. Реактивация узкобороздочными лигандами экспрессии эпигенетически репрессированных генов

Результаты скрининга УБЛ на их способность реактивировать экспрессию гена GFP в модельной системе HeLa TI представлены на рисунке 44.

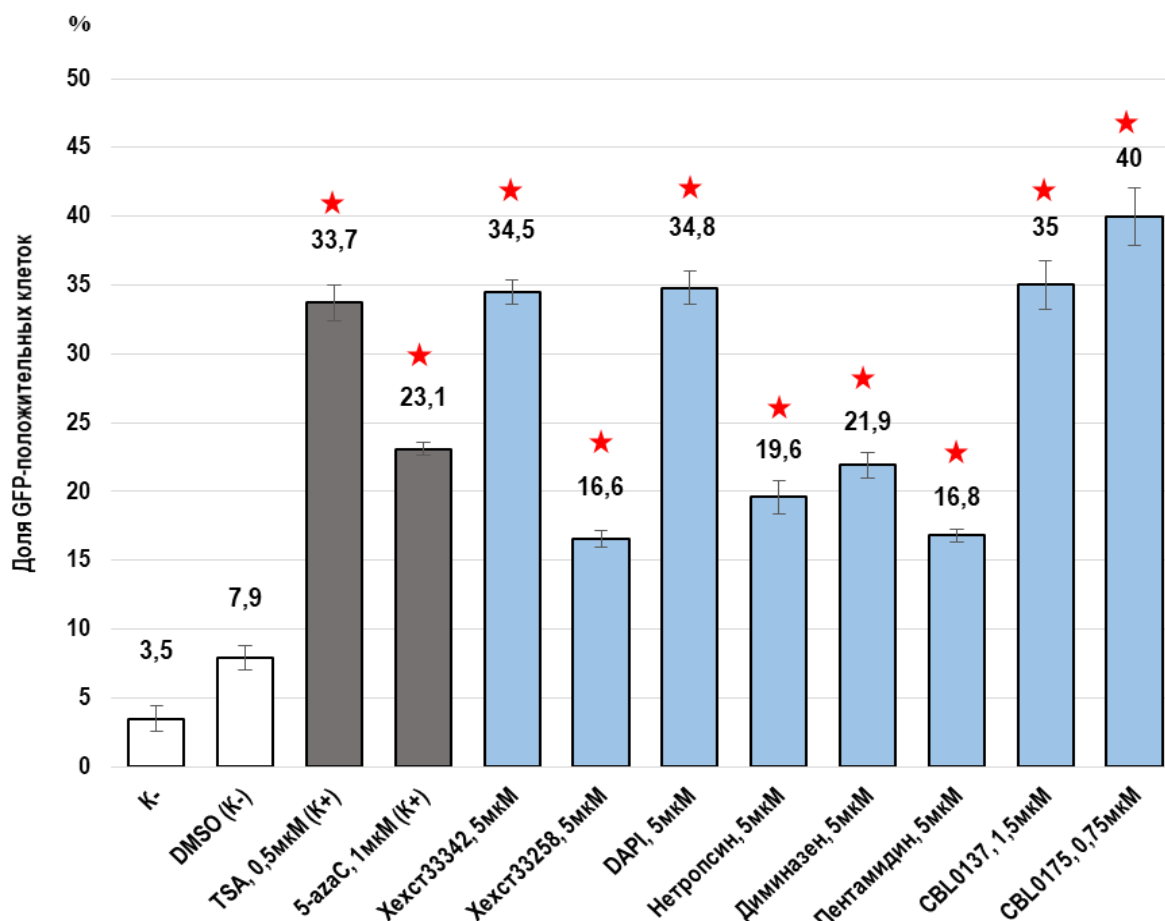


Рисунок 44 - Влияние УБЛ на долю GFP-положительных клеток в популяции HeLa TI. Данные представлены как $M \pm m$, ★ - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$

Как видно, оба контрольных препарата TSA и 5-azaC реактивировали экспрессию гена GFP до 34 и 23% соответственно. Все тестируемые УБЛ проявили способность реактивировать транскрипцию эпигенетически молчащего гена GFP. Наибольшей эпигенетической активностью обладали хехст33342, DAPI, CBL0137 и CBL0175 (35, 35, 35 и 40% соответственно), меньший эффект наблюдался

обработке клеток нетропсином, диминазеном, пентамидином и хехст33258 (20, 22, 17 и 17 соответственно).

Таким образом, впервые была продемонстрирована способность узкобороздочных лигандов влиять на эпигенетическую регуляцию транскрипции генов.

3.2.2.2. Влияние химических соединений на общий уровень гистоновых модификаций

Измерение уровня гистоновых модификаций проводили с помощью вестерн-блоттинга. Клетки HeLa T1 инкубировались с агентами в концентрации 5 мкМ (для TSA - 1 мкМ) в течение 24 часов. Результаты анализа изменений гистоновых модификаций представлен на рисунке 45. Ряд соединений вызывал изменения в уровне триметилирования лизинов гистонов H4 и H3 в положениях 20 (H4K20me3) и 9 (H3K9me3) соответственно (Рисунок 45А). Эти гистоновые модификации характерны для нетранскрибируемых генов. Снижение уровня этих модификаций при обработке HeLa T1 по сравнению с интактными клетками наблюдали для практически во всех образцах. Исключение составили хехст42 и 5-azaC, наиболее значительные изменения наблюдали при действии трихостатина А (TSA). Уровень метилирования H3K9me3 при обработке УБЛ не отличался от уровня в контрольных образцах.

Рисунке 45Б демонстрирует результаты анализа гистоновых модификаций, которые являются маркерными для активно экспрессируемых генов. Эпигенетическими маркерами транскрипции выступают: ацетилирование гистонов H3 и H4 (acH3/acH4) в промоторных областях генов, а также триметилирование лизина гистона H3 в положении 4 (H3K4me3). Мы установили, 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 использовались антитела к гистонам H3 и H4.

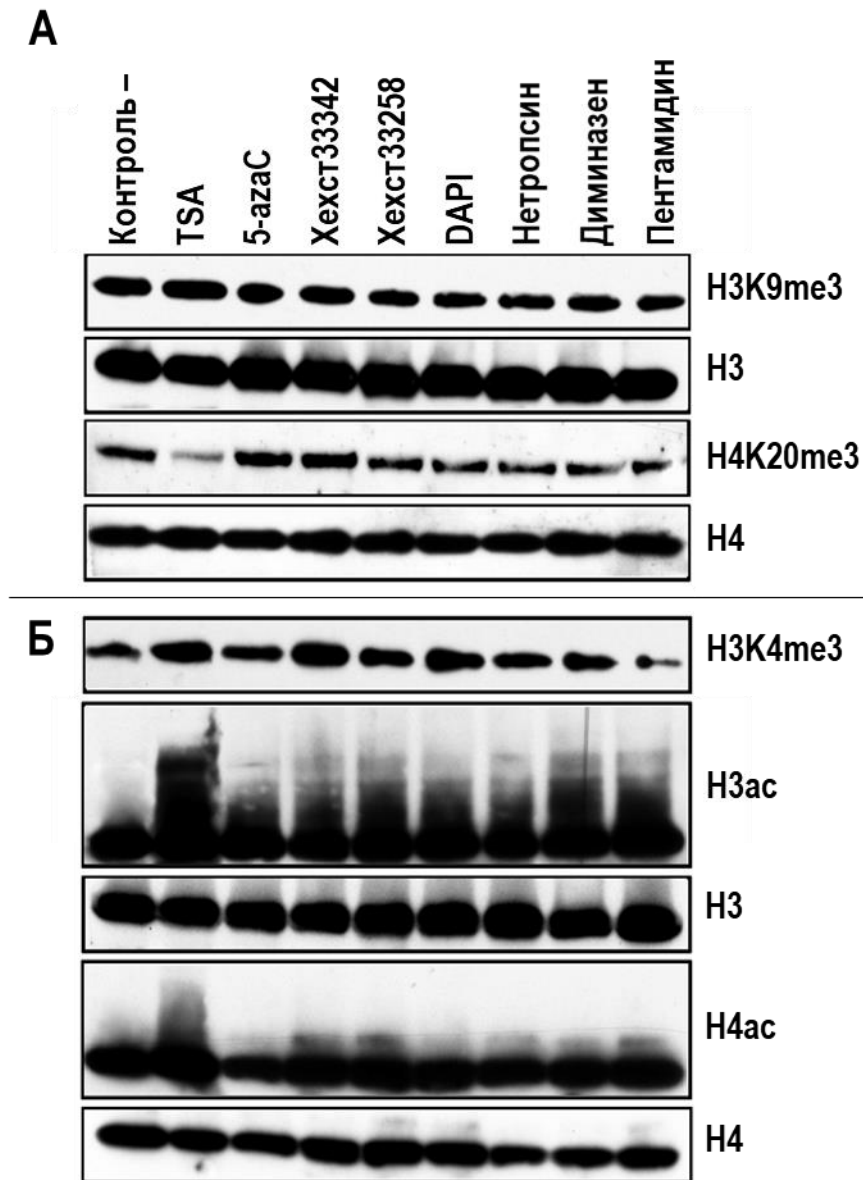


Рисунок 45 – Влияние соединений на общий уровень модификаций гистонов. (А) Анализ гистоновых модификаций H3K9me3 и H4K20me3; (Б) Анализ гистоновых модификаций H3K4me3 и acH3/H4.

В процессе реактивации экспрессии наиболее значимые изменения в модификациях гистонов происходят в промоторе гена. Ранее мы исследовали распределение модификаций гистонов по ретровирусному вектору, интегрированному в геном клеток, и продемонстрировали наличие маркеров репрессии в сайте начала транскрипции гена GFP. В этой части работы мы исследовали влияние УБЛ на эпигенетические маркеры. В качестве контролей использовали TSA и 5-azaC.

Анализ гистоновых модификаций на промоторе гена проводили с помощью иммунопреципитации хроматина с антителами к модификациям гистонов H4K40me3 и H3ac. В качестве отрицательного контроля использовали IgG. Как показано на рисунке 46, изменение метилирования H4K40me3 (Рисунок 46, А) и ацетилирования H3ac (Рисунок 46, Б) наблюдали уже через 8 часов от момента начала инкубации с соединениями. Снижение уровня триметилирования гистона H4 по кодону K40 и повышение уровня ацетилирования гистона H3 в промоторной области GFP свидетельствует о том, что ксенобиотики оказывают действие на эпигенетическую регуляцию экспрессии посредством влияния на уровень гистоновых модификаций. Этот эффект наблюдали для всех соединений в эксперименте.

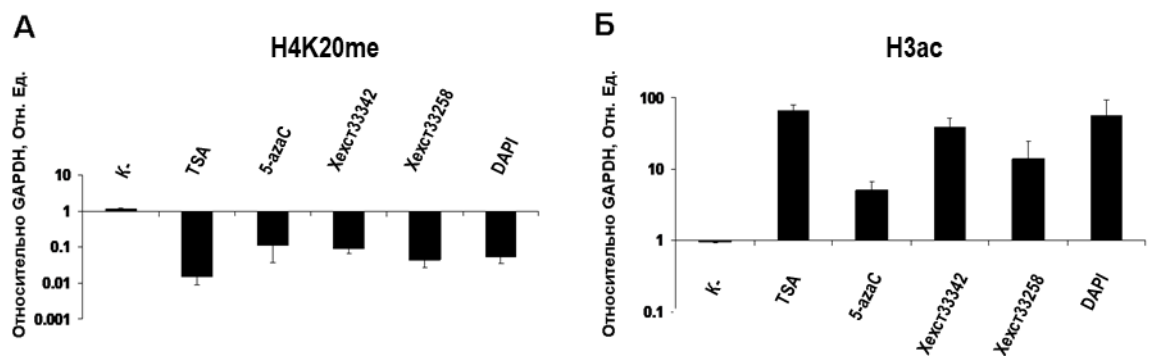


Рисунок 46 - Анализ изменений гистоновых модификаций в промоторной области GFP после обработки клеток УБЛ. (А) Результаты ПЦР в реальном времени для модификации H4K40me3. (Б) Результаты ПЦР в реальном времени для модификации H3ac. Линии погрешности отражают значения стандартного отклонения.

3.2.2.3. Изменение общего уровня метилирования при действии узкобороздочных лигандов

Важным показателем эпигенетической активности ксенобиотиков является изменение уровня метилирования ДНК. 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 свидетельствуют (Рисунок 47) о незначительном изменении общего уровня метилирования ДНК в клетках HeLa TI после инкубации с УБЛ.

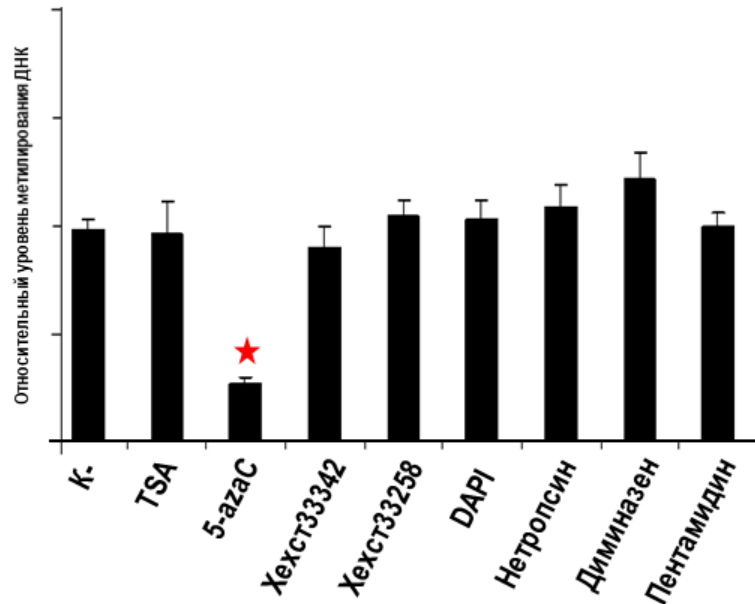


Рисунок 47 - Изменение общего уровня метилирования ДНК. Данные ELISA (★- уровень метилирования статистически значимо отличен от контроля, $p < 0,01$)

Поскольку изменение интегрального уровня метилирования ДНК после обработки клеток было незначительным, далее 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. На рисунке 49А приведена схема LTR и сайта рестрикции метилчувствительной эндонуклеазы HpaII и праймерами для ПЦР.

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.

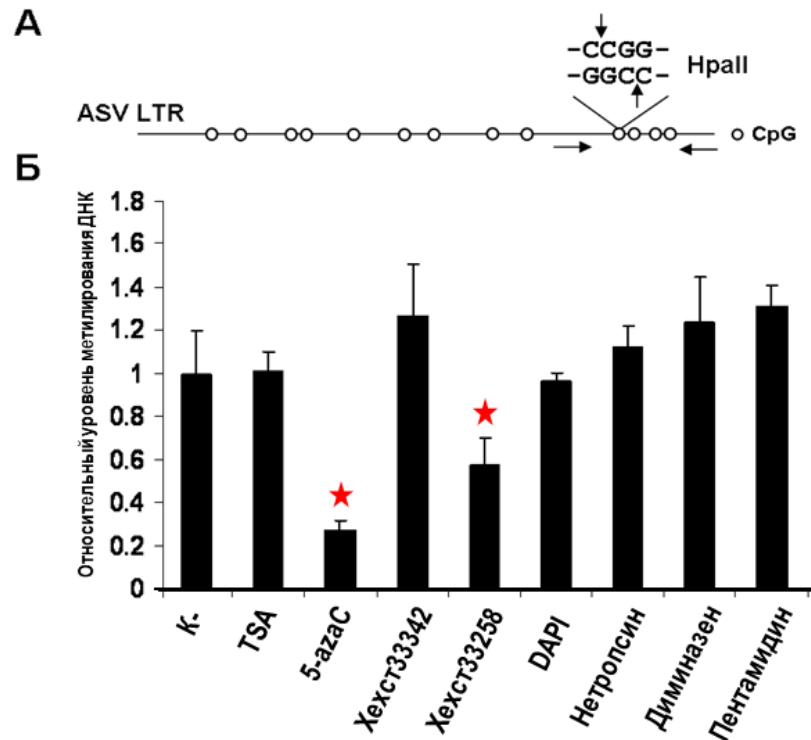


Рисунок 48 - Изменение уровня метилирования в области LTR. (А) Схема LTR с расположением сайта рестрикции HpaII и праймерами для ПЦР. CpG пары обозначены в виде кружков. (Б) Результаты ПЦР реального времени (★- уровень метилирования статистически значимо отличен от контроля, $p < 0,01$)

Исследование уровня метилирования ДНК промоторной области методом метилчувствительной ПЦР продемонстрировало, что изменение уровня метилирования ДНК происходит при воздействии хехст33258, но не с хехст33342. Для подтверждения полученных данных провели анализ метилирования области LTR методом бисульфитного секвенирования в образцах HeLa TI, которые были обработаны УБЛ и контрольными препаратами (Рисунок 49). Всего в анализ вошло 10-20 отдельных клонов для каждого из участков. Параллельно методом проточной цитофлуориметрии изучали уровень флуоресценции.

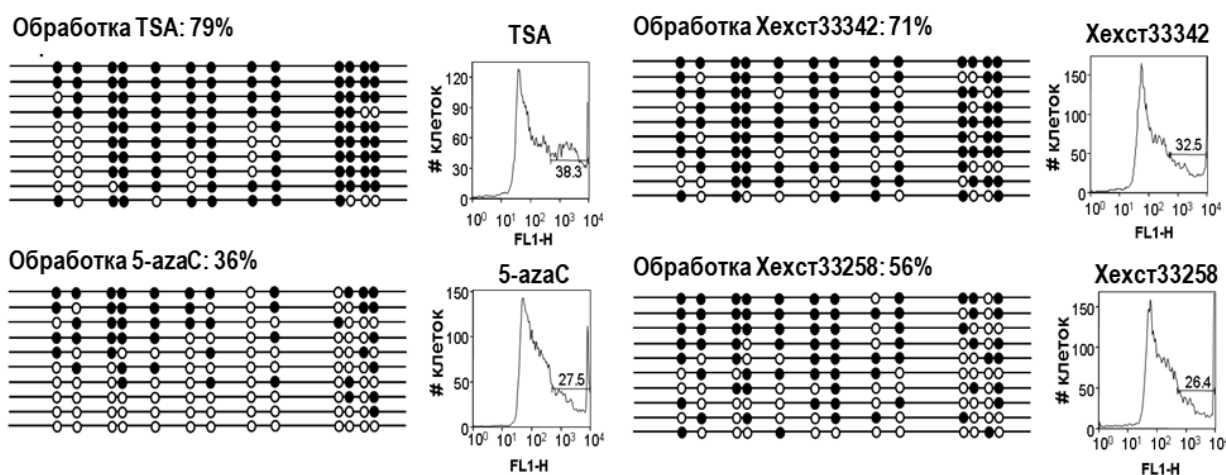


Рисунок 49 - Изменение метилирования в области LTR при действии хехст33342. Доля метилирования получена в результате проведения бисульфитного секвенирования. Также показаны профили, которые были получены методом проточной цитофлуориметрии с указанием доли GFP-положительных клеток. Метилированные CpG пары обозначены в виде черных кружков, неметилированные – в виде белых

О хорошей чувствительности метода можно судить по снижению уровня метилирования для 5-azaC (36%) и отсутствию влияния TSA (79%). Продемонстрировано, 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%.

3.2.2.4. Комбинированное действие узкобороздочных лигандов и эпигенетических ингибиторов

Реализация эпигенетического молчания может осуществляться при воздействии одной из систем эпигенетической регуляции (изменения модификаций гистонов или изменения метилирования ДНК в промоторе гена), так и при их взаимодействии. В клетках HeLa T1 роль эпигенетического регулятора играют как репрессорные гистоновые модификации, так и метилирование ДНК в LTR. При высоком уровне таких модификаций транскрипция репортерного гена GFP снижается, а при низком уровне, наоборот, возрастает.

Для исследования взаимодействия систем эпигенетического регулирования мы изучили взаимное влияние TSA и 5-azaC на клетках HeLa T1. В этом эксперименте HeLa T1 обрабатывали каждым из ингибиторов отдельно, одновременно и последовательно. Клетки инкубировали в течение 24 часов с каждым из агентов: 24 часа при совместной и отдельной обработках и 24+24 часа при последовательном добавлении соединений. Уровень реактивации экспрессии гена GFP оценивали в различные моменты времени после добавления агентов: через 24, 48 и 72 часа. На рисунке 50А приведены данные проточной цитофлуориметрии.

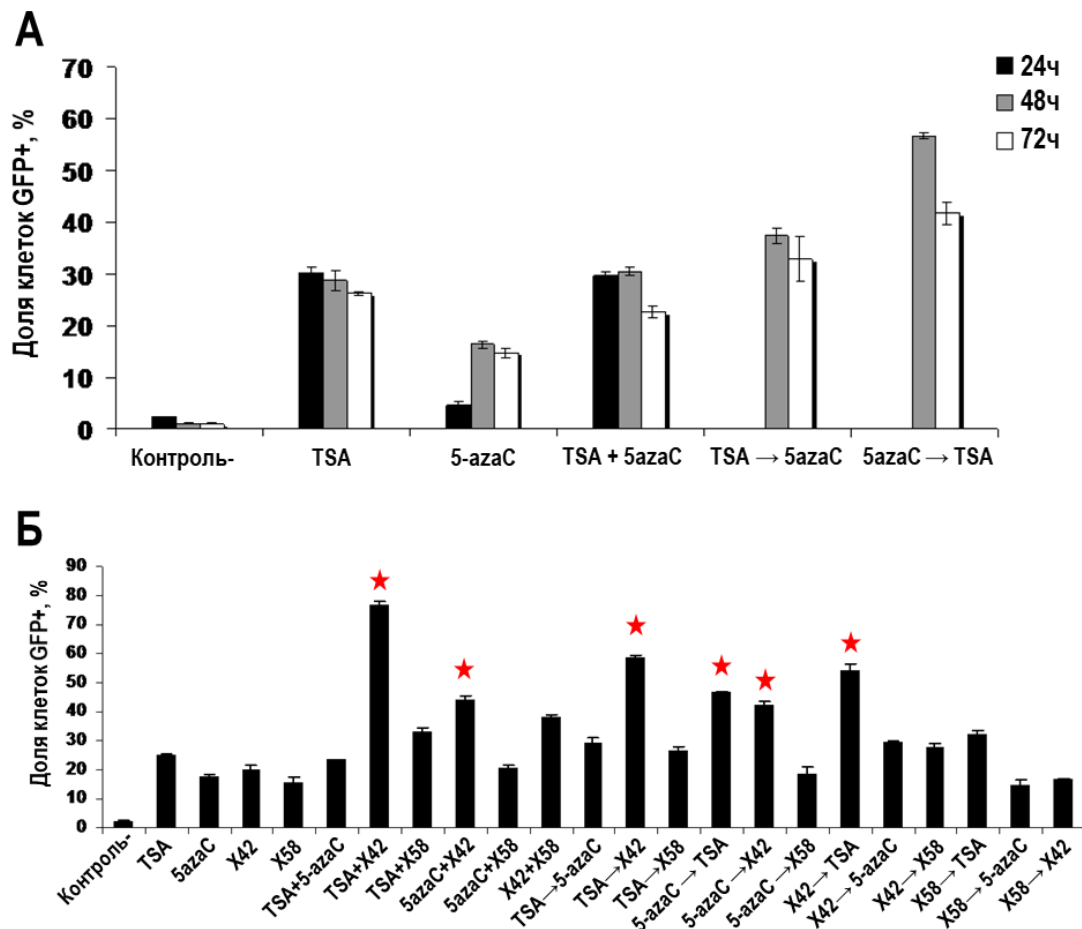


Рисунок 50. – Синергическое действие ингибиторов эпигенетических факторов. (А) Уровень реактивации (доля GFP–положительных клеток) после обработки TSA и 5-azaC (+– одновременная обработка клеток; → – последовательная обработка); (Б) Уровень реактивации (доля GFP–положительных клеток) при обработке эпигенетическими ингибиторами и УБЛ (X42 - хехст42 и X58 - хехст58, + – совместная обработка; → – последовательная обработка, ★-статистически значимое увеличение доли GFP+-клеток по сравнению с образцами клеток, которые обрабатывались агентами в монорежиме, $p < 0,01$)

При изучении взаимного действия TSA и 5-azaC на модели HeLa TI было показано, что увеличение экспрессии гена GFP происходит при последовательной обработке 5-azaC и TSA, но не наоборот. Максимальный эффект как при комбинированной, так и при отдельной обработках веществами регистрировался через 48 часов от момента начала эксперимента.

На клетках HeLa TI мы исследовали эффекты совместного действия УБЛ хехст33342, хехст33258 и эпигенетических ингибиторов (Рисунок 50, Б). Было показано неаддитивное усиление реактивации экспрессии GFP при одновременной обработке клеток хехст33342+TSA и хехст33342+5-azaC. Уровень реактивации экспрессии гена GFP TSA в этом эксперименте составил 25%, 5-azaC - 17%, а при одновременном добавлении с хехст33342 – 76% и 44% соответственно. Кроме того, усиление реактивирующего воздействия наблюдали для образцов с последовательной обработкой TSA→хехст33342 (58%), 5-azaC→хехст33342 (42%) и хехст33342→TSA (54%). Совместная обработка с хехст33258 увеличила реактивирующее действие ингибиторов лишь незначительно.

Эпигенетические ингибиторы TSA и 5-azaC обладают широким спектром действия в отношении ферментов, осуществляющих регуляцию модификаций гистонов и метилирования ДНК. При совместном использовании этих соединений ингибирование эпигенетических факторов неспецифично. Ранее на клетках HeLa TI было проведено исследование белковых факторов, участвующих в поддержании эпигенетической репрессии. С помощью нокдауна генов методом РНК-интерференции были выявлены отдельные белки, участвующие в эпигенетической регуляции экспрессии. При изучении отдельных эпигенетических факторов, которые участвуют в процессе реактивации при совместном действии агентов, был использован метод нокдауна отдельных ферментов с помощью миРНК. Через 72 часа после трансфекции к клеткам добавляли следующие химические соединения: TSA, 5-azaC, хехст33258 и хехст33342. Уровень реактивации транскрипции GFP анализировали с помощью проточной цитофлуориметрии через 120 часов от момента начала эксперимента. Результаты исследования представлены на рисунке 52. При использовании агентов в

указанных концентрациях без нокдауна клеточных белков реактивация экспрессии гена *GFP* составила: 14% для 5-azaC, 17% для TSA, 12% для хехст33258 и 14% для хехст33342. При нокдауне деацетилазы HDAC1, доля клеток с экспрессией гена *GFP* составила 45%, при обработке TSA, либо хехст33342 уровень реактивации возрос до 63 и 64% соответственно. При добавлении хехст58 уровень реактивации повысился до 56%.

Репрессия генов HDAC2, HDAC3 и HDAC4 не влекла за собой изменений экспрессии гена *GFP* в HeLa TI. Уровень флуоресценции при нокдауне этих генов составил менее 10%. При обработке соединениями реактивация на фоне нокдауна не превышала уровень реактивации экспрессии каждым их агентов при действии на интактные клетки (не более 14% для 5-azaC, 17% для TSA, 12% для хехст33258 и 14% для хехст33342).

Нокдаун DNMT1 приводил к реактивации экспрессии гена *GFP* до 24%. На фоне ингибирования этого фактора с помощью РНК-интерференции обработка клеток TSA и хехст33342 увеличила реактивацию *GFP* до 46 % для обоих веществ, применение 5-azaC и хехст33258 не привело к дальнейшему увеличению экспрессии гена.

Нокдаун ДНК метилтрансферазы DNMT3A приводил к реактивации экспрессии гена *GFP*, сравнимой с нокдауном HDAC1 (36%). Тем не менее применение агентов, как эпигенетических ингибиторов (5-azaC, TSA), так и УБЛ не привело к усилению реактивирующего действия.

При нокдауне ДНК метилтрансферазы DNMT3B наблюдалась реактивация экспрессии гена *GFP* до 17%. При обработке клеток агентами усиление транскрипции наблюдали только для хехст33342. В этом случае доля GFP-положительных клеток составила 39%.

Фермент DNMT3L, который сам не обладает метилтрансферазной активностью, способен потенцировать действие DNMT3A и DNMT3B. Нокдаун этого гена не приводил к существенной реактивации транскрипции (10%) в клетках HeLa TI. Обработка таких клеток TSA не вызвала увеличение экспрессии гена *GFP*,

тогда как 5-azaC и оба УБЛ увеличили уровень экспрессии GFP в популяции. Максимальный эффект регистрировали для хехст33342 (25%).

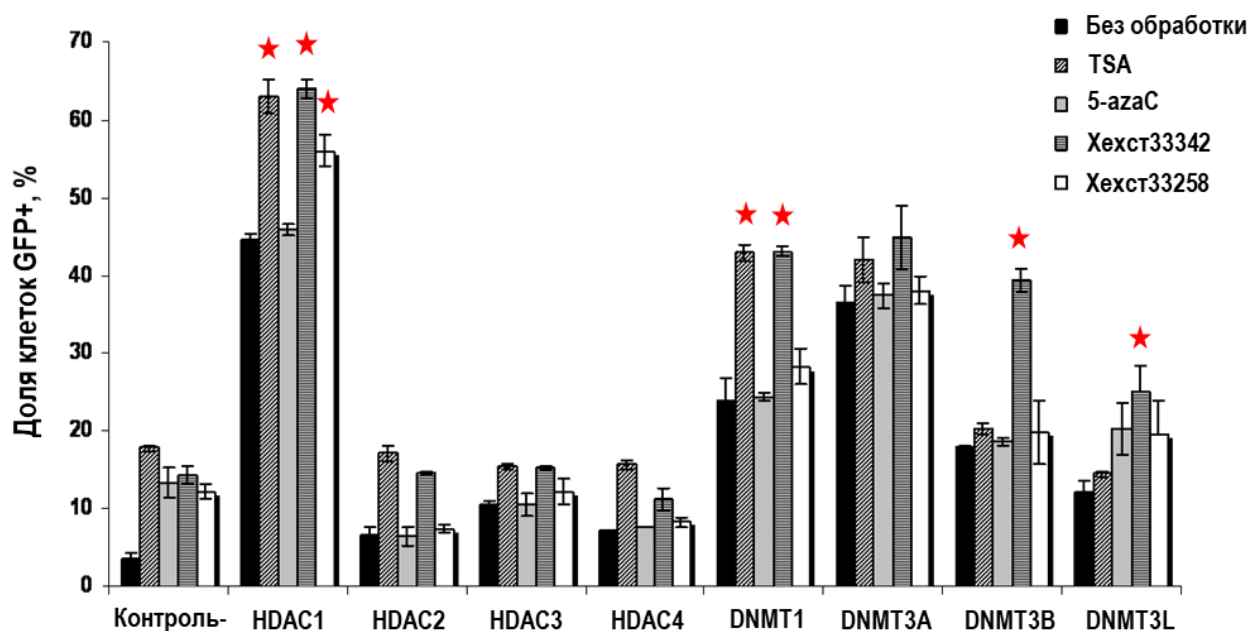


Рисунок 51 - Действие химических соединений на фоне нокдауна генов эпигенетической регуляции. Результат реактивации экспрессии гена GFP (выражен в доле GFP–положительных клеток) после нокдауна генов гистоновых деацетилаз и ДНК метилтрансфераз (Контроль - стандартная миРНК, не соответствующая ни одной мРНК, ★- статистически значимое увеличение доли GFP+-клеток относительно клеток без обработки, $p < 0,01$)

3.3.Обсуждение

Степень проявления генетически детерминированных признаков определяется целым рядом механизмов регуляции экспрессии генов, важнейшим из которых является эпигенетическая репрессия транскрипции. 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, воздействие на эпигенетическую регуляцию до определенного момента обратимо.

В отношении известных канцерогенов спектр эпигенетических эффектов был проанализирован лишь для группы алкилирующих соединений в связи их способностью к метилированию и алкилированию ДНК и гистонов, а их способность реактивировать экспрессию не изучалась. Для остальных канцерогенных соединений системного изучения их влияния на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов не проводилось. Наряду с этим, существует большая группа негенотоксических канцерогенов, которые не проявляют мутагенного действия в стандартных тестах, но способны вызывать активацию экспрессии онкогенов, являющихся звеньями в цепи событий канцерогенеза. К таким соединениям, в частности, относятся гербициды, инсектициды, фунгициды, ежегодное производство которых в мире составляет миллионы тонн. Механизм проканцерогенного действия данных молекул к настоящему времени до конца не понятен, а способность эпигенетически регулировать экспрессию генов не исследовалась. Таким образом, новым актуальным направлением исследований в области химического канцерогенеза является изучение эпигенетической составляющей в действии известных канцерогенов. Второй группой ксенобиотиков, для которых актуальны фундаментальные исследования по выявлению эпигенетических эффектов и изучению их молекулярных механизмов являются противоопухолевые препараты. К настоящему времени получен ряд данных о способности некоторых химиопрепаратов необратимо ингибировать метилтрансферазы, а также об их влиянии на модификации гистонов. Это приводит к изменению профиля экспрессии генов и влияет на функционирование систем репарации повреждений ДНК, определяющих эффективность комбинированной химиотерапии. Ранее нам удалось впервые продемонстрировать способность ряда противоопухолевых препаратов (бортезомиб, мимозин, блеомицин) реактивировать транскрипцию эпигенетически репрессированных генов. Это свидетельствует о необходимости анализа эпигенетических эффектов

противоопухолевых препаратов для разработки схем их более рационального применения.

Несмотря на активное исследование механизмов эпигенетической регуляции транскрипции, эффекты ксенобиотиков на реактивацию эпигенетически репрессированных генов изучены недостаточно, что в первую очередь связано с отсутствием модельных систем, которые позволяют определять такую активность интегрально, а не по отдельным изменениям в определенных участках генома.

Одной из перспективных модельных систем для анализа механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов являются культуры клеток с интегрированным в геном вирусом, содержащим репортерный элемент. Эпигенетические механизмы репрессии ретровирусных генов совпадают с механизмами эпигенетической регуляции экспрессии генов [151] [130].

В представленной работе в качестве модели для анализа влияния химических соединений на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов использована клеточная линия HeLa TI, несущая геном вируса саркомы птиц, содержащий эпигенетически репрессированный репортерный ген *GFP*, экспрессия которого служит в качестве маркера эпигенетической регуляции.

Для тестирования этой эукариотической модельной системы на возможность ее использования в скрининге ксенобиотиков, обладающих эпигенетическими свойствами, было исследовано действие агентов с известной эпигенетической активностью. Положительный результат реактивации молчащего гена *GFP* был показан для всех соединений.

В список эпигенетически активных агентов был включен ряд ингибиторов гистоновых деацетилаз. Так как TSA применялся при разработке этой модели, этот агент был использован в качестве положительного контроля на эпигенетическую реактивацию, которая опосредована изменением модификаций гистонов. Его добавление привело к увеличению доли *GFP*-положительных клеток до 35%. Далее было проанализировано влияние агентов на общий уровень гистоновых модификаций. После обработки TSA наблюдали снижение уровня триметилирования гистона H4 в положении K20 – модификации, характерной для

репрессированных генов. После обработки TSA происходило увеличение уровня триметилирования гистона H3 по положению K4, отвечающего за активацию транскрипции. Анализ изменений гистоновых модификаций в промоторной области гена были подтверждены данными вестерн-блоттинга, что свидетельствовало о влиянии TSA на модификации гистонов как на интегральном, так и на локальном уровне. В качестве контроля TSA использовался и в экспериментах по анализу метилирования ДНК. TSA не приводил к изменениям метилирования ДНК как в области LTR, так и на уровне генома. Результаты наших опытов хорошо согласуются с опубликованными ранее данными о том, что TSA не влияет на уровень метилирования ДНК, но влияет на модификации гистонов в промоторе эпигенетически репрессированного гена, и при этом приводит к увеличению интегрального уровня ацетилирования в клетках [152].

В качестве других ингибиторов гистоновых деацетилаз использовались SANA (вориностат), депсипептид (бициклический пептид, изолированный из *Chromobacterium violaceu*), вальпроевая кислота (VPA) и флавоноид помиферин, выделенный из *Maclura pomifera*. Применение этих агентов привело к реактивации экспрессии гена *GFP* до 19, 21, 19, и 28% соответственно, что несколько ниже по сравнению с уровнем реактивации TSA (35%). Некоторые из этих препаратов в настоящее время используются в клинике. Вориностат применяется в химиотерапии в качестве антинеопластического средства при лимфомах, патогенез которых связан с повышенной экспрессией гистоновых деацетилаз [153-155]. Исследование вальпроевой кислоты (VPA) показало, что этот агент влияет не только на интегральный уровень ацетилирования гистонов, но также изменяет уровень метилирования H3K9ac, гистоновой модификации, играющей роль в регуляции экспрессии генов в стволовых клетках [156]. В настоящее время VPA в клинике используется при легочной гипертензии и эпилепсии, также было продемонстрировано, что этот препарат также может применяться для увеличения чувствительности трансформированных клеток к химиотерапии при лечении опухолей, ассоциированных с вирусом Эпштейна-Барр [157, 158]. Препарат Депсипептид находится на стадии клинических испытаний для лечения Т-

клеточных лимфом. Известно, что препарат требует метаболической активации и является непосредственно синтетическим пептидом. Для помиферина, помимо ингибирования гистоновых деацетилаз, были продемонстрированы антиоксидативное и цитотоксическое действие относительно клеток холангиокарциномы [159].

Ингибитор гистоновой деацетилазы 1 MS275 (Энтиостат) реактивировал экспрессию гена *GFP* у 16% клеток. Ингибитор HDAC1 Энтиостат может использоваться не только при заболеваниях, для которых характерна повышенная экспрессией этого белка, но и для снятия резистентности к препаратам, которая обусловлена эпигенетическими факторами [160]. Для данного агента была продемонстрирована эффективность его совместного использования с ингибиторами метилирования ДНК при терапии рака легкого [161].

3-дiazенплатоцин А (DZNep), ингибитор триметилирования гистонов H3K27me3 и H4K20me3, в скрининге реактивировал экспрессию *GFP* в 15% клеток. Подавляя метилирование гистонов, этот агент приводит к реактивации экспрессии генов, механизм репрессии которых не включает метилирование ДНК [162, 163]. DZNep может использоваться для терапии острого миелоидного лейкоза, а его механизм реактивации экспрессии генов включает усиление образования активных форм кислорода [164, 165].

К эпигенетическим агентам, для которых была показана способность ингибировать метилирование ДНК, в скрининге относились: 5-азацитидин (5-azaC) и 5-аза-2'-дезоксцитидин (d-azaC). Оба вещества являются химическими аналогами цитидина и влекут за собой необратимое ингибирование ДНК-метилтрансфераз. Для реактивации экспрессии генов в клеточных культурах используются оба ингибитора, так как для каждого из них была ранее продемонстрирована высокая эффективность. В течение последних 30 лет эти препараты исследовались в клинических испытаниях, но из-за их высокой токсичности не применяются для лечения пациентов [166]. Обработка HeLa T1 RG108 (N-фталил-L-триптофан) привела к реактивации экспрессии гена *GFP* в 15% клеток. Известно, что его эпигенетическая активность ниже по сравнению с 5-

azaC. Но в отличие от 5-azaC действия этого препарата на метилтрансферазы не основано на ковалентном связывании с ДНК, что делает его более перспективным для использования в терапии. Более того, RG108 не изменяет уровень метилирования сателлитных последовательностей центромерных областей и характеризуется низкой токсичностью [167].

В наших экспериментах 5-azaC использовали как контрольный ингибитор метилирования. Как видно из результатов эксперимента с модификациями гистонов, 5-azaC не оказывал влияния на изменение гистоновых модификаций на глобальном уровне, но приводил к увеличению H3ac и снижению H4K20me3 в промоторе GFP. Однако нельзя исключить, что такие изменения произошли в результате реактивации экспрессии и этот эффект является вторичным [168].

В заключение необходимо отметить, что несмотря на то, что большинство из вышеупомянутых соединений получило практическое применение, механизм их действия изучен не до конца.

Таким образом, для всех агентов с эпигенетической активностью был получен положительный результат по реактивации экспрессии гена GFP, что подтверждает возможность использования этой модели эпигенетического молчания для скрининга химических соединений на их эпигенетическую активность.

Все вещества-ксенобиотики, попадающие в клетку, вовлекаются в процесс метаболизма, целью которого является выведение данных соединений из организма. На первой стадии метаболизма, связанной с повышением гидрофильности ксенобиотика при помощи ферментов системы микросомных монооксигеназ некоторые соединения (проканцерогены) превращаются в высокореактивные производные. Такие промежуточные метаболиты способны ковалентно связываться с клеточными белками и нуклеиновыми кислотами, оказывая мутагенное действие. Различные клеточные линии из-за разного профиля экспрессии ферментов системы микросомных монооксигеназ, представленных множеством изоформ цитохрома P-450, обладают различной способностью метаболизировать проканцерогены. Поскольку HeLa T1 планируется так

планируется использовать для тестирования соединений, требующие метаболической активации, в следующей части работы мы изучили способность клеточной линии к метаболической активации проканцерогенов.

В ходе исследования мы продемонстрировали, что клеточная линия HeLa TI обладает активной системой микросомных монооксигеназ, о чем свидетельствуют: (1) способность клеток линии HeLa TI осуществлять метаболическую активацию бенз(а)пирена; (2) экспрессия в клетках HeLa TI целого ряда изоформ цитохрома P450, субстратами гидроксилирования которых являются известные проканцерогены; (3) способность клеток HeLa TI к повышению экспрессии изоформ цитохрома P450 при действии индукторов микросомных монооксигеназ; (4) нарушение ДНК при действии ряда проканцерогенов, метаболизм которых осуществляется различными изоформами цитохрома P450. Выполнение этого этапа завершило работу над созданием и характеристикой тест-системы HeLa TI для проведения экспрессного анализа влияния ксенобиотиков на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов.

В следующей части работы мы исследовали эпигенетические эффекты узкобороздочных лигандов. Все тестируемые УБЛ обладали реактивирующим эффектом, ранее эффекты соединений этой группы на эпигенетическую регуляцию экспрессии генов у эукариот не изучали.

В список УБЛ были включены производные бисбензимидазола хехст33258 и хехст33342, производные бисбензамидина пентамидин и диминазен, нетропсин, DAPI и производные карбазолов кураксина. Наибольшей реактивирующей способностью обладали хехст33342, DAPI, CBL0137 и CBL0175 (35, 35, 35 и 40% соответственно), меньший эффект наблюдался при действии нетропсина, диминазена, пентамидина и хехст33258 (20, 22, 17 и 17 соответственно).

Особый интерес у нас вызвало то, что соединения хехст33342 и хехст33258, обладая очень схожей молекулярной структурой и отличаясь лишь одним радикалом, проявили различную эпигенетическую активность[169]. Исходя из этого, мы сконцентрировали наше внимание на подробном исследовании механизмов их эпигенетической активности.

Эксперименты по анализу уровня гистоновых модификаций, являющихся маркерами транскрипционно неактивных генов (H3K9me3 и H4K20me), в популяции клеток HeLa T1, не выявил значительного снижения уровня метилирования при действии каждого из агентов. Однако для обоих соединений наблюдалось увеличение ацетилирования гистонов acH3/H4, что характерно для реактивации транскрипции генов. Помимо этого, для хехст33342, но не хехст33258 выявлена способность увеличивать уровень активирующей модификации H3K4me3, которая локализуется в промоторе активно транскрибируемых генов.

Для анализа модификаций гистонов в промоторе гена *GFP* при реактивации были использованы хехст33258, хехст33342, DAPI, а также 5-azaC и TSA в качестве контролей. Нам не удалось продемонстрировать значительного изменения уровня модификации H4K20me для хехст33258, хехст33342, DAPI и 5-azaC, однако в промоторе гена *GFP* наблюдали снижение уровня этой модификации для всех соединений, включая 5-azaC. В промоторе возрастал и уровень ацетилирования гистона H3, что также выявили для всех соединений. Из данных литературы известно, что 5-azaC значительно не влияет на общий уровень модификаций гистонов, что косвенно свидетельствует о том, что, по всей видимости, изменение модификаций в промоторной области при применении 5-azaC происходит вторично за счет реактивации экспрессии гена *GFP* в результате снижения уровня метилирования. Ранее было продемонстрировано, что 5-azaC влияет на структуру хроматина посредством ингибирования метилтрансфераз [170]. Так как для хехста и TSA изменение уровня гистоновых модификаций происходило не только в промоторной области, но и на глобальном уровне, можно предположить, что первичный эффект хехст на регуляцию экспрессии генов основан на изменении уровня модификации гистонов.

При анализе глобального метилирования для группы УБЛ, включая хехст, значительных изменений отмечено не было. Однако при обработке клеток 5-azaC отмечалось снижение уровня метилирования, что согласуется с литературными данным [171-173]. В качестве отрицательного контроля использовался TSA, при

применении которого изменений в глобальном метилировании ДНК не было обнаружено [174].

Некоторые соединения, не влияющие на уровень метилирования ДНК, способны метилировать промоторную область LTR. При исследовании метилирования промотора при обработке хехстами, было выявлено снижение в области LRT при действии 5-azaC и хехст33258. Примечательно, что применение хехст33342 к таким изменениям метилирования не приводила.

Хехст33342 не вызывал изменений уровня метилирования LTR, в то время как обработка клеток хехст33258 снижала уровень метилирования, что согласуется с данными, полученными методом метилчувствительной ПЦР.

Таким образом, нам удалось охарактеризовать действие хехст33342 и хехст33258 на эпигенетические механизмы регуляции экспрессии. Обладая близкой молекулярной структурой, эти агенты по-разному влияют на реактивацию экспрессии гена GFP. При одновременном влиянии на систему регуляции гистоновых модификаций, только один агент - хехст33258 оказывал деметилирующее действие на промотор LTR, однако его реактивирующая способность в эквимоллярных концентрациях была ниже по сравнению с хехст33342.

Установление эпигенетического молчания предполагают совместную активность и системы модификаций хроматина, и системы метилирования ДНК. Многочисленные исследования выявили высокий уровень реактивации репрессированных генов при обработке клеток одновременно ингибиторами ДНК-метилтрансфераз и гистоновых деацетилаз [175-177].

Так как эпигенетическое молчание GFP в HeLa TI обеспечивается наличием гистоновых модификаций и метилирования ДНК, мы изучили эффекты УБЛ при их совместном использовании с эпигенетическими препаратами.

Вначале на клетках HeLa TI мы исследовали эпигенетические эффекты при обработке клеток комбинацией ингибитора гистоновых деацетилаз TSA и ингибитора метилтрансфераз 5-azaC. В опыте клетки обрабатывали каждым агентом отдельно, одновременно или последовательно. Была выявлена

потенцирующая активность 5-azaC при последующей обработке TSA. Доля GFP-положительных клеток составила - 17% для 5-azaC, 30% для TSA и 52% - при их последовательном использовании. Этот опыт позволил нам сделать вывод об упорядоченности процессов ацетилирования гистонов и деметилирования ДНК при поддержании эпигенетической репрессии, при этом деметилирование ДНК с последующим ацетилированием гистонов способствовало реактивации экспрессии гена *GFP* и прерыванию репрессии. Из данных литературы известно, что такой эффект характерен и для реактивации экспрессии клеточных генов [178].

Используя вышеописанную схему обработки (отдельно, одновременно и последовательно) в следующий эксперимент были включены хехсты. Показано, что статистически значимое усиление экспрессии GFP наблюдалось для следующих комбинаций: при одновременной обработке агентами хехст33342 и TSA ($19\% + 25\% \neq 76\%$) и хехст33342 и 5-azaC ($19\% + 17\% \neq 44\%$) выявили потенцирующее действие. При одновременном использовании хехст33342 и хехст33258 эффект их действия был аддитивным ($19\% + 16\% = 35\%$). Был установлен потенцирующий эффект и при последовательном добавлении соединений к клеткам: TSA $\rightarrow$ хехст33342 ($25\% + 19\% \neq 58\%$); 5-azaC $\rightarrow$ хехст33342 ($17\% + 19\% \neq 42\%$) и при обработке хехст33342 $\rightarrow$ TSA ($19\% + 25\% \neq 54\%$). В то время как комбинация хехст33342 $\rightarrow$ 5-azaC не дала подобного эффекта. Интересно, что максимальный потенцирующий эффект был выявлен при совместном действии хехст33342 и TSA, реактивация транскрипции в таком случае достигала 76%. Таким образом, этот эксперимент позволил нам выявить синергическое действие хехст33342 с эпигенетическими препаратами, тогда как для близкого по структуре соединения хехст33258 такого влияния не наблюдали.

Для изучения синергического действия хехст и увеличения избирательности эффекта этих агентов была предпринята попытка определить таргетные белки, которые участвуют в синергическом действии, то есть выявить эпигенетические факторы, часто гиперэкспрессированных в опухолевых клетках.

При ингибировании белков методом РНК-интерференции, мы проанализировали влияние УБЛ на реактивацию экспрессии гена *GFP* при

нокдауне каждого из основных ферментов эпигенетической регуляции. Для проведения опыта были выбраны миРНК для ингибирования гистоновых деацетилаз (HDAC1, HDAC2, HDAC3 и HDAC4). Ранее было установлено, что в установлении эпигенетического молчания в HeLa T1 принимает участие только HDAC1, но не HDAC2, HDAC3 и HDAC4. Также были выбраны миРНК для репрессии ДНК метилтрансферазы (DNMT1, DNMT3A, DNMT3B и DNMT3L). Важно учитывать, что ферменты эпигенетической регуляции могут взаимодействовать между собой и нельзя исключать эффекты их совместного действия.

Обработка TSA на фоне нокдауна DNMT1 и HDAC1 усиливала эффект соединения, однако наблюдался только синергический эффект: TSA - HDAC1 ($17\% + 45\% \approx 63\%$), TSA - DNMT1 ($17\% + 24\% = 41\%$). Хехст33342 оказал схожий эффект на фоне ингибирования этих ферментов: хехст33342 - HDAC1 ($14\% + 45\% \approx 64\%$) и хехст33342 - DNMT1 ($14\% + 24\% \approx 39\%$). Помимо это мы продемонстрировали, что для хехст33342 наблюдается эффект суммирования и при нокдауне DNMT3B и DNMT3L: хехст33342 - DNMT3B ($14\% + 17\% \approx 39\%$) и хехст33342 - DNMT3L ($14\% + 12\% = 26\%$).

В этом опыте действие хехст33342 также отличалось от действия хехст33258. Для хехст33258 был выявлен только аддитивный эффект на фоне ингибирования HDAC1 ($12\% + 45\% = 57\%$).

Несмотря на то, что мы не выявили потенцирующего действия или эффектов сенситизации в последней серии экспериментов, полученные данные указывают на возможность взаимодействия ксенобиотиков с факторами эпигенетической регуляции. Помимо этого, ферменты могут взаимодействовать между собой и нельзя исключать эффект их совместного действия наряду с химическими агентами. Подобные синергические эффекты важно учитывать в комбинированной терапии для повышения эффективности лекарственного средства, снижения применяемых доз и достижения синергических противоопухолевого эффектов.

ГЛАВА 4. МУТАГЕННЫЕ, РЕКОМБИНОГЕННЫЕ И БЛАСТОМОГЕННЫЕ СВОЙСТВА УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ.

4.1. Обзор литературы

4.1.1. Основные типы нарушений ДНК и возможности их выявления при краткосрочном тестировании

Химические канцерогены отличаются между собой по механизмам первичных реакций, способствующих инициации опухолевой трансформации. Прямые канцерогены и метаболиты проканцерогенов взаимодействуют с нуклеофильными группами, повреждая структуры клетки, которые играют важную роль в ее жизнедеятельности. Наиболее существенной для канцерогенеза является способность вызывать нарушения в ДНК при образовании аддуктов, модификации оснований, сшивок цепей, индукции гидролиза связей и ингибирование активности ферментов метаболизма ДНК.

При интенсивном воздействии канцерогена в клетке активируется либо апоптоз, либо репарация. При недостаточной эффективности ферментов репарации ДНК восстановление изначальной структуры ДНК становится невозможным, что влечет за собой возникновение мутаций.

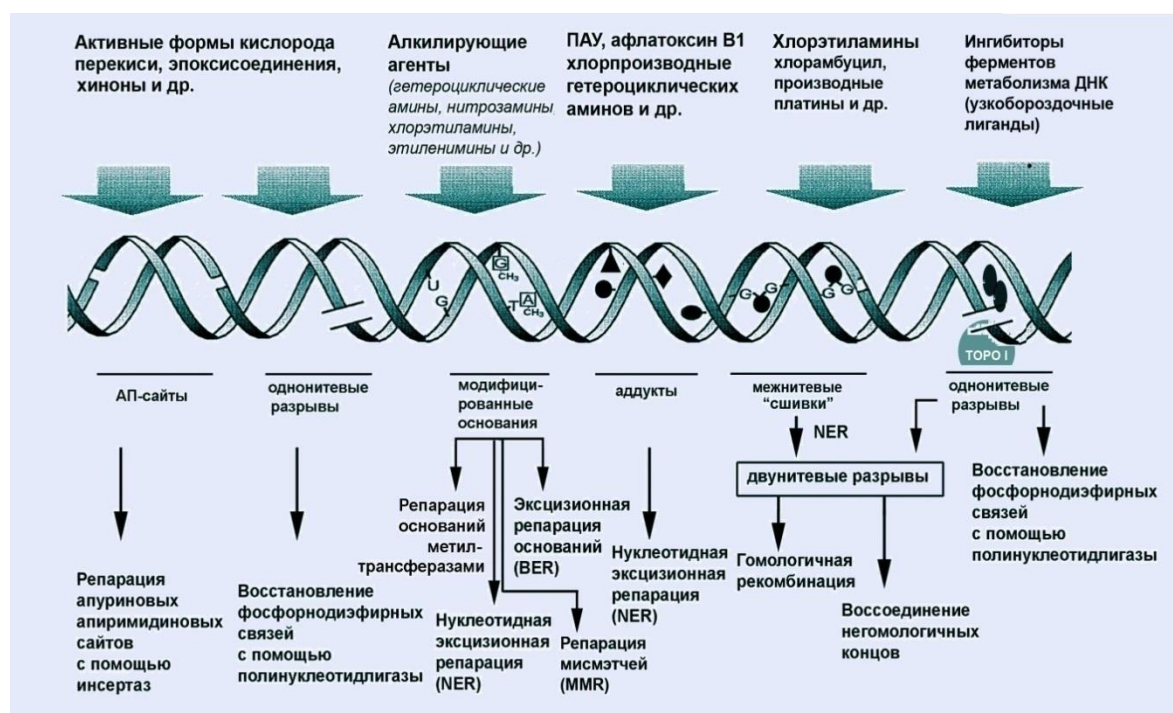


Рисунок 52 - Различные типы повреждения ДНК и их репарация

Почти все типы индуцируемых канцерогенами повреждений ДНК могут активировать апоптоз. Интенсивность повреждения, которая необходима для запуска апоптоза, в клетке определяется активностью белков р53-зависимых путей. При нарушениях в работе систем запуска апоптоза клетка даже со значительными повреждениями ДНК идет по пути репарации. Способ репарации ДНК при этом зависит от типа повреждения ДНК (Рисунок 53). Однонитевые разрывы некоторые аддукты репарируются с участием ДНК-полинуклеотидлигаз. Репарация апириимидиновых и апуриновых сайтов может производиться инсертазами или с помощью эксцизионной репарации. Наиболее распространенным результатом действия алкилирующих агентов является образование N⁷-метилгуанина, O⁴-алкилтимина и O⁶-метилгуанина, их репарация осуществляется метилтрансферазами. Модифицированные основания, которые образуются при ковалентном связывании производных гетероциклических аминов и ПАУ с ДНК, репарируются методом эксцизионной репарации. При экспозиции соединениям платины, бифункциональным алкиляторам и др. химиотерапевтическим препаратам в макромолекуле часто образуются «сшивки», в результате эксцизионной репарации которых могут образовываться двунитевые разрывы. Репарация этих повреждений происходит воссоединением негомологичных концов или с помощью соматической гомологичной рекомбинации. Первый способ репарации направлен на сохранение жизнеспособности клетки, в этом случае высока вероятность значительных структурных изменений как на генном, так и на хромосомном уровнях (делеции, транслокации, инсерции). Соматическая гомологичная рекомбинация способствует полному восстановлению генома, если в процессе репарации принимают участие сестринские хроматиды или гомологи (исключение составляют небольшие участки инициации рекомбинации, которые подвергаются генной конверсии). В то время как рекомбинация несестринских хроматид может привести к потере гетерозиготности.

Системы репарации ДНК в клетке взаимозависимы и взаимосвязаны, при устранении модифицированных оснований может происходить изменение типа нарушения макромолекулы (Рисунок 53).

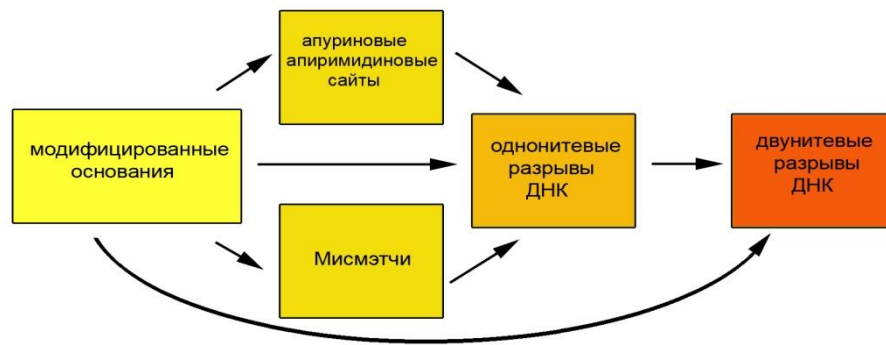


Рисунок 53 - Возможные изменения типа повреждения ДНК в процессе репарации и жизнедеятельности клетки

В результате ошибочной репарации и ее недостаточной эффективности в ДНК могут возникать нарушения трех основных типов: (1) точечные мутации, приводящие к изменению или потере функциональных характеристик кодируемого белка, (2) потеря гетерозиготности, приводящая к возникновению в клетках двух функционально неактивных аллелей, и (3) хромосомные транслокации, при которых может либо изменяться регуляция экспрессии генов в зоне транслокации, либо происходить потеря одного из аллелей с появлением мозаичного гемизиготного клона (Рисунок 54).

4.1.2. Принципы формирования наборов (батареи) краткосрочных тестов

В настоящее время общепринятым является использование наборов краткосрочных тестов (КСТ) *in vivo* и *in vitro*, позволяющих охарактеризовать химические соединения по отдельным свойствам, которые могут обуславливать их канцерогенную активность.

Согласно современным требованиям наборы КСТ должны отвечать ряду требований: «должны быть взаимодополняющими, то есть отличаться или по конечному эффекту (повреждение ДНК, генные мутации, хромосомные aberrации, неопластическая трансформация, нарушение метаболической кооперации и др.), или по уровню биологической организации объекта исследования (прокариоты, эукариоты, системы *in vitro*, *in vivo*). При этом последовательность исследований предполагает движение от простых к сложным и от кратких экспериментов к более длительным. Отбираемые в батарею тесты должны быть надежно верифицированы

на соединениях с известной канцерогенной активностью. Для выявления одних и тех же эффектов существует ряд равноценных методов, которые могут взаимозаменяться. В некоторых случаях, в зависимости от особенностей тестируемого соединения, одним методам следует отдавать предпочтение перед другими. Таким образом, набор краткосрочных тестов не является жестко фиксированным. Действующим началом большинства известных канцерогенов являются высокоактивные метаболиты, поэтому необходимым компонентом ряда КСТ является система адекватной метаболической активации исследуемых препаратов» [179].

В настоящее время выделяют 5 групп краткосрочных тестов:

1. Тесты на выявление генных мутаций и рекомбинаций:

- тест Эймса (*Salmonella*/микросомы) с использованием экзогенной активации препаратов фракцией S9 печени крыс;

- тест на индукцию рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций на *Drosophila melanogaster*;

- тест на соматические мутации и рекомбинации на *Drosophila melanogaster* (SMART).

2. Цитогенетические тесты:

- индукция хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo*;

- индукция микроядер в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo*.

3. Тесты на повреждения ДНК:

- тест по учету повреждений ДНК (ДНК-комет) методом щелочного электрофореза *in vitro* и *in vivo*;

- тест на индукцию SOS-ответа *E. coli*;

- тест на индукцию внепланового синтеза ДНК в клетках млекопитающих;

- выявление повреждений ДНК методом флуориметрии или щелочной элюции.

4. Тесты на промоторную активность:

- ГФРТ-тест на нарушение метаболической кооперации в смешанной культуре соматических клеток млекопитающих.

5. Прямые экспресс-тесты, регистрирующие опухолеобразующий потенциал тестируемых веществ:

- тест на трансформацию клеток в культуре или индукцию опухолей у гидробионтов.

4.1.3.Стратегия исследования химических соединений

На основании результатов исследования ксенобиотика в батарее КСТ делается заключение о потенциальных канцерогенных свойств.

Наиболее существенными для прогноза канцерогенных свойств агента являются данные, полученные при учете генных мутаций (тест Эймса) и анализе хромосомных aberrаций (Рисунок 55). При положительном результате в обоих экспериментах делается однозначное заключение о канцерогенной опасности. В остальных же случаях необходима постановка дополнительных опытов.

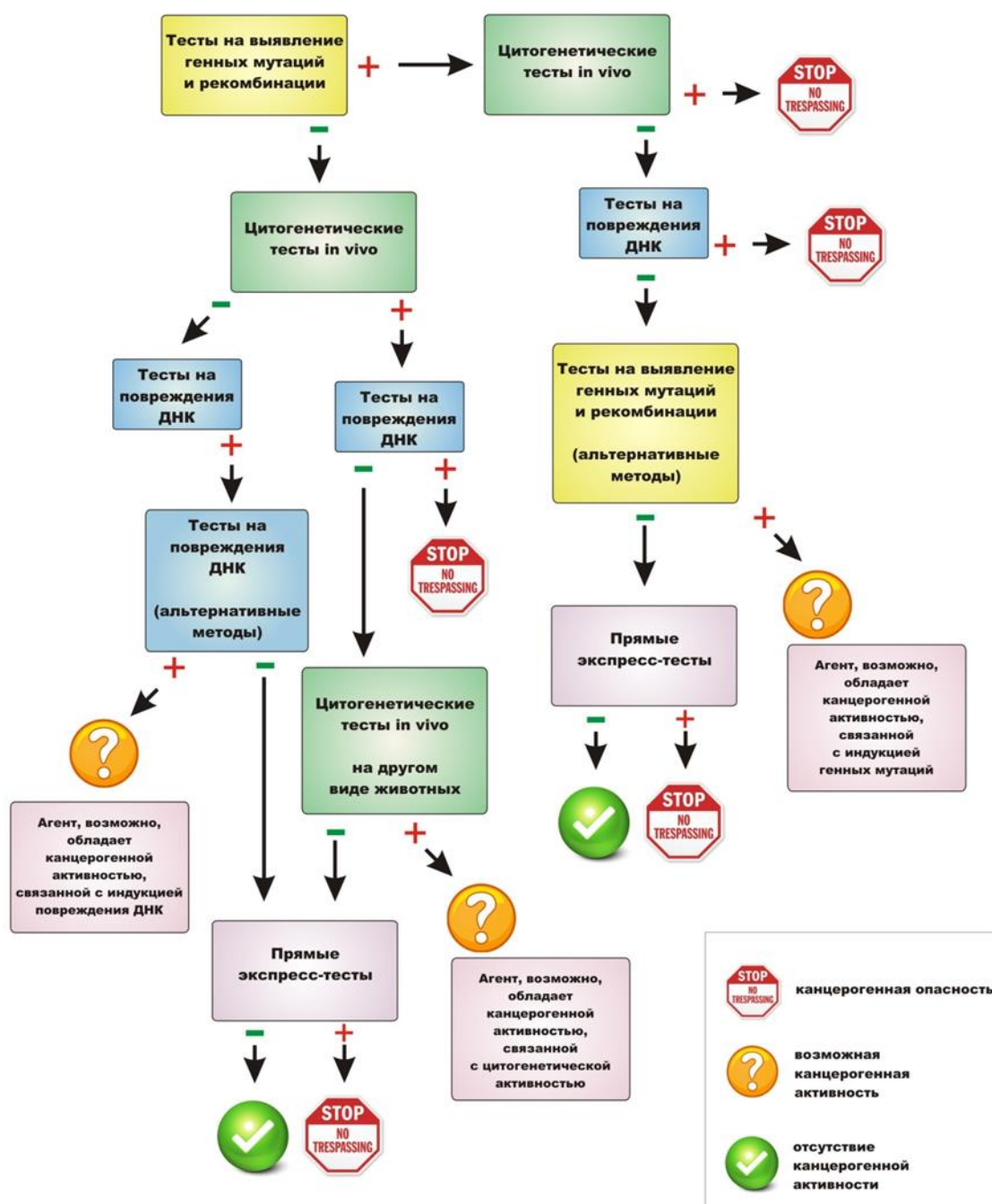


Рисунок 55 - Правила продвижения исследуемых веществ по батарее краткосрочных тестов и интерпретация результатов

При отрицательном результате во всех трех тестах дается заключение об отсутствии потенциальной канцерогенной опасности агента. Для отдельных групп соединений (например, гормонов), даже при отсутствии активности в трех КСТ, рекомендовано исследование с использованием одного из экспресс-тестов на опухолеобразование.

При получении положительного результата в 2 из 3 тестов дальнейшее исследование прекращается и делается заключение о наличии канцерогенной опасности.

Если положительный результат был получен в 1 из трех тестов, задачей следующего этапа является исследование способности препарата вызывать определенный тип генетических нарушений. Так, при наличии эффекта в тесте на индукцию генных мутаций и рекомбинаций необходимо провести исследование препарата альтернативным методом, который способен выявлять такой тип повреждений. Например, если положительный ответ был получен при тестировании мутагенной активности на бактериях, необходимо провести изучение препарата на дрозофиле. Если эффект был продемонстрирован в цитогенетическом тесте на клетках костного мозга мышей, уточняющий эксперимент необходимо провести на другом виде лабораторных животных.

Если при повторном исследовании (альтернативным методом) был получен положительный результат, то делается вывод о том, что препарат обладает способностью индуцировать появление генетических повреждений определенного типа. При получении отрицательного результата проводят дальнейшие исследования с использованием одного из прямых экспресс-тестов.

4.1.4. Краткий обзор тестов для прогноза канцерогенной опасности ксенобиотиков

В этой части работы приведен обзор тестов на потенциальную канцерогенную опасность ксенобиотиков, результаты которых имеют наиболее существенное значение при данном виде исследований: (1) тест на мутагенную активность на *Salmonella typhimurium* (тест Эймса); (2) тест на соматические мутации и рекомбинации на *Drosophila melanogaster* (SMART-test); (3) тест на индукцию хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей *Mus musculus*. Тест SMART будет описан более подробно, так как понимание принципов данного метода необходимы для обсуждения полученных результатов.

Мутационный тест на *Salmonella typhimurium* (тест Эймса)

Тест на *Salmonella typhimurium* был разработан Б. Эймсом в 70-е годы двадцатого века и является бактериальной тест-системой для учета мутаций при действии ксенобиотиков и их метаболитов, которые могут индуцировать мутации типа сдвига рамки считывания или замены оснований в геноме бактерий [180]. В тесте применяются штаммы бактерий, несущие мутации в генах, которые участвуют в синтезе гистидина и исследуется способность ксенобиотиков вызывать обратную мутацию этого гена. При этом бактерии приобретают способность расти в среде без гистидина. Для метаболической активации проканцерогенов применяют фракция печени крыс S9, которая содержит микросомальные монооксигеназы.

В ходе эксперимента (Рисунок 56) происходит обработка бактерий тестируемым агентом с системой метаболической активации или её. После инкубации в течение 48-72 часов подсчитывается количество мутировавших колоний в сравнении с количеством спонтанных ревертантов.

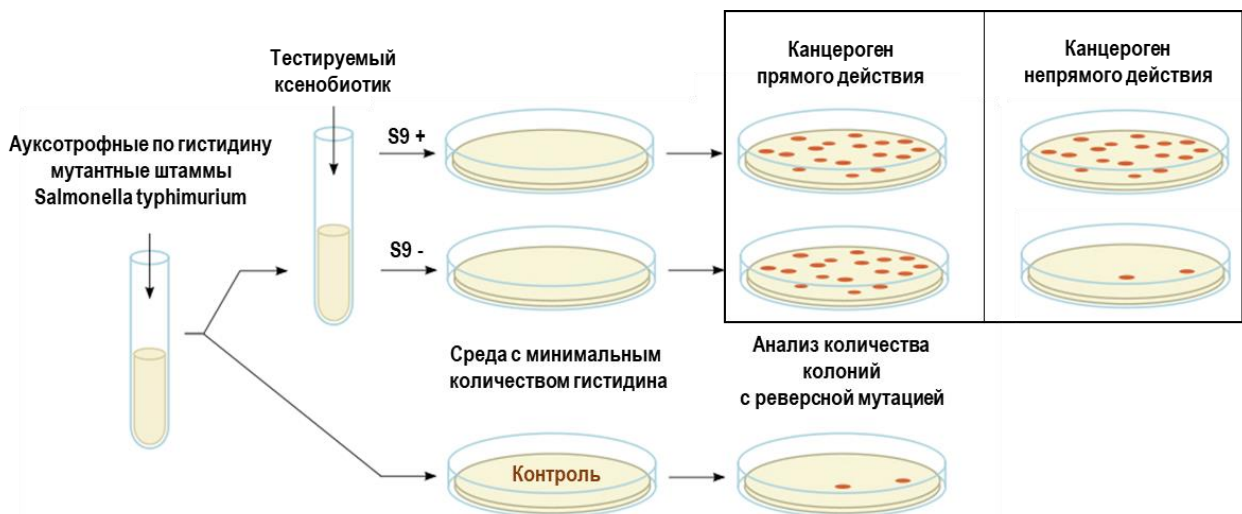


Рисунок 56 - Схема проведения теста Эймса на мутагенную активность ксенобиотиков

Если исследуемый агент мутагенен, то будет индуцировать реверсивные мутации у гистидин-зависимых штаммов бактерий.

Тест на соматические мутации и рекомбинации на *Drosophila melanogaster*

Использование дрозофилы для исследования мутагенеза и причин его возникновения по появлению мозаичных соматических клонов было предложено в тридцатые годы прошлого столетия [181]. При облучении личинок, гетерозиготных по гену окраски тела и макрохет y^+/y (доминантный ген y^+ обуславливал серый цвет, а рецессивный ген y соответствовал желтой окраске, которая проявлялась в геми- или гомозиготном состоянии), наблюдалось формирование мозаичных клонов (Рисунок 57).

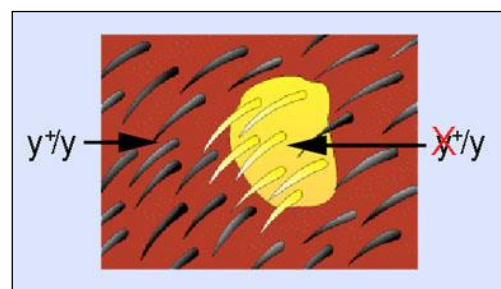


Рисунок 57 - Соматический мозаичный клон, выявленный у имаго после воздействия радиации на личинку дрозофилы

В начале 40-х годов Ш. Ауэрбах, И. Рапопортом и Дж. Робсоном впервые было описано сильное мутагенное действие некоторых химических соединений.

В середине 70-х Белицким и соавт. было показано, что разнообразные химические канцерогены также увеличивают частоту появления соматических мозаичных клонов. На этой основе был создан экспресс-метод тестирования мутагенного эффекта канцерогенов на дрозофиле по частоте возникновения соматических мозаичных клонов [182].

Известно, что появление соматических клонов, связанное с потерей функционально активного доминантного аллеля у гетерозигот, может происходить в результате точечных мутаций в нормальном гене, генных и хромосомных делеций и, наконец, в результате потери гетерозиготности при соматической рекомбинации (Рисунок 58).

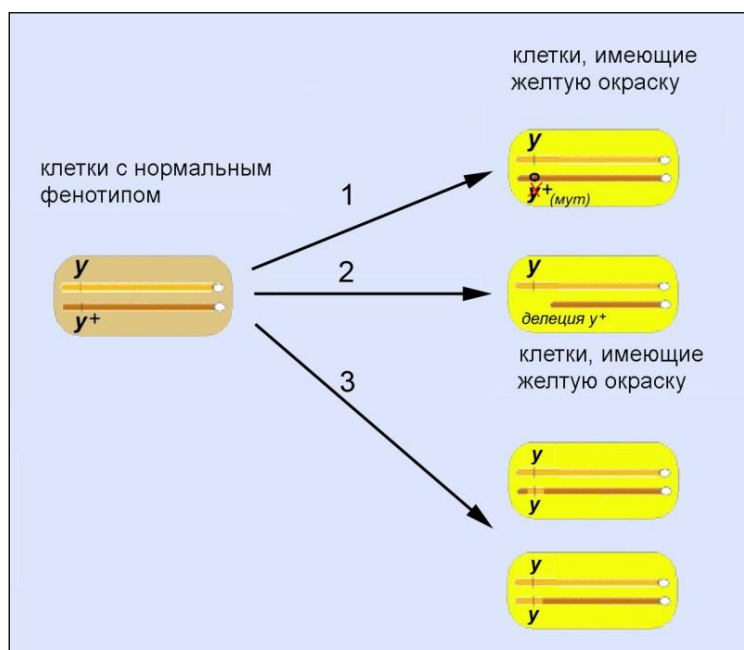


Рисунок 58 - Причины появления соматического мозаичного клона. 1 – точечный мутагенез с потерей функции *y* экспрессируемого белка; 2 – делеция нормального аллеля (на хромосомном или геномном уровне); 3 – соматическая рекомбинация с образованием клона, гомозиготного по рецессивному аллелю

Позднее было создано много различных вариантов данного теста (Таблица 5), но широкую верификацию и применение получили лишь две его модификации: тест на гетерозиготах по маркеру окраски омматидий глаза *w/w+* и биотест на гетерозиготах *mwh +/+ flr* (крыловые маркеры, «wing spot test»).

Таблица 3 - Варианты тестов на соматические мутации и рекомбинации на *Drosophila* и их принципы

Генетический маркер, хромосома	Локализация маркера	Показатель эффекта	Авторы метода тестирования химических канцерогенов
yellow (<i>y</i>), singed (<i>sn</i>)	X X	Появление извитых щетинок(<i>sn</i>) и желтых пятен, макро- и микрохет (<i>y</i>)	[182]
multiple wing hair (<i>mwh</i>) flair (<i>flr</i>)	III III	Появление участков крыла с нарушенной морфологией (<i>mwh</i> и/или <i>flr</i>)	[183]

white (w), white ⁺ (w ⁺)	X X	Появление белых омматидий глаза (w)	
warts ^{P2} warts ^{P6} warts ^{X1} (wts)	III	Появление опухолей.	[184]

Наиболее поздней модификацией этого метода тестирования является тест на бластомогенную активность с использованием гетерозигот *wts/+*. Сидоровым Р.А. и соавт. впервые была создана тест-система для скрининга химических канцерогенов на дрозофиле, в которой показателем их эффекта является образование опухолей [184]. В основу данного метода была положена способность образования соматических клонов у гетерозигот по мутантному гену-супрессору опухолевого роста *warts* (*wts*) в ответ на действие химических канцерогенов (Рисунок 59).

Потеря функциональной активности *wts* дикого типа в гетерозиготах *wts/+* приводит к переходу мутантного гена в гомозиготное состояние, что способствует образованию опухолей. Фенотип бородавкообразных имагинальных разрастаний *wts* характеризуется грубой решётчатой поверхностью кутикулы, в отличие от гладкой кутикулы дикого типа.

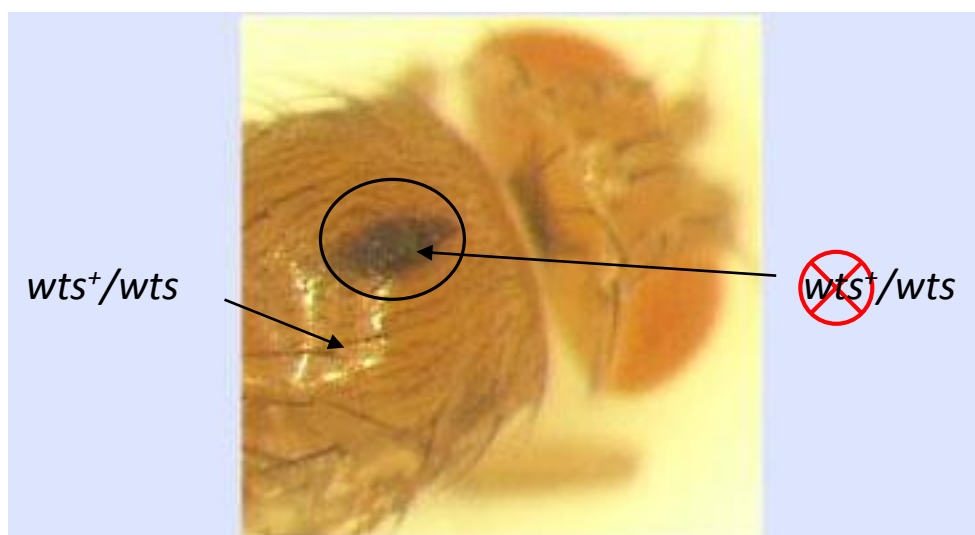


Рисунок 59 - Соматический клон у гетерозиготы по мутантному гену-супрессору опухолевого роста *warts* (*wts*)

Ген *wts* дрозофилы имеет близкие гомологи у разных видов, включая млекопитающих и человека, также являющихся супрессорами опухолевого

роста[185], а мутации в гене *LATS1* человека ассоциированы с саркомой мягких тканей [186, 187], а также, предположительно, с опухолями молочной железы и яичников [188, 189]. У дрозофилы *wts* необходим для контроля пролиферации клеток и нормального морфогенеза. Продукт гена *wts* относится к семейству серин-треониновых киназ LATS и является ключевым белком сигнального пути Hippo [190, 191]. Этот путь активации пролиферации и апоптоза высококонсервативен, и каждый из его белков имеет гомологи у млекопитающих (Рисунок 60).

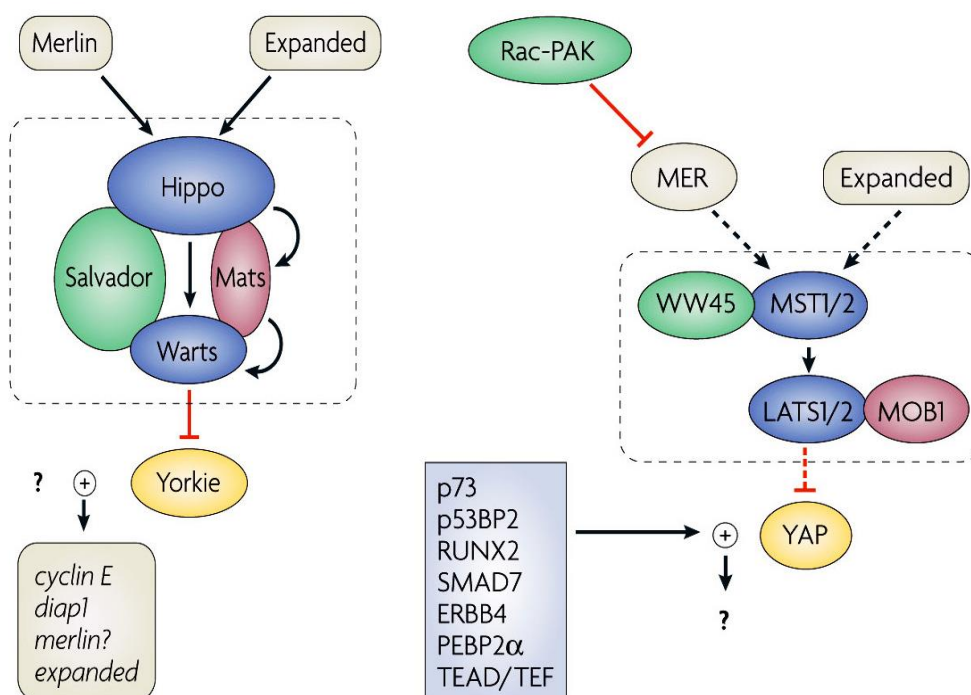


Рисунок 60 - Hippo-сигнальный путь у дрозофилы (слева) и его аналог у млекопитающих (справа) [190]

Мутация в гене *wts* *D.melanogaster* приводит к гипертрофии апикальной части эпителиальных клеток имагинальных дисков и их избыточной пролиферации [192], что при развитии особи в имаго проявляется в наличии митотических клонов, напоминающих по виду бородавки (отсюда и название). Гомозиготная по мутантному гену *wts* особь доживает, как правило, до поздних личиночных стадий, но, вследствие сильного разрастания имагинальных дисков и больших нарушений в дифференцировке тканей, погибает. В связи с этим, линию мух, несущих этот ген, культивируют в виде гетерозигот по III хромосоме. При этом используются различные балансерные конструкции (балансирующая хромосома имеет

многочисленные инвертированные повторы, что при рекомбинации приводит к образованию хромосом с двумя центромерами или ее отсутствию, препятствуя дальнейшему делению клетки), которые, с одной стороны, препятствуют потере мутантного аллеля, а с другой стороны, позволяют особям проходить полный жизненный цикл.

Учет хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих

Целью данного метода является выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической активности ксенобиотиков в клетках костного мозга млекопитающих.

При проведении тестирования мыши получают малые дозы препарата в течение 5 суток (для лекарственных средств доза составляет одну терапевтическую единицу), либо большую дозу соединения (10 терапевтических единиц) за 24 часа до выделения костного мозга. После фиксации клеток костного мозга проводят их окраску. Для анализа отбирают метафазные пластинки с хорошим разбросом хромосом, без продольных наложений и модульным числом 40. При метафазном анализе клеток костного мозга учитываются одиночные и парные делеции, хроматидные и хромосомные обмены и другие структурные нарушения хромосом (Рисунок 61).

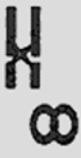
	Нормальные хромосомы	Аберрации хромосомного типа				Аберрации хроматидного типа	
Внутрихромосомные		Парный фрагмент	Ацентрические кольца	Центрическое кольцо	Инверсия	Фрагмент (делеция)	Варианты изоделеций
							
Межхромосомные		Симметричный обмен		Асимметричный обмен (дицентрик)		Симметричный обмен	Асимметричный обмен
							

Рисунок 61 - Типы хромосомных и хроматидных аберраций [193]

4.2. Собственные результаты

Поскольку ранее нами было показано, что некоторые из исследуемых узкобороздочных лигандов обладают способностью ингибировать топоизомеразу I, что может являться причиной накопления одноцепочечных разрывов, данная серия экспериментов посвящена изучению потенциальной канцерогенной опасности УБЛ.

4.2.1. 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) [180] (Таблица 6 и таблицы A1-A6 Приложения А). В качестве положительных контролей были использованы вещества, индуцирующие мутации у соответствующих штаммов-тестеров при наличии или в отсутствие активации

смесью S9. Для вариантов тестирования без активирующей смеси был использован N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин (НМНГ) и 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-дизапирен (ДДТДП) [179, 194]. При использовании активирующей фракции S9, её активность контролировали по эффекту бенз(а)пирена (БП) и 2-аминофлуорена (2-АФ).

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 отсутствии активирующей микросомальной смеси S9.

Таблица 4 - Результаты тестирования мутагенного эффекта УБЛ на индикаторных штаммах TA98 и TA100. Цветами обозначена мутагенная активность препарата в данном опыте: зеленый – отсутствие мутагенной активности, красный – её наличие, НД-исследование не проводилось (ДДТДП - 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-дизапирен, 2-АФ - 2-аминофлуорен, БП-бенз(а)пирен, НМНГ - N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидин)

Соединение	Доза, моль/чашку	Штамм <i>Salmonella Typhimurium</i>							
		TA98				TA100			
		S9-		S9+		S9-		S9+	
		1	2	1	2	1	2	1	2
Контроль									
ДДТДП	0,067			НД	НД	НД	НД	НД	НД
2-АФ	0,11	НД	НД			НД	НД		
БП	0,04	НД	НД	НД	НД	НД	НД		
МННГ	0,068	НД	НД	НД	НД			НД	НД
Хехст33342	5×10^{-6}								
	50×10^{-6}								
Хехст33258	5×10^{-6}								
	50×10^{-6}								
DAPI	5×10^{-6}								
	10^{-5}								
	5×10^{-5}								
	10^{-4}								

Диминазен	5×10^{-6}								
	10^{-5}								
	5×10^{-5}								
	10^{-4}								
Пентамидин	5×10^{-6}								
	10^{-5}								
	5×10^{-5}								
	10^{-4}								
Кураксин CBL0137	10^{-7}								
	10^{-6}								
	10^{-5}								

4.2.2. Отсутствие генотоксических свойств узкобороздочных лигандов в тесте на хромосомные aberrации

Далее мы провели 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. В качестве положительного контроля использовались химиотерапевтические препараты Циклофосфамид и Доксорубицин, для которых была продемонстрирована способность индуцировать хромосомные aberrации в костном мозге мышей ранее (Таблица 5).

Таблица 5 - Влияние УБЛ на частоту хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей (* - количество aberrантных метафазных пластин статистически значимо больше контрольного значения при использовании критерия χ^2 Пирсона ($p < 0,01$))

Препараты	Просмотрено метафаз всего	Из них aberrантных	% aberrантных метафаз	χ^2
Контроль	500	12	2,4%	-
Циклофосфамид	500	64	12,8%*	36,6
Доксорубицин	500	145	29%*	131
Пентамидин	500	10	2%	-
Нейтропсин	500	18	3,6%	0,8
Диминазин	500	14	2,8%	0,3

Продолжение таблицы 5

Хехст42	500	20	4%	1,5
DAPI	500	21	4,2%	2

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.

4.2.3. 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. Результаты тестирования представлены на Рисунке 62 и в Таблице Б1 Приложения Б.

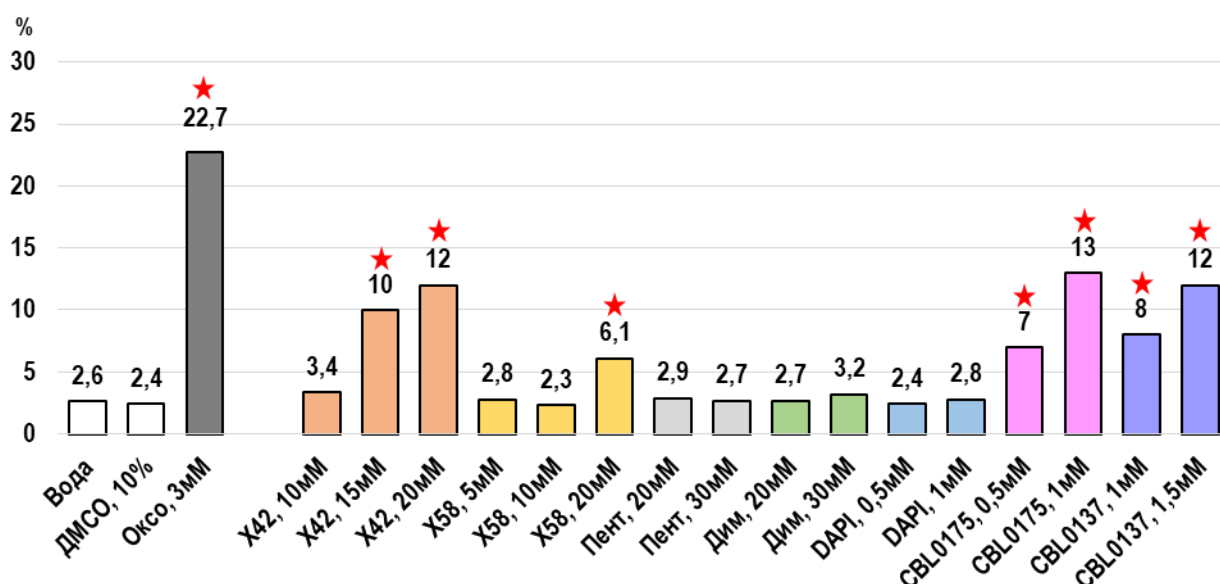


Рисунок 62 - Частота появления опухолевых клонов при индуцированном узкобороздочными лигандами у гетерозигот по гену-супрессору *wt5* (Оксо – оксоплатин, X42–Хехст33342, X58–Хехст33258, Пент–Пентамидин, Дим–Диминазен, ★-частота образования опухолей значимо выше частоты появления клонов у контрольной группы при использовании критерия Фишера, $p < 0,01$)

Частота спонтанного мозаицизма в контрольной группе составила: для воды – 2,4%, для 10% ДМСО – 2,6%. Частота появления опухолевых клонов у гетерозигот по *wt5^{P4}* при индукции раствором оксоплатина (3мМ) 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 бóльших 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.

Исследование связывания флуоресцирующих узкобороздочных лигандов с ДНК политенных хромосом *in vivo* показало, что протестированные соединения при кормлении ими личинок по-разному окрашивают ДНК клеток слюнных желез, что, по всей видимости, связано с различной проницаемостью мембраны для

каждого из соединений (Рисунок 63). Бóльшая проницаемость была зарегистрирована для хехст33342; меньшая интенсивность окраски ДНК была показана для хехст33358, что коррелирует с полученными данными в тесте SMART.

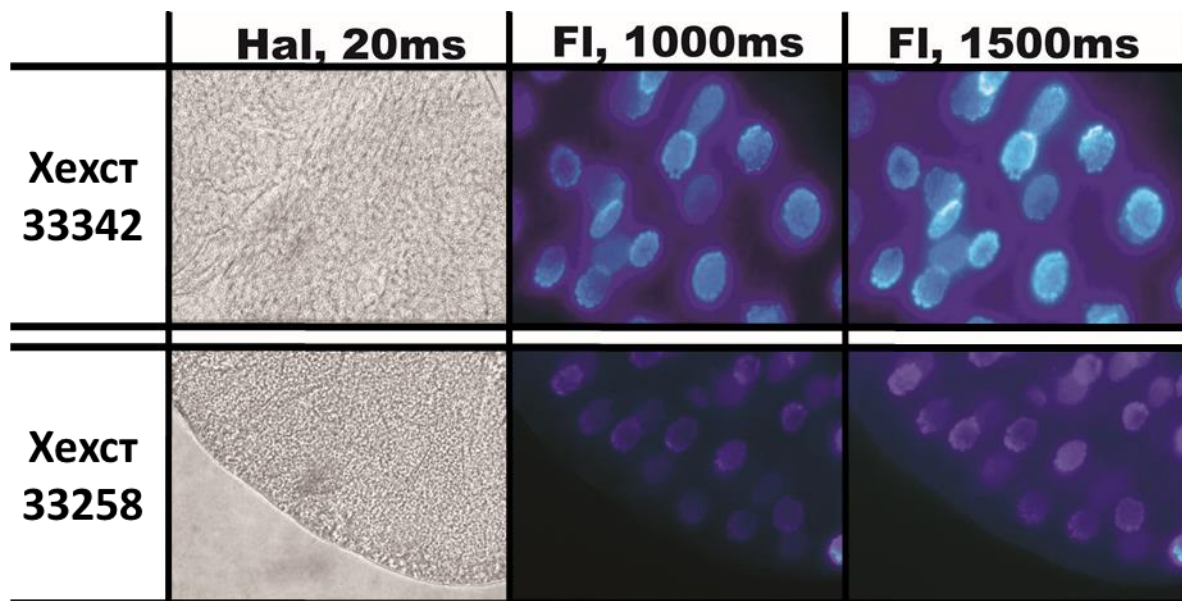


Рисунок 63 - Свечение ядер клеток слюнных желез личинок дрозофилы при кормлении УБЛ хехст33342, хехст33258

Таким образом, мы продемонстрировали, что при отсутствии активности в тесте Эймса и в тесте по индукции хромосомных aberrаций некоторые УБЛ увеличивают частоту появления опухолевых клонов в тесте на соматические мутации и рекомбинации на дрозофиле. Из этого следует, что, по всей видимости, бластомогенный эффект этих агентов реализуется за счет их рекомбиногенной активности.

4.2.4. Влияние узкобороздочных лигандов на запуск гомологичной рекомбинации

Для проверки гипотезы о рекомбиногенной активности УБЛ было использовано два подхода: (1) использование генетических конструктов, препятствующих рекомбинации, и (2) инактивация ключевой для рекомбинации хеликазы.

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).

Идея эксперимента заключается в том, что при блокировании соматической рекомбинации появление опухолей будет ассоциировано исключительно с инактивацией нормального аллеля в результате прямого мутагенеза, тогда как в стандартном тесте SMART на гетерозиготах *wts/+* появление опухолей может быть вызвано как мутагенезом, так и соматической рекомбинацией.

Было продемонстрировано, что использование балансерной хромосомы подавляет бластомогенную активность *hex33342*. Количество опухолей при обработке этим агентов оставалось на уровне контроля, в то же время при индукции опухолей оксоплатином, их количество возрастало (Рисунок 64, Таблица Б2 Приложения Б). Эти результаты демонстрируют, что причиной увеличения частоты появления опухолевых клонов при действии УБЛ является индукция соматической рекомбинации.

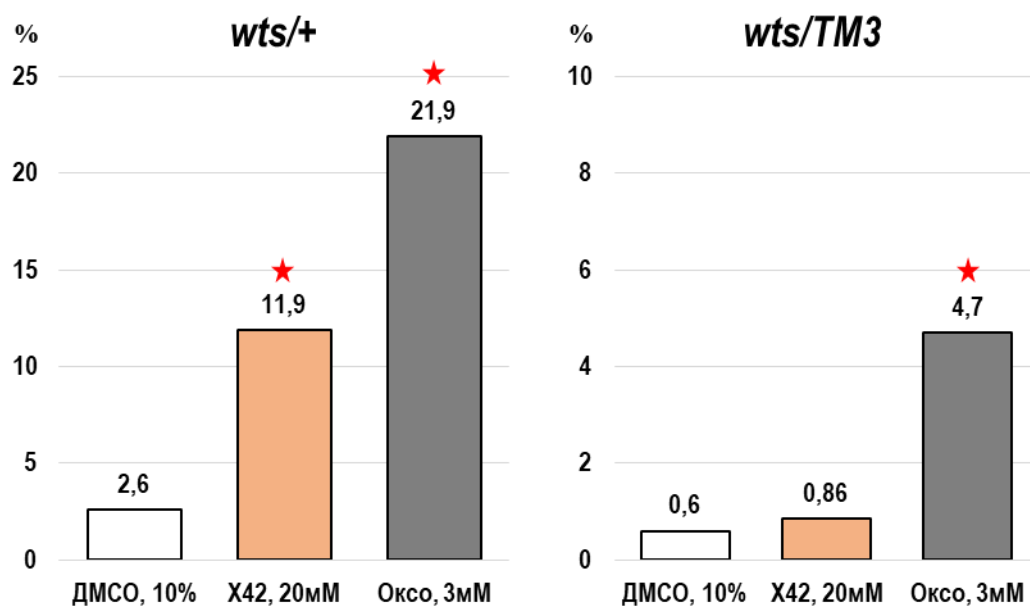


Рисунок 64 - Частота появления опухолевых клонов у гетерозигот *wts/+* и *wts/TM3*. (Оксо – оксоплатин, X42–Хехст33342, ★-частота образования опухолей значимо выше частоты появления клонов у контрольной группы при использовании критерия Фишера, $p < 0,01$)

Для изучения бластомогенной активности хехст33342 при инактивации одного из основных белков, участвующих в соматической рекомбинации и репарации, использовали особей *Drosophila* с доминантной мутацией гена (*Mus309*) хеликазы BLM.

У эукариот во время репликации функцию разделения комплементарных нитей ДНК выполняют хеликазы. Хеликазы RecQ играют роль в поддержании стабильности генома. У человека инактивация хеликаз данного семейства ассоциирована с онкологическими заболеваниями: RecQ4 (синдром Ротмунда–Томсона), WRN (синдром Вернера), BLM (синдром Блума).

Установлено, что одним из ключевых белков репарации повреждений при воздействии УБЛ является RecQ-хеликаза dmBLM, которая в комплексе с другими ферментами реализует перемещение нитей, раскручивание дуплекса и репарацию двунитевых разрывов.

Мы продемонстрировали, что наличие мутации по гену *Mus309* 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 65, Таблица Б3 Приложения Б).

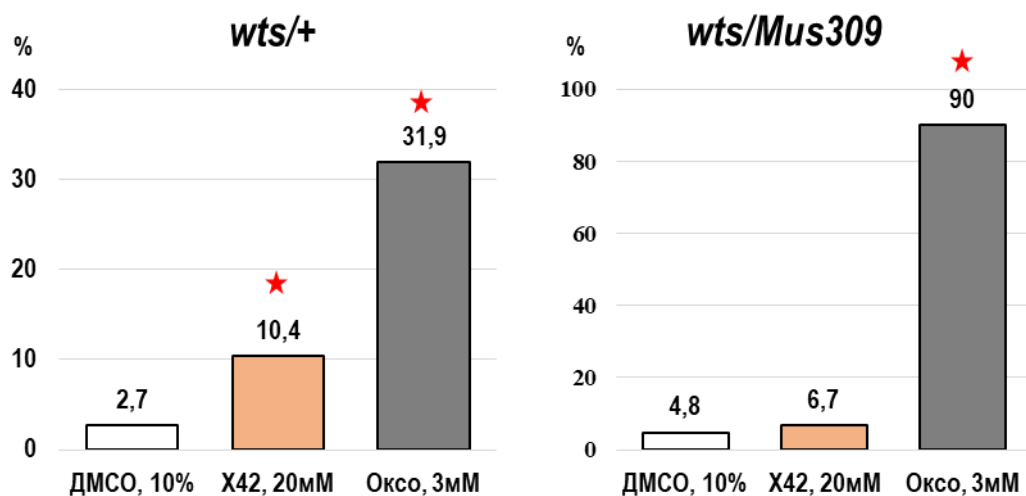


Рисунок 65 - Влияние мутации в гене RecQ-хеликазы dmBLM (*mus309*) на частоту образования опухолей при индукции Оксоплатином и Хехст33342 и без неё (Оксо – оксоплатин, Х42–Хехст33342, ★-частота образования опухолей значительно выше частоты появления клонов у контрольной группы при использовании критерия Фишера, $p < 0,01$)

Полученные результаты подтверждают наше предположение о рекомбиногенном механизме бластомогенной активности хехст33342.

4.3. Обсуждение

Механизм действия ряда УБЛ характеризуется тем, что эти соединения, не обладая мутагенной активностью в тестах *in vitro* [195], способны увеличивать частоту гомологичной рекомбинации. Это обуславливается их способностью ингибировать активность топоизомеразы I, что впоследствии ведет к появлению одноцепочечных разрывов в ДНК, репарация которых основана на соматической рекомбинации. Опосредованный генотоксический эффект такого типа был продемонстрирован ранее в тесте на рекомбинацию и соматический мутагенез для камптотецина и элептицина [196].

Наши эксперименты выявили такие же свойства у хехст33258, хехст33342, CBL0175 и CBL0137[197]. Установлено, что эти узкобороздочные лиганды способствуют увеличению частоту образования бластомогенных клонов у

дрозофил *wts/+*. При этом немаловажно, что токсический эффект УБЛ при максимальной из использованных концентраций был невелик [198].

Ранее бластомогенный эффект этих агентов не исследовался. Прежде всего это обуславливается отсутствием активности этих агентов в тестах, основанных на индукции реверсных мутаций у бактерий.

В литературе есть упоминание о слабом мутагенном эффекте хехст33258 в тесте на *S.typhimutium* штамма TA102. Высокая чувствительность штамма TA102 к мутагенному действию ксенобиотиков объясняется многокопийностью плазмиды. Реверсная мутация, которую несет геном этих бактерий, представляет собой транзицию $T \rightarrow C$. Это означает, что обратная мутация должна происходить в паре AT, а не CG-, что характерно для других штаммов [199]. Как известно, хехсты имеют сродство именно к AT-богатым сайтам ДНК [200]. Вероятно, эти факты объясняют превышение мутагенной активности над пороговым (в 1,6 раза) при действии хехст33258 [201].

В эукариотической системе также было показано отсутствие мутагенной активности (HPRT-тест на фибробластах линии V79 [202]). Однако на фибробластах мыши LM была продемонстрирована способность данных УБЛ нарушать конденсацию хромосом, что влекло за собой развитие анеуплоидию и полиплоидию [203, 204].

В тесте Эймса на штаммах TA98 и TA100 мы продемонстрировали, что ни одно из соединений не вызывало мутаций как в присутствии, так и в отсутствии активирующей смеси S9, что согласуется с данными литературы [201, 202].

Мы предположили, что в основе бластомогенной активности УБЛ лежит их способность индуцировать преимущественно соматическую рекомбинацию. Эта гипотеза нашла подтверждение при анализе данных экспериментов с использованием генетических конструкторов, которые препятствуют рекомбинации, а также инактивации хеликазы BLM. Эти данные согласуются с результатами исследований, направленных на тестирование прочих ингибиторов топоизомеразы I в тестах на дрозофиле. В этих опытах была продемонстрирована превалирующая роль рекомбинации при образовании соматических мозаичных клонов [196]. Также

было показано, что SMAR-тест на особях *wts/+* позволяет выявлять мутагенные, бластомогенные и рекомбиногенные свойства соединений, которые обладают опосредованным генотоксическим эффектом, то есть индуцируют повреждения ДНК при нарушении работы ферментов ее метаболизма.

Среди различных механизмов, обеспечивающих стабильности генома, особое место занимает соматическая гомологичная рекомбинация. Её биологическая роль заключается в репарации поврежденного локуса хромосомной ДНК за счет взаимодействия с интактным локусом, который расположен на гомологичной хромосоме. При гетерозиготности аллелей по этому локусу и участии несестринских хроматид происходит частичная потеря генетической информации и переход аллелей в гомозиготное состояние. Если в клетке один из аллелей гена-супрессора опухолевого роста нормален, а другой - мутантен, то в результате соматической рекомбинации мутантный ген может перейти в гомозиготное состояние. У пациентов с наследственным синдромом Ли-Фраумени или ретинобластомой этот механизм является ключевым при трансформации клеток и образовании опухолей. С использованием модельных систем и методов генетического анализа опухолей было продемонстрировано, что соматическая рекомбинация, которая приводит к потере гетерозиготности, происходит с более высокой частотой по сравнению с воссоединением негомологичных концов или мутагенезом (Таблица 6).

Таблица 6 - Роль различных перестроек ДНК в возникновении клона клеток с проявляющимся рецессивным аллелем у млекопитающих (ВНГК- воссоединение негомологичных концов, ТК -тимидин-киназа)

Пациенты/модель	ГЕН	ВНГК* и точечные мутации Гетерозиготные и гомозиготные клоны	Гомологичная рекомбинация Гомозиготные клоны
С ретинобластомой	Rb1	25 – 34%	56 - 75%
С синдромом Ли-Фраумени	TP53	-	44 – 56%
Мыши (гетерозиготные)	Trp53+/-	-	50 – 93% (зависит от линии)

ТК-6 (клеточная линия, лимфоциты мыши)	спонтанные перестройки тимидин-киназы (ТК)	30%	70%
	индуцированные перестройки ТК	14%	86%
WTK-1 (клеточная линия, p53-/-)	спонтанные перестройки ТК	5%	95%
	индуцированные перестройки ТК	0%	100%

Потеря гетерозиготности в результате соматической рекомбинации приводит к манифестации накопленных в течение всей жизни рецессивных мутаций, что объясняет существенное повышение частоты онкологических заболеваний у пожилых людей. Таким образом, соматическая рекомбинация играет важную роль в многостадийном процессе канцерогенеза.

При анализе эффектов канцерогенов в SMART на дрозофиле, сравнение частот соматического мозаицизма у самок гетерозиготных по гену y^+/y , который является маркерным геном половой X-хромосомы, и самцов-гемизигот y^+/Y , позволяет не только выявить мутагенный эффект канцерогенов, но и оценить вклад в индукцию соматического мозаицизма генетических повреждений разного типа. Так, у самцов, имеющих лишь одну X-хромосому, рекомбинация невозможна, и соответственно, образование мозаичных клонов является суммарным результатом точечного мутагенеза и генных/хромосомных делеций. У самок еще одной причиной возникновения клонов может быть потеря гетерозиготности при соматической рекомбинации. Как было показано, вклад рекомбинационной репарации в частоту мозаичных клонов, как спонтанных, так и индуцированных целым рядом химических канцерогенов, превышает суммарный вклад генных и хромосомных делеций и точечного мутагенеза (Рисунок 66).

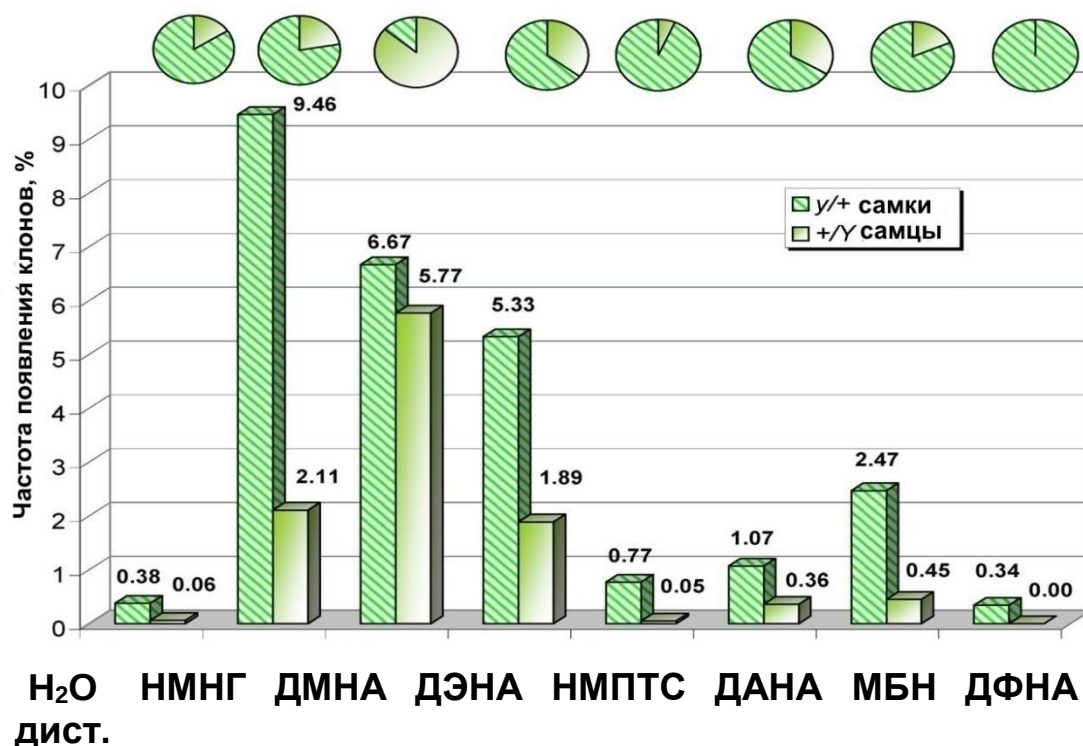


Рисунок 66 - Соотношение мутаций и рекомбинаций у *D.melanogaster* у гетерозиготных или гемизиготных по y+ (НМНГ-N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин; ДМНА-N-нитрозо-N,N-диметиламин; ДЭНА-N-нитрозо-N,N-диэтиламин; НМПТС-N-нитрозо-N-метил-N-п-толуолсульфамид; ДАНА-N-нитрозо-N,N-диаллиламин; МБН-N-метил-N-бензил-нитрозамин; ДФНА-N-нитрозо-N,N-дифениламин)

Когда были собраны первые данные об эффектах канцерогенов млекопитающих в SMAR-тесте на дрозофиле, считалось, что у млекопитающих процесс рекомбинационной репарации происходит исключительно путем взаимодействия сестринских хроматид и, соответственно, данные о потере гетерозиготности в результате соматической рекомбинации не экстраполировали на млекопитающих. Однако в последнее десятилетие данные о роли соматической рекомбинации у млекопитающих свидетельствуют о большей адекватности тестирования мутагенной активности химических соединений на дрозофиле, чем считалось ранее. Учитывая, что наиболее широко используемые тесты на мутагенность (бактериальный тест Эймса и HPRT-тест на фибробластах китайского хомячка V-79) основаны на определении частоты реверсной мутации, и, соответственно, выявляют лишь события точечного мутагенеза, развитие и

усовершенствование тестов на рекомбиногенную активность и их внедрение в повседневный скрининг ксенобиотиков имеет большой практический смысл.

ГЛАВА 5. АНТИКАНЦЕРОГЕННЫЕ СВОЙСТВА КУРАКСИНА CBL0137

5.1. Обзор литературы

Продemonстрированный в предыдущих главах широкий спектр воздействия малых негенотоксических молекул на эпигенетические процессы дает основание использовать их не только для подавления опухолевого роста, но и для профилактики химического канцерогенеза, с которым по данным Всемирной организации здравоохранения связано возникновение более чем 80% онкологических заболеваний.

Злокачественная трансформация, вызываемая канцерогенными соединениями, является многостадийным процессом, включающим в себя ряд тесно связанных генетических и эпигенетических изменений, которые в зависимости от типа канцерогена, могут быть первичными или вторичными. Хорошо известно, что предотвратить этот процесс на стадии предрака значительно легче, чем излечить развившуюся опухоль. Учитывая способность малых молекул типа УБЛ действовать одновременно на несколько цепей сигнальных молекул, наиболее важных для патологической пролиферации, нам представилось необходимым изучить возможность их использования для данной цели. В случае успеха этот путь может стать новым направлением в профилактике химического канцерогенеза.

Для изучения этой возможности был исследован один из наиболее перспективных классов биологически активных малых молекул, которыми являются кураксины. Как было показано выше, эти соединения нарушают нормальную упаковку ДНК в ядрах и связанную с ней работу ряда белковых каскадов, связанных, как ранее было показано, с активацией p53-зависимого апоптоза и ингибированием NF- κ B-зависимого сигнального пути. При изучении этих препаратов основной акцент делался на их противоопухолевую активность и в меньшей степени на профилактическую. Нами был предпринят комплекс исследований по обоим направлениям. Вместе с изучением цитотоксичности в культуре опухолевых клеток мы исследовали возможность ингибирования

кураксином CBL0137 канцерогенеза, вызываемого в толстом кишечнике химическим канцерогеном с акцентом на изучение действия кураксина на сигнальный путь WNT/ β -катенин, играющий важную роль в основных процессах клеточного гомеостаза - пролиферации, дифференцировке, апоптозе и ряде других.

Рак толстой кишки (РТК) является одним из наиболее распространенных типов злокачественных новообразований и находится на третьем месте по частоте выявления в мире. Ежегодно диагностируется около 1,2 миллионов случаев РТК, а 600 тысяч человек погибает от этого заболевания. По расчётам, к 2030 году эти показатели должны увеличиться на 60% [205]. На возникновение РТК влияют сразу несколько факторов – генетические, эпигенетические, факторы образа жизни и окружающей среды. Одна треть пациентов с РТК имеют семейную историю этого заболевания. Приблизительно, от 5% до 10% всех наследственных РТК возникают у пациентов с генетическими синдромами, вызванными патогенными мутациями [206]. Среди этих синдромов - семейный аденоматозный полипоз (мутации в гене APC), наследственный неполипозный колоректальный рак (мутации в генах репарации MMR). Механизмы, лежащие в основе развития спорадического РТК, включают в себя мутации в специфических онкогенах (например, APC, KRAS) и генах супрессоров опухолевого роста (например, P53), а также эпигенетические изменения [207]. Чаще всего РТК развивается на фоне хронических воспалительных процессов в кишечнике.

На настоящий момент существует ряд лекарственных средств, для которых была показана их антиканцерогенная активность относительно РТК, включая нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП), заместительную гормональную терапию у женщин в постменопаузе, статины, бисфосфонаты и ингибиторы ангиотензина [208]. Наиболее многообещающие данные об антиканцерогенной активности были получены на животных для НПВП (6). Эти эксперименты продемонстрировали, что введение противовоспалительных соединений животным, подвергшимся воздействию канцерогена, приводит к снижению как частоты появления опухолей, так и их множественности. Эпидемиологические исследования также показывают, что

противовоспалительные препараты оказывают антиканцерогенное действие относительно РТК [209]. Эти данные согласуются с хорошо установленной ролью воспалительных факторов в развитии этого вида рака [210]. Однако долгосрочное употребление разработанных к настоящему моменту НПВП ассоциировано со значительными побочными эффектами. Таким образом, хотя профилактика является многообещающим подходом к снижению заболеваемости РТК, очевидно, что необходимы новые безопасные и эффективные препараты.

Исследования последних лет, направленные на разработку антиканцерогенных препаратов относительно РТК, основывались на более глубоком понимании молекулярных событий канцерогенеза [211, 212]. Было показано, что аберрантная активация сигнального пути APC/WNT/ β -catenin (далее сигнальный путь WNT) играет главную роль как в генезе спорадических, так и наследственных РТК.

Канонический сигнальный путь WNT (сигнальный путь WNT/ β -катенин) контролирует множество клеточных процессов, включая дифференцировку, пролиферацию, миграцию, апоптоз и поддержание в клетках стволового фенотипа [213-215]. Центральной молекулой этого сигнального пути является эволюционно консервативный белок β –катенин (Рисунок 69)[216]. Семейство катенинов включает в себя три подсемейства: подсемейство p120 (p120; ARVCF; δ -катенин;), β -подсемейство (β -катенин и плакоглобин) и α -подсемейство (α -Е-катенин; α -N-катенин; α -Т-катенин)[217]. Ранее предполагалось, что β -катенин локализуется только у клеточной мембраны и вовлечен в процесс адгезии и формирования контактов с цитоскелетом. Однако в более поздних работах было показано, что данный белок также выступает в качестве мессенджера, передающего сигнал от гликопротеинов WNT [218]. WNT – семейство секретируемых липид-модифицированных гликопротеинов, участвующих в аутокринной и паракринной регуляции. У человека эта группа белков, которая кодируется 19 генами [219], можно разделить на следующие функциональные группы: а) β -катенин зависимые или канонические (Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt8), б) β -катенин независимые или неканонические (Wnt5a, Wnt7a), в) белки WNT, способные активировать как

канонический, так и неканонический сигнальные пути (Wnt11) [220]. Отсутствие лиганда WNT запускает процессы разрушения β -катенина [221]. При этом β -катенин связывается с белковым комплексом, компонентами которого являются APC (Adenomatous Polyposis Coli), GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β), CK1 (Casein kinase 1) и Axin. Эти белки фосфорилируют β -катенин по Ser45, Ser33, Ser37 и Ser41 [222]. Такие модификации распознаются E3-убиквитин лигазным комплексом TRCP-1, который убиквитинирует β -катенин по N-концу, что приводит к протеасомной деградации [223]. К такому же эффекту может приводить наличие секретируемых антагонистов WNT сигнала, к которым можно отнести белки семейства SFRP (Secreted Frizzled-Related Protein) и WIF-1 (Wnt-Inhibitory Factor-1), взаимодействующие непосредственно с WNT-лигандом, а также белки семейства DKK (Dickkopf), связывающие ко-рецепторы LRP5 и LRP6 [221].

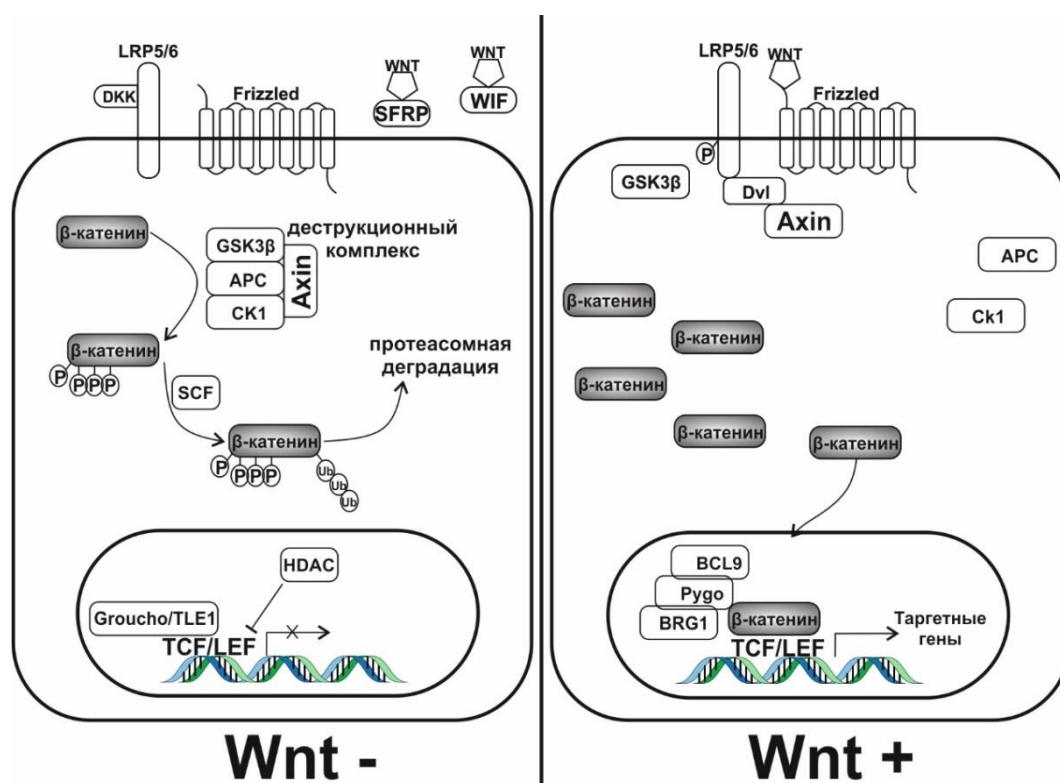


Рисунок 67 - Схема канонического сигнального пути WNT/β-катенин. Сигнальный каскад WNT в нормальной клетке в присутствии и отсутствии лиганда

В ответ на взаимодействие WNT-лиганда или его агонистов R-spondin и Norrin с рецептором Fz (Frizzled) и ко-рецепторами Lrp5/6 (Low-density lipoprotein

receptor-related protein) происходит активация белка Dvl (Dishevelled) и его связывание с белком разлагающего комплекса Axin [221]. Перечисленные выше события приводят к распаду β -катенин разрушающего комплекса, накоплению β -катенина в цитоплазме и его транслокации в ядро. В ядре β -катенин связывается с транскрипционными факторами TCF/Lef и запускает экспрессию таргетных генов [224]. К эффекторам сигнального пути WNT относят гены регуляторов пролиферации (*c-Myc* и *CCND1*), метаболизма (*PKC1* и *MCT*), клеточной миграции (*MMP7*, *CXCL12*, *CXCR4*), воспаления (*COX2*, *iNOS2*) и развития множественной лекарственной устойчивости (*ABCB1*) [225-229].

В последних работах создание препаратов для модулирования сигнального пути WNT в трансформированных клетках и доброкачественных опухолях отмечается как один из наиболее перспективных путей развития профилактики РТК [212]. Антиканцерогенная активность была описана для некоторых фитонутриентов (ресвератрол, генистеин и др.) [230, 231]. Показано, что эти молекулы обладают способностью взаимодействовать с ДНК нековалентно, ингибируют сигнальный путь WNT и проявляют антиканцерогенные свойства при химически индуцированном канцерогенезе у мышей [232, 233]. Настоящая глава посвящена исследованию антиканцерогенных свойств кураксина CBL0137 относительно рака толстой кишки.

Недавно было продемонстрировано, что кураксин CBL0137 вызывает активное связывание одной из субъединиц гистонового шаперона FACT с ДНК [68]. Это приводит к модулированию активности сигнальных путей и транскрипционных факторов, таких как P53, NF- κ B, MYC и HSF-1 [44, 46]. NF- κ B является одним из основных регуляторов экспрессии гена COX2 [234], белок которого вовлечен в активацию воспаления у млекопитающих. Активация COX2 приводит к повышению уровня метаболизма арахидоновой кислоты в биоактивные простагландины и тромбоксаны. В частности, повышается уровень PGE₂, который обладает провоспалительным, антиапоптотическим эффектами, а также способствует метастазированию и неоангиогенезу [235, 236]. Антиапоптотический механизм действия PGE₂ реализуется через подавление экспрессии *Bcl2* при

активации MAPK или PI3K [237, 238]. Мы показали, что кураксин CBL0137 вызывает значительное снижение транскрипции *COX2* после обработки линии клеток РТК НСТ116 [239]. Этот ингибирующий эффект CBL0137 на экспрессию *COX2* в клетках НСТ116 был еще более заметным, когда клетки предварительно обрабатывали $TNF\alpha$ (Рисунок 68).

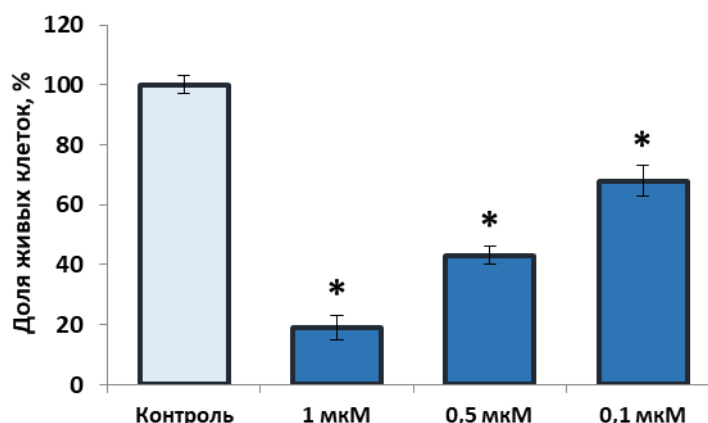


Рисунок 68 - Цитотоксическое действие кураксина CBL0137 на клетки линии НСТ116. Данные представлены как $M \pm m$, * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$

Кроме этого, нами было показано, что CBL0137 обладает значительным цитотоксическим эффектом в отношении клеток рака толстой кишки НСТ116 и оказывает противоопухолевое действие в отношении аллографтов аденокарциномы толстой кишки на мышах (см. Главу 6).

Как уже упоминалось, в основе патогенеза РТК лежат хроническое воспаление и нарушения сигнального пути WNT. Поскольку противовоспалительные свойства кураксина были показаны ранее, то перед проведением эксперимента на животных мы исследовали влияние CBL0137 на активность сигнального пути WNT.

5.2. Собственные результаты

5.2.1. Влияние кураксина CBL0137 на активность сигнального пути WNT

На первом этапе мы изучили цитотоксическую активность CBL0137 относительно клеток рака толстой кишки НСТ116, HT29, SW480, Caco2. Клетки

линии HCT116 содержат делецию в гене β -катенина (CTNNB1), другие клеточные линии дефектны по гену APC [240, 241]. Клетки инкубировали в культуральной среде с кураксином (0,075 мкМ-1,2 мкМ) в течение 72 часов. IC50 для клеток линий HT29, HCT116, SW480 и Caco2 составила 0,70 мкМ; 0,67 мкМ; 0,63 мкМ и 0,86 мкМ соответственно (Рисунок 69).

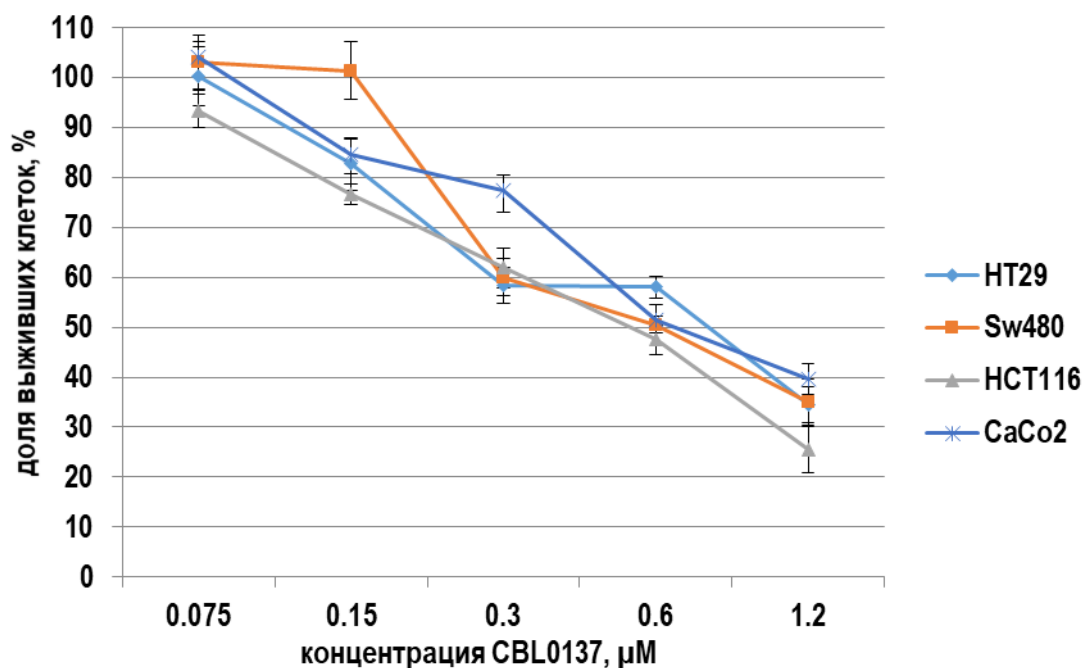


Рисунок 69 - Цитотоксическая активность CBL0137 относительно клеток рака толстой кишки. Данные представлены как $M \pm m$

Далее на клетках HCT116 мы изучили профиль экспрессии генов, ассоциированных с сигнальным путем WNT, в интактных клетках и клетках, которые инкубировались с кураксином (0, 5 мкМ) 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 70А, Таблица Г1 приложения Г).

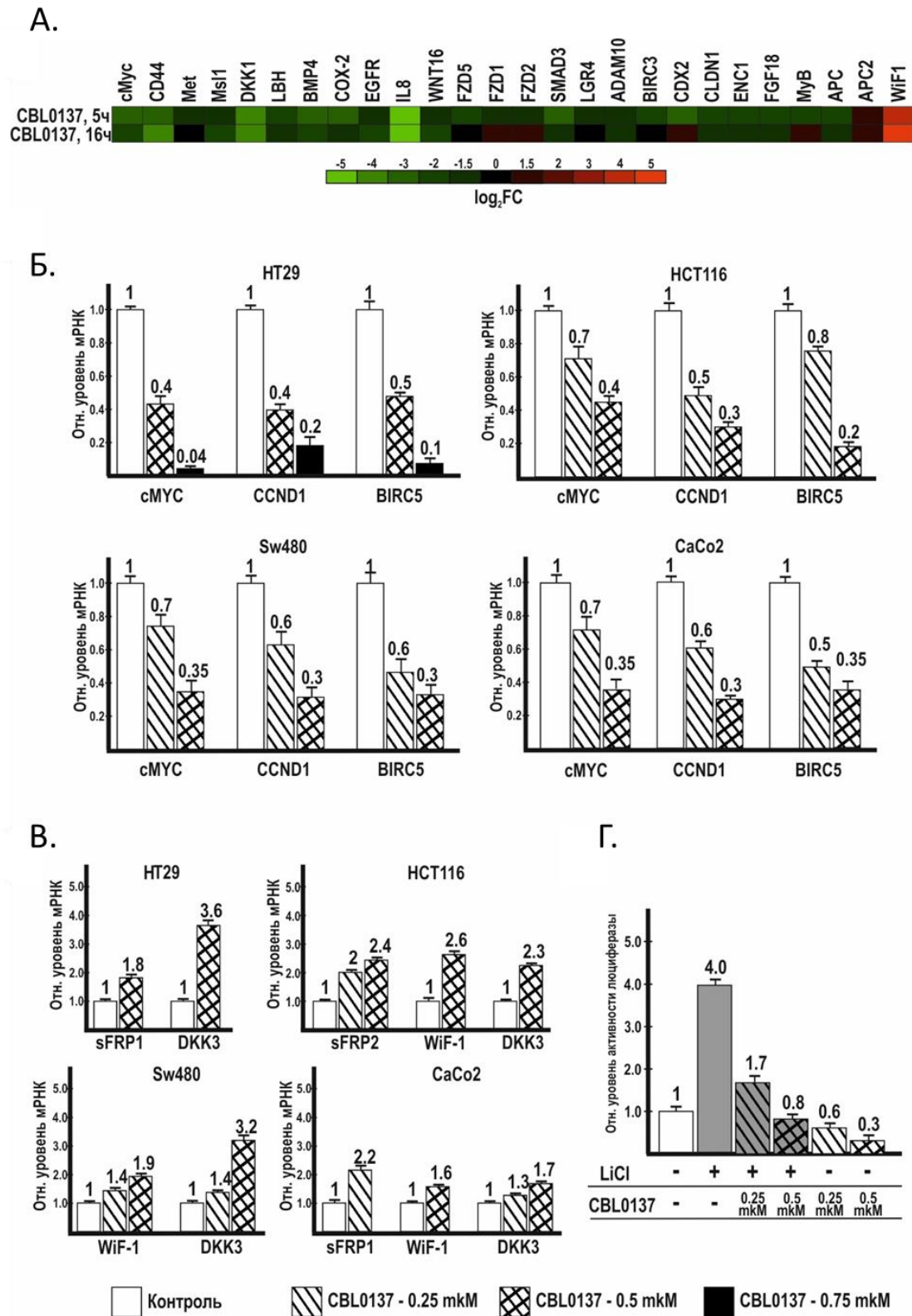


Рисунок 70 - Влияние кураксина CBL0137 на активность сигнального пути. А. Влияние кураксина CBL0137 (0, 5 мкМ, клетки HCT116, обработка в течение 5 и 16 часов); Б, В. Влияние кураксина на уровень экспрессии основных таргетных генов сигнального пути WNT на клеточных линиях HT29, HCT116, SW480, CaCo2 (0,25-0,75 мкМ, 24 часа); Г. Влияние кураксина на экспрессию гена люциферазы под контролем промотора, содержащего TCF/LEF-респонсивные последовательности.

Для подтверждения данных микроэрея, мы изучили влияние кураксина на уровень экспрессии основных таргетных генов сигнального пути WNT на клеточных линиях HT29, HCT116, SW480, Caco2. Клетки инкубировали в среде с различными концентрациями CBL0137 (0,25мкМ, 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 β -катенина: *Cyclin D1* (активация пролиферации), *CMYC* (активация пролиферации, ингибирование апоптоза) и *Survivin (Birc5)* (ингибирование апоптоза) (Рисунок 71Б). С другой стороны, для генов, которые являются негативными регуляторами этого сигнального пути, *DKK3*, *SFRP1* и *WIF-1*, было зарегистрировано увеличение экспрессии (Рисунок 70В).

Попадая в ядро β -катенин связывается с комплексом транскрипционных факторов TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor), которые участвуют в активации всех мишеней сигнального пути WNT. 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 70Г). При активации сигнального пути WNT с помощью LiCl (ингибитор GSK3 β) обработка клеток кураксином приводила к снижению сигнала в 5 раз.

Продемонстрировав то, что обработка клеточных линий рака толстой кишки приводит к ингибированию сигнального пути WNT за счет угнетения экспрессии таргетных генов β -катенина и увеличения экспрессии генов белков-антагонистов WNT, мы подтвердили нашу гипотезу о влиянии CBL0137 на WNT-сигналинг. Это послужило обоснованием целесообразности проведения эксперимента по исследованию антиканцерогенных свойств кураксина *in vivo* на модели ДМГ-индуцированного канцерогенеза.

5.2.2. Анतिकанцерогенная активность кураксина CBL0137 *in vivo*

Модель канцерогенеза при индукции опухолей диметилгидразином хорошо изучена и широко используется по сегодняшний день. Способность диметилгидразина (ДМГ) индуцировать опухоли толстого кишечника у мышей и крыс известна с 70-х годов. Были получены и подробно описаны новые модели опухолей, индуцированных ДМГ, у мышей: саркомы матки, кисты и гемангиоэндотелиомы яичников, ангиосаркомы почечной капсулы у самцов, аденомы почек у самцов, опухоли области заднего прохода (в т.ч. опухоли клиторальной и препуциальной желез). Актуальность использования данной модельной системы химически-индуцированных опухолей объясняется и тем, что 1,2-диметилгидразин (1,2-ДМГ) и его несимметричный аналог, 1,1-диметилгидразин (1,1-ДМГ), являются канцерогенами человека. Гидразин и его производные официально признаны в Российском законодательстве канцерогенами человека. 1,1-ДМГ широко используется в аэрокосмической промышленности как важный компонент ракетного топлива. В его производстве и использовании заняты тысячи человек, многие из которых относятся к группе повышенного канцерогенного риска, поскольку имеют признаки хронического отравления этим соединением.

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

В эксперименте были использованы самки и самцы мышей линии СВА, поскольку данная линия чувствительна к канцерогенному действию 1,2-ДМГ, причем, самки и самцы в различной степени. Кроме того, эти животные более резистентны к токсическому действию 1,2-ДМГ при его длительном введении. Мышей разделили на 8 групп: четыре группы мышей-самцов и четыре группы мышей-самок (40-45 животных на группу). В эксперименте использовались следующие схемы введения препаратов (Рисунок 71): (1) Мышам группы 1 (1,2-ДМГ+CBL0137) вводили 1,2-ДМГ внутривентрально один раз в неделю в дозе 8 мг / кг в течение 15 недель (самцы) или в течении 20 недель (самки), далее мыши этой

группы получали кураксин вместе с питьевой водой в дозе 20 мг/кг с 18 по 40 неделю (самцы) или с 23 по 40 неделю (самки); (2) Мыши группы 2 (1,2-ДМГ) получали только инъекции 1,2-ДМГ по схеме, описанной для группы 1; (3) Мыши 3-ей (CBL0137) группы получали только кураксин; (4) Группа 4 (Контроль) являлась отрицательным контролем. Животные этой группы подвергались таким же манипуляциям, что и мыши других групп, но не получали препаратов.

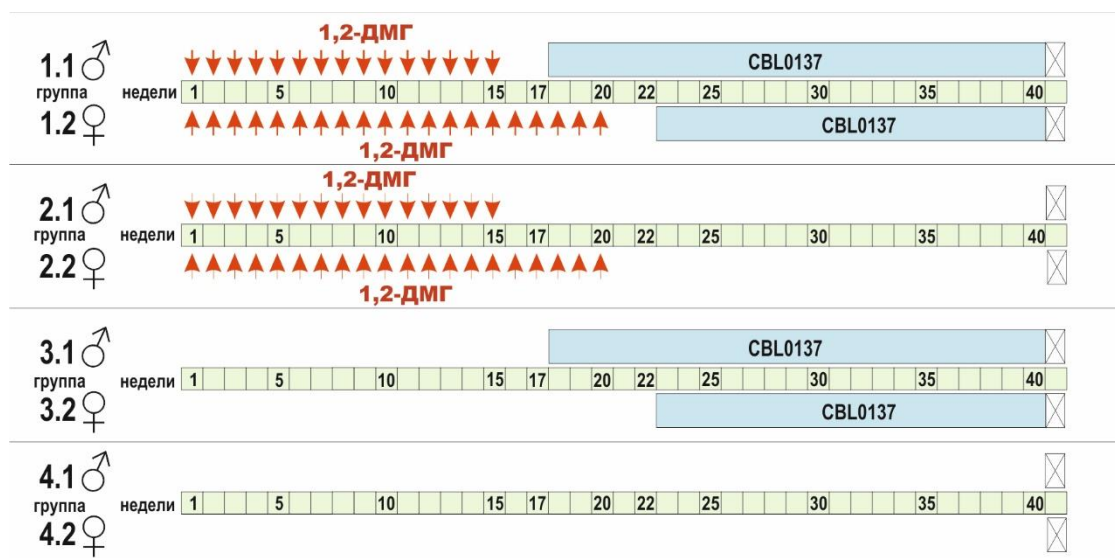


Рисунок 71 - Общая схема эксперимента

В ходе эксперимента общее состояние животных, оцениваемое по их двигательной активности и реакции на раздражители, было одинаковым для мышей всех четырех экспериментальных групп. Как и ожидалось, во время эксперимента во всех группах наблюдалось устойчивое увеличение средней массы тела животного. Однако в соответствии с ранее опубликованными результатами Turusov et al [242], группы животных, которым вводили 1,2-ДМГ набирали вес медленнее, чем животные остальных групп. CBL0137 (20 мг/ кг в питьевой воде) не влиял на увеличение массы тела ни у мышей, получавших 1,2-ДМГ, ни у животных, не получавших 1,2-ДМГ. 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 (Таблица 8). Таким образом, сам по себе CBL0137 не оказывал никакого влияния на массу тела животного.

Таблица 8 - Средняя масса тела животных в разных экспериментальных группах

Группа	Средняя масса тела в группе			
	самцы		самки	
	$M \pm m$	Уровень статистической значимости	$M \pm m$	Уровень статистической значимости
Контроль	$36,38 \pm 0,47$	$p=0,58$	$31,73 \pm 0,62$	$p=0,47$
СВЛ0137	$36,00 \pm 0,54$		$31,10 \pm 0,60$	
1,2-ДМГ	$30,87 \pm 0,49$	$p=0,11$	$27,04 \pm 0,58$	$p=0,58$
1,2-ДМГ+СВЛ0137	$29,64 \pm 0,58$		$26,50 \pm 0,82$	

По истечении 40 недель животных вскрывали и проводили макроскопическое обследование внутренних органов и их взвешивание, затем все ткани фиксировали для дальнейшего гистологического освидетельствования. Основным типом новообразований, вызываемых 1,2-ДМГ у мышей СВА, являются опухоли толстого кишечника. Так как, помимо опухолей кишечника, 1,2-ДМГ вызывает у мышей этой линии соединительнотканые и эпителиальные опухоли других локализаций, то другие органы также были собраны для гистологического.

Толстая кишка. Полученные гистологические срезы анализировали на наличие аденом и аденокарцином, регистрировали множественность опухолей, а также оценивали частоту появления фокусов с нарушенной секрецией муцина. В использованной модели железистые полипы представляют собой гиперплазию железистого эпителия толстой кишки, обладают экзофитным ростом, не прорастают базальную мембрану и не поражают мышечный слой. Аденокарцинома толстой кишки же характеризуется клеточной атипией и инвазивным ростом с прорастанием базальной мембраны и мышечного слоя. Фокусы с нарушенной секрецией муцина представляют собой участки кишки, состоящие из нескольких бокаловидных клеток, не продуцирующих муцин (mucin-depleted foci). Появлению таких фокусов предшествует стадия изменения кислотности муцина. Бокаловидные клетки нормальной слизистой толстой кишки продуцируют в основном сульфомуцины, а бокаловидные клетки, прилегающие к карциноме, но внешне не измененные – сиаломуцины. Было показано, что возникновение этих фокусов может быть связано как с нарушениями в сигнальном пути WNT и мутациями в гене β -катенина, так и с хроническим воспалением. В связи с этим,

фокусы бокаловидных клеток, не продуцирующих муцин, считают проявлением высокой степени дисплазии и относят к пренеопластическим изменениям. Характеристические микрофотографии гистологических срезов кишечника представлены на Рисунке 72.

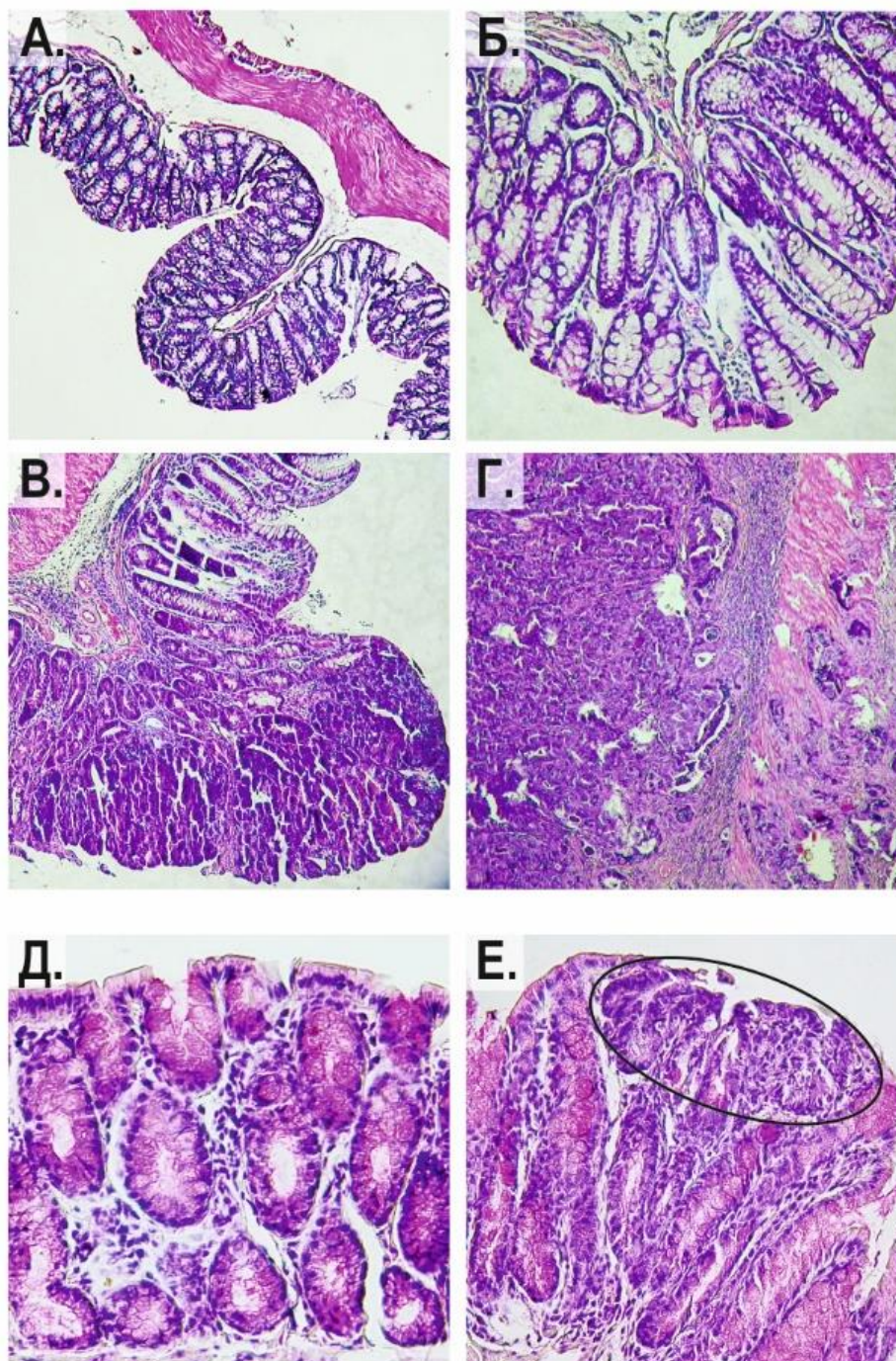


Рисунок 72 - Микрофотографии срезов кишечника. (А-Г) Окраска гематоксилин-эозином (А, Б) Нормальный эпителий кишечника (х40; х200) (В) Аденома (х200) (Г) Аденокарцинома (х200) (Д,Е) Окраска муцикармином. (Д) Нормальный муцин-продуцирующий эпителий (х400) (Е) Фокус с нарушением продукции муцина в аденоме (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 (Таблица Д1 приложения Д).

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 73). 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 73А). Тогда как среди 44 самцов, получавших 1,2-ДМГ и CBL0137, 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 CBL0137, 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+CBL0137 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 CBL0137 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+CBL0137 была статистически значимой ($p < 0,01$) как для самцов (54% и 23 % соответственно), так и для самок (64% и 25% соответственно) (Рисунок 73Б). Введение CBL0137 аналогичным образом изменило пропорции животных с аденокарциномами, но статистически значимая разница была зарегистрирована только между группами самцов. Примечательно, что у самцов при введении CBL0137 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+СВЛ0137).

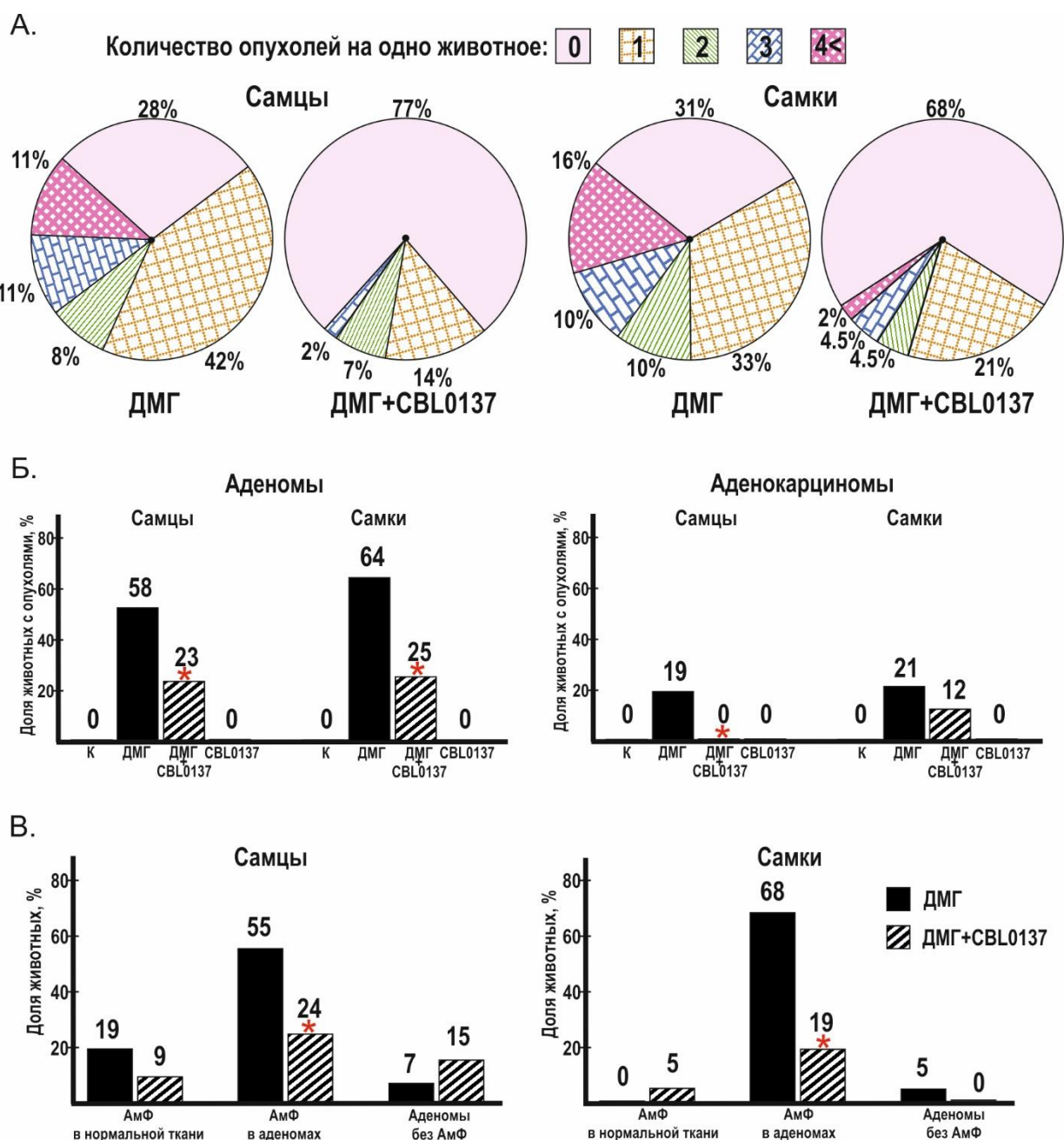


Рисунок 73 - Антиканцерогенная активность СВЛ0137 относительно РТК,

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 (χ^2 ; $p < 0,01$))

Как уже упоминалось, фокусы с нарушенной секрецией муцина являются пренеопластическими изменениями бокаловидных клеток [243]. Мы показали, что частота аденом с такими фокусами у мышей, получавших и CBL0137 и 1,2-ДМГ значительно снижена по сравнению с мышами группы ДМГ (24% против 55% у самцов и 19% против 68% у самок) (Рисунок 74С). Помимо этого, введение CBL0137 привело к снижению доли самцов с такими фокусами в нормальной ткани (9% - в группе 1,2-ДМГ+CBL0137 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+CBL0137, фокусы с нарушенной секрецией муцина были найдены у 1 животного, а в группе 1,2-ДМГ таких изменений найдено не было.

В ходе эксперимента также были получены данные по влиянию CBL0137 на частоту образования других опухолей (Рисунок 74).

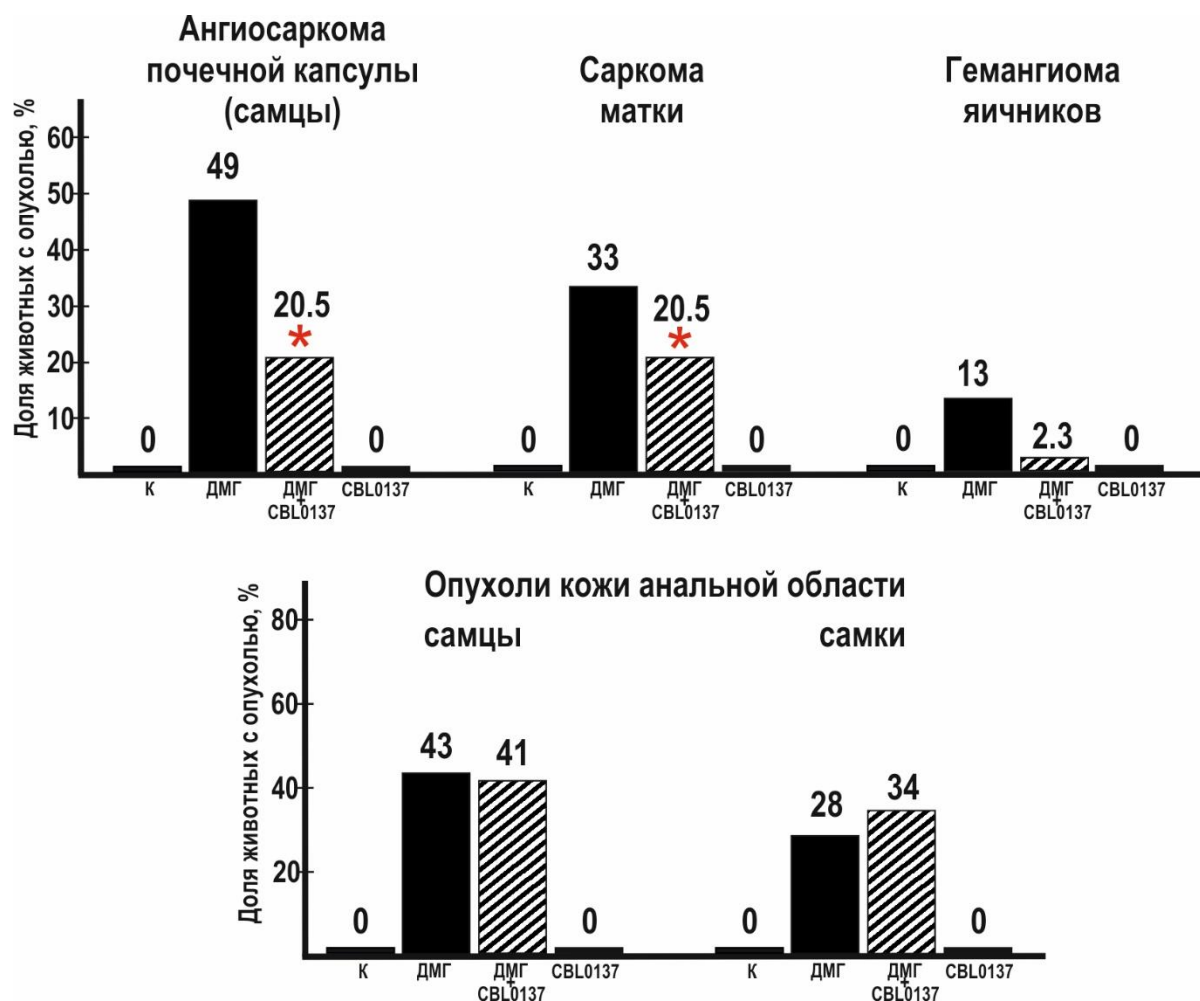


Рисунок 74 - Влияние CBL0137 на частоту опухолей при индукции канцерогенеза 1,2-ДМГ (ДМГ – 1,2-ДМГ; * - частота появления опухолей в данной группе статистически значимо отличается от частоты появления опухолей в группе 1,2-ДМГ (χ^2 ; $p < 0,05$))

Почки. У мышей, получавших 1,2-ДМГ и 1,2-ДМГ+CBL0137, как у самцов, так и у самок были обнаружены аденомы почек. У самцов были также обнаружены ангиосаркомы почечной капсулы.

По гистологической структуре аденомы почек подразделяются на цистаденомы, папиллярные цистаденомы, солидные аденомы. Митозы в этих опухолях крайне редки, клеточный атипизм выражен не резко, инвазивный рост в окружающую ткань отсутствует. У самцов, получавших только 1,2-ДМГ аденомы почек были выявлены в 100% случаев (у 37 из 37 животных), а в группе 1,2-ДМГ+CBL0137 – у 42 из 44 животных (95,45%). При микроскопическом исследовании у многих животных обнаруживалось по несколько аденом почек. Множественность

поражения аденомами почек в группе 1,2-ДМГ в 1,5 раза превышала таковую в группе 1,2-ДМГ+СВL0137 (3,84 и 2,55 соответственно). У самок в группе 1,2-ДМГ аденомы почек были найдены у 3 из 39 (7,69%), а в группе 1,2-ДМГ+СВL0137 – у 1 из 44 животных (2,27%). Эти различия статистически не значимы ($P>0,05$).

Гистологически на ранних стадиях развития ангиосаркомы почечной капсулы обнаруживались подкапсульные кровоизлияния с тромбозом сосудов и разрастанием капилляров в капсуле почки. Крупные опухоли представляли собой различные гистологические варианты ангиосарком. Метастазы не были обнаружены ни в одном случае. Ангиосаркомы почечной капсулы были найдены только у самцов: в группе 1,2-ДМГ - у 18 из 37 животных (48,7%), а в группе ДМГ+Кураксин – у 9 из 44 (20,5%). Эти различия были статистически значимы ($P<0,01$).

Кожа анальной области. Опухоли кожи анальной области относятся к одним из самых частых новообразований, вызываемых ДМГ у мышей. Опухоли кожи анальной области (ОКАО) представляют собой плоскоклеточный рак, возникающий из покровного эпителия кожи анальной области. Некоторые из этих опухолей могут развиваться не из покровного эпителия, а из перианальных сальных (препуциальных) желез.

У самцов в группе 1,2-ДМГ опухоли кожи анальной области выявлены у 16 из 37 (43,2%), в группе 1,2-ДМГ+СВL0137 – у 18 из 44 животных (40,91%).

У самок также не было обнаружено статистически значимых различий в частоте образования опухолей кожи анальной области. В группе 1,2-ДМГ ОКАО обнаружены у 11 из 39 (28,21%), а в группе 1,2-ДМГ + СВL0137 – у 15 из 44 животных (34,09%).

При микроскопическом исследовании было выявлено несколько гистологических типов опухолей кожи анальной области. Наиболее часто обнаруживался плоскоклеточный рак с ороговением и без ороговения. Плоскоклеточный рак кожи с ороговением является более дифференцированным типом рака, чем рак кожи без ороговения. Только в двух случаях был диагностирован рак препуциальной железы (1 случай у самок и 1 - у самцов) в

группе 1,2-ДМГ, причем у самца эта опухоль дала метастаз в легкое. Отмечалось увеличение количества плоскоклеточного рака с ороговением в группе 1,2-ДМГ + CBL0137 по сравнению с группой 1,2-ДМГ. Так, у самцов в группе 1,2-ДМГ у 7 из 37 (18,92%) животных был найден плоскоклеточный рак с ороговением, в группе 1,2-ДМГ + CBL0137 – у 16 из 44 (36,36%). Плоскоклеточный рак без ороговения обнаруживался у 8 животных из 37 (21,62%) в группе 1,2-ДМГ и только у 2 из 44 (4,55%) в группе 1,2-ДМГ + CBL0137. У самок плоскоклеточный рак с ороговением встречался в 3 случаях из 39 (7,69%) в группе 1,2-ДМГ и в 11 из 44 (25,00%) в группе 1,2-ДМГ + CBL0137. Плоскоклеточный рак без ороговения встречался в 7 случаях из 39 (17,94%) в группе 1,2-ДМГ и в 4 из 44 (9,09%) в группе 1,2-ДМГ + Кураксин.

Матка. Гистологически эти опухоли были определены как стромальные саркомы, возникающие в строме эндометрия с инвазией в миометрий. Ткань опухоли состояла из вытянутых клеток фибробластического типа и участков незрелых мезенхимных клеток. Метастаз в стенку желудка выглядел как выступающее в полость образование и микроскопически имел структуру фибробластической саркомы. Спонтанные саркомы матки у мышей линии СВА возникают крайне редко и лишь у мышей старше 18 месяцев. В зависимости от дозы и режима введения 1,2-ДМГ может индуцировать саркомы матки у 20-50% самок.

Количество сарком матки в группе 1,2-ДМГ в 1,4 раза превышало количество этих опухолей в группе 1,2-ДМГ + CBL0137. В группе 1,2-ДМГ саркомы матки встречались у 13 из 39 животных (33,33%), а в группе 1,2-ДМГ + CBL0137 – у 9 из 44 (20,45%). Эта разница находится на грани статистической значимости. У одной из самок в группе 1,2-ДМГ был обнаружен метастаз саркомы матки в стенку желудка.

Яичники. У самок опытных и контрольной групп было показано образование гемангиом. Эти опухоли были обнаружены только в группах 1,2-ДМГ (у 5 самок из 39 – 12,82%) и 1,2-ДМГ + CBL0137 (у 1 самки из 44 – 2,27%). Несмотря

на 5-ти кратное превышение количества этих опухолей в группе 1,2-ДМГ по сравнению с группой 1,2-ДМГ+СВL0137, эти различия статистически не значимы.

Легкие. В легких обнаруживались доброкачественные новообразования – аденомы, которые являются спонтанными у линейных мышей, причем у линии СВА они возникают в небольшом проценте случаев.

У самцов 1,2-ДМГ стимулировал спонтанный аденомогенез в легких, при этом СВL0137 не изменял его действие. Так, в группе 1,2-ДМГ аденомы были выявлены у 7 животных из 27 (26%, $P < 0,05$ по сравнению с контролем), в группе 1,2-ДМГ+СВL0137 - у 7 из 44 (15,91%, $P > 0,05$ по сравнению с контролем), в контрольной группе - у 1 из 30 (3,33%). В группе СВL0137 аденом легких обнаружено не было.

У самок в группе 1,2-ДМГ аденомы выявлены у 3 животных из 39 (7,69%), в группе 1,2-ДМГ+СВL0137 - у 2 из 44 (4,55%), в группе СВL0137 - у 1 из 39 (2,56%). В контрольной группе аденомы легких не обнаруживались.

Селезенка. У животных всех групп патологических изменений селезенки выявлено не было.

5.3. Обсуждение

Сигнальные пути WNT и NF κ B играют ключевую роль в патогенезе рака толстой кишки и в настоящий момент рассматриваются как перспективные мишени для создания терапевтических и профилактических препаратов для РТК [207, 244]. Способность ингибировать NF κ B для нового класса ДНК-связывающих малых молекул (кураксинов), представленных в нашем исследовании СВL0137, была продемонстрирована в различных клеточных линиях [68, 239]. В нашей работе мы впервые показали, что СВL0137 также ингибирует WNT-сигналинг.

Способность кураксина ингибировать активность сигнального пути WNT была показана на различных клеточных линиях с использованием трех подходов: анализ экспрессии генов с помощью ДНК-микрочипов, количественная ПЦР и люциферазный репортерный анализ. Данные микроэкрена выявили значительное ингибирующее действие СВL0137 на экспрессию многих компонентов и генов-

мишеней сигнального пути WNT, тогда как экспрессия WNT-антагонистов *WIF1* и *APC2* была повышена. Используя количественную ПЦР, мы продемонстрировали дозозависимый ингибирующий эффект кураксина на экспрессию нескольких генов-мишеней (*cMYC*, *CCND1* и *BIRC5*) в четырех различных клеточных линиях РТК. Мы также наблюдали дозозависимую активацию антагонистов WNT-сигналинга *SFRP1*, *WIF1* и *DKK3*. Следует отметить, что естественная инактивация этих антагонистов в клетках РТК, полученных от пациентов [245, 246], в опухолевых клеточных линиях РТК(39), а также в опухолях, индуцированных ДМГ у мышей, происходит в основном посредством эпигенетического молчания [247]. Результаты наших исследований по влиянию CBL0137 на реактивацию экспрессии эпигенетически репрессированных генов (Глава 4 и [68]), позволяют предположить, что эпигенетическая активность кураксина лежит в основе наблюдаемого увеличения экспрессии антагонистов WNT-сигналинга в клеточных линиях РТК. Падение уровня экспрессии репортерного гена люциферазы, контролируемого промотором TCF/LEF в клетках РТК, после обработки кураксином, подтверждает нашу гипотезу о том, что CBL0137 является эффективным ингибитором сигнального пути WNT.

Этот вывод согласуется с нашими данными о том, что CBL0137 ингибирует активность провоспалительной циклооксигеназы COX-2 [44, 239], поскольку одним из мишеней COX-2 является простагландин E2, регулирующий WNT-сигналинг. Кроме того, было показано, что CBL0137 активирует экспрессию NOTCH1 в клетках мелкоклеточного рака легких [48], а также было продемонстрировано взаимное влияние β -катенина и эффекторов *NOTCH1* при канцерогенезе кишечника [248]. Вероятно, что влияние CBL0137 на экспрессию *cMyc*, которую раньше связывали с действием кураксина на гистоновый шаперон FACT [68], является следствием угнетения сигнального пути WNT.

Значимость результатов этого исследования усиливается тем фактом, что аберрантная активация передачи сигналов WNT играет основную роль в колоректальном канцерогенезе у млекопитающих (Рисунок 75). Герминальные

мутации в гене *APC* являются причиной семейного аденоматозного полипоза, главного фактора наследственной предрасположенности к РТК [249].

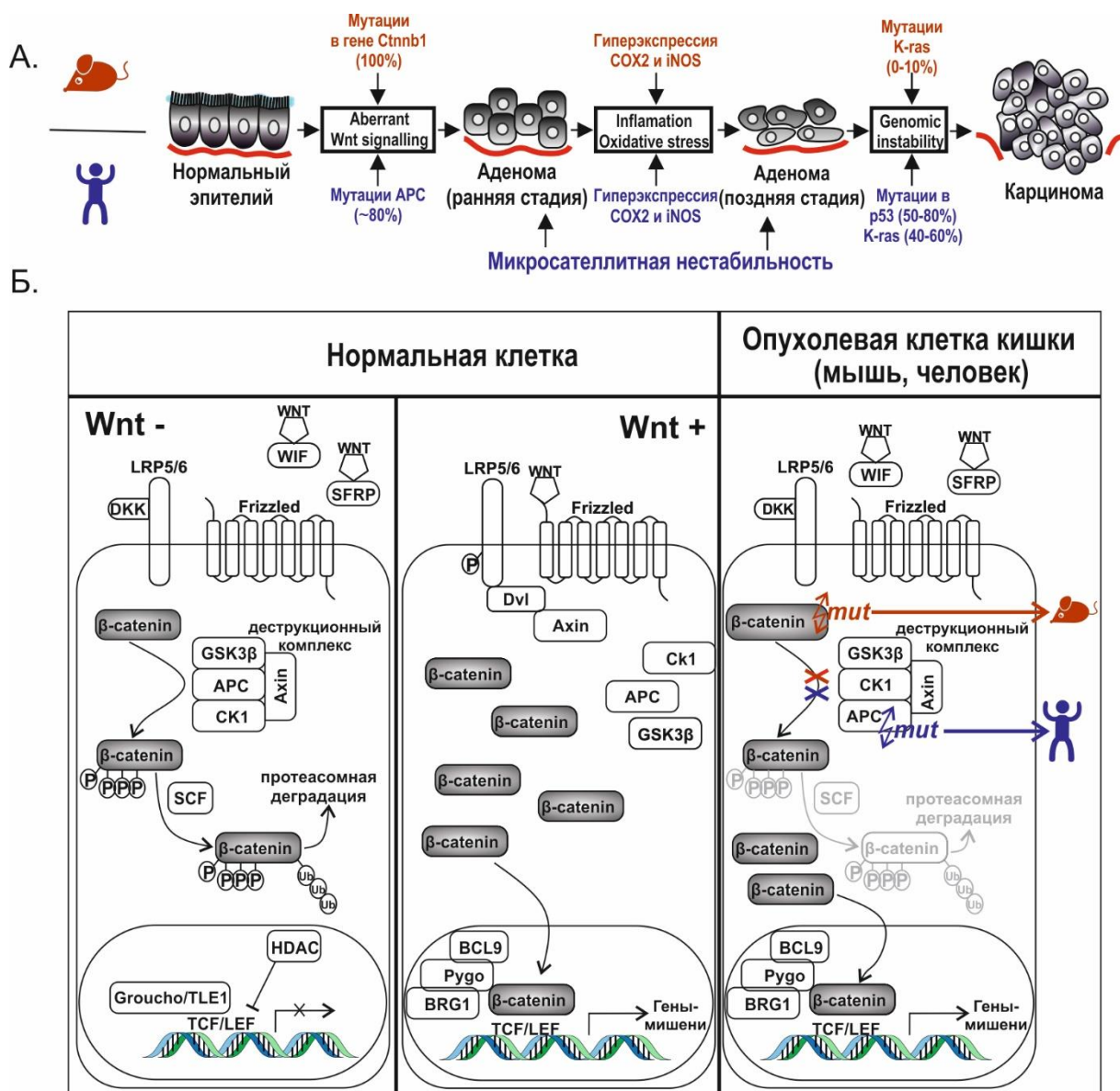


Рисунок 75 - Молекулярные механизмы возникновения рака толстой кишки.

(А) Генетические изменения при развитии РТК у мыши и человека (*Ctnnb1* – β -катенин мыши). (Б) Механизмы нарушения сигнального пути WNT при РТК у мыши и человека

Продemonстрировав, что CBL0137 обладает цитотоксической активностью относительно клеток РТК и ингибирует сигнальный путь WNT, мы исследовали антиканцерогенную активность кураксина при индукции опухолей 1,2-ДМГ на мышах. Эта модель канцерогенеза была разработана и получила распространение вслед за исследованиями, продемонстрировавшими, что гидразины из саговой

муки вызывают РТК [250]. 1,2-ДМГ и его несимметричный аналог 1,1-ДМГ представляют собой широко распространенные химические канцерогены для человека. 1,1-диметилгидразин является промышленным химическим веществом, которое попадает в окружающую среду в основном за счет выбросов при его использовании в качестве аэрокосмического топлива [251]. Введение ДМГ грызунам приводит к развитию опухолей толстой кишки с морфологическими и гистологическими признаками, сходными с теми, которые наблюдаются при спорадическом РТК у человека (Рисунок 76А). Как и у человека, активация сигнального пути WNT на ранних стадиях является критическим событием при ДМГ-канцерогенезе у грызунов [252]. Примечательно, что аберрантная активация WNT-сигналинга в обоих случаях обуславливается нарушением фосфорилирования β -катенина (Рисунок 76Б) [253, 254]. У млекопитающих передача сигналов пути WNT в основном регулируется посредством протеасомной деградации β -катенина в результате его фосфорилирования и последующего убиквитинирования. В клетках РТК человека этот процесс нарушается из-за мутаций в гене APC, приводящих к инактивации комплекса деградации β -катенина. В опухолях мыши фосфорилирование β -катенина нарушается вследствие мутаций в гене β -катенина, которые затрагивают области связывания белка с киназой GSK-3 β . Таким образом, последствия мутаций β -катенина в опухолях, индуцированных ДМГ у мышей, и мутации APC и β -катенина в РТК человека сходны. Гиперэкспрессия SOX2 также характерна как для клеток РТК человека, так и для клеток опухолей, индуцированных ДМГ, у мышей. Вместе эти факты указывают на то, что модель РТК, индуцированного ДМГ, на мышах является адекватной моделью для тестирования эффектов потенциальных препаратов для людей.

Результаты нашего исследования на мышах продемонстрировали четкий, статистически значимый антиканцерогенный эффект CBL0137 относительно РТК как у самцов, так и у самок. В то же время долгосрочное потребление CBL0137 вместе с питьевой водой не вызывало каких-либо заметных изменений в органах и тканях мышей обоих полов. Это согласуется с результатами предыдущих исследований, демонстрирующих, что CBL0137 в целом безопасен и хорошо

переносится млекопитающими. Хорошо известно, что аденомы толстой кишки и карциномы появляются у мужчин в более раннем возрасте и с большей частотой, чем у женщин. Это также наблюдается и на мышах после индукции опухолей азоксиметаном (метаболит ДМГ) [255]. По всей видимости, это связано с опухоль-стимулирующим действием тестостерона. Принимая это во внимание, при моделировании канцерогенеза для самцов и самок используются различные схемы введения индуктора [256]. Применяя это к нашему исследованию, самцам 1,2-ДМГ вводился в течение 15 недель, самкам – в течение 20. У самцов, получавших 1,2-ДМГ, введение CBL0137 уменьшало частоту возникновения аденом примерно в 2,5 раза и полностью предотвращало появление аденокарцином. Доля самцов, у которых не было найдено опухолей толстой кишки к концу исследования, при применении кураксина увеличилась с 24% до 73%. Более того, у 55% самцов, получавших только 1,2-ДМГ, были найдены аденомы с фокусами, в которых нарушена продукция муцина, тогда как в группе 1,2-ДМГ+CBL0137 этот показатель составил 24%. У самок при индукции опухолей CBL0137 подавлял частоту развития аденом и аденокарцином в 2,6 и в 1,8 раз соответственно. При этом, доля самок без опухолей толстой кишки увеличилась с 28% до 68% при введении CBL0137.

Наши данные о том, что кураксин обладает антиканцерогенной активностью, согласуются с результатами ранее выполненных исследований. Было показано, что хроническое введение CBL0137 снижает частоту появления опухолей у мышей MMTV-neu, не вызывая каких-либо обнаруживаемых изменений в нормальных органах и тканях [67]. В этой работе об антиканцерогенном эффекте CBL0137 судили по снижению частоты карцином молочной железы, замедлению опухолевого роста и длительности жизни животных. При моделировании нейробластомы, вызванной MYCN, у мышей TH-MYCN +/+ введение низких доз CBL0137 на 6-28 сутки после рождения вызывало значимую задержку роста опухолей [47]. Таким образом, доказательств, подтверждающих потенциальную клиническую эффективность CBL0137 в качестве профилактического средства против различных видов рака, становится всё больше.

В целом, наши результаты показывают, что CBL0137 является эффективным ингибитором сигнального пути WNT в клетках РТК[257]. Вместе с ранее продемонстрированной способностью ингибировать NFκB и противовоспалительной активностью CBL0137, подавление сигнального пути WNT объясняет высокую антиканцерогенную активность кураксина относительно РТК, наблюдаемую при индукции опухолей у мышей. Помимо того, полученные данные подчеркивают высокий потенциал CBL0137 в качестве противоопухолевого агента относительно широкого круга опухолей, развитие которых ассоциировано с aberrантной активацией сигнального пути WNT.

ГЛАВА 6. ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ СВОЙСТВА УЗКОБОРОЗДОЧНЫХ ЛИГАНДОВ IN VITRO И IN VIVO

6.1. Обзор литературы

В связи с высокой цитотоксической и цитостатической активностью УБЛ в экспериментах на культурах опухолевых клеток изучению противоопухолевой активности данной группы соединений посвящено большое количество исследований. Для пентамидина помимо его цитотоксических и цитостатических свойств была показана способность активировать рецептор смерти DR5 и подавлять антиапоптотические белки XIAP и Mcl-1 [39] и ингибировать сигнальные пути, связанные с гипоксией [40]. Также *in vivo* было продемонстрировано, что при совместном действии пентамидина с алкилирующими препаратами, интеркаляторами и ингибиторами топоизомераз наблюдается синергический эффект [40-43]. Такие соединения как бисбензимидазолы, нетропсин, дистамицин А, DAPI, проявляя сильный противоопухолевый эффект на животных, оказались не эффективными в клинических испытаниях. При этом при применении этих соединений регистрировалось большое количество побочных эффектов [26] [25] [27-31]. Таким образом, ни один из классических УБЛ до настоящего момента не нашел применения в химиотерапии. Тем не менее, структура некоторых УБЛ легла в основу разработки широкого круга алкилирующих соединений; ряд из которых исследовали в клинических испытаниях при терапии злокачественных новообразований.

К наиболее интересным синтезированным молекулам относятся производные дистамицина А – таллимустин и бросталлицин. Молекула таллимустина совмещает в своей структуре ДНК-связывающий фрагмент дистамицина А и алкилирующий заметитель β-хлорэтиламин. Бромталлицин представляет собой производное дистамицина А с бромакрилоильным заместителем. Для таллимустина была показана сиквенс-специфичность в отношении последовательности 5'-TTTTGPr-3', а также способность к

алкилированию в узкой бороздке ДНК. Этот препарат достиг второй стадии клинических исследований при терапии пациентов с раком толстой и прямой кишки, а также с раком легкого. В связи с тем, что лечение сопровождалось такими побочными эффектами как нейтропения и тромбоцитопения, а эффективность была невысокой, клинические исследования этого агента были прекращены [32-35]. Бросталлицин также достиг второй фазы клинических испытаний, но в 2014 году был признан недостаточно эффективным [36-38]. Противоопухолевые свойства диминазена до настоящего времени не изучали.

6.2. Собственные результаты

6.2.1. Влияние УБЛ на эффективность действия цитостатиков на культурах опухолевых клеток

В последние годы для терапии злокачественных новообразований было разработано множество цитостатиков. Эти соединения, несмотря на большое количество побочных эффектов и доказанную канцерогенную активность, продолжают применяться в качестве базовой терапии [258]. В связи с этим, одной из актуальных задач современной онкологии является поиск подходов к увеличению эффективности использования генотоксических препаратов. Одним из возможных путей решения данной проблемы является избирательное увеличение чувствительности опухолевых клеток к действию цитостатиков. Механизм действия генотоксических противоопухолевых препаратов тесно сопряжен с системой репарации, активность которой значительно влияет на величину эффективных доз препарата, а, следовательно, и на выраженность побочных эффектов. Частым событием при опухолевой трансформации является возникновение мутаций, которые приводят к инактивации путей репарации. Например, при мутации в генах BRCA1 или BRCA2, утрачивается такое звено репарации как гомологическая рекомбинация. Подавление активности ферментов, отвечающий за NER и BER в данных клетках, приводит к увеличению эффективности генотоксических воздействий. Данный эффект получил название

«синтетическая летальность». Ингибирование белков семейства PARP, которые играют ключевую роль в репарации одноцепочечных, двухцепочечных разрывов и в экцизионной репарации, является перспективным направлением таргетной терапии. В связи с этим были разработаны ингибиторы белка PARP 1, которые уже нашли применение в терапии некоторых видов опухолей. Однако данные препараты не лишены недостатков, к которым относится низкая избирательность. Ранее мы показали, что узкобороздочные лиганды ингибируют PARP1 по ДНК-зависимому механизму. Мы предположили, что при совместном действии УБЛ, в частности, диминазена, с цитостатиками будет наблюдаться синергический эффект их действия. Оценку влияния УБЛ на эффективность действия цитостатиков проводили на клетках линий рака молочной железы MDA-MB-231 и рака толстой кишки HT29 (Рисунок 76).

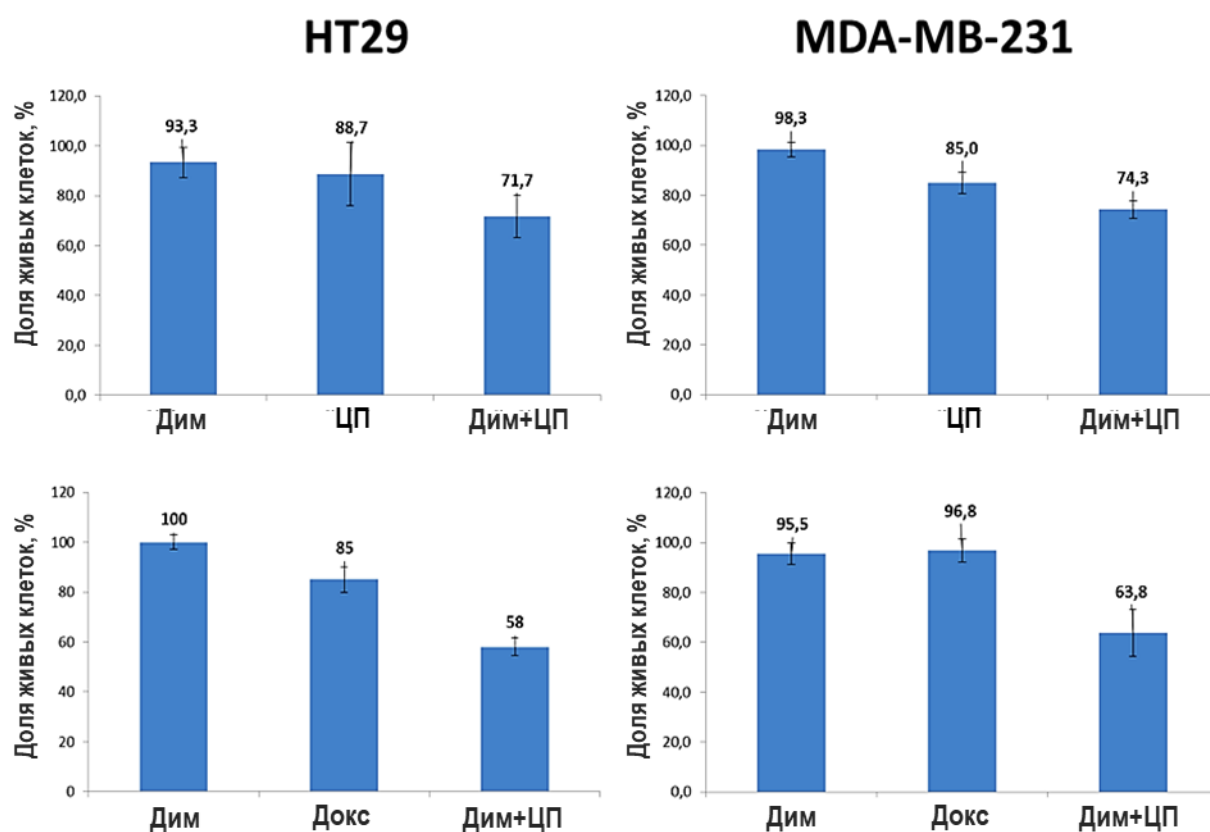


Рисунок 76 - Цитотоксическая активность препаратов и их комбинаций при действии на клетки линий HT29 и MDA-MB-231 (Дим – диминазен, ЦП – цисплатин, Докс – доксорубицин). Данные представлены как $M \pm m$.

Цитотоксичность препаратов и их комбинаций определяли с помощью теста МТТ. Мы показали, 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 – $5+3 \neq 37$), тогда как при совместном действии диминазена и цисплатина эффект был близок к аддитивному.

6.2.2. 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.).

Мы провели изучение влияния совместного действия олапариба и диминазена на онкогенный потенциал опухолевых клеток методом анализа способности опухолевых клеток образовывать колонии (clonogenic assay) в разреженной популяции (Рисунок 77).

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.

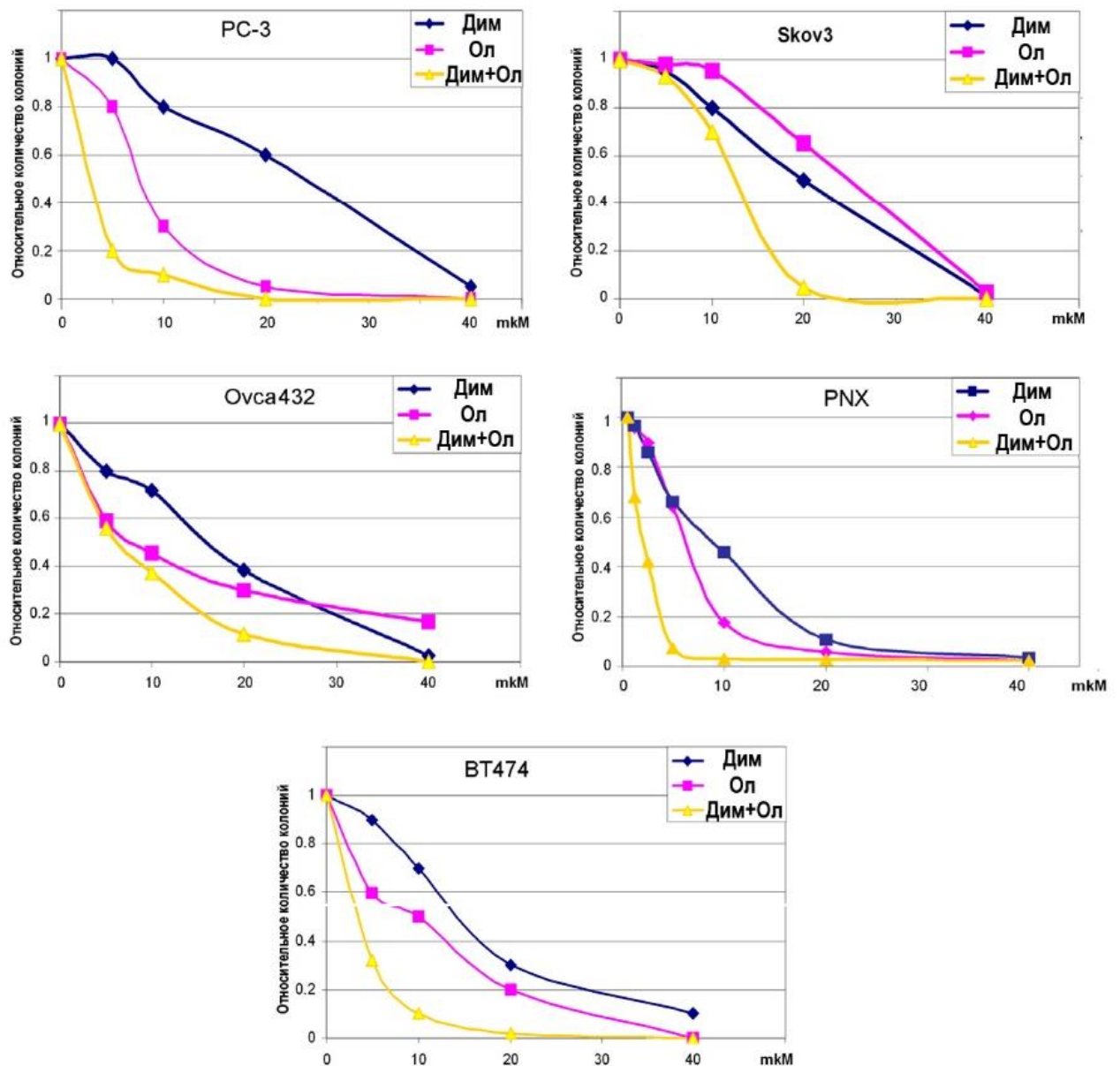


Рисунок 77 - Влияние диминазена (Дим), олапариба(Ол), а также их комбинации на способность опухолевых клеток формировать колонии

6.2.3. Влияние кураксина на рост перевиваемой аденокарциномы толстой кишки Акатол

Ранее нами было показано, что кураксин CBL0137 проявляет антиканцерогенные свойства относительно злокачественных новообразований толстой кишки при ДМГ-индуцированном канцерогенезе. В настоящем эксперименте были исследованы противоопухолевые эффекты кураксина в

различных дозах (с определением зависимости доза-эффект) относительно перевиваемой опухоли кишечника Акатола.

Аденокарцинома толстого кишечника Акатола легко перевивается и не рассасывается спонтанно. Опухоль представляет собой аденокарциному с участками солидного роста опухолевых клеток. В крупных узлах опухоли обнаруживаются очаги некроза и кровоизлияний. Опухоль обладает выраженным инфильтративным ростом в периферической зоне, разрушает пограничные с опухолью ткани. В том случае, когда опухоль инфильтрирует участки грубоволокнистой соединительной ткани, она может принимать строение аденокарциномы скirrosного типа. Если рост опухоли осуществляется в рыхлой соединительной ткани, то здесь, как правило, преобладают либо микро- и макроальвеолярные структуры, либо железистые структуры, разделенные тонкими прослойками рыхлой соединительной ткани. Границы между отдельными клетками выражены не четко. Хроматин в ядре собран в виде крупных гиперхромных зерен, цитоплазма клеток отличается выраженной базофилией. В опухоли много митозов. В центральной части опухоли количество делящихся клеток снижается.

Перед началом эксперимента все животные были помечены и взвешены. Измельченная опухолевая масса вводилась 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.

Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к корму и воде (стерильная питьевая вода). В течение эксперимента гибель и состояние мышей регистрировали один раз в день. В частности, оценивали изменения двигательной активности и поведения.

Оценку экспериментальных данных проводили по следующим критериям: (1) время появления первых узелков; (2) торможение роста опухоли; (3) продолжительность жизни животных.

Время появления первых узелков. Для определения времени появления первых узелков проводилась ежедневная пальпация мышей в течение первой недели после перевивки опухоли. Процент увеличения времени появления первых узелков определялся по формуле:

$$\text{Процент увеличения времени появления первых узелков} = \frac{(\text{среднее время появления узелков в опыте}) - (\text{среднее время появления узелков в контроле})}{(\text{среднее время появления узелков в контроле})} \times 100\%$$

В эксперименте время появления первых узелков во всех группах достоверно не различалось и составило около 6-ти суток (Таблица 9, Таблица И1 Приложения И).

Таблица 9 - Время появления первых узелков у мышей на месте перевивки опухоли

Группа	Среднее время появления первых узелков (сутки, $M \pm m$)	% увеличения времени появления первых узелков
Группа К (контроль)	$6,08 \pm 0,20$	
Группа CX5 (5 мг/кг)	$6,04 \pm 0,17$	-0,7
Группа CX10 (10 мг/кг)	$6,04 \pm 0,20$	-0,7
Группа CX15 (15 мг/кг)	$6,40 \pm 0,20$	5,0
Группа CX20 (20 мг/кг)	$6,64 \pm 0,23$	8,4
Группа 5-ФУ	$6,36 \pm 0,24$	4,4

Торможение роста опухоли. О противоопухолевом действии исследуемых препаратов судили также по результатам сопоставления среднего объема опухолей в контрольных и опытных группах. Объем вычислялся как произведение величин трех взаимно перпендикулярных размеров опухоли. Измерение опухолей проводилось 3 раза в неделю. Процент торможения роста опухоли по объему определялся на каждое ее измерение и вычислялся по формуле:

$$\text{\% торможения роста опухоли по объему} = \frac{(\text{средний объем опухоли в контроле}) - (\text{средний объем опухоли в опыте})}{(\text{средний объем опухоли в контроле})} \times 100\%$$

Данные по измерению объема перевиваемой опухоли представлены на рисунке 78 и в таблице И2 Приложения И. Сравнительный анализ данных по

объему показал, что в течение первых 9 суток достоверных различий между опытными и контрольной группами не наблюдалось.

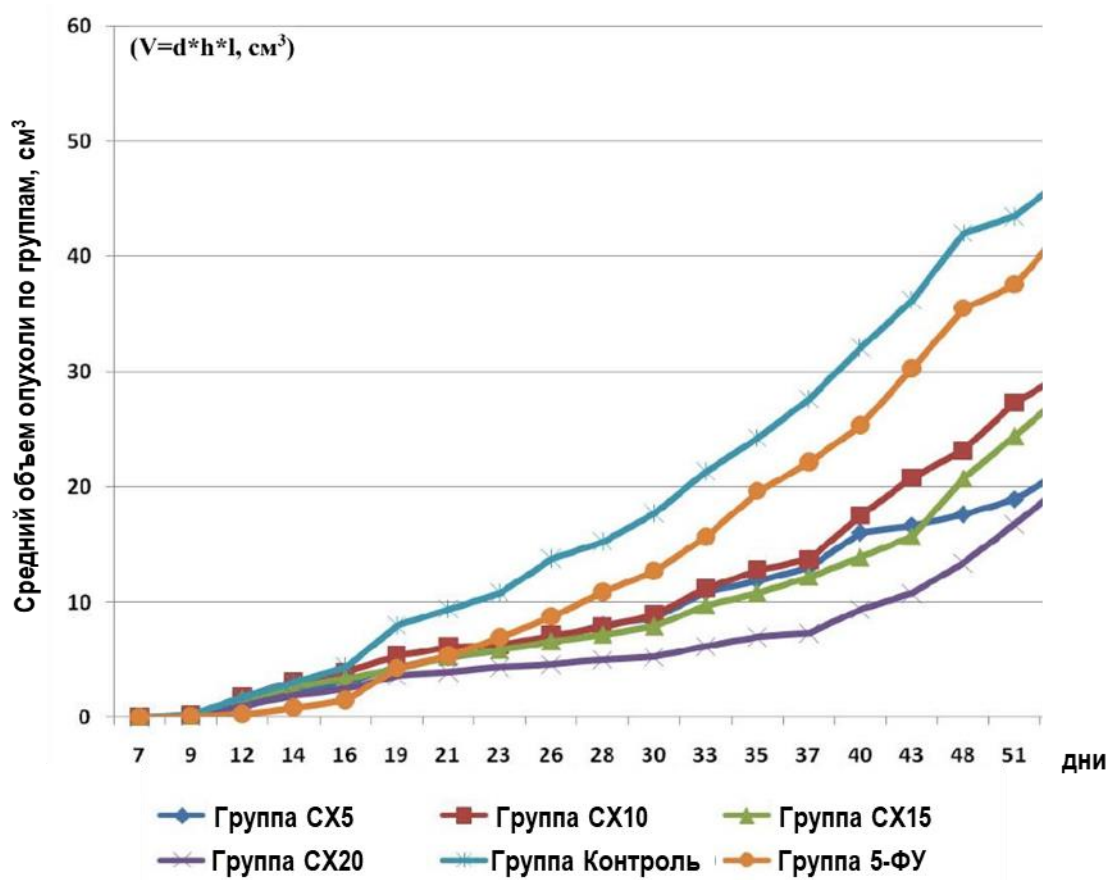


Рисунок 78 - Динамика роста объема опухолевого узла по группам

К 12 суткам достоверное торможение роста опухоли по объему отмечалось только у мышей, получавших CBL0137 в дозе 20 мг/кг (43%) и 5-фторурацил (84%). С 19 суток и до завершения эксперимента у мышей, получавших CBL0137 наблюдалось достоверное 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%).

Средние значения объема опухолей по группам на 19 и 40 сутки представлены в таблице 10. Статистически значимые отличия от контроля на 19 сутки были зафиксированы для всех групп, на 40-е – только для групп мышей, получавших CBL0137.

Таблица 10 - Объемы опухолей на 19 и 40 сутки эксперимента (* – статистически значимые различия по отношению к контрольной группе, $p < 0,01$)

Группа	Объем опухолей на 19 сутки после перевивки ($M \pm m$)	Объем опухолей на 40 сутки после перевивки ($M \pm m$)
Группа К	9,4±0,9	32,1±2,2
Группа CX5	5,2± 0,6*	16,0±2,1*
Группа CX10	6,1±0,4*	17,5±1,5*
Группа CX15	5,25±0,5*	13,9±1,5*
Группа CX20	4±0,3*	9,3±1*
Группа 5-ФУ	5,4±0,6*	25,4±2,5

Максимальный эффект торможения роста опухоли при воздействии 5-фторурацила проявился на 12 сутки после перевивки (4 сутки после начала его введения (84%)) и уже начиная с 14 суток (сразу после окончания введения 5-ФУ) происходило постепенное снижение торможения роста опухолевого узла по сравнению с контрольной группой. С 35 суток и до завершения эксперимента достоверных отличий в средних размерах опухолевого узла у мышей, получавших 5-ФУ и мышей контрольной группы не отмечалось.

Продолжительность жизни животных. Согласно различным зарубежным законодательным 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 объёма ($V=d \cdot l \cdot h=10 \text{ см}^3$).

Процент увеличения продолжительности жизни животных вычислялся по формуле:

$$\begin{array}{l} \text{\% увеличения} \\ \text{продолжительности} \\ \text{жизни} \end{array} = \frac{(\text{сред.продол.жизни в опыте}) - (\text{сред.продол.жизни в контроле})}{(\text{сред.продол.жизни в контроле})} \times 100\%$$

Статистически значимое увеличение продолжительности жизни при использовании первого подхода было показано для всех экспериментальных групп

(Рисунок 79, Таблица 11). Максимальное увеличение продолжительности жизни наблюдалось для группы мышей, получавших 20 мг/кг CBL0137, и составила 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 значительно слабее.

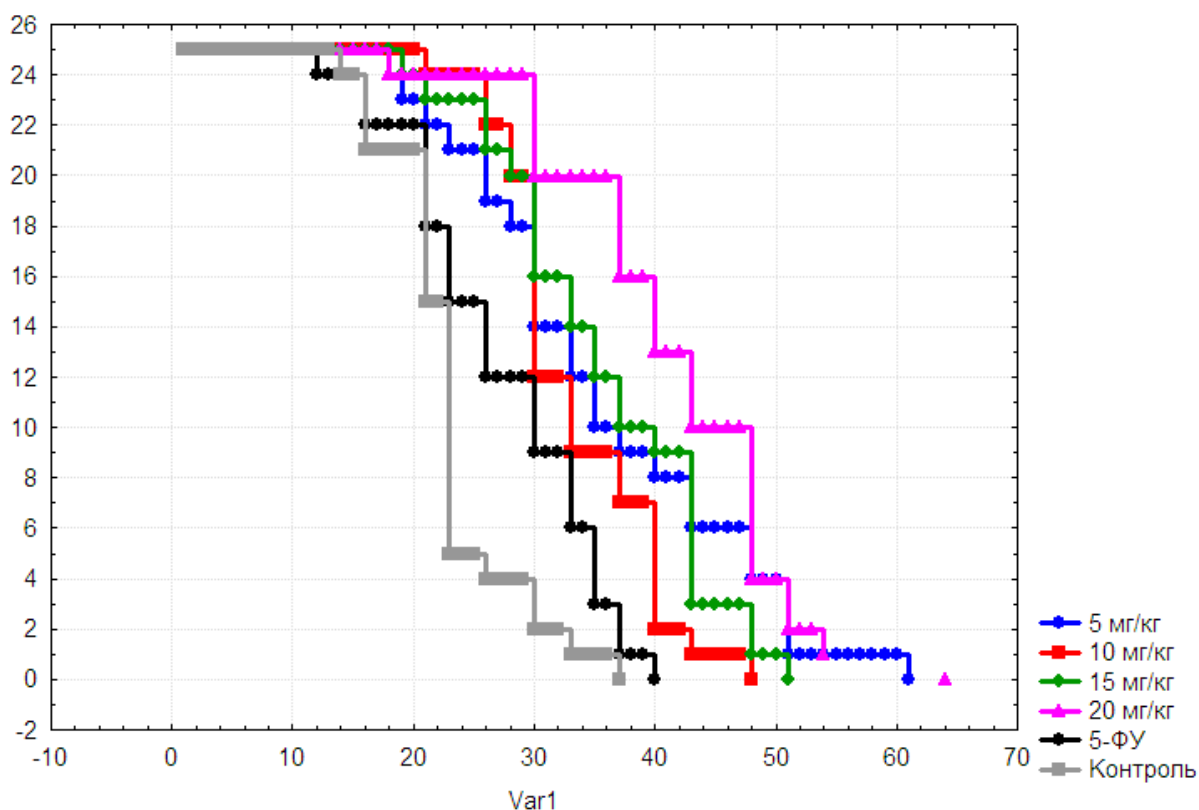


Рисунок 79 - Продолжительность жизни при выбывании животного из группы по достижении объема опухоли 10 см³

Таблица 11 - Продолжительность жизни мышей при выбывании животного из группы по достижении объема опухоли 10 см³ (* – 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± 1	
Группа CX5	35,6± 2,2**	55
Группа CX10	33,3± 1,2**	45
Группа CX15	35,7± 1,7**	55
Группа CX20	41,7± 1,9**	82
Группа 5-ФУ	27,3± 1,5*	19

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

6.2.4. Противоопухолевое действие диминазена относительно перевиваемой саркомы матки 322

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

Саркома матки См 322 является солидной опухолью, после перевивки не рассасывается спонтанно, ее характеристики достаточно хорошо изучены и эта модель применяется для оценки противоопухолевого действия химиопрепаратов.

Саркома матки См 322 была индуцирована 1,2-диметилгидразином у мышей-самок линии СВА. Характеризуется 100% перевиваемостью и быстрым ростом. Первые пальпируемые узелки на месте перевивки появляются через 3-4 дня. Средняя продолжительность жизни животных с перевитой саркомой матки составляет 20-24 дня.

Перед началом эксперимента все животные были помечены, взвешены, рассажены в клетки. 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) время появления первых узелков; (2) торможение роста опухолей по объему; (3) продолжительность жизни животных.

Время появления первых узелков. Для определения времени появления первых узелков проводилась ежедневная пальпация места перевивки у мышей в течение первой недели после перевивки опухоли.

В Группках К, ЦП и ЦФ у всех животных на 3 сутки появились опухолевые узелки (Таблицы Е1.1 и Е.1.2 Приложения Е). При анализе этого параметра результаты для Группы ЦП и ЦФ можно приравнять к результатам группы К, так как введение препаратов ЦП и ЦФ начиналось только через три дня после перевивки См 322, когда у всех животных в этих группах узелки уже пальпировались.

Мышам групп Дим, Дим+ЦП, Дим+ЦФ диминазен начал вводиться на первые сутки после перевивки См 322. В этих группах находилось в сумме 25 животных. На 3-и сутки узелки на месте перевивки опухоли пальпировались у 10 животных (40%), у 15 мышей их не было (60%). Эти различия статистически достоверны по сравнению с результатами, полученными в объединенной группе (К; ЦП; ЦФ) ($p \leq 0,01$). Таким образом, диминазен оказал значимое влияние на время появления опухолевых узелков.

Торможение роста опухолей по объему. Противоопухолевое действие Дим, ЦП и ЦФ оценивалось по результатам сопоставления среднего объема опухолей в контрольной и опытных группах. Измерение проводилось 3 раза в неделю. Данные по измерению объема опухолевого узла представлены в таблицах Е2-Е8 Приложения Е.

Введение одного диминазена вызвало достоверное торможение роста опухоли по сравнению с контрольной группой начиная с 6-х суток эксперимента (Рисунок 80). 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.

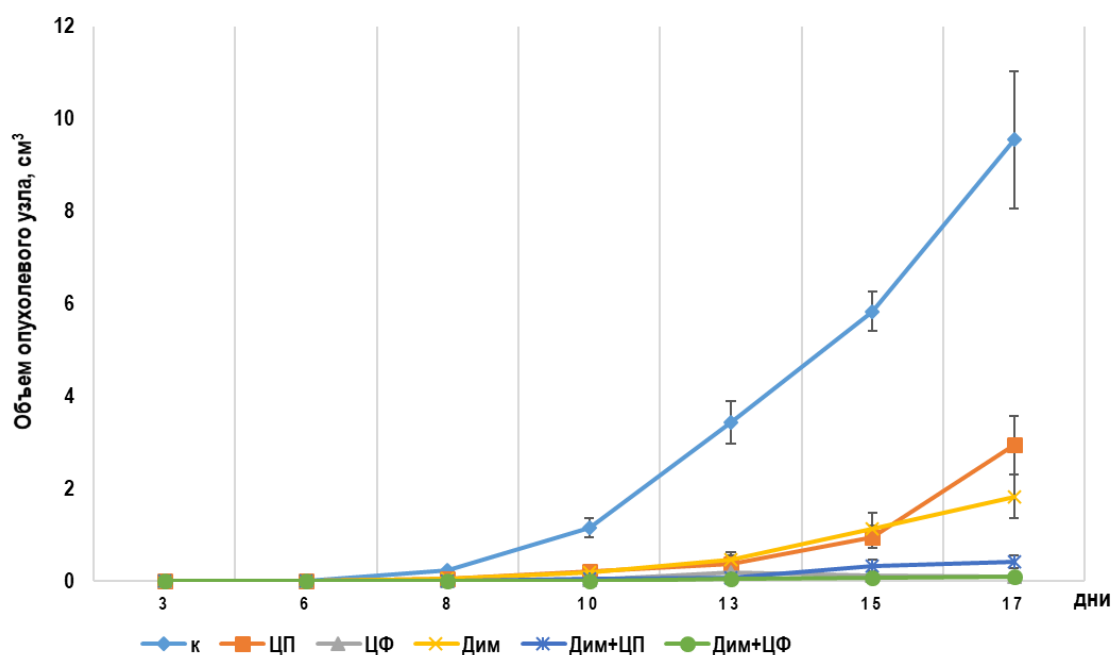


Рисунок 80 - Динамика роста опухолевого узла по группам. Данные представлены как $M \pm m$.

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 достоверно ($p \leq 0,01$) 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).

6.2.5. 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 Р388 является солидной формой лимфоцитарной лейкемии. Преимущество солидной формы заключается в том, что при такой форме опухоли можно регистрировать динамику роста узла в качестве критерия для оценки противоопухолевой активности тестируемых препаратов. Продолжительность жизни животных с данной опухолью составляет около 20 дней.

Перед началом эксперимента все животные были помечены и взвешены. Измельченная опухолевая масса вводилась подкожно в правую подмышечную впадину всем мышам линии BDF₁ 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 внутрибрюшинно 3 раза в неделю в течение 1 недели в дозе 1,5 мг/кг (на 12, 14 и 16 сутки по перевивки); (3) Мышам группы Дим внутрибрюшинно вводили диминазен 3 раза в неделю в течение 1 недели в дозе 100 мг/кг (на 12, 14 и 16 сутки по перевивки).

Противоопухолевое действие исследуемых соединений оценивалось по результатам сопоставления среднего объема опухолей в контрольной и опытных группах. Объем вычислялся как произведение величин трех взаимно перпендикулярных размеров опухоли. Измерение проводилось 3 раза в неделю. Данные по измерению объема опухолевого узла представлены на рисунке 81 и в таблицах Ж1-Ж4 Приложения Ж.

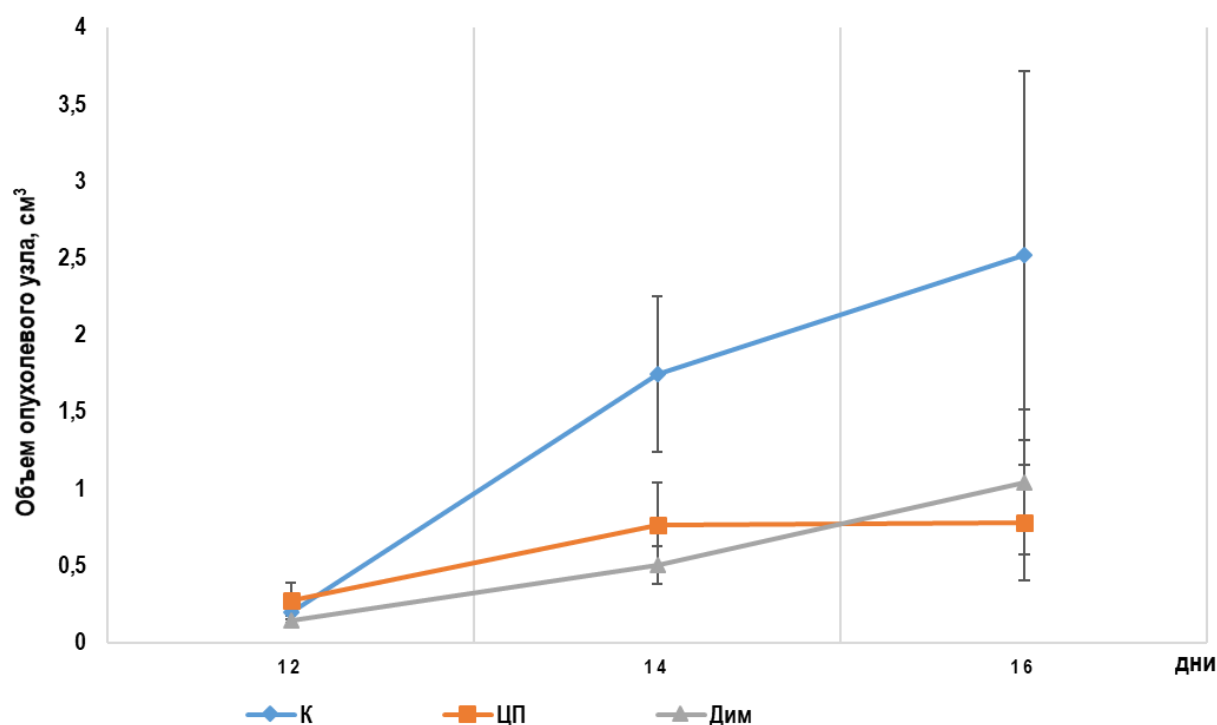


Рисунок 81 - Динамика роста опухолевого узла по группам. Данные представлены как $M \pm m$.

Анализ роста опухоли удалось провести только на 14 и 16 сутки, так как на 19 сутки в контрольной группе пали 6 животных из 9, а у двух из трех оставшихся мышей произошло рассасывание опухоли. 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 достоверной. 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 23,75 дней соответственно) имела тенденцию к увеличению по сравнению продолжительностью жизни мышей контрольной группы К (19,4 дня), однако отличия были статистически не значимыми (Таблица Ж4 Приложения Ж).

6.3. Обсуждение

Исследования диминазена начались более 60 лет назад. К настоящему моменту этот препарат является одним из самых эффективных средств для лечения трипаносомозов, бабезиозов, лейшманиозов и амёбиазов у животных [259]. В связи

с появлением штаммов, устойчивых к препарату, интенсивность исследований самого диминазена, а также возможных комбинаций этого агента с другими лекарственными средствами при терапии, значительно возросла в последние годы [260]. Были открыты новые перспективные фармакологические направления для его использования в качестве гипотензивного препарата [261, 262], иммуномодулятора [263, 264], а также для борьбы с нейродегенеративными заболеваниями и ревматоидным артритом [265, 266]. Противоопухолевые свойства этого соединения до настоящего времени не изучались. По всей видимости, это связано негеноотоксическими механизмами действия препарата, а также с отсутствием эффекта диминазена на ключевые белки-мишени противоопухолевой терапии (например, топоизомеразы). В работе нам удалось показать, что при отсутствии мутагенной, рекомбиногенной и бластомогенной активности диминазен способен вызывать изменение структуры хроматина, реактивацию экспрессии эпигенетически репрессированных генов, а также ингибировать PARP1, разобщая его взаимодействие с ДНК-активатором.

Ингибирование PARP1 в настоящее время рассматривается как один из перспективных подходов к созданию препаратов для монокимиотерапии, а также адъювантной химиотерапии в качестве сенситизаторов опухолевых клеток к основному цитотоксическому или лучевому воздействию. Прежде всего это обусловлено участием данного белка в активации эксцизионной репарации (см. раздел 2.1) [267].

Молекулярные механизмы действия всех ингибиторов PARP1, которые используются в клинике, либо проходят доклинические и клинические испытания в настоящее время, основаны на их способности связываться с каталитическим доменом белка PARP1. Это приводит к неспособности фермента автополи-АДФ-рибозилироваться, что влечет за собой угнетение эксцизионной репарации в клетке. Большая часть этих соединений являются прямыми аналогами никотинамида. С одной стороны, такое химическое строение обеспечивает высокую степень ингибирования PARP1 в клетке. С другой же стороны, NAD является кофактором в ходе большого числа клеточных процессов, которые не

связаны с репарацией и использование сходных по структуре молекул приводит к их нарушению в клетке и проявлению ряда серьезных побочных токсических эффектов на уровне всего организма [268].

В основе повышения чувствительности опухоли к химио- и радиотерапии при помощи ингибиторов PARP1 лежит стратегия индукции синтетической летальности. При наличии в опухоли соматических мутаций или эпимутаций, которые приводят к инактивации системы гомологичной рекомбинации, репарация двуцепочечных разрывов в таких клетках происходит исключительно по механизму эксцизионной репарации. В такой ситуации использование ингибиторов эксцизионной репарации, например, ингибиторов PARP1, приводит к угнетению всех систем репарации двуцепочечных разрывов в опухолевых клетках. Дополнительное применение генотоксических агентов вызывает резкое накопление повреждений ДНК, и, как следствие, активацию апоптоза. Важно, что при этом другие нетрансформированные быстроделющиеся клетки организма будут менее чувствительны к действию цитостатиков в связи с наличием в них активной системы гомологичной рекомбинации. Помимо наиболее часто встречающихся мутаций в генах гомологичной рекомбинации BRCA1/2 к угнетению этой системы репарации могут приводить нарушения в генах RAD51 RAD54, DSS1, RPA1, ATM, chk2, PTEN и т.д. [269-271]. Теоретическим обоснованием монотерапии служит другой вероятный механизм действия ингибиторов PARP1. Он заключается в том, что ингибиторы PARP1 блокируют активность фермента и, как следствие, вызывают его стабилизацию на хроматине. При повреждении ДНК PARP1 не автополи-АДФ-рибозилируется и не теряет связи с хроматином и физически препятствует доступу белков всех типов репарации к месту разрыва («PARP1 trapping») [272].

В данной части работы мы впервые продемонстрировали способность диминазена сенситизировать клетки рака толстого кишечника HT29 и рака молочной железы MDA-MB-231 к действию цитостатика доксорубина. Более того, мы показали, что совместное применение диминазена и ингибитора PARP1 олапариба значительно снижает онкогенный потенциал клеток рака молочной

железы (BT474), рака простаты (PC3), рака яичников (Skov3 и Ovca432), а также рака почек (PNX).

На модели саркомы матки в экспериментах *in vivo* было выявлено, что диминазен оказывает ингибирующее влияние на рост аллографтов опухолей, увеличивая время появления опухолевых узелков после перевивки, а также уменьшая скорость роста опухоли. Более того, совместное применение диминазена и цисплатина в значительной степени увеличивает эффективность терапии относительно групп животных, получавших только один их агентов. Впервые было установлено, что диминазен способен негативно влиять на скорость роста опухолей кроветворной системы. Так, на модели лимфобластного лейкоза эффективность применения этого препарата была сравнима с эффективностью применения цисплатина[273].

Молекулярные механизмы антиканцерогенной и противоопухолевой активности кураксина CBL0137 подробно были рассмотрены в разделе 1.1.2. и главе 5. Получив данные о значительной антиканцерогенной активности кураксина на химически-индуцированной модели рака толстого кишечника, большой интерес представляло исследование его противоопухолевых свойств относительно рака той же нозологии. В данной главе мы провели анализ влияния CBL0137 на скорость роста аллографтной опухоли толстого кишечника Акатол. Во всех дозах (5, 10, 15 и 20 мг/кг) кураксин оказывал тормозящее действие на рост опухоли. Максимальный эффект CBL0137 наблюдался на 37 сутки и составил 53, 50, 56, 74% для доз 5, 10, 15, 20 мг/кг/день соответственно. При анализе продолжительности жизни (при выбывании животного из группы при достижении опухолью критического объема) была продемонстрирована противоопухолевая активность для всех используемых доз препарата, при этом максимальный эффект наблюдался у мышей, принимающих кураксин в дозе 20 мг/кг/день, и составил 81,7%.

Таким образом, в данной главе *in vivo* и *in vitro* была продемонстрирована перспективность использования диминазена и кураксина в качестве противоопухолевых препаратов, что обуславливает необходимость в дальнейших испытаниях по подбору эффективных доз и лекарственных форм для этих молекул.

ГЛАВА 7. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

• Список используемых реактивов

1. Агар-агар бактериологический, «Диаэм», Россия
2. Агароза, «Fisher Biotech», Испания
3. Ампициллин, «ПанЭко», Россия
4. Борная кислота, «Sigma-Aldrich», США
5. Бромистый этидий, «Sigma-Aldrich», США
6. Гематоксиллин, «BioVitrum», Россия
7. Гентамицин, «ПанЭко», Россия
8. Гистомикс, среда для заливки блоков, «BioVitrum», Россия
9. Глицерин, «Serva», Германия
10. (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), «ПанЭко», Россия
11. Диметилсульфоксид (ДМСО), «ПанЭко», Россия
12. 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолиум бромид (МТТ), «ПанЭко», Россия
13. Диметилформамид (ДМФА), «Химмед», Россия
14. Диминазен, «Sigma-Aldrich», США
15. Дитиотрейтол (ДТТ), «ThermoFischer Scientific», США
16. Диэтиловый эфир, «Химмед», Россия
17. Дрожжевой экстракт, «ПанЭко», Россия
18. Изоамиловый спирт, «Химмед», Россия
19. Изопропиловый спирт, «Химмед», Россия
20. Йодистый пропидий (PI), «Sigma-Aldrich», США
21. Калий хлорид, «Химмед», Россия
22. Кальций хлорид, «Химмед», Россия
23. Кислота серная, «Химмед», Россия
24. Кислота соляная, «Химмед», Россия
25. Ксилол, «Sigma-Aldrich», США
26. Магний хлорид, «Химмед», Россия

27. Магний сульфат, «Химмед», Россия
28. Маркер молекулярного веса белков Page Ruler Plus, 10-250 kDa «ThermoFischer Scientific», США США)
29. Маркеры молекулярного веса НК: маркер 100 bp («Biotech», Англия), pBR322/TaqI, pBR322/BsuRI, lambda/EcoRI, Hind III («СибЭнзим», Россия)
30. Монтирующая среда Bio-Mount, «Sigma-Aldrich», США
31. Набор реактивов для выделения РНК RNeasy kit, «Qiagen», США
32. Набор реактивов для выделения РНК из тканей TRIzol reagent kit, «ThermoFischer Scientific», США
33. Набор реактивов для выделения плазмидной ДНК QIAprep Spin Miniprep Kit, «Qiagen», США
34. Набор реактивов для определения активности люциферазы Luciferase Assay System, «Promega», США
35. Набор реактивов для ПЦР, «Синтол», Россия
36. Набор реактивов для трансфекции Lipofectamine LTX, «Promega», США
37. Натрий ацетат, «Химмед», Россия
38. Натрий боргидрид, «Химмед», Россия
39. Натрий гидрид, «Химмед», Россия
40. Натрий гидроксид, «Химмед», Россия
41. Натрий дезоксихолат, «Химмед», Россия
42. Натрий додецилсульфат (SDS), «Химмед», Россия
43. Натрий хлорид, «Химмед», Россия
44. Натрий цитрат, «Химмед», Россия
45. Нетропсин, «Sigma-Aldrich», США
46. Обратная транскриптаза MMLV, «Синтол», Россия
47. Олигонуклеотиды, синтезированные НПФ «Синтол», Россия
48. Пентамидин, «Sigma-Aldrich», США
49. Реагент для определения концентрации белков Bio-Rad Protein Assay, «Bio-Rad», США

50. РНКазы А, «ThermoFischer Scientific», США
51. Силикагель, «Химмед», Россия
52. Триптон, «Диаэм», Россия
53. Тритон-X100, «Sigma-Aldrich», США
54. Формалин 10% забуференный, «BioVitrum», Россия
55. Фосфорно-солевой буфер (PBS), «Flow Laboratories», Англия
56. Хлороформ, «Химмед», Россия
57. Эозин, «BioVitrum», Россия
58. Этилендиаминтетрауксусная кислота, динатриевая соль (EDTA), «Sigma-Aldrich», США
59. Этиловый спирт

• Список используемых приборов

1. Проточный цитофлуориметр FACSCalibur (“Becton Dickinson”, США);
2. Спектрофотометр BioPhotometr Eppendorf, Германия;
3. Спектрофотометр NanoVue Plus GE Healthcare;
4. ПЦР-анализатор Bio-Rad iQ5 Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA;
5. Флуоресцентный микроскоп Zeiss;
6. Микропланшетный ридер Infinite F500 Tecan (Tecan, Австрия).

• Клеточные линии

В работе использовали клетки аденокарциномы толстого кишечника Caco2, HCT116, HT29, Sw480, клетки рака молочной железы MCF7, BT474, рака простаты PC3, рака яичников Skov3 и Ovca432, а также рака почек PNX. Клетки культивировали в стандартной среде DMEM, содержащей 5%-ную эмбриональную сыворотку телят («РАА», Австрия) и гентамицин (50 ед/мл) при 37°C и в 5%-ном CO₂.

• Определение цитотоксического эффекта соединений

Цитотоксическую активность соединений определяли методом МТТ-теста. Клетки рассевали в 96-луночные планшеты («Eppendorf», США) (5000-10000 клеток/лун) и инкубировали в течение 24 ч. В день опыта приготавливали необходимые разведения агентов. Клетки инкубировали с соединением в течении

24, 48 или 72 ч часов, далее вносили 20 мкл реагента МТТ (5 мг/мл, «ПанЭко», Россия) или в растворе Хэнкса («ПанЭко», Россия) и инкубировали 2-4 ч при 37°C. Образовавшийся формазан растворяли в 200 мкл диметилсульфоксида (ДМСО, ПанЭко, Россия), инкубировали при 37°C. После растворения кристаллов измеряли оптическую плотность раствора в лунках на спектрофотометре MultiScan MCC 340 (Labsystems, США), длина волны - 570 нм. При построении кривых выживаемости за 100% жизнеспособность принимали ОП раствора формазана в контроле.

• **Изучение взаимодействия соединений с ДНК по изменению электрофоретической подвижности**

Пробы объемом 20 мкл с 200 нг плазмидной ДНК рНОТ-1 и различными концентрациями исследуемых соединений инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре, либо 24 часа при 4 °С. Изменение электрофоретической подвижности ДНК при взаимодействии с соединениями определяли путем электрофореза в 1% агарозном геле с ТАЕ-буфером. Состав буфера: 40 мМ трис-основания, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ ледяной уксусной кислоты. Для нанесения ДНК в лунки агарозного геля использовали 6-кратный буфер, содержащий 30% глицерина, 2,5 мг/мл бромфенолового синего. Электрофорез проводили при напряжении электрического поля 2 В/см в течение 2 часов. Полученный гель окрашивали водным раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Распределение ДНК в геле регистрировали по флуоресценции в ультрафиолетовом свете с длиной волны от 240 до 360 нм.

• **Изучение влияния соединений на каталитическую активность топоизомеразы I**

Ядерный экстракт клеток MCF-7 с высоким содержанием топоизомеразы I инкубировали с 200 нг сверхспирализованной плазмидной ДНК рUC19 в присутствии соединений в различных концентрациях в течение 30 минут при 37°C. Инкубация проводилась в реакционном буфере (10 мМ Трис-HCl, pH 7,9; 1мМ ЭДТА; 0,15 М NaCl; 0,1% BSA; 0,1 мМ спермидин, 5% глицерин). Объем реакционной смеси составлял 10 мкл. Реакцию останавливали внесением додецилсульфата натрия до конечной концентрации 1%. После добавления

протеиназы К (до конечной концентрации 50 мкг/мл) реакционную смесь инкубировали в течение 1 часа при 55°C. Продукты реакции разделяли путем электрофореза в 1% агарозном геле с ТАЕ-буфером. Электрофорез проводили при напряжении электрического поля 2 В/см в течение 3 часов. Полученный гель окрашивали водным раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Распределение ДНК в геле регистрировали по флуоресценции в ультрафиолетовом свете с длиной волны от 240 до 360 нм.

• Футпринтинг ДНКазой I

• Получение ДНК-дуплексов с флуоресцентной меткой

ДНК-дуплексы получали с применением ПЦР-реакции. Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала:

- 1 нг плазмидной ДНК pUC19;
- праймеры (0,4 мкМ), один из которых включает флуоресцентную метку на 5'-конце;
- четыре дезоксинуклеозидтрифосфата (0,2 мМ);
- $MgCl_2$ (2 мМ);
- Taq ДНК-полимеразу (2,5 Е);
- 5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б (Синтол).

Реакцию проводили в термоциклере РТС-100 (MJ Research Inc) по следующей схеме: в течении 2 минут проходила денатурация ДНК при 94 °С, затем следовали 29 циклов (30 сек 95 °С, 1 минута 56 °С, 40 сек 72 °С). После ПЦР реакционные смеси объединяли.

Для проведения реакции использовали следующие праймеры:

5'-(TAMRA)-GTAAAACGACGGCCAGT-3' (флуоресцентно меченный прямой праймер)

5'-CGATTTTTTGTGATGCTCGTCAGG-3' (обратный праймер)

В итоге получали дуплекс ДНК протяженностью 530 пар оснований.

• Очистка ДНК-дуплекса

Раствор ДНК очищали от примесей низкомолекулярных веществ путем высаливания. К реакционной смеси, содержащей синтезированный ДНК-дуплекс,

добавляли твердый перхлорат лития, доводя его до концентрации 2 М в конечном растворе. Центрифугировали при 14000 об/мин 5 минут. Отбирали супернатант, избавляясь таким образом от солей. Затем осаждали ДНК путем добавления трех объемов ацетона и инкубации в течение 10 минут при -80 °С. Смесь центрифугировали при 14000 об/мин 5 минут при 4 °С. Удаляли супернатант, оставляя осадок ДНК-дуплекса. Добавляли 1 мл ацетона и снова центрифугировали при 14000 об/мин 5 минут при 4 °С. Осадок ДНК-дуплекса растворяли в воде (miliQ).

• Горизонтальный электрофорез в агарозном геле

Полученный ДНК-дуплекс отделяли от побочных продуктов ПЦР путем электрофореза в 4% агарозном геле с ТАЕ-буфером. Состав буфера: 40 мМ трис-основания, 1 мМ ЭДТА, 20 мМ ледяной уксусной кислоты. Для нанесения ДНК в лунки агарозного геля использовали 6-кратный буфер, содержащий 30% глицерина, 2,5 мг/мл бромфенолового синего. Электрофорез проводили при напряжении электрического поля 2 В/см в течение 1 часа.

• Выделение ДНК-дуплекса из агарозного геля

После проведения электрофореза фрагмент агарозного геля с ДНК-дуплексом вырезали при ультрафиолетовом свете. ДНК-дуплекс выделяли из геля при помощи набора QIAquick Gel Extraction Kit #28106 (QUIAGEN) в соответствии с инструкцией производителя.

• Обработка ДНК-дуплекса рестриктазами

Для получения контрольной дорожки при электрофорезе в денатурирующих условиях, которая позволяет определить протяженность фрагментов дуплекса, полученных при обработке ДНКазой I, проводили обработку ДНК-дуплекса рестриктазами с известной локализацией сайтов рестрикции. Реакционная смесь объемом 25 мкл для каждой рестриктазы включала 2,5 мкл буфера для фермента, 1 мкл рестриктазы, 2,5 мкл 2 мкМ флуоресцентно меченной ДНК, 19 мкл воды (miliQ). Названия соответствующих буферов, поставляемых производителями, и условия реакции представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Рестриктазы, использованные в работе, соответствующие им реакционные буферы и условия проведения реакции

Рестриктаза	Буфер для фермента	Условия реакции
Hind III	W buffer (СибЭнзим)	1 час при 37 °С
Sbf I	CutSmart buffer (New England BioLabs)	1 час при 37 °С
Sal I	O buffer (СибЭнзим)	1 час при 37 °С
BamHI	G buffer (СибЭнзим)	1 час при 37 °С
KpnI	B buffer (СибЭнзим)	1 час при 37 °С
EcoICRI	G buffer (СибЭнзим)	1 час при 37 °С
EcoRI	G buffer (СибЭнзим)	1 час при 37 °С
PvuII	G buffer (СибЭнзим)	1 час при 37 °С

Реакцию останавливали инкубацией при 80 °С в течение 20 минут. Полученные смеси с рестрикционными фрагментами сливали в одну пробирку и впоследствии в качестве контроля наносили на гель по 10 мкл итоговой смеси при электрофорезе в денатурирующих условиях.

• Футпринтинг с использованием ДНКазы I

Перед проведением футпринтинга комплексов соединений с ДНК подбирали оптимальную концентрацию ДНКазы I.

Перед обработкой ДНКазой ДНК-дуплекс инкубировали в присутствии соединения для формирования комплекса вещества с молекулами ДНК. Для этого смешивали 2,5 мкл 0,8 мкМ флуоресцентно меченной ДНК, 1 мкл 10-кратного буфера для ДНКазы (Синтол), 4,5 мкл воды (miliQ) и 1 мкл необходимой концентрации соединения. Инкубацию в получившейся смеси объемом 9 мкл проводили при 37 °С в течение 15 минут. Затем добавляли 1 мкл 3,2 мЕ/мкл (концентрация, определенная при подборе оптимальной активности ДНКазы). Полученную реакционную смесь объемом 10 мкл инкубировали при 37 °С в течение 15 минут. Реакцию останавливали внесением 10 мкл формамида и инкубацией при 95 °С в течение 5 минут.

• Электрофорез в денатурирующих условиях.

Анализ проб проводили в денатурирующих условиях в ПААГ размером 20х20х0,04. ПААГ (12 %) содержал акриламид и N,N'-метиленбисакриламид (в соотношении 24:1), 7 М мочевины и 20% формамид. Электрофорез проходил в ТБЕ-буфере с температурой 70 – 80 °С при напряжении электрического поля 8 В/см в течение 40 минут. Визуализацию распределения ДНК проводили на приборе Typhoon 9410 Molecular Imager (GE Amersham). Максимум возбуждения и флуоресценции красителя TAMRA составляет 546 и 579 нм, соответственно.

• Метод расщепления ДНК микрококковой нуклеазой

Клетки клеточной линии HT1080 снимали с подложки с помощью растворов Версена и Трипсина, центрифугировали 4 минуты 1100 оборотов/мин и промывали осадок в 1× буфере RSB (10 mM Tris, pH7.6, 15 mM NaCl и 1.5mM MgCl₂). После повторного центрифугирования осадок клеток ресуспендировали в RSB-буфере с 1% Triton X-100 (5 мл на 20 млн. клеток) и держали на льду в течении 15 минут, после чего гомогенизировали. Ядра осаждали с помощью центрифугирования (5мин., 2000g, 4°C) и дважды промывали в 10 мл буфера А (15 mM Tris, pH 7.5, 15 mM NaCl, 60 mM KCl, 0.34 М сахароза, 0.5 mM спермидин, 0.15 mM спермин, 0.25 mM PMSF and 0.1% β-меркаптоэтанол). Затем ядра (из 20 млн. клеток) ресуспендировали в 1,5 мл буфера А с добавлением 15мкл 0,1М CaCl₂. Аликвоты с ядрами обрабатывали ДНК-тропными соединениями в максимальной (стоковой) концентрации и инкубировали в течении 30 минут при 37°C. Затем в каждую аликвоту добавляли 1мкл 24U/мл микрококковой нуклеазы и инкубировали при 37°C 15 минут. Останавливали реакцию 2мкл EDTA, после чего в каждую пробу добавляли 18мкл H₂O, 12 млк 10% SDS и 24 мкл 5М NaCl. Выделение ДНК проводили фенол-хлороформной экстракцией с преципитацией этанолом и анализировали в 1.5% агарозном геле с последующей окраской 0.5гр/мл этидиум бромидом в 1× TAE буфере в течение 30 минут и промывали гель 15 минут в дистиллированной воде перед анализом.

• Прижизненная микроскопия клеток

Для данного исследования были использованы клеточные линии HeLa SSRP1-GFP H2B-mCherry, HT1080 SPT16-GFP, H2B-mCherry и HT1080 H1-mCherry. Клетки культивировали в 48-луночных планшетах с прозрачным дном для визуализации от Mat-Tek Corporation (Ashland, MA, USA). Для наблюдения и анализа флюоресцентно-меченных субъединиц гистонового шаперона FACT и гистоновых белков H2B, H1, клетки обрабатывали ДНК-тропными соединениями и получали фотографии в нескольких временных точках после обработки с помощью инвертированного микроскопа Zeiss Axio Observer A1 с масляным объективом NAchroplan 100×/1.25 и камерой Zeiss MRC5 с программным обеспечением AxioVision Rel.4.8.

В некоторых случаях перед анализом флюоресценции клетки фиксировались в 4% параформальдегиде в течении 10 минут.

• Проточная цитофлуориметрия

Клетки клеточной линии HeLa T1 снимали с подложки с помощью растворов Версена и Трипсина, центрифугировали 4 минуты 1100 оборотов/мин и промывали осадок в 1× буфере PBS. Анализ клеток проводили на проточном цитометре BD LSRII UV A Cytometers (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). Полученные данные анализировали с помощью программы WinList 3D (Verity Software House, Topsham, ME, USA).

• Выделение РНК и обратная транскрипция

Выделение клеточной РНК проводили при использовании набора для выделения РНК RNeasy kit из клеточных культур и TRIzol reagent kit из тканей. Концентрацию РНК измеряли по ОП раствора с помощью бескуветного спектрофотометра NanoVue (GE Healthcare, США), длина волны - 260 нм. Об чистоте образца РНК судили по соотношению значений ОП раствора при длине волны 260 и 280 нм. Для получения кДНК проводили реакцию обратной транскрипции (ОТ). Для этого к 1 мкг РНК добавляли 0,4 мкг случайных гексамерных олигонуклеотидов, денатурировали и охлаждали на льду. В смесь для

ОТ входили: 2 ед. обратной транскриптазы MMLV, буфер для ОТ, 2 мМ дитиотрейтола, 0,5 ед. рибонуклеазного ингибитора, 0,5 мМ дНТФ, дистиллированной водой доводили объем до 20 мкл. Реакцию проводили при 37°C в течение 1 ч, реакцию останавливали при 95°C в течение 5 мин, затем добавляли 80 мкл воды и аликвоты использовали для проведения ПЦР со специфическими праймерами.

Последовательности праймеров указаны в таблице 13.

Таблица 13 - Последовательность используемых праймеров

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер
cMyc	GGGAGGCTATTCTGCCCATT	CTGAGTCGAGGTCATAGTTCCTG
Survivin	CCAGTGTTTCTTCTGCTTCAAGG	TCTCCGCAGTTTCCTCAAATTCT
CCND1	CTACCTTCCGCAGTGCTCCTA	CCCAGCCAAGAAACGGCTC
Rpl27	ACCGTCACCCCCGCAAAGTG	CCCGTCGGGCCTTGCGTTTA
WIF-1	GCGCCCAGCCGTCTAAA	CCTGGCGCCGTCAGATAC
DKK3	ATCAGAAGTGAACCTGGCAAA	CATTTGTCCAGTCTGGTTGTTGG
SFRP-1	CCATCATTGAACATCTCTGTGCC	CATTCTTCAGGTACAGCACAAGC
SFRP-2	CCTTTCGGACACACCGTTC	CCACCGAGGAAGCTCCAAA

• Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез проводили в 0.7 -2 %-ном агарозном геле (60 В, агароза «Fisher Biotech») в Трис-боратном буфере (pH 8, состав: 0,089 М Трис-НCl, 0,002 М EDTA, 0,089 М борной кислоты). При нанесении ДНК использовали 6-кратный буфер (0,25% бромфенолового синего, 30% глицерина, 0,25% ксилолцианола). Для определения молекулярного веса фрагментов ДНК использовали маркеры молекулярного веса pBR322/TaqI, pBR322/BsuRI, lambda/EcoRI, Hind III. ДНК визуализацию в агарозном геле с помощью окрашивания бромистым этидием.

• Реакция поли-АДФ-рибозилирования

Реакционную смесь, состоящую из ДНК-лиганда (10 нМ), белка PARP1 (0,1 ед.) и ингибитора инкубировали в 20 мкл буфера в течение 1 часа при 37 °C. Реакцию останавливали добавлением 3х буфера Blue и нагреванием. Реакционные смеси анализировали методом гель-электрофореза в 10% ДСН-ПААГ с 4%-м концентрирующим слоем. Анализ количества поли-АДФ-рибозы проводили с помощью вестерн-блоттинга.

• Электрофорез белков в полиакриламидном геле с SDS

Электрофорез белков в ПААГ с SDS проводили в соответствии с методом, описанном Лэммли [274]. Концентрирующий гель содержал 4% полиакриламида, разделяющий гель – 12%. На каждую дорожку наносили 30 мкг белка. Для определения молекулярной массы белков использовали маркер молекулярного веса Page Ruler Plus.

• Вестерн блоттинг

Для получения тотальных клеточных лизатов использовали буфер RIPA (10 mM Трис, pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,5% дезоксихолат натрия, 1% Тритон-X 100, 10% глицерин); цитоплазматическую и ядерную фракции белков выделяли при использовании буферов для выделения ядерной (20 mM Трис-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 400 mM NaCl, 1 mM ДТТ, 0,05% NP-40, 1 mM EDTA, 10% глицерин) и цитоплазматической (25 mM Трис-HCl, 5 mM KCl, 1 mM NaCl, 1 mM ДТТ, 1% NP-40) фракций соответственно. Концентрацию белка определяли с помощью реагента Bio-Rad Protein Assay («Bio-Rad», США). Белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с SDS и переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Thermo Fisher», США). Для иммуноблоттинга использовали антитела к PARP1 («Santa Cruz Biotechnology», США), SSRP1, SPT116 («BioLegend», США), антитела к поли(АДФ-рибозе) (clone 10H, «Tulip BioLabs», США), DNMT1 (H-300), DNMT3A (H-295), и DNMT3B (H-230) («Santa Cruz Biotechnology», США), HDAC1 (ab19845), HDAC2 (ab16032), HDAC3 (ab16047), HDAC4 (ab12172), H3 (ab1791), H4 (ab10158), H3K9me3 (ab8898), H3K4me3 (ab8580), H4K20me3 (ab9053) («Abcam», США); H3 (07-677-I) и H4(06-598) («Millipore», США). В работе использовались вторичные козы антигены против IgG кролика (31462, Pierce, США) и мыши (ab47827, Abcam, США). Для предотвращения неспецифической сорбции мембраны в течение 1 ч инкубировали с 5%-ным раствором блокирующего агента Blotto («Bio-Rad», США) в TBS-буфере (20 mM Трис-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl), затем инкубировали с первичными антителами в течение 6 ч при комнатной температуре. Мембраны отмывали и

инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой, образовавшиеся комплексы проявляли хемилюминесцентным реагентом. Визуализацию сигнала проводили с помощью прибора для геледокументирования ImageQuant LAS4000. Количественный анализ изображений проводили с помощью открыто распространяемого пакета программ ImageJ.

• Анализ метилирования методом бисульфитного секвенирования

Профиль метилирования отдельных областей интегрированного в клетку вируса оценивали методом бисульфитного секвенирования. Суммарную геномную ДНК выделяли из инфицированных клеток, содержащих интегрированный ретровирусный геном, используя DNeasy («Qiagen», США). Реакцию бисульфитной обработки проводили с использованием EZ DNA Methylation Gold (Zymo Research, США) согласно протоколу производителя, при условиях, приводящих к полной конверсии цитозина в урацил (98°C – 10 минут; 53°C - 4 часа). Таким образом модифицированную ДНК использовали для дальнейшей ПЦР используя GoTag Flexi DNA polymerase («Promega», США), с праймерами к выбранной области. Последовательность праймеров подбирали таким образом, что она не содержала CG пар и соответствовала полностью конвертированной в процессе бисульфитной обработки ДНК. Ниже приведены последовательности праймеров, использованных в работе и условия ПЦР.

Для области LTR промотора использовали: Fw GTAATATGTTTTATAAGGAGAGAAAAAG; Rev AAAACCTTCTACTTCATACA AATACTC; 94°C- 3 мин, 30 циклов (94°C-30с, 54°C -40с, 70°C -30с), 72°C -3 мин.

Продукты амплификации были вырезаны из геля и очищены с использованием Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research, США). Клонирование в pGEM-T Easy вектор проводили с использованием pGEM-T Easy Vector System (Promega, США) и компетентных клеток Z-Competene E. Coli Cells - Strain Zymo 5α согласно протоколу производителя. Для каждой области было проанализировано секвенированием 10-20 клонов. Профиль метилирования для каждой области был получен путем сравнения сиквенсов ДНК после бисульфитной обработки с немодифицированной ДНК.

• Анализ метилирования методом ELISA

Общий уровень метилирования ДНК в клетках оценивали методом иммуноферментного анализа ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) с использованием белковых метил-связывающих доменов и антител к метилированной ДНК. Согласно протоколу производителя, MethylFlash Methylated DNA Quantification («Epigentek», США) для оптимального определения метилирования использоавали 0,1мкг ДНК. Положительный (метилированная ДНК) и отрицательный (неметилированная ДНК) использовались согласно протоколу и входили в состав предоставляемых реагентов. В лунки 96-луночного планшета для проведения иммуноанализа сорбировали антиген (0,1мкг ДНК) в лунку в 100 мкл связывающего буфера (PBS). Инкубация проводилась в течение 30 минут при комнатной температуре и встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов.

Отмывка несвязавшихся молекул антигена (ДНК) и блокирования мест неспецифического связывания осуществлялась фосфатно-солевым буфером содержащим 0.1% Tween-20 (PBST). Далее проводилась инкубация со специфическими антителами к метилированной ДНК в течение 60 минут при комнатной температуре и встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов. Отмывка несвязавшихся молекул антител проводилась 3 раза с использованием отмывочного буфера. Добавление антивидовых антител, конъюгированных с ферментной меткой, проводилась в течение 30 минут при комнатной температуре и встряхивании на горизонтальном шейкере для планшетов. Пероксидаза хрена катализирует реакцию окисления субстрата перекисью водорода. В качестве субстрата пероксидазы хрена используется о-фенилендиамин (ОФД). В результате прохождения реакции образуется окрашенный продукт окисления ОФД. Перед измерением оптической плотности проводилась остановка цветной реакции с помощью 0.5 М H₂SO₄. Оптическая плотность раствора окрашенного продукта измеряется при $\lambda=450\text{nm}$ с использованием планшетного спектрофотометра. Относительный уровень метилирование ДНК оценивали по формуле:

$$5-mC\% = \frac{(sampleOD - ME3OD)/S}{(ME4OD - ME3OD) \times 2^*/P} \times 100\%, \text{ где } S - \text{ количество ДНК (нг); } P -$$

положительный контроль (нг); 2^* - фактор нормализации положительного контроля к 100% (положительный контроль содержит 50% 5-mC); ME3OD – оптическая плотность отрицательного контроля; ME4OD - оптическая плотность положительного контроля.

• Определение активности люциферазы

Активность люциферазы определяли, смешивая 10 мкл тотального клеточного лизата с 60 мкл буфера, содержащего субстрат для люциферазы, и измеряя люминесценцию на люминометре «Turner Biosystems 20/20» (США).

• Бактериальный тест на мутагенную активность Эймса

Изучение потенциальной мутагенной активности было проведено в соответствии с рекомендациями авторов теста [180]. Были использованы индикаторные штаммы *Salmonella typhimurium* TA98 (генотип hisD3052 rfa uvrB/pKM101) и TA100 (генотип hisG46 rfa uvrB/pKM101). Индукция ферментов микросомного окисления была осуществлена с помощью предварительного введения крысам линии «Вистар» смеси полихлорированных бифенилов «Совол» однократно, в дозе 300 мг/мл внутрибрюшинно, за 5 суток до забоя [194]. После забоя животных вскрывали, извлекали печень, ткань печени гомогенизировали и центрифугировали при 9000 об/мин, в течение 10 мин, при 4°C. Супернатант отбирали и использовали в качестве источника микросомных белков (фракция S9). Микросомная активирующая смесь состояла из 6 мг/мл белка фракции S9, 4 мМ НАДФ, 5 мМ глюкозо-6-фосфата, 33 мМ KCl, 8 мМ MgCl₂ и 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,4. В 0,7% L-агар без гистидина последовательно вносили 0,1 мл препарата необходимой концентрации, 0,1 мл суспензии бактерий, 0,5 мл микросомной активирующей смеси (либо соответствующий объем буфера). После полного застывания L-агара чашки Петри помещали в термостат при 37°C. Учёт результатов проводили через 48-72 часа инкубации. В качестве положительных контролей были использованы вещества, индуцирующие мутации у соответствующих штаммов-тестеров при наличии или в отсутствие активации

смесью S9. Для вариантов тестирования без активирующей смеси был использован азид натрия и 2,7-диамино-4,9-диокси-5,10-диоксо-4,5,9,10-тетрагидро-4,9-диазапирен (ДДДТДП) [275]. При использовании активирующей фракции S9, ее активность контролировали по эффекту бенз(а)пирена и 2-аминофлуорена (2-АФ). Стоковые растворы тестируемых соединений готовили в стерильном ДМСО; для приготовления дальнейших разведений использовали стерильную бидистиллированную воду. Мутагенный эффект считался положительным при двукратном превышении числа мутантных колоний в опыте по сравнению с соответствующим контролем.

• Анализ хромосомных aberrаций

Изучение генотоксического действия препаратов в тесте учёта хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей осуществляли на линии мышей C57Bl/6 массой тела 18-20 г, согласно современным методическим указаниям. С этой целью был использован стандартизированный и модифицированный в ВНИЦ БАБ метод Ford C. E., Hamerton J.L., позволяющий проводить учёт и анализ клеток костного мозга млекопитающих на стадии метафазы.

Фиксацию клеток костного мозга мышей проводили спустя 24 часа после последнего введения препарата. На каждый опытный и контрольный варианты брали не менее 5 животных и анализировали не менее 100 метафазных пластинок от каждого. Для анализа отбирали метафазные пластинки с хорошим разбросом хромосом, без продольных наложений и модульным числом 40. Анализ проводили на микроскопах, используя иммерсионные объективы с зеленым фильтром.

Процедура приготовления препаратов на стадии метафазы состояла в следующем. За 2-3 часа до забоя животным вводили 0,04% раствор колхицина из расчёта 0,1 мл на 10 г массы тела животных. Клетки костного мозга из обеих бедренных костей вымывали с помощью шприца культуральной средой DMEM (ПанЭко, Россия), полученную клеточную суспензию центрифугировали в течение 10 мин. при 1000 об/мин при комнатной температуре. Супернатант сливали, к осадку добавляли нагретый до 37° С гипотонический раствор (0.56% раствор хлорида калия) и инкубировали при 37° С в течение 10-15 мин. После инкубации

клеточную суспензию центрифугировали в течение 10 мин. при 1000 об/мин при комнатной температуре, супернатант сливали и добавляли фиксатор (смесь этанола и ледяной уксусной кислоты в соотношении 3:1), приготовленный *ex tempore*. Смену фиксатора проводили 3 раза. Из последнего фиксатора суспензию клеток раскапывали на предметные стекла, предварительно вымытые и охлажденные. Все процедуры после смены гипотонического раствора на фиксатор проводили при 0-4°C. Окрашивали хромосомы красителем Гимза (ПанЭко, Россия) в течение 5-15 мин.

При метафазном анализе клеток костного мозга учитываются одиночные и парные делеции, хроматидные и хромосомные обмены и другие нарушения хромосом, в соответствии с рекомендациями.

• **Тест на соматические мутации и рекомбинации (SMART) на *Drosophila melanogaster*.**

В используемой модификации теста SMART гетерозигот wtsP4/+ получали путем скрещивания: ♀ w; wtsP4/TM3 (получена от P.Bryant) X ♂ D-32(дикая линия). Родителей скрещивали массово, помещая по 10 самок и 5 самцов в пробирки со стандартной питательной средой на 36 – 40 ч. Личинок первого возраста F1 обрабатывали испытуемыми соединениями из расчёта 0,2 мл раствора тестируемого вещества на пробирку. В качестве контроля использовали 10% водный раствор ДМСО. Концентрации соединений были подобраны на основании предварительных экспериментов, исходя из токсических и мутагенных свойств агента. Взрослых самцов и самок из F1 просматривали под бинокулярной лупой на наличие опухолей. Подсчитывали количество просмотренных особей (N), количество опухолевых клонов (ОК), рассчитывали частоту опухолей на 100 особей $p = (ОК/Н) \times 100\%$.

• **Изучение противоопухолевой активности ДНК-тропных соединений**

Все эксперименты на животных проводили в соответствии с требованиями Этического комитета ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» МЗ РФ по работе с животными. Животных содержали в стандартных условиях со свободным доступом к корму и воде (стерильная питьевая вода). В качестве основного корма

были использованы стандартизованные брикетированные гранулированные корма для мышей. Показатели массы тела регистрировали ежедневно в течение всего эксперимента. Распределение мышей по группам, время перевивки опухолей и схемы введения препаратов подробно описаны в соответствующих главах.

Исследования проводили на перевиваемых опухолях (аденокарцинома толстой кишки АКАТОЛ, лимформа Р388 и саркома матки См322) по стандартной методике. Для получения достаточного количества перевиваемого материала, образец опухолевой ткани получали из банка опухолевых штаммов ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н.Блохина» Минздрава России и перевивали подкожно мышам. После развития видимых опухолевых узлов измеряли их длину, ширину и глубину и производили расчет объема опухоли. Критериями противоопухолевой активности исследуемых соединений являлись: время появления первого узелка, динамика роста объема опухоли, продолжительность жизни животных.

• Гистологический и иммуногистохимический анализ

Для подготовки гистологических срезов использовали стандартный протокол гистологического анализа: после выделения ткани фиксировали в забуференном 10% формалине («BioVitrum», Россия) в течение не менее 3-х суток. Затем образцы тканей обезвоживали спиртами (70°; 96° – 1, 96° – 2; 100° – 1, 100° – 2), хлороформом, заливали в гистомикс (Histomix extra, «BioVitrum», Россия). Удаление парафина и окрашивание гистологических препаратов проводили по следующей схеме: Ксилол – 1; Ксилол – 2; спирты (100°, 96°, 70°), гематоксилин-эозин. Обезвоживание и заключение препаратов в бальзам проводили по следующей схеме: спирты (100°, 96°, 70°); Ксилол – 1; Ксилол – 2; монтирующая среда Bio-Mount.

• Статистическая обработка данных

Средние значения и среднеквадратичные отклонения рассчитывали с помощью пакета программ Microsoft Excel. При проведении экспериментов на *D.melanogaster* с использованием теста на соматический мутагенез и рекомбинацию для выявления статистически значимых различий использовали критерий Фишера, при анализе противоопухолевой активности и при проведении

экспериментов по выявлению антиканцерогенного действия CBL0137 – критерий χ^2 Пирсона, при анализе различий продолжительности жизни животных в группах использовали логарифмический ранговый тест, в остальных разделах работы применяли t-критерий Стьюдента.

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 INF- α . 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 FACT.

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, связанную с модификацией гистонов и метилированием ДНК.

7. Производное карбазола кураксин обладает значимой антиканцерогенной и противоопухолевой активностью относительно рака кишечника, что связано с его противовоспалительным действием 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.

9. 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.

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 противолопухолевой терапии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AhR – рецептор ароматических углеводородов (aryl hydrocarbon receptor)

AMP – аденозиннуклеотидмонофосфат

BER – эксцизионная репарация оснований (base excision repair)

cAMP – циклический AMP (cyclic AMP)

CCND1 – циклин D1

CCND2 – циклин D2

CdK – циклин-зависимая киназа (cyclin-dependent kinase)

CHK – чекпойнт-киназа

CMV – цитомегаловирус

COX-2 – циклооксигеназа 2

CYP – цитохром P450

CYP11B1 – цитохром P450-зависимой 11 β -гидроксилаза

DKK1 – Dickkopf1

Dox – доксорубицин

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота

EGFR – эпидермальный фактор роста (Epidermal growth factor)

FKBP51 – белок 51, связывающий FK506 (FK506 binding protein)

GAPDH – глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа

HDAC – гистоновая деацетилаза

HIF1 α – фактор, индуцируемого гипоксией 1 α (Hypoxia induced factor 1 α)

IFN – интерферон

iNOS – индуцибельная синтаза оксида азота (Inducible nitric oxide synthase)

MDR – множественная лекарственная устойчивость (Multidrug resistance)

MTS – (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2H-тетразолиум

MTT – 3-(4,5-диметилтиазолил-2-ел)-2,5-дифенилтетразолиум бромид

NER – эксцизионная репарация нуклеотидов (Nucleotide excision repair)

NF- κ B – ядерный фактор каппа B

NGS – полногеномное секвенирование нового поколения (Next generation sequencing)

PARP – полимераза поли(АДФ-рибозы)

PBS – фосфорно-солевой буфер

PI – йодистый пропидий

Rpl27 – рибосомальный белок L27

RpS6 – рибосомный белок S6

SDS – натрий додецилсульфат

STAT – белки из семейства передачи сигнала и активации транскрипции (Signal transducer and activator of transcription)

TNF α – фактор некроза опухоли α

Top1 – топоизомераза 1

TPA – 12-О-тетрадеканойлфорбол-13-ацетат

VEGF – фактор роста сосудов (Vascular-endotelial growth factor)

мРНК – матричная РНК

ДМСО – диметилсульфоксид

ДТТ – дитиотрейтол

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

МАИР – международное агентство по изучению рака

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

ОМЛ – острый миелолейкоз

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РМЖ – рак молочной железы

УБЛ – узкобороздочные лиганды

ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lerman, L.S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines / L.S. Lerman // J. Mol. Biol. – 1961. – Vol. 3. – P. 18-30.
2. Nakamoto, K. Drug-DNA interactions: structures and spectra / K. Nakamoto, M. Tsuboi, G.D. Strahan // Methods Biochem. Anal. – 2008. – Vol. 51. – P. 1-366.
3. Neto, B.A. Recent developments in the chemistry of deoxyribonucleic acid (DNA) intercalators: principles, design, synthesis, applications and trends / B.A. Neto, A.A. Lapis // Molecules. – 2009. – Vol. 14, N 5. – P. 1725-1746.
4. Mukherjee, A. Drug-DNA intercalation: from discovery to the molecular mechanism / A. Mukherjee, W.D. Sasikala // Adv. Protein. Chem. Struct. Biol. – 2013. – Vol. 92. – P. 1-62.
5. Hurwitz, J. The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. III. The inhibition of the enzymatic synthesis of ribonucleic acid and deoxyribonucleic acid by actinomycin D and proflavin / J. Hurwitz, J.J. Furth, M. Malamy et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1962. – Vol. 48. – P. 1222-1230.
6. Sobell, H.M. Actinomycin and DNA transcription / H.M. Sobell // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1985. – Vol. 82, N 16. – P. 5328-5331.
7. Waring, M.J. The effects of antimicrobial agents on ribonucleic acid polymerase / M.J. Waring // Mol. Pharmacol. – 1965. – Vol. 1, N 1. – P. 1-13.
8. Ferguson, L.R. Genotoxicity of non-covalent interactions: DNA intercalators / L.R. Ferguson, W.A. Denny / L.R. Ferguson // Mutat. Res. – 2007. – Vol. 623, N 1-2. – P. 14-23.
9. Pang, B. Drug-induced histone eviction from open chromatin contributes to the chemotherapeutic effects of doxorubicin / B. Pang, X. Qiao, L. Janssen et al. // Nat. Commun. – 2013. – Vol. 4. – P. 1908.
10. Pommier, Y. Drugging topoisomerases: lessons and challenges / Y. Pommier // ACS Chem. Biol. – 2013. – Vol. 8, N 1. – P. 82-95.
11. Bacherikov, V.A. Synthesis and antitumor activity of 5-(9-acridinylamino)anisidine derivatives / V.A. Bacherikov, J.Y. Chang, Y. Lin et al. // Bioorg. Med. Chem. – 2005. – Vol. 13, N 23. – P. 6513-6520.

12. Horstmann, M.A. Amsacrine combined with etoposide and high-dose methylprednisolone as salvage therapy in acute lymphoblastic leukemia in children / M.A. Horstmann, W.A. Hassenpflug, U. zur Stadt et al. // *Haematologica*. – 2005. – Vol. 90, N 12. – P. 1701-1703.
13. Arcamone, F. Adriamycin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius* / F. Arcamone, G. Cassinelli, G. Fantini et al. // *Biotechnol Bioeng*. – 1969. – Vol. 11, N 6. – P. 1101-1110.
14. Weiss, R.B. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? / R.B. Weiss // *Semin Oncol*. – 1992. – Vol. 19, N 6. – P. 670-686.
15. Harousseau, J.L. Treatment of relapsed acute myeloid leukemia with idarubicin and intermediate-dose cytarabine / J.L. Harousseau, J. Reiffers, P. Hurlteloup et al. // *J. Clin. Oncol*. – 1989. – Vol. 7, N 1. – P. 45-49.
16. Oki, T. Antitumor anthracycline antibiotics, aclacinomycin a and analogues. II. Structural determination / T. Oki, I. Kitamura, Y. Matsuzawa et al. // *J. Antibiot (Tokyo)*. – 1979. – Vol. 32, N 8. – P. 801-819.
17. Larsen, A.K. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy / A.K. Larsen, A.E. Escargueil, A. Skladanowski // *Pharmacol. Ther.* – 2003. – Vol. 99, N 2. – P. 167-181.
18. Hollstein, U. Actinomycin. Chemistry and mechanism of action / U. Hollstein // *Chem. Reviews*. – 1974. – Vol. 74, N 6. – P. 625-652.
19. Kopka, M.L. The molecular origin of DNA-drug specificity in netropsin and distamycin / M.L. Kopka, C.Yoon, D. Goodsell et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 1985. – Vol. 82, N 5. – P. 1376-1380.
20. Miskovic, K. Antineoplastic DNA-binding compounds: intercalating and minor groove binding drugs / K. Miskovic, M. Bujak, M. Baus Loncar et al. // *Arh. Hig. Rada Toksikol*. – 2013. – Vol. 64, N 4. – P. 593-602.
21. Hasanzadeh, M. Pharmacogenomic study using bio- and nanobioelectrochemistry: Drug-DNA interaction / M. Hasanzadeh, N. Shadjou // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl*. – 2016. – Vol. 61. – P. 1002-1017.

22. Карпеченко, Н.Ю. Визуализация ДНК при гель-электрофорезе флуоресцентным красителем SYBRGold по протоколу предокрашивания / Н.Ю. Карпеченко, В.К. Гасанова, Н.В. Ряднинская и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2012. – Т. 10. – С. 5.
23. Wilson, W.D. Binding of 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) to GC and mixed sequences in DNA: intercalation of a classical groove-binding molecule / W.D. Wilson, F.A. Tanious, H.J. Barton et al. // J. Am. Chem. Society. – 1989. – Vol. 111, N 13. – P. 5008-5010.
24. Vekshin, N. Binding of Hoechst with nucleic acids using fluorescence spectroscopy / N. Vekshin // J. Biophys. Chem. – 2011. – Vol. 02, N. 04. – P. 4.
25. Baraldi, P.G. DNA minor groove binders as potential antitumor and antimicrobial agents / P.G. Baraldi, A. Bovero, F. Fruttarolo et al. // Med. Res. Rev. – 2004. – Vol. 24, N 4. – P. 475-528.
26. Kraut, E.H. Phase II study of pibenzimol in pancreatic cancer. A Southwest Oncology Group study / E.H. Kraut, T. Fleming, M. Segal et al. // Invest. New Drugs. – 1991. – Vol. 9, N 1. – P. 95-96.
27. Arcamone, F. Structure and syntethesis of Distamycin A / F. Arcamone, S. Penco, P. Orezzi et al. // Nature. – 1964. – Vol. 203. – P. 1064-1065.
28. Dimarco, A. Experimental studies on distamycin A--a new antibiotic with cytotoxic activity / A. Dimarco, M. Gaetani, P. Orezzi et al. // Cancer Chemother. Rep. – 1962. – Vol. 18. – P. 15-19.
29. Finlay, A.C. Netropsin, a New Antibiotic Produced by a Streptomyces / A.C. Finlay, F.A. Hochstein, B.A. Sobin et al. // J. Am. Chem. Society. – 1951. – Vol. 73, N 1. – P. 341-343.
30. Suckling, C. From multiply active natural product to candidate drug? Antibacterial (and other) minor groove binders for DNA / C. Suckling // Future Med. Chem. – 2012. – Vol. 4, N 8. – P. 971-989.
31. Белицкий, Г.А. Трабектедин – лиганд узкой бороздки ДНК / Г.А. Белицкий, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая и др. // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. – Т. 2, № 2. – С. 9.

32. Broggin, M. Selective DNA interaction of the novel distamycin derivative FCE 24517 / M. Broggin, E. Erba, M. Ponti et al. // *Cancer Res.* – 1991. – Vol. 51, N 1. – P. 199-204.

33. Herzig, M.C. Tallimustine lesions in cellular DNA are AT sequence-specific but not region-specific / M. C. Herzig, A.V. Trevino, B. Arnett // *Biochemistry.* – 1999. – Vol. 38, N 42. – P. 14045-14055.

34. Punt, C.J. Tallimustine in advanced previously untreated colorectal cancer, a phase II study / C.J. Punt, Y. Humblet, E. Roca et al. // *Br. J. Cancer.* – 1996. – Vol. 73, N 6. – P. 803-804.

35. Viallet, J. Tallimustine is inactive in patients with previously treated small cell lung cancer. A phase II trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group / J. Viallet, D. Stewart, F. Shepherd et al. // *Lung Cancer.* – 1996. – Vol. 15, N 3. – P. 367-373.

36. Geroni, C. Brostallicin, a novel anticancer agent whose activity is enhanced upon binding to glutathione / C. Geroni, S. Marchini, P. Cozzi et al. // *Cancer Res.* – 2002. – Vol. 62, N 8. – P. 2332-2336.

37. Leahy, M. Brostallicin, an agent with potential activity in metastatic soft tissue sarcoma: a phase II study from the European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group / M. Leahy, I. Ray-Coquard, J. Verweij et al. // *Eur. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 43, N 2. – P. 308-315.

38. Gelderblom, H. Brostallicin versus doxorubicin as first-line chemotherapy in patients with advanced or metastatic soft tissue sarcoma: an European Organisation for Research and Treatment of Cancer Soft Tissue and Bone Sarcoma Group randomised phase II and pharmacogenetic study / H. Gelderblom, J.Y. Blay, B.M. Seddon et al. // *Eur. J. Cancer.* – 2014. – Vol. 50, N 2. – P. 388-396.

39. Qiu, G. Pentamidine sensitizes chronic myelogenous leukemia K562 cells to TRAIL-induced apoptosis / G. Qiu, J. Jiang, X.S. Liu // *Leuk Res.* – 2012. – Vol. 36, N 11. – P. 1417-1421.

40. Jung, H.J. Pentamidine reduces expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in DU145 and MDA-MB-231 cancer cells / H.J. Jung, S.I. Suh, M.H. Suh et al. // *Cancer Lett.* – 2011. – Vol. 303, N 1. – P. 39-46.
41. Chow, T.Y. The DNA double-stranded break repair protein endo-exonuclease as a therapeutic target for cancer / T.Y. Chow, M.A. Alaoui-Jamali, C. Yeh et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2004. – Vol. 3, N 8. – P. 911-919.
42. Pathak, M.K. Pentamidine is an inhibitor of PRL phosphatases with anticancer activity / M.K. Pathak, D. Dhawan, D.J. Lindner et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2002. – Vol. 1, N 14. – P. 1255-1264.
43. Zerbini, L.F. Computational repositioning and preclinical validation of pentamidine for renal cell cancer / L.F. Zerbini, M.K. Bhasin, J.F. de Vasconcellos et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2014. – Vol. 13, N 7. – P. 1929-1941.
44. Gasparian, A.V. Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF-kappaB and activate p53 by targeting FACT / A.V. Gasparian, C.A. Burkhart, A.A. Purmal et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2011. – Vol. 3, N 95. – P. 95ra74.
45. Leonova, K. TRAIN (Transcription of Repeats Activates INterferon) in response to chromatin destabilization induced by small molecules in mammalian cells / K. Leonova, A. Safina, E. Nesher et al. // *Elife.* – 2018. – Vol. 7.
46. Nesher, E. Role of Chromatin Damage and Chromatin Trapping of FACT in Mediating the Anticancer Cytotoxicity of DNA-Binding Small-Molecule Drugs / E. Nesher, A. Safina, I. Aljahdali et al. // *Cancer Res.* – 2018. – Vol. 78, N 6. – P. 1431-1443.
47. Carter, D.R. Therapeutic targeting of the MYC signal by inhibition of histone chaperone FACT in neuroblastoma / D.R. Carter, J. Murray, B.B. Cheung et al. // *Sci. Transl. Med.* – 2015. – Vol. 7, N 312. – P. 312ra176.
48. De, S. The FACT inhibitor CBL0137 Synergizes with Cisplatin in Small-Cell Lung Cancer by Increasing NOTCH1 Expression and Targeting Tumor-Initiating Cells / S. De, D.J. Lindner, C.J. Coleman et al. // *Cancer Res.* – 2018. – Vol. 78, N 9. – P. 2396-2406.

49. Chen, A.Y. DNA minor groove-binding ligands: a different class of mammalian DNA topoisomerase I inhibitors / A.Y. Chen, C. Yu, B. Gatto et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1993. – Vol. 90, N 17. – P. 8131-8135.

50. Hondele, M. Structural basis of histone H2A-H2B recognition by the essential chaperone FACT / M. Hondele, T. Stuwe, M. Hassler et al. // *Nature*. – 2013. – Vol. 499, N 7456. – P. 111-114.

51. Bruhn, S.L. Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin / S.L. Bruhn, P.M. Pil, J.M. Essigmann et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1992. – Vol. 89, N 6. – P. 2307-2311.

52. Brewster, N.K. Characterization of the CP complex, an abundant dimer of Cdc68 and Pob3 proteins that regulates yeast transcriptional activation and chromatin repression / N.K. Brewster, G.C. Johnston, R.A. Singer // *J. Biol. Chem.* – 1998. – Vol. 273, N 34. – P. 21972-21979.

53. Fox, K.R. Footprinting studies on the sequence-selective binding of pentamidine to DNA / K.R. Fox, C.E. Sansom, M.F. Stevens // *FEBS Lett.* – 1990. – Vol. 266, N 1-2. – P. 150-154.

54. Sun, T. Pentamidine binds to tRNA through non-specific hydrophobic interactions and inhibits aminoacylation and translation / T. Sun, Y. Zhang // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – Vol. 36, N 5. – P. 1654-1664.

55. Brown, D.G. Crystal structure of a berenil-d(CGCAAATTTGCG) complex. An example of drug-DNA recognition based on sequence-dependent structural features / D.G. Brown, M.R. Sanderson, E. Garman // *J. Mol. Biol.* – 1992. – Vol. 226, N 2. – P. 481-490.

56. Sbirkova-Dimitrova, H.I. Crystal structure of the DNA sequence d(CGTGAATTCACG)₂ with DAPI / H.I. Sbirkova-Dimitrova, B. Shivachev // *Acta Crystallogr. F Struct. Biol. Commun.* – 2017. – Vol. 73, N Pt 9. – P. 500-504.

57. Sriram, M. Conformation of B-DNA containing O6-ethyl-G-C base pairs stabilized by minor groove binding drugs: molecular structure of d(CGC[e6G]AATTCGCG complexed with Hoechst 33258 or Hoechst 33342 / M.

Sriram, G.A. van der Marel, H.L. Roelen et al. // *EMBO J.* – 1992. – Vol. 11, N 1. – P. 225-232.

58. Poccia, D.L. Activity of a DNA topoisomerase (nicking-closing enzyme) during sea urchin development and the cell cycle / D.L. Poccia, D. LeVine, J.C. Wang // *Dev. Biol.* – 1978. – Vol. 64, N 2. – P. 273-283.

59. Pommier, Y. Interfacial inhibitors of protein-nucleic acid interactions / Y. Pommier, C. Marchand // *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* – 2005. – Vol. 5, N 4. – P. 421-429.

60. Lord, C.J. The DNA damage response and cancer therapy / C.J. Lord, A. Ashworth // *Nature.* – 2012. – Vol. 481, N 7381. – P. 287-294.

61. Савинкова, А.В. Варианты и перспективы перепрофилирования лекарственных препаратов для использования в терапии онкологических заболеваний / А.В. Савинкова, Е.М. Жидкова, Л.Р. Тилова и др. // *Сибирский онкологический журнал.* – 2018. – Т. 17, № 3. – С. 11.

62. Wojcik, K. Daunomycin, an antitumor DNA intercalator, influences histone-DNA interactions / K. Wojcik, M. Zarebski, A. Cossarizza et al. // *Cancer Biol. Ther.* – 2013. – Vol. 14, N 9. – P. 823-832.

63. Hajihassan, Z. Studies on the binding affinity of anticancer drug mitoxantrone to chromatin, DNA and histone proteins / Z. Hajihassan, A. Rabbani-Chadegani // *J. Biomed. Sci.* – 2009. – Vol. 16. – P. 31.

64. Dellaire, G. High resolution imaging of changes in the structure and spatial organization of chromatin, gamma-H2A.X and the MRN complex within etoposide-induced DNA repair foci / G. Dellaire, R. Kepkay, D.P. Bazett-Jones // *Cell Cycle.* – 2009. – Vol. 8, N 22. – P. 3750-3769.

65. Selvi, B.R. Sanguinarine interacts with chromatin, modulates epigenetic modifications, and transcription in the context of chromatin / B.R. Selvi, S.K. Pradhan, J. Shandilya et al. // *Chem. Biol.* – 2009. – Vol. 16, N 2. – P. 203-216.

66. Rabbani-Chadegani, A. Investigation of the interaction between berberine and nucleosomes in solution: Spectroscopic and equilibrium dialysis approach / A. Rabbani-

Chadegani, H. Mollaei, J. Sargolzaei // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2017. – Vol. 173. – P. 418-424.

67. Koman, I.E. Targeting FACT complex suppresses mammary tumorigenesis in Her2/neu transgenic mice / I.E. Koman, M. Commane, G. Paszkiewicz // *Cancer Prev. Res. (Phila).* – 2012. – Vol. 5, N 8. – P. 1025-1035.

68. Safina, A. FACT is a sensor of DNA torsional stress in eukaryotic cells / A. Safina, P. Cheney, M. Pal et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Vol. 45, N 4. – P. 1925-1945.

69. Кирсанов, К.И. Влияние ДНК-тропных антиканцерогенных соединений на механизмы регуляции экспрессии генов / К.И. Кирсанов, О.А. Власова, Т.И. Фетисов, М.Г. Якубовская и др. // *Успехи молекулярной онкологии.* – 2018. – Т. 5, № 4. – С. 23.

70. Любителев, А.В. Структуры и функции линкерных гистонов / А.В. Любителев, Д.В. Никитин, А.К. Шайтан и др. // *Биохимия.* – 2016. – Т. 81, № 3. – С. 10.

71. Happel, N. Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function / N. Happel, D. Doenecke // *Gene.* – 2009. – Vol. 431, N 1-2. – P. 1-12.

72. Alvarez-Gonzalez, R. Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo / R. Alvarez-Gonzalez, M.K. Jacobson // *Biochemistry.* – 1987. – Vol. 26, N 11. – P. 3218-3224.

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

74. Hakme, A. The expanding field of poly(ADP-ribosyl)ation reactions. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series / A. Hakme, H.K. Wong, F. Dantzer et al. // *EMBO Rep.* – 2008. – Vol. 9, N 11. – P. 1094-1100.

75. Pion, E. DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation / E. Pion, G.M. Ullmann, J.C. Ame // *Biochemistry.* – 2005. – Vol. 44, N 44. – P. 14670-14681.

76. Grimaldi, G. ADP-ribosylation and intracellular traffic: an emerging role for PARP enzymes / G. Grimaldi, D. Corda // *Biochem. Soc. Trans.* – 2019. – Vol. 47, N 1. – P. 357-370.
77. Bai, P. The role of PARP-1 and PARP-2 enzymes in metabolic regulation and disease / P. Bai, C. Canto // *Cell Metab.* – 2012. – Vol. 16, N 3. – P. 290-295.
78. Gagne, J.P. Structural biology. PARP-1 activation--bringing the pieces together / J.P. Gagne, M. Rouleau, G.G. Poirier // *Science.* – 2012. – T. 336, N 6082. – P. 678-679.
79. Rouleau, M. PARP inhibition: PARP1 and beyond / M. Rouleau, A. Patel, M.J. Hendzel et al. // *Nat. Rev. Cancer.* – 2010. – Vol. 10, N 4. – P. 293-301.
80. Boamah, E.K. Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 (PARP-1) regulates ribosomal biogenesis in *Drosophila* nucleoli / E.K. Boamah, E. Kotova, M. Garabedian et al. // *PLoS Genet.* – 2012. – Vol. 8, N 1. – P. e1002442.
81. Winstall, E. Preferential perinuclear localization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase / E. Winstall, E.B. Affar, R. Shah et al. // *Exp. Cell. Res.* – 1999. – Vol. 251, N 2. – P. 372-378.
82. Tulin, A. *Drosophila* poly(ADP-ribose) glycohydrolase mediates chromatin structure and SIR2-dependent silencing / A. Tulin, N.M. Naumova, A.K. Menon et al. // *Genetics.* – 2006. – Vol. 172, N 1. – P. 363-371.
83. Pinnola, A. Nucleosomal core histones mediate dynamic regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 protein binding to chromatin and induction of its enzymatic activity / A. Pinnola, N. Naumova, M. Shah et al. // *J. Biol. Chem.* – 2007. – Vol. 282, N 44. – P. 32511-32519.
84. Meyer-Ficca, M.L. Poly(ADP-ribosyl)ation during chromatin remodeling steps in rat spermiogenesis / M.L. Meyer-Ficca, H. Scherthan, A. Burkle et al. // *Chromosoma.* – 2005. – Vol. 114, N 1. – P. 67-74.
85. Thomas, C. Poly-ADP-ribose polymerase: machinery for nuclear processes / C. Thomas, A.V. Tulin // *Mol. Aspects Med.* – 2013. – Vol. 34, N 6. – P. 1124-1137.

86. Bryant, H.E. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase / H.E. Bryant, N. Schultz, H.D. Thomas et al. // *Nature*. – 2005. – Vol. 434, N 7035. – P. 913-917.

87. Kusch, T. Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions / T. Kusch, L. Florens, W.H. Macdonald et al. // *Science*. – 2004. – Vol. 306, N 5704. – P. 2084-2087.

88. Ikura, T. Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis / T. Ikura, V.V. Ogryzko, M. Grigoriev et al. // *Cell*. – 2000. – Vol. 102, N 4. – P. 463-473.

89. Kim, M.Y. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1 / M.Y. Kim, S. Mauro, N. Gevry et al. // *Cell*. – 2004. – Vol. 119, N 6. – P. 803-814.

90. Aubin, R.J. Correlation between endogenous nucleosomal hyper(ADP-ribosyl)ation of histone H1 and the induction of chromatin relaxation / R.J. Aubin, A. Frechette, G. de Murcia et al. // *EMBO J*. – 1983. – Vol. 2, N 10. – P. 1685-1693.

91. Ji, Y. Poly(ADP-ribosyl)ation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulates splicing / Y. Ji, A.V. Tulin // *Nucleic Acids Res*. – 2009. – Vol. 37, N 11. – P. 3501-3513.

92. Fahrner, J. Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length / J. Fahrner, R. Kranaster, M. Altmeyer et al. // *Nucleic Acids Res*. – 2007. – Vol. 35, N 21. – P. e143.

93. Malanga, M. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions / M. Malanga, J.M. Pleschke, H.E. Kleczkowska et al. // *J. Biol. Chem*. – 1998. – Vol. 273, N 19. – P. 11839-11843.

94. Karras, G.I. The macro domain is an ADP-ribose binding module / G.I. Karras, G. Kustatscher, H.R. Buhecha et al. // *EMBO J*. – 2005. – Vol. 24, N 11. – P. 1911-1920.

95. Krishnakumar, R. Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes / R. Krishnakumar, M.J. Gamble, K.M. Frizzell et al. // *Science*. – 2008. – Vol. 319, N 5864. – P. 819-821.

96. Kotova, E. *Drosophila* histone H2A variant (H2Av) controls poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) activation in chromatin / E. Kotova, N. Lodhi, M. Jarnik et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108, N 15. – P. 6205-6210.
97. Petesch, S.J. Activator-induced spread of poly(ADP-ribose) polymerase promotes nucleosome loss at Hsp7 / S.J. Petesch, J.T. Lis // *Mol. Cell.* – 2012. – Vol. 45, N 1. – P. 64-74.
98. Suto, R.K. Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z / R.K. Suto, M.J. Clarkson, D.J. Tremethick et al. // *Nat. Struct. Biol.* – 2000. – Vol. 7, N 12. – P. 1121-1124.
99. Javle, M. The role of PARP in DNA repair and its therapeutic exploitation / M. Javle, N.J. Curtin // *Br. J. Cancer.* – 2011. – Vol. 105, N 8. – P. 1114-1122.
100. Malanga, M. Poly(ADP-ribose) binds to the splicing factor ASF/SF2 and regulates its phosphorylation by DNA topoisomerase I / M. Malanga, A. Czuby, A. Girstun et al. // *J. Biol. Chem.* – 2008. – Vol. 283, N 29. – P. 19991-19998.
101. Weaver, A.N. Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer / A.N. Weaver, E.S. Yang // *Front Oncol.* – 2013. – Vol. 3. – P. 290.
102. Reale, A. Modulation of DNMT1 activity by ADP-ribose polymers / A. Reale, G.D. Matteis, G. Galleazzi et al. // *Oncogene.* – 2005. – Vol. 24, N 1. – P. 13-19.
103. Langelier, M.F. PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification / M.F. Langelier, T. Eisemann, A.A. Riccio et al. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2018. – Vol. 53. – P. 187-198.
104. Wang, M. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways / M. Wang, W. Wu, W. Wu et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – Vol. 34, N 21. – P. 6170-6182.
105. Kirsanov, K.I. Minor groove binding ligands disrupt PARP-1 activation pathways / K.I. Kirsanov, E. Kotova, P. Makhov et al. // *Oncotarget.* – 2014. – Vol. 5, N 2. – P. 428-437.
106. Eustermann, S. The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger / S. Eustermann, H. Videler, J.C. Yang et al. // *J. Mol. Biol.* – 2011. – Vol. 407, N 1. – P. 149-170.

107. Kun, E. Coenzymatic activity of randomly broken or intact double-stranded DNAs in auto and histone H1 trans-poly(ADP-ribosylation), catalyzed by poly(ADP-ribose) polymerase (PARP I) / E. Kun, E. Kirsten, C.P. Ordahl // J. Biol. Chem. – 2002. – Vol. 277, N 42. – P. 39066-39069.
108. Kotova, E. Uncoupling of the transactivation and transrepression functions of PARP1 protein / E. Kotova, M. Jarnik, A.V. Tulin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107, N 14. – P. 6406-6411.
109. Clark, N.J. Alternative modes of binding of poly(ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and nucleosomes / N.J. Clark, M. Kramer, U.M. Muthurajan et al. // J. Biol. Chem. – 2012. – Vol. 287, N 39. – P. 32430-32439.
110. Набережнов, Д.С. Сравнительный анализ влияния узкобороздочных лигандов на активацию белка PARP1 / Д.С. Набережнов, В.Ю. Глазунов, Г.А. Белицкий и др. // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – Т. 6. – С. 8.
111. Крамеров, Д.А. Короткие ретротранспозоны и их использование в филогенетических исследованиях / Д.А. Крамеров, Н.С. Васецкий // Молекулярная Биология. – 2016. – Т. 50, № 4. – С. 12.
112. Федоров, А.В. Регуляция транскрипции ретротранспозонов LINE-1 млекопитающих / А.В. Федоров // Цитология. – 2008. – Т. 50, № 12. – С. 12.
113. Hancks, D.C. Active human retrotransposons: variation and disease / D.C. Hancks, H.H. Kazazian // Curr. Opin. Genet. Dev. – 2012. – Vol. 22, N 3. – P. 191-203.
114. Cordaux, R. The impact of retrotransposons on human genome evolution / R. Cordaux, M.A. Batzer // Nat. Rev. Genet. – 2009. – Vol. 10, N 10. – P. 691-703.
115. Bundo, M. Increased l1 retrotransposition in the neuronal genome in schizophrenia / M. Bundo, M. Toyoshima, Y. Okada et al. // Neuron. – 2014. – Vol. 81, N 2. – P. 306-313.
116. Kines, K.J. Potential for genomic instability associated with retrotranspositionally-incompetent L1 loci / K.J. Kines, M. Sokolowski, D.L. de Haro et al. // Nucleic Acids Res. – 2014. – Vol. 42, N 16. – P. 10488-10502.

117. Liang, G. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements / G. Liang, M.F. Chan, Y. Tomigahara et al. // *Mol. Cell Biol.* – 2002. – Vol. 22, N 2. – P. 480-491.

118. Moldovan, J.B. The Zinc-Finger Antiviral Protein ZAP Inhibits LINE and Alu Retrotransposition / J.B. Moldovan, J.V. Moran // *PLoS Genet.* – 2015. – Vol. 11, N 5. – P. e1005121.

119. Montoya-Durango, D.E. LINE-1 silencing by retinoblastoma proteins is effected through the nucleosomal and remodeling deacetylase multiprotein complex / Montoya- D.E. Durango, K.A. Ramos, P. Bojang et al. // *BMC Cancer.* – 2016. – Vol. 16. – P. 38.

120. Yu, Q. Type I interferon controls propagation of long interspersed element-1 / Q. Yu, C.J. Carbone, Y.V. Katlinskaya et al. // *J. Biol. Chem.* – 2015. – Vol. 290, N 16. – P. 10191-10199.

121. Goodier, J.L. The Broad-Spectrum Antiviral Protein ZAP Restricts Human Retrotransposition / J.L. Goodier, G.C. Pereira, L.E. Cheung et al. // *PLoS Genet.* – 2015. – Vol. 11, N 5. – P. e1005252.

122. Hu, Y. Preferential cytotoxicity of bortezomib toward highly malignant human liposarcoma cells via suppression of MDR1 expression and function / Y. Hu, L. Wang, L. Wang et al. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2015. – Vol. 283, N 1. – P. 1-8.

123. Platanias, L.C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling / L.C. Platanias // *Nat. Rev. Immunol.* – 2005. – Vol. 5, N 5. – P. 375-386.

124. Thyrell, L. Mechanisms of Interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells / L. Thyrell, S. Erickson, B. Zhivotovsky // *Oncogene.* – 2002. – Vol. 21, N 8. – P. 1251-1262.

125. Gajewski, T.F. Innate immune sensing of cancer: clues from an identified role for type I IFNs / T.F. Gajewski, M.B. Fuertes, S.R. Woo // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2012. – Vol. 61, N 8. – P. 1343-1347.

126. Gajewski, T.F. Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment / T.F. Gajewski, H. Schreiber, Y.X. Fu // *Nat. Immunol.* – 2013. – Vol. 14, N 10. – P. 1014-1022.

127. Bidwell, B.N. Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape / B.N. Bidwell, C.Y. Slaney, N.P. Withana et al. // *Nat. Med.* – 2012. – Vol. 18, N 8. – P. 1224-1231.

128. Власова, О.А. Активация сигнального пути интерферона-альфа ресвератролом, генистеином и кверцетином / О.А. Власова, А.А. Борунова, А. Сафина и др. // *Сибирский онкологический журнал.* – 2019. – Т. 18, № 1. – С. 6.

129. Шалгинских, Н.А. Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов в химическом канцерогенезе / Н.А. Шалгинских, Н.Ю. Карпеченко, А.М. Оглоблина и др. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* – 2014. – Т. 3. – С. 23.

130. Jaenisch, R. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals / R. Jaenisch, A. Bird // *Nat. Genet.* – 2003. – Vol. 33. – Suppl. – P. 245-254.

131. Lu, J. MicroRNA expression profiles classify human cancers / J. Lu, G. Getz, E.A. Miska et al. // *Nature.* – 2005. – Vol. 435, N 7043. – P. 834-838.

132. Brooks, T.A. Making sense of G-quadruplex and i-motif functions in oncogene promoters / T.A. Brooks, S. Kendrick, L. Hurley // *FEBS J.* – 2010. – Vol. 277, N 17. – P. 3459-3469.

133. Leeb, M. Establishment of epigenetic patterns in development / M. Leeb, A. Wutz // *Chromosoma.* – 2012. – Vol. 121, N 3. – P. 251-262.

134. Rodriguez, J. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers / J. Rodriguez, J. Frigola, E. Vendrell et al. // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, N 17. – P. 8462-9468.

135. Yamada, Y. Concise review: dedifferentiation meets cancer development: proof of concept for epigenetic cancer / Y. Yamada, H. Haga, Y. Yamada // *Stem Cells Transl. Med.* – 2014. – Vol. 3, N 10. – P. 1182-1187.

136. Максимова, В.П. Современные подходы к выявлению и изучению эпигенетически активных ксенобиотиков / В.П. Максимова, П.Е. Бугаева, Е.М. Жидкова и др. // *Успехи молекулярной онкологии.* – 2019. – Т. 6, № 3. – С. 16.

137. Kouzarides, T. Chromatin modifications and their function / T. Kouzarides // *Cell*. – 2007. – Vol. 128, N 4. – P. 693-705.
138. Paulsen, M. DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease / M. Paulsen, A.C. Ferguson-Smith // *J. Pathol.* – 2001. – Vol. 195, N 1. – P. 97-110.
139. Wu, H. Reversing DNA methylation: mechanisms, genomics, and biological functions / H. Wu, Y. Zhang // *Cell*. – 2014. – Vol. 156, N 1-2. – P. 45-68.
140. Cui, D. DNA Methyltransferases, DNA Methylation, and Age-Associated Cognitive Function / D. Cui, X. Xu // *Int. J. Mol. Sci.* – 2018. – Vol. 19, N 5.
141. Shimbo, T. Proteins That Read DNA Methylation / T. Shimbo, P.A. Wade // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 2016. – Vol. 945. – P. 303-320.
142. Lennartsson, A. Histone modification patterns and epigenetic codes / A. Lennartsson, K. Ekwall // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2009. – Vol. 1790, N 9. – P. 863-868.
143. Wang, G.G. Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications / G.G. Wang, C.D. Allis, P. Chi // *Trends Mol. Med.* – 2007. – Vol. 13, N 9. – P. 363-372.
144. Yang, J. Identification of a new ribose methylation in the 18S rRNA of *S. cerevisiae* / J. Yang, S. Sharma, P. Kotter et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – Vol. 43, N 4. – P. 2342-2352.
145. Izzo, A. Chatting histone modifications in mammals / A. Izzo, R. Schneider // *Brief Funct Genomics*. – 2010. – Vol. 9, N 5-6. – P. 429-443.
146. Verdone, L. Histone acetylation in gene regulation / L. Verdone, E. Agricola, M. Caserta et al. // *Brief Funct. Genomic Proteomic*. – 2006. – Vol. 5, N 3. – P. 209-221.
147. Herceg, Z. Towards incorporating epigenetic mechanisms into carcinogen identification and evaluation / Z. Herceg, M.P. Lambert, K. van Veldhoven et al. // *Carcinogenesis*. – 2013. – Vol. 34, N 9. – P. 1955-1967.
148. Minatel, B.C. Environmental arsenic exposure: From genetic susceptibility to pathogenesis / B.C. Minatel, A.P. Sage, C. Anderson et al. // *Environ. Int.* – 2018. – Vol. 112. – P. 183-197.

149. Svoboda, J. Retroviruses in foreign species and the problem of provirus silencing / J. Svoboda, J. Hejnar, J. Geryk et al. // *Gene*. – 2000. – Vol. 261, N 1. – P. 181-188.

150. Poleshko, A. Identification of a functional network of human epigenetic silencing factors / A. Poleshko, M.B. Einarson, N. Shalginskikh et al. // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285, N 1. – P. 422-433.

151. Katz, R.A. High-frequency epigenetic repression and silencing of retroviruses can be antagonized by histone deacetylase inhibitors and transcriptional activators, but uniform reactivation in cell clones is restricted by additional mechanisms / R.A. Katz, E. Jack-Scott, A. Narezkina et al. // *J. Virol.* – 2007. – Vol. 81, N 6. – P. 2592-2604.

152. Budde, L.E. A phase I study of pulse high-dose vorinostat (V) plus rituximab (R), ifosphamide, carboplatin, and etoposide (ICE) in patients with relapsed lymphoma / L.E. Budde, M.M. Zhang, A.R. Shustov et al. // *Br. J. Haematol.* – 2013. – Vol. 161, N 2. – P. 183-191.

153. Glister, C. The anti-epileptic drug valproic acid (VPA) inhibits steroidogenesis in bovine theca and granulosa cells in vitro / C. Glister, L. Satchell, A.E. Michael et al. // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7, N 11. – P. e49553.

154. Zhao, L. Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: therapeutic potential of valproic acid and suberoylanilide hydroxamic acid / L. Zhao, C.N. Chen, N. Hajji et al. // *Circulation*. – 2012. – Vol. 126, N 4. – P. 455-467.

155. Feng, W.H. Valproic acid enhances the efficacy of chemotherapy in EBV-positive tumors by increasing lytic viral gene expression / W.H. Feng, S.C. Kenney // *Cancer Res.* – 2006. – Vol. 66, N 17. – P. 8762-8769.

156. Svasti, J. Proteomic profiling of cholangiocarcinoma cell line treated with pomiferin from *Derris malaccensis* / J. Svasti, C. Srisomsap, P. Subhasitanont et al. // *Proteomics*. – 2005. – Vol. 5, N 17. – P. 4504-4509.

157. Sharma, S.V. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations / S.V. Sharma, D.Y. Lee, B. Li et al. // *Cell*. – 2010. – Vol. 141, N 1. – P. 69-80.

158. Glasspool, R.M. Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance / R.M. Glasspool, J.M. Teodoridis, R. Brown // *Br. J. Cancer*. – 2006. – Vol. 94, N 8. – P. 1087-1092.

159. Belinsky, S.A. Combination therapy with vidaza and entinostat suppresses tumor growth and reprograms the epigenome in an orthotopic lung cancer model / S.A. Belinsky, M.J. Grimes, M.A. Picchi et al. // *Cancer Res*. – 2011. – Vol. 71, N 2. – P. 454-462.

160. Miranda, T.B. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation / T.B. Miranda, C.C. Cortez, C.B. Yoo et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2009. – Vol. 8, N 6. – P. 1579-1588.

161. Zhou, J. The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML / J. Zhou, C. Bi, L.L. Cheong et al. // *Blood*. – 2011. – Vol. 118, N 10. – P. 2830-2839.

162. Liang, G. Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine / G. Liang, F.A. Gonzales, P.A. Jones et al. // *Cancer Res*. – 2002. – Vol. 62, N 4. – P. 961-966.

163. Karpf, A.R. Inhibition of DNA methyltransferase stimulates the expression of signal transducer and activator of transcription 1, 2, and 3 genes in colon tumor cells / A.R. Karpf, P.W. Peterson, J.T. Rawlins et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1999. – Vol. 96, N 24. – P. 14007-14012.

164. Steensma, D.P. Multicenter study of decitabine administered daily for 5 days every 4 weeks to adults with myelodysplastic syndromes: the alternative dosing for outpatient treatment (ADOPT) trial / D.P. Steensma, M.R. Baer, J.L. Slack et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2009. – Vol. 27, N 23. – P. 3842-3848.

165. Christman, J.K. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy / J.K. Christman // *Oncogene*. – 2002. – Vol. 21, N 35. – P. 5483-5495.

166. Brueckner, B. Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases / B. Brueckner, R. Garcia Boy, P. Siedlecki et al. // *Cancer Res*. – 2005. – Vol. 65, N 14. – P. 6305-6311.

167. Krawczyk, J. 5-Azacytidine for the treatment of myelodysplastic syndromes / J. Krawczyk, N. Keane, C.L. Freeman et al. // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2013. – Vol. 14, N 9. – P. 1255-1268.
168. Johnson, W.S. Selective recognition of the m5CpG dinucleotide sequence in DNA by mitomycin C for alkylation and cross-linking / W.S. Johnson, Q.Y. He, M. Tomasz // *Bioorg. Med. Chem.* – 1995. – Vol. 3, N 6. – P. 851-860.
169. Шалгинских, Н.А. Эпигенетические эффекты узкобороздочных лигандов / Н.А. Шалгинских, К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, Г.А. Белицкий и др. // *Молекулярная медицина.* – 2014. – Т. 3. – С. 6.
170. Watson, R.E. The value of DNA methylation analysis in basic, initial toxicity assessments / R.E. Watson, J.M. McKim, G.L. Cockerell // *Toxicol. Sci.* – 2004. – Vol. 79, N 1. – P. 178-188.
171. Senigl, F. The core element of a CpG island protects avian sarcoma and leukosis virus-derived vectors from transcriptional silencing / F. Senigl, J. Plachy, J. Hejnar // *J. Virol.* – 2008. – Vol. 82, N 16. – P. 7818-7827.
172. Baqir, S. Inhibitors of histone deacetylases and DNA methyltransferases alter imprinted gene regulation in embryonic stem cells / S. Baqir, L.C. Smith // *Cloning Stem Cells.* – 2006. – Vol. 8, N 3. – P. 200-213.
173. Piacentini, P. Trichostatin A enhances the response of chemotherapeutic agents in inhibiting pancreatic cancer cell proliferation / P. Piacentini, M. Donadelli, C. Costanzo et al. // *Virchows Arch.* – 2006. – Vol. 448, N 6. – P. 797-804.
174. Zhang, Y. Coordinated changes in DNA methylation and histone modifications regulate silencing/derepression of luteinizing hormone receptor gene transcription / Y. Zhang, N. Fatima, M.L. Dufau // *Mol. Cell. Biol.* – 2005. – Vol. 25, N 18. – P. 7929-7939.
175. Fabbri, M. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B / M. Fabbri, R. Garzon, A. Cimmino et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104, N 40. – P. 15805-15810.
176. Garzon, R. MicroRNA-29b induces global DNA hypomethylation and tumor suppressor gene reexpression in acute myeloid leukemia by targeting directly DNMT3A

and 3B and indirectly DNMT1 / R. Garzon, S. Liu, M. Fabbri et al. // *Blood*. – 2009. – Vol. 113, N 25. – P. 6411-6418.

177. Takada, S. Potential role of miR-29b in modulation of Dnmt3a and Dnmt3b expression in primordial germ cells of female mouse embryos / S. Takada, E. Berezikov, Y.L. Choi et al. // *RNA*. – 2009. – Vol. 15, N 8. – P. 1507-1514.

178. Zhao, Q. PRMT5-mediated methylation of histone H4R3 recruits DNMT3A, coupling histone and DNA methylation in gene silencing / Q. Zhao, G. Rank, Y.T. Tan et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2009. – Vol. 16, N 3. – P. 304-311.

179. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 940 с.

180. Maron, D.M. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test / D.M. Maron, B.N. Ames // *Mutat. Res.* – 1983. – Vol. 113, N 3-4. – P. 173-215.

181. Patterson, J.T. Proof That the Entire Chromosome Is Not Eliminated in the Production of Somatic Variations by X-Rays in *Drosophila* / J.T. Patterson // *Genetics*. – 1930. – Vol. 15, N 2. – P. 141-149.

182. Shabad, L.M. Somatic mutagenesis in *D. melanogaster* as an express method of testing carcinogens (N-nitroso compounds) / L.M. Shabad, E.M. Khovanova, E.G. Logvinenko et al. // *Dokl. Akad. Nauk SSSR*. – 1976. – Vol. 231, N 4. – P. 997-1000.

183. Vogel, E.W. Performance of 181 chemicals in a *Drosophila* assay predominantly monitoring interchromosomal mitotic recombination / E.W. Vogel, M.J. Nivard // *Mutagenesis*. – 1993. – Vol. 8, N 1. – P. 57-81.

184. Sidorov, R.A. Induction of tumor clones in *D. melanogaster* wts/+ heterozygotes with chemical carcinogens / R.A. Sidorov, E.G. Ugnivenko, E.M. Khovanova et al. // *Mutat. Res.* – 2001. – Vol. 498, N 1-2. – P. 181-191.

185. Justice, R.W. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation / R.W. Justice, O. Zilian, D.F. Woods et al. // *Genes. Dev.* – 1995. – Vol. 9, N 5. – P. 534-546.

186. Hisaoka, M. Molecular alterations of h-warts/LATS1 tumor suppressor in human soft tissue sarcoma / M. Hisaoka, A. Tanaka, H. Hashimoto // *Lab. Invest.* – 2002. – Vol. 82, N 10. – P. 1427-1435.

187. Iida, S. Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G1 tetraploidy checkpoint function / S. Iida, T. Hirota, T. Morisaki et al. // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23, N 31. – P. 5266-5274.

188. Nishiyama, Y. A human homolog of Drosophila warts tumor suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis / Y. Nishiyama, T. Hirota, T. Morisaki et al. // *FEBS Lett.* – 1999. – Vol. 459, N 2. – P. 159-165.

189. Morinaga, N. Molecular analysis of the h-warts/LATS1 gene in human breast cancer / N. Morinaga, Y. Shitara, Y. Yanagita et al. // *Int. J. Oncol.* – 2000. – Vol. 17, N 6. – P. 1125-1129.

190. Saucedo, L.J. Filling out the Hippo pathway / L.J. Saucedo, B.A. Edgar // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2007. – Vol. 8, N 8. – P. 613-621.

191. Zygulska, A.L. Hippo pathway - brief overview of its relevance in cancer / A.L. Zygulska, K. Krzemieniecki, P. Pierzchalski // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2017. – Vol. 68, N 3. – P. 311-335.

192. Bryant, P.J. Tumor suppressor genes encoding proteins required for cell interactions and signal transduction in Drosophila / P.J. Bryant, K.L. Watson, R.W. Justice et al. // *Dev. Suppl.* – 1993. – P. 239-249.

193. Радиация и патология. / А.Ф. Цыб, Р.С. Будагов, И.А. Замулаева. – М.: Высшая школа, 2005. – 341 с.

194. Белицкий, Г.А. Методические рекомендации по исследованию канцерогенных свойств фармакологических и лекарственных средств / Г.А. Белицкий, Ю.А. Ревазова, С.К. Абилов // *Ведомости Фармакологического комитета.* – 1998. – Т. 1. – С. 4.

195. 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 et al. // *Mutat. Res.* – 2010. – Vol. 699, N 1-2. – P. 1-4.

196. Frei, H. Induction of somatic mutation and recombination by four inhibitors of eukaryotic topoisomerases assayed in the wing spot test of *Drosophila melanogaster* / H. Frei, F.E. Wurgler // *Mutagenesis*. – 1996. – Vol. 11, N 4. – P. 315-325.

197. Кирсанов, К.И. Анализ бластомогенной активности канцерогенов млекопитающих на дрозофиле с использованием аллеля wtsP4 и ингибированием p53 методом РНК-интерференции / К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, Р.А. Сидоров, Г.А. Белицкий и др. // *Генетика*. – 2011. – Т. 47, № 4. – С. 9.

198. Кирсанов, К.И. Бластомогенная активность бисбензимидазольных красителей ДНК при тестировании на дрозофиле / К.И. Кирсанов, Е.А. Лесовая, А.А. Иванов и др. // *Вестник РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН*. – 2012. – Т. 23, № 4(90). – С. 6.

199. Levin, D.E. A new *Salmonella* tester strain (TA102) with A X T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens / D.E. Levin, M. Hollstein, M.F. Christman et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1982. – Vol. 79, N 23. – P. 7445-7449.

200. Portugal, J. Assignment of DNA binding sites for 4',6-diamidine-2-phenylindole and bisbenzimidazole (Hoechst 33258). A comparative footprinting study / J. Portugal, M.J. Waring // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1988. – Vol. 949, N 2. – P. 158-168.

201. Ferguson, L.R. Microbial mutagenic effects of the DNA minor groove binder pibenzimidazole (Hoechst 33258) and a series of mustard analogues / L.R. Ferguson, W.A. Denny // *Mutat. Res*. – 1995. – Vol. 329, N 1. – P. 19-27.

202. Durand, R.E. Cytotoxicity, Mutagenicity and DNA damage by Hoechst 33342 / R.E. Durand, P.L. Olive // *J. Histochem. Cytochem*. – 1982. – Vol. 30, N 2. – P. 111-116.

203. Turner, P.R. The mutagenic properties of DNA minor-groove binding ligands / P.R. Turner, W.A. Denny // *Mutat. Res*. – 1996. – Vol. 355, N 1-2. – P. 141-169.

204. Vig, B.K. Sequence of centromere separation: kinetochore formation in induced laggards and micronuclei / B.K. Vig, S.E. Swearngin // *Mutagenesis*. – 1986. – Vol. 1, N 6. – P. 461-465.

205. Bray, F. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries / F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram // *CA Cancer J. Clin.* – 2018. – Vol. 68, N 6. – P. 394-424.
206. Saltz, L.B. Value in Colorectal Cancer Treatment: Where It Is Lacking, and Why / L.B. Saltz // *Cancer J.* – 2016. – Vol. 22, N 3. – P. 232-235.
207. Inamura, K. Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology / K. Inamura // *Cancers (Basel)*. – 2018. – Vol. 10, N 1.
208. Steward, W.P. Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field / W.P. Steward, K. Brown // *Br. J. Cancer.* – 2013. – Vol. 109, N 1. – P. 1-7.
209. Kuo, C.N. Association between Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs and Colorectal Cancer: A Population-Based Case-Control Study / C.N. Kuo, J.J. Pan, Y.W. Huang et al. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* – 2018. – Vol. 27, N 7. – P. 737-745.
210. Hussain, S.P. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials / S.P. Hussain, C.C. Harris // *Int. J. Cancer.* – 2007. – Vol. 121, N 11. – P. 2373-2380.
211. Lang, M. Chemoprevention of colorectal cancer / M. Lang, C. Gasche // *Dig. Dis.* – 2015. – Vol. 33, N 1. – P. 58-67.
212. Boursi B,. Current and future clinical strategies in colon cancer prevention and the emerging role of chemoprevention / B. Boursi, N. Arber // *Curr. Pharm. Des.* – 2007. – Vol. 13, N 22. – P. 2274-2282.
213. Reya, T. Wnt signalling in stem cells and cancer / T. Reya, H. Clevers // *Nature.* – 2005. – Vol. 434, N 7035. – P. 843-850.
214. Rulifson, I.C. Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation / I.C. Rulifson, S.K. Karnik, P.W. Heiser et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2007. – Vol. 104, N 15. – P. 6247-6252.
215. Lu, D. Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells / D. Lu, M.Y. Choi, J. Yu et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. – Vol. 108, N 32. – P. 13253-1357.
216. Fetisov, T.I. Alterations in WNT Signaling in Leukemias / T.I. Fetisov, E.A. Lesovaya, M.G. Yakubovskaya // *Biochemistry (Mosc)*. – 2018. – Vol. 83, N 12. – P. 1448-1458.

217. Zhao, Z.M. The evolutionary history of the catenin gene family during metazoan evolution / Z.M. Zhao, A.B. Reynolds, E.A. Gaucher // *BMC Evol. Biol.* – 2011. – Vol. 11. – P. 198.
218. Ozawa, M. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species / M. Ozawa, H. Baribault, R. Kemler // *EMBO J.* – 1989. – Vol. 8, N 6. – P. 1711-1717.
219. Cadigan, K.M. Wnt signaling: a common theme in animal development / K.M. Cadigan, R. Nusse // *Genes. Dev.* – 1997. – Vol. 11, N 24. – P. 3286-3305.
220. Koyanagi, M. Non-canonical Wnt signaling enhances differentiation of human circulating progenitor cells to cardiomyogenic cells / M. Koyanagi, J. Haendeler, C. Badorff et al. // *J. Biol. Chem.* – 2005. – Vol. 280, N 17. – P. 16838-16842.
221. Cruciat, C.M. Secreted and transmembrane wnt inhibitors and activators / C.M. Cruciat, C. Niehrs // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* – 2013. – Vol. 5, N 3. – P. a015081.
222. Stamos, J.L. The beta-catenin destruction complex / J.L. Stamos, W.I. Weis // *Cold Spring Harb. Perspect Biol.* – 2013. – Vol. 5, N 1. – P. a007898.
223. Liu, C. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism / C. Liu, Y. Li, M. Semenov et al. // *Cell.* – 2002. – Vol. 108, N 6. – P. 837-847.
224. Cadigan, K.M. TCF/LEFs and Wnt signaling in the nucleus / K.M. Cadigan, M.L. Waterman // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2012. – Vol. 4, N 11.
225. Pate, K.T. Wnt signaling directs a metabolic program of glycolysis and angiogenesis in colon cancer / K.T. Pate, C. Stringari, S. Sprowl-Tanio et al. // *EMBO J.* – 2014. – Vol. 33, N 13. – P. 1454-1473.
226. Yamada, T. Transactivation of the multidrug resistance 1 gene by T-cell factor 4/beta-catenin complex in early colorectal carcinogenesis / T. Yamada, A.S. Takaoka, Y. Naishiro et al. // *Cancer Res.* – 2000. – Vol. 60, N 17. – P. 4761-4766.
227. Holland, J.D. Combined Wnt/beta-catenin, Met, and CXCL12/CXCR4 signals characterize basal breast cancer and predict disease outcome / J.D. Holland, B. Gyorffy, R. Vogel et al. // *Cell Rep.* – 2013. – Vol. 5, N 5. – P. 1214-1227.

228. Nunez, F. Wnt/beta-catenin signaling enhances cyclooxygenase-2 (COX2) transcriptional activity in gastric cancer cells / F. Nunez, S. Bravo, F. Cruzat // PLoS One. – 2011. – Vol. 6, N 4. – P. e18562.

229. Choe, Y. Wnt signaling regulates intermediate precursor production in the postnatal dentate gyrus by regulating CXCR4 expression / Y. Choe, S.J. Pleasure // Dev. Neurosci. – 2012. – Vol. 34, N 6. – P. 502-514.

230. Sekar, V. Genistein regulates tumor microenvironment and exhibits anticancer effect in dimethyl hydrazine-induced experimental colon carcinogenesis / V. Sekar, S.K. Anandasadagopan, S. Ganapasam // Biofactors. – 2016. – Vol. 42, N 6. – P. 623-637.

231. Bishayee, A. Cancer prevention and treatment with resveratrol: from rodent studies to clinical trials / A. Bishayee // Cancer Prev. Res. (Phila). – 2009. – Vol. 2, N 5. – P. 409-418.

232. N'Soukpoe-Kossi, C.N. Structural modeling for DNA binding to antioxidants resveratrol, genistein and curcumin / C.N. N'Soukpoe-Kossi, P. Bourassa, J.S. Mandeville et al. // J. Photochem. Photobiol. B. – 2015. – Vol. 151. – P. 69-75.

233. Patel, R. Polymeric black tea polyphenols inhibit 1,2-dimethylhydrazine induced colorectal carcinogenesis by inhibiting cell proliferation via Wnt/beta-catenin pathway / R. Patel, A. Ingle, G.B. Maru // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2008. – Vol. 227, N 1. – P. 136-146.

234. Plummer, S.M. Inhibition of cyclo-oxygenase 2 expression in colon cells by the chemopreventive agent curcumin involves inhibition of NF-kappaB activation via the NIK/IKK signalling complex / S.M. Plummer, K.A. Holloway, M.M. Manson et al. // Oncogene. – 1999. – Vol. 18, N 44. – P. 6013-6020.

235. Jones, M.K. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing / M.K. Jones, H. Wang, B.M. Peskar et al. // Nat. Med. – 1999. – Vol. 5, N 12. – P. 1418-1423.

236. Tsujii, M. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential / M. Tsujii, S. Kawano, R.N. DuBois // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – Vol. 94, N 7. – P. 3336-3340.

237. Tessner, T.G. Prostaglandin E2 reduces radiation-induced epithelial apoptosis through a mechanism involving AKT activation and bax translocation / T.G. Tessner, F. Muhale, T.E. Riehl et al. // *J. Clin. Invest.* – 2004. – Vol. 114, N 11. – P. 1676-1685.

238. Pozzi, A. Colon carcinoma cell growth is associated with prostaglandin E2/EP4 receptor-evoked ERK activation / A. Pozzi, X. Yan, I. Macias-Perez et al. // *J. Biol. Chem.* – 2004. – Vol. 279, N 28. – P. 29797-29804.

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

240. Ikediobi, O.N. Mutation analysis of 24 known cancer genes in the NCI-60 cell line set / O.N. Ikediobi, H. Davies, G. Bignell et al. // *Mol. Cancer Ther.* – 2006. – Vol. 5, N 11. – P. 2606-2612.

241. Ilyas, M. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers / M. Ilyas, I.P. Tomlinson, A. Rowan et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1997. – Vol. 94, N 19. – P. 10330-10334.

242. Turusov, V.S. Pararenal angiosarcoma induced in male mice by 1,2-dimethylhydrazine--a model for studying the role of androgens in chemical carcinogenesis / V.S. Turusov, G.Y. Chemeris, Y. Parfenov et al. // *Carcinogenesis.* – 1985. – Vol. 6, N 3. – P. 325-331.

243. Lesovaya, E.A. Rapatar, a nanoformulation of rapamycin, decreases chemically-induced benign prostate hyperplasia in rats / E.A. Lesovaya, K.I. Kirsanov, E.E. Antoshina et al. // *Oncotarget.* – 2015. – Vol. 6, N 12. – P. 9718-9727.

244. Lawler, M. Critical research gaps and recommendations to inform research prioritisation for more effective prevention and improved outcomes in colorectal cancer / M. Lawler, D. Alsina, R.A. Adams et al. // *Gut.* – 2018. – Vol. 67, N 1. – P. 179-193.

245. Caldwell, G.M. The Wnt antagonist sFRP1 in colorectal tumorigenesis / G.M. Caldwell, C. Jones, K. Gensberg et al. // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, N 3. – P. 883-888.

246. Silva, A.L. Boosting Wnt activity during colorectal cancer progression through selective hypermethylation of Wnt signaling antagonists / A.L. Silva, S.N. Dawson, M.J. Arends et al. // *BMC Cancer*. – 2014. – Vol. 14. – P. 891.

247. Lu, R. Folic acid and sodium butyrate prevent tumorigenesis in a mouse model of colorectal cancer / R. Lu, X. Wang, D.F. Sun et al. // *Epigenetics*. – 2008. – Vol. 3, N 6. – P. 330-335.

248. Buchanan, F.G. Connecting COX-2 and Wnt in cancer / F.G. Buchanan, R.N. DuBois / F.G. Buchanan // *Cancer Cell*. – 2006. – Vol. 9, N 1. – P. 6-8.

249. Kinzler, K.W. Lessons from hereditary colorectal cancer / K.W. Kinzler, B. Vogelstein / K.W. Kinzler // *Cell*. – 1996. – Vol. 87, N 2. – P. 159-170.

250. Laqueur, G.L. Carcinogenic Properties of Nuts from *Cycas Circinalis* L. Indigenous to Guam / G.L. Laqueur, O. Mickelsen, M.G. Whiting et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1963. – Vol. 31. – P. 919-951.

251. Carlsen, L. A preliminary assessment of the potential environmental and human health impact of unsymmetrical dimethylhydrazine as a result of space activities / L. Carlsen, O.A. Kenesova, S.E. Batyrbekova // *Chemosphere*. – 2007. – Vol. 67, N 6. – P. 1108-1116.

252. Perse, M. Morphological and molecular alterations in 1,2 dimethylhydrazine and azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats / M. Perse, A. Cerar // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2011. – Vol. 2011. – P. 473964.

253. Novellasedemunt, L. Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A Review in the Theme: Cell Signaling: Proteins, Pathways and Mechanisms / L. Novellasedemunt, P. Antas, V.S. Li // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2015. – Vol. 309, N 8. – P. 511-521.

254. Evans, J.P. From mice to men: Murine models of colorectal cancer for use in translational research / J.P. Evans, P.A. Sutton, B.K. Winiarski et al. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2016. – Vol. 98. – P. 94-105.

255. Amos-Landgraf, J.M. Sex disparity in colonic adenomagenesis involves promotion by male hormones, not protection by female hormones / J.M. Amos-Landgraf, J. Heijmans, M.C. Wielenga et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2014. – Vol. 111, N 46. – P. 16514-16519.

256. Turusov, V.S. 1,2-Dimethylhydrazine carcinogenesis in C3HA and CBA female mice prenatally treated with diethylstilbestrol / V.S. Turusov, L.S. Trukhanova, N.S. Lanko et al. // *Teratog. Carcinog. Mutagen.* – 1997. – Vol. 17, N 1. – P. 19-28.

257. 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 et al. // *Cancer Prev. Res. (Phila).* – 2019.10.1158/1940-6207.CAPR-19-0198.

258. Belitsky, G.A. Prevention of therapy-related malignances in cancer survivors / G.A. Belitsky, K.I. Kirsanov, E.A. Lesovaya et al. // *Oncotarget.* – 2019. – Vol. 10, N 22. – P. 2114-2115.

259. da Silva Oliveira, G.L Diminazene aceturate--An antiparasitic drug of antiquity: Advances in pharmacology & therapeutics / G.L. da Silva Oliveira, R.M. de Freitas // *Pharmacol. Res.* – 2015. – Vol. 102. – P. 138-157.

260. Kuriakose, S.M. Diminazene aceturate (Berenil) downregulates Trypanosoma congolense-induced proinflammatory cytokine production by altering phosphorylation of MAPK and STAT proteins / S.M. Kuriakose, C. Onyilagha et al. // *Immunol. Res.* – 2019. – Vol. 67, N 1. – P. 84-92.

261. Rigatto, K. Diminazene aceturate improves autonomic modulation in pulmonary hypertension / K. Rigatto, K.R. Casali, V. Shenoy et al. // *Eur. J. Pharmacol.* – 2013. – Vol. 713, N 1-3. – P. 89-93.

262. Shenoy, V. Diminazene attenuates pulmonary hypertension and improves angiogenic progenitor cell functions in experimental models / V. Shenoy, A. Gjymishka, Y.P. Jarajapu et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* – 2013. – Vol. 187, N 6. – P. 648-657.

263. Kuriakose, S. Diminazene aceturate (Berenil) modulates LPS induced pro-inflammatory cytokine production by inhibiting phosphorylation of MAPKs and STAT proteins / S. Kuriakose, H. Muleme, C. Onyilagha et al. // *Innate Immun.* – 2014. – Vol. 20, N 7. – P. 760-773.

264. Zheng, C. Topical administration of diminazene aceturate decreases inflammation in endotoxin-induced uveitis / C. Zheng, C. Lei, Z. Chen et al. // *Mol. Vis.* – 2015. – Vol. 21. – P. 403-411.

265. Neidhart, M. Inhibition of spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity: a new therapeutic concept in rheumatoid arthritis / M. Neidhart, E. Karouzakis, A. Jungel et al. // *Arthritis Rheumatol.* – 2014. – Vol. 66, N 7. – P. 1723-1733.

266. Libby, P.R. Inhibition of enzymes of polyamine back-conversion by pentamidine and berenil / P.R. Libby, C.W. Porter // *Biochem. Pharmacol.* – 1992. – Vol. 44, N 4. – P. 830-832.

267. Sandhu, S.K. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer treatment: a clinical perspective / S.K. Sandhu, T.A. Yap, J.S. de Bono // *Eur. J. Cancer.* – 2010. – Vol. 46, N 1. – P. 9-20.

268. Kummar, S. Advances in using PARP inhibitors to treat cancer / S. Kummar, A. Chen, R.E. Parchment et al. // *BMC Med.* – 2012. – Vol. 10. – P. 25.

269. Konstantinopoulos, P.A. Gene expression profile of BRCAness that correlates with responsiveness to chemotherapy and with outcome in patients with epithelial ovarian cancer / P.A. Konstantinopoulos, D. Spentzos, B.Y. Karlan et al. // *J. Clin. Oncol.* – 2010. – Vol. 28, N 22. – P. 3555-3561.

270. D'Andrea, A.D. Mechanisms of PARP inhibitor sensitivity and resistance / A.D. D'Andrea // *DNA Repair (Amst).* – 2018. – Vol. 71. – P. 172-176.

271. Jiang, X. PARP inhibitors in ovarian cancer: Sensitivity prediction and resistance mechanisms / X. Jiang, X. Li, W. Li et al. // *J. Cell Mol. Med.* – 2019. – Vol. 23, N 4. – P. 2303-2313.

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

273. Тилова, Л.Р. Молекулярно-генетические нарушения, лежащие в основе опухолей системы крови, и соответствующие им изменения сигнальных систем клетки / Л.Р. Тилова, Е.М. Жидкова, А.В. Савинкова и др. // *Клиническая онкогематология.* – 2017. – Т. 2. – С. 13.

274. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // Nature. – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680-685.

275. Абилев, Р.К. О мутагенном действии производного тетрагидродиазопирена на бактерии / Р.К. Абилев, Л.М. Фонштейн, Г.И Мигачев, А.М. Андриевский // Генетика. – 1979. – Т. 15, № 5. – С. 5.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А

Таблица А1 - Результаты тестирования мутагенного эффекта Хехст 33258 и Хехст33342 на индикаторном штамме ТА98

Исследуемое вещество	Доза на чашку, мкмоль	Штамм ТА98									
		-S9					+S9				
		Опыт 1		Опыт 2		МА ^В	Опыт 1		Опыт 2		МА
		M ± m ^а	M _i /M _o ^б	M ± m	M _i /M _o		M ± m	M _i /M _o	M ± m	M _i /M _o	
Контроль	0	32±2,1	1,0	33±7,1	1,0	-	26±5,5	1,0	31±0,6	1,0	-
2-АФ	110000	-	-	-	-	-	1257±516,7	48	1468±204,2	47	+
ДДДТДП	67000	1477±433,2	46	1573±105,0	48	+	-	-	-	-	-
Хехст 33258	5	33±4,4	1,0	-	-	-	32±2,1	1,2	-	-	-
	50	27±6,4	0,8	31±7,5	0,9	-	29±3,1	1,1	29±8,6	0,9	-
	500(Т)	14±2,0	0,5	30±0,6	0,9	-	27±6,7	1,0	30±4,2	1,0	-
	5000(Т)	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-
Хехст 33342	5	35±9,5	1,1	34±1,0	1,1	-	33±4,0	1,3	31±0,6	1,0	-
	50	28±4,5	0,9	32±1,0	1,0	-	34±3,5	1,3	34±0,6	1,1	-
	500(Т)	0	0	-	-	Т	0	0	-	-	Т

^а Среднее число ревертантов на чашку ± стандартное отклонение.^б Отношение числа ревертантов в опыте к числу ревертантов в контроле^в Мутагенная активность препарата («+» означает наличие, « - » отсутствие мутагенной активности)^г Токсичность при данной дозе соединения

Приложение А (продолжение)

Таблица А2 - Результаты тестирования мутагенного эффекта Хехст33258 и Хехст33342 на индикаторном штамме ТА100

Исследуемое вещество	Доза на чашку, мкмоль	Штамм ТА100									
		-S9					+S9				
		Опыт 1		Опыт 2		МА ^в	Опыт 1		Опыт 2		МА
		М ± m ^а	Mi/Mo ^б	М ± m	Mi/Mo		М ± m	Mi/Mo	М ± m	Mi/Mo	
Контроль	0	77±2,3	1,0	79±9,2	1,0	-	103±6,1		101±12,8	-	-
БП	40000	-	-	-	-	-	957±148,5	9,3	1025±64,1	10	+
2-АФ	110000	-	-	-	-	-	1316±466,7	10	1147±64,1	11,3	+
МННГ	68000	1336±253,2	17,4	1440±123,0	18,2	+	-	-	-	-	-
Хехст 33258	5	74±2,5	1,0	-	-	-	78±11,5	0,8	-	-	-
	50	74±6,1	1,0	-	-	-	90±19	0,9	-	-	-
	500	72±13,5	1,0	82±3,2	1,0	-	85±9,5	0,8	105±15,1	1,0	-
	5000	66±10,1	0,9	75±2,5	0,9	-	97±8,7	0,9	89±4,0	0,9	-
Хехст 33342	0,5	83±8	1,1	84±4,6	1,1	-	102±4,1	1,0	105±8,4	1,0	-
	5	64±9,6	0,8	81±4,9	1,0	-	90±15,7	0,9	103±16,4	1,0	-
	50(Т)	8±7,3	0	-	-	Т	29±9,3	0,3	-	-	Т

^а Среднее число ревертантов на чашку ± стандартное отклонение.^б Отношение числа ревертантов в опыте к числу ревертантов в контроле^в Мутагенная активность препарата («+» означает наличие, «-» отсутствие мутагенной активности)^г Токсичность при данной дозе соединения

Приложение А (продолжение)

Таблица А3 - Тестирования мутагенного эффекта узкобороздочных лигандов на индикаторных штаммах *Salmonella typhimurium* TA98

Соединение	Доза (моль/чашка)	ТА98									
		-S9				МА ^в	+S9				
		Эксперимент 1		Эксперимент 2			Эксперимент 1		Эксперимент 2		МА
		М ± m ^а	М _i /M _о ^б	М ± m	М _i /M _о		М ± m	М _i /M _о	М ± m	М _i /M _о	
Контроль	0	39±7,1	1,0	36±4,5	1,0	-	25±8,5	1,0	29±5,6	1,0	-
2-АФ	1,1×10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	257±16,7	10	398±54	13	+
ДДДТДП	6,7×10 ⁻⁵	1426±218,2	37	1593±215,0	44	+	-	-	-	-	-
DAPI	5x10 ⁻⁶	35±4,6	0,9	36±3,8	1,0	-	32±2,1	1,2	31±4,6	1,1	-
	10 ⁻⁵	47±6,4	1,2	41±7,5	1,1	-	29±3,1	1,1	29±8,6	1,0	-
	5x10 ⁻⁵	43±2,8	1,1	44±9,6	1,2	-	23±6,9	0,9	31±4,6	1,1	-
	10 ⁻⁴	38±8,3	1,0	36±5,3	1,0	-	21±3,1	0,8	23±3,6	0,8	-
	5x10 ⁻⁴ (Т) ^г	0	0	0	0	-	14±1,6	0,6	10±0,6	0,3	
	10 ⁻³ (Т)	0	0	0	0	-	0	0	0	0	
Диминазен	5x10 ⁻⁶	32±6,9	0,8	33±8,3	0,8	-	30±2,9	1,2	29±6,8	1,0	-
	10 ⁻⁵	34±6,8	0,9	34±7,8	0,9	-	24±2,3	1,0	27±8,3	0,9	-
	5x10 ⁻⁵	37±2,6	0,9	35±7,6	1,0	-	22±1,7	0,8	30±1,8	1,0	-
	10 ⁻⁴	48±8,9	1,2	39±5,3	1,1	-	32±7,3	1,2	31±4,5	1,1	-
	5x10 ⁻⁴ (Т)	11±0,5	0,3	17±0,9	0,4	-	17±1,6	0,7	19±2,6	0,7	-
	10 ⁻³ (Т)	0	0	0	0	-	15±2,1	0,6	16±6,1	0,6	-
Пентамидин	5x10 ⁻⁶	39±4,2	1,0	33±5,9	0,9	-	30±9,0	1,2	27±6,8	0,9	-
	10 ⁻⁵	37±6,8	1,0	29±3,5	0,8	-	25±3,7	1,0	30±7,6	1,0	-
	5x10 ⁻⁵	34±2,7	0,9	40±8,6	1,1	-	28±9,7	1,1	24±4,9	0,8	-
	10 ⁻⁴	35±7,4	0,9	39±5,8	1,1	-	29±7,5	1,2	23±9,8	0,8	-
	5x10 ⁻⁴ (Т)	11±0,5	0,3	27±8,9	0,8	-	30±9,6	1,2	28±6,6	1,0	-
	10 ⁻³ (Т)	0	0	0	0	-	10±3,7	0,4	0	0	-

^а Среднее число ревертантов на чашку ± стандартное отклонение.

^б Отношение числа ревертантов в опыте к числу ревертантов в контроле

^в Мутагенная активность препарата («+» означает наличие, «-» отсутствие мутагенной активности).

^г Токсичность при данной дозе соединения.

Приложение А (продолжение)

Таблица А4 - Тестирования мутагенного эффекта узкобороздочных лигандов на индикаторных штаммах *Salmonella typhimurium* TA100

Соединение	Доза (нмоль/чашка)	TA100									
		-S9					+S9				
		Эксперимент 1		Эксперимент 2		МА ^c	Эксперимент 1		Эксперимент 2		МА
		M ± m ^a	M _i /M ₀ ^b	M ± m	M _i /M ₀		M ± m	M _i /M ₀	M ± m	M _i /M ₀	
Контроль	0	75±2,6	1,0	80±9,9	1,0	-	93±6,9		91±10,8	-	-
Бенз(а)пирен	4,0×10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	736±78,5	8	625±44,8	7	+
МННГ	6,8×10 ⁻⁵	441±33,2	6	444±23,0	6	+	-	-	-	-	-
DAPI	5×10 ⁻⁶	73±9,7	0,9	82±11,7	1,0	-	92±10,4	1,0	94±10,3	1,0	-
	10 ⁻⁵	77±11,5	1,0	94±9,5	1,2	-	100±10,5	1,1	109±9,1	1,2	-
	5×10 ⁻⁵	84±9,8	1,1	70±7,9	0,9	-	98±19,5	1,1	103±11,9	1,1	-
	10 ⁻⁴	81±6,9	1,1	83±5,7	1,0	-	83±9,5	0,9	75±9,6	0,8	-
	5×10 ⁻⁴ (T) ^г	23±1,9	0,3	17±1,6	0,2	-	13±8,7	0,15	31±7,4	0,3	
	10 ⁻³ (T)	0	0	0	0	-	0	0	0	0	
Диминазен	5×10 ⁻⁶	72±11,9	1,0	83±6,3	1,0	-	100±11,9	1,1	99±10,8	1,1	-
	10 ⁻⁵	74±6,5	1,0	84±7,3	1,1	-	104±11,3	1,1	107±9,3	1,2	-
	5×10 ⁻⁵	77±8,6	1,0	85±7,6	1,1	-	92±1,8	1,0	90±10,8	1,0	-
	10 ⁻⁴	88±8,7	1,2	79±5,9	1,0	-	92±8,3	1,0	81±7,5	0,9	-
	5×10 ⁻⁴ (T)	21±9,5	0,3	37±4,9	0,5	-	27±1,6	0,3	23±9,6	0,3	-
	10 ⁻³ (T)	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-
Пентамидин	5×10 ⁻⁶	76±6,6	1,0	86±8,2	1,1	-	90±9,8	1,0	100±11,2	1,1	-
	10 ⁻⁵	82±8,6	1,1	74±9,5	0,9	-	95±12,4	1,0	98±9,7	1,1	-
	5×10 ⁻⁵	73±6,2	1,0	86±4,3	1,1	-	102±5,2	1,1	85±8,6	0,9	-
	10 ⁻⁴	84±9,8	1,1	77±8,7	1,0	-	68±3,8	0,7	99±6,9	1,1	-
	5×10 ⁻⁴ (T)	25±3,2	0,3	26±2,3	0,3	-	22±4,8	0,2	32±4,7	0,4	-
	10 ⁻³ (T)	0	0	0	0	-	0	0	0	0	-

^a Среднее число ревертантов на чашку ± стандартное отклонение.

^b Отношение числа ревертантов в опыте к числу ревертантов в контроле

^b Мутагенная активность препарата («+» означает наличие, «-» отсутствие мутагенной активности)

^г Токсичность при данной дозе соединения

Приложение А (продолжение)

Таблица А5 - Результаты тестирования мутагенного эффекта CBL0175 на индикаторном штамме TA98

Исследуемое вещество	Доза на чашку, мкмоль	Штамм TA98									
		-S9				+S9					
		Опыт 1		Опыт 2		МА ^В	Опыт 1		Опыт 2		МА
		М ± m ^а	M _i /M _o ^б	М ± m	Mi/Mo		М ± m	M _i /M _o	М ± m	Mi/M _o	
Контроль	0	17,3±5,6	1,0	19,7±9,7	1,0	-	25,0±3,5	1,0	21,2±6,4	1,0	-
2-АФ	110000	-	-	-	-	-	569,3±28,1	23	812,8±152,7	37	+
ДДДТДП	67000	1718,7±183,3	101	1347,1±187,9	71	+	-	-	-	-	-
CBL0175	0,1	17,7±1,2	1,0	19,3±4,6	1,0	-	22,0±3,5	0,9	21,3±3,7	1,0	-
	1	14,7±1,2	0,8	20,7±3,3	1,1	-	21,7±2,5	0,8	20,2±7,1	1,0	-
	10	16,7±3,7	0,9	18,9±1,8	1,0	-	22,3±6,5	0,9	17,0±4,2	0,8	-
	100(T) ^Г	5,0±0,8	0,3	3,5±0,5	0,2	-	7,0±1,9	0,3	4,0±0,7	0,2	-

^а Среднее число ревертантов на чашку ± стандартное отклонение.^б Отношение числа ревертантов в опыте к числу ревертантов в контроле^в Мутагенная активность препарата («+» означает наличие, « - » отсутствие мутагенной активности)^г Токсичность при данной дозе соединения

Приложение А (окончание)

Таблица А6 - Результаты тестирования мутагенного эффекта CBL0175 на индикаторном штамме TA100

Исследуемое вещество	Доза на чашку, мкмоль	Штамм TA100									
		-S9				+S9					
		Опыт 1		Опыт 2		МА ^В	Опыт 1		Опыт 2		МА
		М ± m ^а	M _i /M _o ^б	М ± m	Mi/Mo		М ± m	Mi/M _o	М ± m	Mi/M _o	
Контроль	0	93,0±14,7	1,0	78,9±9,4	1,0	-	85,7±9,9	1,0	90,7±8,8	1,0	-
2-АФ	110000	-	-	-	-	-	436,3±87,4	5,1	874,3±124,5	9,7	+
МННГ	68000	698,7±138,1	7,5	873,7±111,4	11,1	+	-	-	-	-	-
CBL0175	0,1	89,6±11,6	1,0	68,4±4,6	0,9	-	96,7±20,5	1,1	91,4±9,5	1,0	-
	1	57,0±10,4	0,6	71,3±10,1	0,9	-	82,3±5,5	1,0	80,8±7,3	0,9	-
	10	32,3±8,1	0,3	53,0±8,1	0,7	-	79,3±18,7	0,9	57,6±17,1	0,6	-
	100(Т)	0	-	2,5±0,5	0,03	-	20,7±5,3	0,2	13,7±5,2	0,1	-

^а Среднее число ревертантов на чашку ± стандартное отклонение.^б Отношение числа ревертантов в опыте к числу ревертантов в контроле^в Мутагенная активность препарата («+» означает наличие, « - » отсутствие мутагенной активности)^г Токсичность при данной дозе соединения

Приложение Б

Таблица Б1 - Частота появления опухолевых клонов *wts* при обработке личинок генотипа *wts/+* узкобороздочными лигандами (* – частота статистически значимо отлична от соответствующего контроля при использовании критерия Фишера, $p < 0,01$)

Вещество	Концентрация, мМ	Количество особей (N)	Количество опухолевых клонов (n)	n/N*100%
Эксперименты на гетерозиготах <i>wts/+</i>				
Хехст33342	10	147	5	3,4
	15	140	14	10,0*
	20	336	40	12,0*
Хехст33258	5	228	8	2,8
	10	257	6	2,3
	20	425	26	6,1*
Пентамидин	20	310	9	2,9
	30	741	20	2,7
Диминазен	20	556	15	2,7
	30	562	18	3,2
DAPI	0,5	462	11	2,4
	1	464	13	2,8
CBL0175	0,5	213	15	7*
	1	377	50	13*
CBL0137	1	642	53	8*
	1,5	385	47	12*
Оксоплатин	3	564	128	22,7*
ДМСО	10%	770	20	2,6
Вода	-	820	20	2,4

Таблица Б2 - Частота появления опухолевых клонов *wts* при обработке личинок генотипов *wts/+* и *wts/TM3* соединением Хехст33342 (* – частота статистически значимо отлична от соответствующего контроля при использовании критерия Фишера, $p < 0,01$)

Вещество	Концентрация, мМ	Количество особей (N)	Количество опухолевых клонов (n)	n/N*100%
Эксперименты на гетерозиготах <i>wts/TM3</i>				
Хехст33342	20	701	6	0,86
Оксоплатин	3	984	32	4,7*
ДМСО	10%	985	6	0,6
Эксперименты на гетерозиготах <i>wts/+</i>				
Хехст33342	20	336	40	11,9*
Оксоплатин	3	447	98	21,9*
ДМСО	10%	820	20	2,6

Таблица Б3 - Частота появления опухолевых клонов *wts* при обработке личинок генотипов *wts/+* и *wts/Mus309* соединением Хехст33342 (* – частота статистически значимо отлична от соответствующего контроля при использовании критерия Фишера, $p < 0,01$)

Вещество	Концентрация, мМ	Количество особей (N)	Количество опухолевых клонов (n)	n/N*100%
Эксперименты на гетерозиготах <i>wts/Mus309</i>				
Хехст33342	20	622	42	6,75
Оксоплатин	3	398	358	90*
ДМСО	10%	542	26	4,8
Эксперименты на гетерозиготах <i>wts/+</i>				
Хехст33342	20	834	87	10,4*
Оксоплатин	3	342	109	31,9*
ДМСО	10%	481	13	2,7

Приложение В

Таблица В1 - Изменение количества бенз (а)пирена в среде в зависимости от условий инкубации. В таблице представлены значения высот пиков люминисценции бенз (а)пирена (БП) и 1,12-бензперилена (БПЛ, использовался в качестве внутреннего стандарта) при длинах волн 403 и 406 нм соответственно, отношения этих значений с учётом разведения пробы и соответствующие им остаточные количества бенз(а)пирена в среде в зависимости от условий инкубации

Концентрация бенз(а)пирена	Плотность рассаdки (кол-во клеток в лунке)	БП/ БПЛ 1.12М	Остаточное количество БП, %
Инкубация 24 часа			
1×10^{-6}	0	8,75	100,00
1×10^{-6}	40000	6,4	73,14
1×10^{-6}	120000	2,6	29,71
1×10^{-8}	0	0,342	100,00
1×10^{-8}	40000	0,1	29,24
1×10^{-8}	120000	0,088	25,73
Инкубация 48 часов			
1×10^{-6}	0	10,5	100,00
1×10^{-6}	40000	2,2	18,33
1×10^{-6}	120000	0,55	4,58
1×10^{-8}	0	0,35	100,00
1×10^{-8}	40000	0,077	22,00
1×10^{-8}	120000	0,11	31,43

Приложение Г

Таблица Г1 - Влияние кураксина на уровень экспрессии генов сигнального пути WNT при обработке клеток рака толстого кишечника HCT116 препаратом в течение 5 и 16 часов. Представлен логарифм отношения уровней экспрессии генов в экспериментальном и контрольном образцах ($\log_2$).

Функциональная группа	Ген	Изменение экспрессии ($\log_2$)	
		5ч	16ч
Таргетные гены сигнального пути WNT	<i>CMYC</i>	-2,9	-1,8
	<i>CD44</i>	-3,9	-3,4
	<i>MET</i>	-1,3	-1,2
	<i>MSL1</i>	-1,4	-2,15
	<i>LBH</i>	-2,1	-1,2
	<i>BMP4</i>	-2,9	-2,4
	<i>COX-2</i>	-3,4	-1,2
	<i>EGFR</i>	-1,2	-2,3
	<i>SMAD3</i>	-3,2	-1,2
	<i>LGR4</i>	-1,4	-10
	<i>ADAM10</i>	-1,4	-1,1
	<i>BIRC3</i>	-2,2	-2,1
	<i>CDX2</i>	-2,9	-1,2
	<i>CLDN1</i>	-1,9	-1,2
	<i>ENC1</i>	-1,7	-1,1
	<i>FGF18</i>	-2,3	-1,5
	<i>MYB</i>	-1,8	1,2
	<i>IL8</i>	-4,9	-4,8
Лиганд	<i>WNT16</i>	-1,5	-1,8
Рецепторы	<i>FZD5</i>	-1,8	-2
	<i>FZD1</i>	-1,2	1,7
	<i>FZD2</i>	-1,0	1,3
Негативные регуляторы	<i>APC</i>	-1,7	-1,02
	<i>APC2</i>	1,5	1,5
	<i>WIF1</i>	4,0	5,2
	<i>DKK1</i>	-4,3	-4,2

Приложение Д

Таблица Д1 - Количество новообразований толстого кишечника у мышей по группам

Группа		1,2-ДМГ			1,2-ДМГ + CBL0137			CBL0137	Контроль
		Кол-во мышей	% мышей	Кол-во опухолей	Кол-во мышей	% мышей	Кол-во опухолей	Кол-во мышей	Кол-во мышей
Самцы	Количество/доля животных в группе	36	100	-	43	100	-	36	35
	Самцы с аденомами	21	58,2	43	10	23,2	15	0	0
	с 1 аденомой	11	30,5	11	6	13,9	6	0	0
	с 2 аденомами	4	11,1	8	3	7,0	6	0	0
	с 3 аденомами	2	5,5	6	1	2,3	3	0	0
	с 4 и более аденом	4	11,1	18	0	0	0	0	0
	Самцы с аденокарциномой	7	19,0	8	0	0	0	0	0
	Самцы без опухолей	10	24,3	-	32	72,7	-	36	35
	Самцы, взятые в анализ фокусов с нарушением продукции муцина	31	100	-	33	100	-	0	0
	Самцы с амуциновыми фокусами в гистологически нормальной ткани кишки	6	19,3	-	3	9,0	-	0	0
	Самцы с амуциновыми фокусами в аденомах	17	54,8	-	8	24,2	-	0	0
	Самцы без амуциновых фокусов в аденомах	2	6,45	-	5	15,2	-	0	0
Самки	Количество/доля животных в группе	39	100	-	44	100	-	35	35
	Самки с аденомами	25	64,1	53	11	25,0	18	0	0
	с 1 аденомой	12	30,1	12	7	15,9	7	0	0
	с 2 аденомами	5	12,8	10	2	4,5	4	0	0
	с 3 аденомами	4	10,2	12	1	2,3	3	0	0
	с 4 и более аденом	4	10,2	19	1	2,3	4	0	0
	Самки с аденокарциномой	8	20,51	12	5	11,4	5	0	0
	Самки без опухолей	11	28,2	-	30	68,2	-	35	35
	Самки, взятые в анализ фокусов с нарушением продукции муцина	22	100	-	21	100	-	0	0
	Самки с амуциновыми фокусами в гистологически нормальной ткани кишки	0	0	-	1	4,8	-	0	0
	Самки с амуциновыми фокусами в аденомах	15	68,2	-	4	19,0	-	0	0
	Самки без амуциновых фокусов в аденомах	1	4,5	-	0	0	-	0	0

Таблица Е1.1 - Время появления первых узелков

№№ мыши	Время появления первых узелков (сут.)					
	Группа 1	Группа 2 ЦП	Группа 3 ЦФ	Группа 4 Дим	Группа 5 Дим + ЦП	Группа 6 Дим + ЦФ
1	3	3	3	3	3	13
2	3	3	3	6	8	3
3	3	3	3	3	6	3
4	3	3	3	6	9	8
5	3	3	3			
6	3	3	3	6	8	6
7	3	3	3	3	6	3
8	3	3	3	3	3	6
9	3	3	3	6	15	6
10	3	3	3			
М±m	3,00 ± 0,0	3,00 ± 0,0	3,00 ± 0,0	4,50 ± 0,53	7,33 ± 1,13	6,00 ± 1,12

Таблица Е1.2 - Влияние диминазена на время появления первых узелков (на 3 сутки после перевивки См322)

№№ мыши	Время появления первых узелков (сут.)					
	Группа 1	Группа 2 ЦП	Группа 3 ЦФ	Группа 4 Дим	Группа 5 Дим + ЦП	Группа 6 Дим + ЦФ
1	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	-	-	+
3	+	+	+	+	-	+
4	+	+	+	-	+	-
5	+	+	+		-	
6	+	+	+	-	-	-
7	+	+	+	+	-	+
8	+	+	+	+	+	-
9	+	+	+	-	-	-
10	+	+	+			
	100%			Dim – + 10 мышей (40%) всего 25 мышей; - 15 мышей (60%) *p ≤ 0,01 (χ²)		

22.05.18. - перевивка См322; 23.05.18. - начало введения Диминазена; 25.05.18. – начало введения Цисплатина (ЦП) и Циклофосфана (ЦФ). Уровень статистической значимости оценивали по критерию χ^2 Пирсона.

Приложение Е (продолжение)

Таблица Е2 - Динамика объема опухоли См322. Группа Контроль (К)

№ мышь	Сутки после перевивки опухоли/масса мыши (г)/объем опухоли (см³)													
	25.05. 3 сут.	28.05. 6 сут.	30.05. 8 сут.	01.06. 10 сут.	04.06. 13 сут.	06.06. 15 сут.	08.06. 17 сут.	13.06. 22 сут.	15.06. 24 сут.	18.06. 27 сут.	20.06. 29 сут.	22.06. 31 сут.		
1	0,008	0,018	0,207	0,754	2,744	5,661	Пала 08.06.18.							
2	0,008	0,024	0,225	2,106	Пала 04.06.18.									
3	0,001	0,001	0,050	0,336	3,255	Пала 06.06.18.								
4	0,001	0,050	0,294	1,134	3,150	6,400	Пала 08.06.18.							
5	0,001	0,040	0,155	0,697	5,940	6,615	Пала 08.06.18.							
6	0,001	0,048	0,144	1,008	3,750	5,950	11,480	Пала 13.06.18.						
7	0,001	0,090	0,330	0,432	0,900	3,510	5,940	Пала 13.06.18.						
8	0,001	0,030	0,375	2,184	3,600	7,350	Пала 08.06.18.							
9	0,008	0,050	0,252	2,016	5,100	6,720	13,320	Пала 13.06.18.						
10	0,001	0,008	0,243	0,932	2,480	4,440	7,400	12,950	12,950	Пала 18.06.18.				
M±m	0,003 ±0,001	0,036 ±0,008	0,228 ±0,029	1,160 ±0,208	3,435 ±0,460	5,831 ±0,422	9,535 ±1,491							

22.05.18. - перевивка саркомы матки См 322.

Таблица Е3 - Динамика объема опухоли См322. Группа Цисплатин (ЦП)

№ мышь	Сутки после перевивки опухоли/масса мыши (г)/объем опухоли (см³)														
	25.05. 3 сут.	28.05. 6 сут.	30.05. 8 сут.	01.06. 10 сут.	04.06. 13 сут.	06.06. 15 сут.	08.06. 17 сут.	13.06. 22 сут.	15.06. 24 сут.	18.06. 27 сут.	20.06. 29 сут.	22.06. 31 сут.	25.06. 34 сут.	27.06. 36 сут.	29.06. 38 сут.
1	0,001	0,008	0,060	0,098	0,189	0,267	0,325	Пала 13.06.18.							
2	0,001	0,008	0,072	0,054	0,120	0,054	0,077	3,850	5,000	6,000	Пала 20.06.18.				
3	0,001	0,004	0,045	0,091	0,091	1,190	5,600	Пала 13.06.18.							
4	0,001	0	0,060	0,396	1,881	2,835	6,435	Пала 12.06.18.							
5	0,001	0,004	0,027	0,240	0,414	1,485	4,284	Пала 13.06.18.							
6	0,001	0,008	0,072	0,768	0,320	0,720	1,728	4,500	5,400	Пала 18.06.18.					
7	0,001	0,018	0,032	0,050	0,075	0,640	2,475	2,275	Пала 15.06.18.						
8	0,001	0,008	0,147	0,198	0,384	0,405	2,475	3,150	4,080	4,080	6,160	7,700	6,600	Пала 27.06.18.	
9	0,008	0,018	0,018	0,177	0,251	1,050	1,890	2,070	2,835	5,250	6,900	9,108	9,867		
10	0,001	0,012	0,045	0,108	0,108	0,900	4,140	8,400	8,750	12,000	13,440	Пала 22.06.18.			
M±m	0,002 ±0,001	0,009 ±0,002	0,058 ±0,011	0,218 ±0,066	0,383 ±0,162	0,955 ±0,237	2,943 ±0,637	4,041 ±0,867	5,213 ±0,882	6,833 ±1,530	8,833 ±1,891	8,404 ±0,499	8,234 ±1,159		

22.05.18. - перевивка саркомы матки См 322; 25.05.18 - 1-ое введение Цисплатина, 8.05.18 - 2-ое введение Цисплатина

Приложение Е (продолжение)

ТаблицаЕ4 - Динамика объема опухоли См322. Группа Циклофосамид (ЦФ)

№ мышы	Сутки после перевивки опухоли/масса мышы (г)/объем опухоли (см ³)														
	25.05. 3 сут.	28.05. 6 сут.	30.05. 8 сут.	01.06. 10 сут.	04.06. 13 сут.	06.06. 15 сут.	08.06. 17 сут.	13.06. 22 сут.	15.06. 24 сут.	18.06. 27 сут.	20.06. 29 сут.	22.06. 31 сут.	25.06. 34 сут.	27.06. 36 сут.	29.06. 38 сут.
1	0,001	0	0,018	0,168	0,760	0,081	0,225	0,225	0,003	0	0	0	0	0	0
2	0,001	0	0,001	0,004	0,218	0,168	0,087	0,390	0	0	0,050	0,105	0,480	1,320	1,430
3	0,001	0	0	0	0,001	0,001	0,001	0,042	0,050	0,210	0,080	0,080	0,120	0,576	1,320
4	0,001	0,004	0,027	0,042	0,093	0,299	0,125	0	0,002	0,002	0,001	0,001`	0,002	0,002	0
5	0,008	0,001	0,001	0,004	0,125	0,049	0,075	0,020	0,001	0,004	0,004	0,010	0,126	0,560	0,840
6	0,008	0,008	0,018	0,018	0,120	0,018	0,161	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0,001	0	0,008	0,016	0,189	0,315	0,020	0	0	0	0	0	0	0	0
8	0,001	0,004	0,006	0,018	0,162	0,105	0,120	0,125	0,210	0,315	0	0	0	0,004	0,015
9	0,008	0	0,001	0,032	0,190	0,091	0,018	0	0	0,072	0,200	0,540	2,340	4,420	6,930
10	0,001	0	0,018	0,032	0,075	0,126	0,108	0,910	0	0,010	0,001	0	0	0	0
M±m	0,003 ±0,001	0,002 ±0,001	0,010 ±0,003	0,033 ±0,015	0,193 ±0,063	0,125 ±0,032	0,094 ±0,021	0,171 ±0,087	0,027 ±0,020	0,061 ±0,033	0,034 ±0,019	0,074 ±0,051	0,307 ±0,219	0,688 ±0,415	1,054 ±0,644

№ мышы	Сутки после перевивки опухоли/масса мыши (г)/объем опухоли (см³)														
	02.07. 41 сут.	04.04. 43 сут.	06.07. 45 сут.	09.07. 48 сут.	13.07. 52 сут.	16.07. 55 сут.	20.07. 59 сут.								
1	0	0	0	0	0	0	0								
2	1,120	Пала 04.07.18.													
3	2,400	4,080	4,896	6,864	Пала 12.07.18.										
4	0	0	0	0	0	0	0								
5	2,250	4,830	6,885	14,168	Пала 10.07.18.										
6	0	0	0	0	0	0	0	Пала 27.08.18.							
7	0	0	0	0,008	0,060	0,252	0,392	Пала 06.08.18.							
8	0,336	0,720	1,287	Пала 09.07.18.											
9	9,775	Пала 04.07.18.													
10	0	0	0	0	0	0	0								
M±m	1,588 ±0,909	1,204 ±0,672	1,634 ±0,898	3,006 ±1,938	0,012 ±0,011	0,050 ±0,045	0,078 ±0,070								

22.05.18. - перевивка саркомы матки См 322

25.05.18 - 1-ое введение Циклофосфана

28.05.18 - 2-ое введение Циклофосфана

Приложение Е (продолжение)

Таблица Е5 - Динамика объема опухоли См322. Группа Диминазен (Дим)

№ мышы	Сутки после перевивки опухоли/масса мышы (г)/объем опухоли (см³)														
	25.05. 3 сут.	28.05. 6 сут.	30.05. 8 сут.	01.06. 10 сут.	04.06. 13 сут.	06.06. 15 сут.	08.06. 17 сут.	13.06. 22 сут.	15.06. 24 сут.	18.06. 27 сут.	20.06. 29 сут.	22.06. 31 сут.	25.06. 34 сут.	27.06. 36 сут.	
1	0,001	0,008	0,008	0,028	0,121	0,420	0,051	0,826	1,120	1,728	1,960	Пала 22.06.18.			
2	0	0,001	0,008	0,018	0,117	0,195	0,255	2,156	1,600	Пала 18.06.18.					
3	0,001	0,008	0,315	0,770	0,459	1,000	2,178	4,200	2,100	5,400	Пала 20.06.18.				
4	0	0,001	0,008	0,048	0,150	0,735	0,735	1,890	1,190	2,640	3,250	Пала 22.06.18.			
5	Пала 25.05.18.														
6	0	0,001	0,008	0,198	0,825	1,200	3,220	Пала 12.06.18.							
7	0,001	0,001	0,001	0,030	0,416	1,056	2,990	Пала 13.06.18.							
8	0,001	0,008	0,060	0,240	1,430	3,640	3,780	4,480	Пала 15.06.18.						
9	0	0,001	0,018	0,120	0,264	0,840	1,440	4,500	2,700	Пала 17.06.18.					
M±m	0,001 ±0,0	0,004 ±0,001	0,053 ±0,035	0,182 ±0,083	0,473 ±0,150	1,136 ±0,352	1,831 ±0,471	3,009 ±0,590	1,742 ±0,265	3,256 ±0,902	2,605 ±0,457				

22.05.18 - перевивка саркомы матки См 322.

23.05.18 - 1-ое введение Диминазена.

25.05.18 - 2-ое введение Диминазена.

28.05.18 - 3-е введение Диминазена.

Приложение Е (продолжение)

Таблица Е6 - Динамика объема опухоли См322. Группа Диминазен+Цисплатин (Дим+ЦП)

№ мышы	Сутки после перевивки опухоли/масса мышы (г)/объем опухоли (см³)														
	25.05. 3 сут.	28.05. 6 сут.	30.05. 8 сут.	01.06. 10 сут.	04.06. 13 сут.	06.06. 15 сут.	08.06. 17 сут.	13.06. 22 сут.	15.06. 24 сут.	18.06. 27 сут.	20.06. 29 сут.	22.06. 31 сут.	25.06. 34 сут.	27.06. 36 сут.	29.06. 38 сут.
1	0,001	0	0	0,018	0,036	0,150	0,200	0,700	0,840	0,960	0,700	1,800	2,210	3,024	6,358
2	0	0	0,027	0,168	0,083	0,328	0,601	5,460	7,800	11,700	Пала 19.06.18.				
3	0	0,001	0,001	0,008	0,008	0,008	0,008	0,357	0,120	1,550	1,728	2,600	Пала 25.06.18.		
4	0,001	0	0	0,030	0,031	1,134	1,134	Пала 12.06.18.							
5	0	0	0,012	0,060	0,350	0,240	0,440	5,148	4,680	Пала 18.06.18.					
6	0	0	0,012	0,054	0,032	0,020	0,045	2,100	2,730	7,200	8,000	10,400	Пала 25.06.18.		
7	0	0,001	0,018	0,072	0,090	0,210	0,315	0,072	0,006	0,006	0,006	0,004	0,002	0	0
8	0,001	0,001	0,008	0,027	0,060	0,945	0,990	Пала 12.06.18.							
9	0	0	0	0	0	0,001	0,008	0,078	0,126	0,210	0,700	1,200	2,652	4,845	7,980
M±m	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,009 ±0,003	0,049 ±0,016	0,077 ±0,034	0,337 ±0,131	0,416 ±0,132	1,988 ±0,828	2,329 ±1,038	3,604 ±1,780	2,227 ±1,312	3,201 ±1,651	1,621 ±0,670	2,623 ±1,155	4,779 ±1,991

№ мышы	Сутки после перевивки опухоли/масса мышы (г)/объем опухоли (см ³)														
	02.07. 41 сут.	04.04. 43 сут.	06.07. 45 сут.	09.07. 48 сут.	13.07. 52 сут.	16.07. 55 сут.	20.07. 59 сут.								
1	Пала 02.07.18.														
2															
3															
4															
5															
6															
7	0	0	0	0	0	0	0								
8															
9	9,500	10,450	6,300	8,250	Пала 13.07.18.										
M±m	4,750 ±3,369	5,225 ±3,706	3,150 ±2,234	4,125 ±2,926											

22.05.18. - перевивка саркомы матки См 322

25.05.18 - 2-ое введение Диминазена

25.05.18 - 1-ое введение Цисплатина

23.05.18 - 1-ое введение Диминазена

28.05.18 - 3-е введение Диминазена

28.05.18 - 2-ое введение Цисплатина

Приложение Е (продолжение)

Таблица Е7 - Динамика объема опухоли См322. Группа Диминазен+Циклофосфан

№ мышь	Сутки после перевивки опухоли/масса мыши (г)/объем опухоли (см ³)														
	25.05. 3 сут.	28.05. 6 сут.	30.05. 8 сут.	01.06. 10 сут.	04.06. 13 сут.	06.06. 15 сут.	08.06. 17 сут.	13.06. 22 сут.	15.06. 24 сут.	18.06. 27 сут.	20.06. 29 сут.	22.06. 31 сут.	25.06. 34 сут.	27.06. 36 сут.	29.06. 38 сут.
1	0	0	0	0	0,008	0,008	0,008	0	0	0	0,018	0,004	0,032	0,090	0,294
2	0,001	0,004	0,004	0,004	0,060	0,100	0,252	0,118	0,140	0,500	0,560	1,500	Пала 24.06.18.		
3	0,001	0,001	0,001	0,008	0,027	0,048	0,048	0,797	0,490	0,100	0,225	0,560	1,320	2,340	3,315
4	0	0	0,008	0	0,001	0	0,075	0	0	0	0	0	0,001	0,050	0,245
5	Пала 25.05.18.														
6	0	0,001	0,008	0,024	0,049	0,028	0,028	0,625	1,200	3,000	2,700	4,200	Пала 24.06.18.		
7	0,001	0,001	0,001	0,008	0,027	0,027	0,027	0	0,090	0,567	1,056	2,400	5,950	5,950	7,000
8	0	0,001	0,001	0,008	0,048	0,048	0,048	0	0	0	0	0	0	0,001	0,001
9	0	0,001	0,001	0,002	0,225	0,240	0,240	0	0,050	0,200	0,672	1,040	2,640	5,760	6,936
M±m	0,0 ±0,0	0,001 ±0,0	0,003 ±0,001	0,007 ±0,003	0,056 ±0,024	0,062 ±0,026	0,091 ±0,032	0,193 ±0,108	0,246 ±0,138	0,546 ±0,336	0,654 ±0,301	1,213 ±0,488	1,657 ±0,876	2,365 ±1,060	2,965 ±1,241

№ мышь	Сутки после перевивки опухоли/масса мыши (г)/объем опухоли (см³)														
	02.07. 41 сут.	04.04. 43 сут.	06.07. 45 сут.	09.07. 48 сут.	13.07. 52 сут.	16.07. 55 сут.	20.07. 59 сут.								
1	0,900	1,188	1,584	3,876	4,752	7,500	Пала 20.07.18								
2															
3	5,880	6,900	Пала 06.07.18.												
4	1,584	2,970	9,100	10,000	14,400	Пала 15.07.18/									
5															
6															
7	Пала 01.07.18.														
8	0,004	0,012	0,018	0,075	0,168	0,448	0,800	Пала 02.08.18.							
9	Пала 02.07.18.														
M±m	2,092 ±1,129	2,768 ±1,304	3,567 ±2,991	4,650 ±2,363	6,440 ±3,429	3,974 ±2,501									

22.05.18. - перевивка саркомы матки См 322. 23.05.18 - 1-ое введение Диминазена 25.05.18 - 2-ое введение Диминазена 28.05.18 - 3-е введение Диминазена
 25.05.18 - 1-ое введение Циклофосфана 28.05.18 - 2-ое введение Циклофосфана

Приложение Е (продолжение)

Таблица Е8 - Средний объем опухоли См 322 по группам

Группы	Сутки после перевивки опухоли/масса мыши (г)/объем опухоли (см ³), М±m															
	25.05. 3 сут.	28.05. 6 сут.	30.05. 8 сут.	01.06. 10 сут.	04.06. 13 сут.	06.06. 15 сут.	08.06. 17 сут.	13.06. 22 сут.	15.06. 24 сут.	18.06. 27 сут.	20.06. 29 сут.	22.06. 31 сут.	25.06. 34 сут.	27.06. 36 сут.	29.06. 38 сут.	02.07. 41 сут.
Группа 1 К	0,003 ±0,001	0,036 ±0,008	0,228 ±0,029	1,160 ±0,208	3,435 ±0,460	5,831 ±0,422	9,535 ±1,491									
Группа 2 ЦП	0,002 ±0,001	0,009 ±0,002	0,058 ±0,011	0,218 ±0,066	0,383 ±0,162	0,955 ±0,237	2,943 ±0,637	4,041 ±0,867	5,213 ±0,882	6,833 ±1,530	8,833 ±1,891	8,404 ±0,499	8,234 ±1,159			
Группа 3 ЦФ	0,003 ±0,001	0,002 ±0,001	0,010 ±0,003	0,033 ±0,015	0,193 ±0,063	0,125 ±0,032	0,094 ±0,021	0,171 ±0,087	0,027 ±0,020	0,061 ±0,033	0,034 ±0,019	0,074 ±0,051	0,307 ±0,219	0,688 ±0,415	1,054 ±0,644	1,054 ±0,644
Группа 4 Дим	0,001 ±0,0	0,004 ±0,001	0,053 ±0,035	0,182 ±0,083	0,473 ±0,150	1,136 ±0,352	1,831 ±0,471	3,009 ±0,590	1,742 ±0,265	3,256 ±0,902	2,605 ±0,457					
Группа 5 Дим + ЦП	0,0 ±0,0	0,0 ±0,0	0,009 ±0,003	0,049 ±0,016	0,077 ±0,034	0,337 ±0,131	0,416 ±0,132	1,988 ±0,828	2,329 ±1,038	3,604 ±1,780	2,227 ±1,312	3,201 ±1,651	1,621 ±0,670	2,623 ±1,155	4,779 ±1,991	4,750 ±3,369
Группа 6 Дим + ЦФ	0,0 ±0,0	0,001 ±0,0	0,003 ±0,001	0,007 ±0,003	0,056 ±0,024	0,062 ±0,026	0,091 ±0,032	0,193 ±0,108	0,246 ±0,138	0,546 ±0,336	0,654 ±0,301	1,213 ±0,488	1,657 ±0,876	2,365 ±1,060	2,965 ±1,241	2,092 ±1,129
p_{1,4}		≤0,01	≤0,01	≤0,001	≤0,001	≤0,001	≤0,001									
p_{2,5}		≤0,01	≤0,01	≤0,05	≥0,05	≤0,05	≤0,01	≥0,05	≥0,05	≥0,05	≤0,05	≤0,05	≤0,001			
p_{3,6}		≥0,05	≥0,05	≥0,05	≥0,05	≥0,05	≥0,05	≥0,05	≥0,05	≥0,05	≥0,05	≤0,05	≥0,05			

Уровень статистической значимости различий между группами оценивали по критерию Стьюдента.

p_{1,2} < 0,05;

p_{1,3} < 0,001;

p_{1,4} < 0,001;

p_{1,5} < 0,001;

p_{1,6} < 0,001;

p_{2,5} < 0,01;

p_{3,6} ≥ 0,05.

Приложение Е (окончание)

Таблица Е9 - Продолжительность жизни животных

№№ мыши	Продолжительность жизни (сут.)/ Группа					
	Группа 1 К	Группа 2 ЦП	Группа 3 ЦФ	Группа 4 Дим	Группа 5 Дим + ЦП	Группа 6 Дим + ЦФ
1	17	22	жива	31	41	59
2	13	29	43	27	28	33
3	15	22	51	29	34	45
4	17	21	жива	31	21	54
5	17	22	49		27	
6	22	27	97	21	34	33
7	22	24	76	22	жива	40
8	17	36	48	24	21	72
9	22	38	43	26	52	41
10	27	31	жива			
M±m	18,90 ± 1,26	27,20 ± 1,85	53,40 ± 2,21	26,38 ± 1,27	35,33 ± 4,24	45,63 ± 3,59

Продолжительность жизни у выживших мышей считалась на момент завершения эксперимента – 60 дней.

Уровень статистической значимости различий между группами оценивали по критерию Стьюдента.

p_{1,2} < 0,05;

p_{1,3} < 0,001;

p_{1,4} < 0,01;

p_{1,5} < 0,01;

p_{1,6} < 0,01;

p_{2,5} ≥ 0,05;

p_{3,6} ≥ 0,05.

Приложение Ж

Таблица Ж1 - Динамика роста объема опухоли. Группа Контроль (P388)

№ мышы	Дата измерения (сутки после перевивки опухоли) / масса мышы/ объем опухоли (см³)												
	7.11.17. масса, г	13.11.17. 5 сутки	20.11.17. 12 сутки	22.11.17. масса, г	22.11.17. 14 сутки	24.11.17. 16 сутки	27.11.17. 19 сутки	29.11.17. масса, г	29.11.17. 21 сутки	01.12.17. 23 сутки	04.12.17. 26 сутки		
1	18	0	0,008	20	0,008	0,032	0,004	20	0	0	0,001		
2	21	0	0,008	23	0,058	0,100	0,100	22	0,001	0,001	0		
3	22	0	0,450	23	2,400	Пала 23.11.17.							
4	20	0	0,600	23	4,025	7,920	Пала 27.11.17.						
5	20	0	0,008	21	0,080	0,050	0,050	21	0,004	0	0		
6	21	0	0,450	23	3,050	Пала 23.11.17.							
7	19	0	0,080	Пала 22.11.17.									
8	20	0	0,075	23	2,052	4,500	Пала 27.11.17.						
9	18	0	0,105	22	2,290	Пала 23.11.17.							
M±m	19,89 ±0.43	0	0,198 ±0.073	22,25 ±0.39	1,745 ±0.505	2,520 ±1.429	0,051 ±0.023	21,00 ±0.47	0,002 ±0.001	0,00 ±0.0	0,00 ±0.0		

08.11.17. – перевивка P-388 п/к

20.11.17. – начало введения физраствора п/к.

Таблица Ж2 - Динамика роста объема опухоли. Группа ЦП (Цисплатин)

№ мышы	Дата измерения (сутки после перевивки опухоли) / масса мышы/ объем опухоли (см³)												
	7.11.17. масса, г	13.11.17. 5 сутки	20.11.17. 12 сутки	22.11.17. масса, г	22.11.17. 14 сутки	24.11.17. 16 сутки	27.11.17. 19 сутки	29.11.17. масса, г	29.11.17. 21 сутки	01.12.17. 23 сутки	04.12.17. 26 сутки		
1	18	0	0,270	22	0,495	Пала 24.11.17.							
2	20	0	0,027	20	0,075	0,090	0	22	0	0	0		
3	20	0	0,050	21	0,009	0,032	0	22	0	0	0		
4	20	0	0,050	22	0,050	0,140	0,012	24	0,001	0	0		
5	24	0	1,125	25	1,683	1,668	1,670	Пала 29.11.17.					
6	18	0	0,315	19	1,695	Пала 23.11.17.							
7	19	0	0,147	20	0,192	0,352	0,048	22	0,018	0,008	0,008		
8	23	0	0,180	22	1,920	2,400	Пала 27.11.17.						
M±m	20,25 ±0,72	0	0,271 ±0,119	21,38 ±0,61	0,765 ±0,279	0,780 ±0,374	0,346 ±0,270	22,50 ±0,43	0,005 ±0,004	0,002 ±0,002	0,002 ±0,002		

08.11.17. – перевивка P-388 п/к 20.11.17. – начало введения Цисплатина

Приложение Ж (продолжение)

Таблица ЖЗ - Динамика роста объема опухоли. Группа Дим (Диминазен)

№ мышы	Дата измерения (сутки после перевивки опухоли) / масса мышы/ объем опухоли (см³)												
	7.11.17. масса, г	13.11.17. 5 сутки	20.11.17. 12 сутки	22.11.17. масса, г	22.11.17. 14 сутки	24.11.17. 16 сутки	27.11.17. 19 сутки	29.11.17. масса, г	29.11.17. 21 сутки	01.12.17. 23 сутки	04.12.17. 26 сутки		
1	18	0	0,300	21	1,002	3,984	Пала 27.11.17.						
2	18	0	0,192	20	0,192	0,180	0,062	20	0,032	0	0		
3	21	0	0,027	22	0,072	0,256	0,024	22	0	0	0		
4	20	0	0,090	20	0,700	1,155	0,490	22	0,090	0,004	0,004		
5	20	0	0,192	22	0,324	0,432	0,288	23	0,040	0	0		
6	21	0	0,098	23	1,045	Пала 23.11.17.							
7	21	0	0,192	22	0,504	0,825	0,324	23	0,090	0,140	0,072		
8	19	0	0,072	20	0,192	0,476	0,192	22	0,144	0,027	0,008		
M±m	19,75 ±0,42	0	0,145 ±0,029	21,25 ±0,390	0,504 ±0,124	1,044 ±0,468	0,230 ±0,065	22,00 ±0,41	0,066 ±0,019	0,029 ±0,021	0,014 ±0,011		

08.11.17. – перевивка Р-388 п/к

20.11.17. – начало введения Диминазена

Приложение Ж (продолжение)

Таблица Ж4 - Сводная таблица. Средний объем перевиваемой опухоли по группам

Группы	Объем опухоли (см ³) / сутки после перевивки опухоли (M±m)							
	5	12	14	16	19	21	23	26
Группа 1 Контроль (перевивка Р-388)	0	0,198 ±0,073	1,745 ±0,505	2,520 ±1,429	Пало более 50% животных			
Группа 2 ЦП	0	0,271 ±0,119	0,765 ±0,279	0,780 ±0,374	0,346 ±0,270	Пало более 50% животных	0,002 ±0,002	0,002 ±0,002
Группа 3 Дим	0	0,145 ±0,029	0,504 ±0,124	1,044 ±0,468	0,230 ±0,065	Пало более 50% животных		
р _{1,2} р _{1,3}			р>0,05 р<0,05	р>0,05 р>0,05				

Приложение Ж (окончание)

Таблица Ж4 - Продолжительность жизни мышей опытных и контрольной групп после перевивки Р-388 до окончания эксперимента

Контроль (перевивка Р-388)		Цисплатин		Диминазен	
№ мыши	Продолж. жизни (сут.)	№ мыши	Продолж. жизни (сут.)	№ мыши	Продолж. жизни (сут.)
1	26	1	16	1	19
2	6	2	26	2	26
3	15	3	26	3	26
4	19	4	26	4	26
5	26	5	21	5	26
6	15	6	15	6	15
7	14	7	26	7	26
8	19	8	19	8	26
9	15				
M±m	19,44 ±1,64		21,88 ±1,57		23,75 ±1,42
p			p>0,05		p>0,05

Приложение И

Таблица И1 - Время появления первых узелков на месте перевивки аденокарциномы толстого кишечника «Акатол»

Группа CX5 (5 мг/кг)		Группа CX10 (10 мг/кг)		Группа CX15 (15 мг/кг)		Группа CX20 (20 мг/кг)		Группа 5 -ФУ		Группа К (контроль)	
№ клетки, № мыши	Время появл. узелков (сут.)	№ клетки, № мыши	Время появл. узелков (сут.)	№ клетки, № мыши	Время появл. узелков (сут.)	№ клетки, № мыши	Время появл. узелков (сут.)	№ клетки, № мыши	Время появл. узелков (сут.)	№ клетки, № мыши	Время появл. узелков (сут.)
Б-1, 1	7	Б-4, 1	6	Б-7, 1	7	Б-10, 1	7	Б-13, 1	5	Б-16, 1	7
Б-1, 2	7	Б-4, 2	7	Б-7, 2	6	Б-10, 2	6	Б-13, 2	7	Б-16, 2	5
Б-1, 3	7	Б-4, 3	5	Б-7, 3	6	Б-10, 3	7	Б-13, 3	5	Б-16, 3	5
Б-1, 4	7	Б-4, 4	6	Б-7, 4	5	Б-10, 4	6	Б-13, 4	7	Б-16, 4	7
Б-1, 5	5	Б-4, 5	5	Б-7, 5	5	Б-10, 5	7	Б-13, 5	9	Б-16, 5	6
Б-1, 6	5	Б-4, 6	6	Б-7, 6	7	Б-10, 6	6	Б-13, 6	7	Б-16, 6	7
Б-1, 7	7	Б-4, 7	6	Б-7, 7	7	Б-10, 7	6	Б-13, 7	5	Б-16, 7	6
Б-1, 8	5	Б-4, 8	5	Б-7, 8	6	Б-10, 8	5	Б-13, 8	7	Б-16, 8	6
Б-1, 9	7	Б-4, 9	6	Б-7, 9	7	Б-10, 9	5	Б-13, 9	5	Б-16, 9	6
Б-1, 10	7	Б-4, 10	7	Б-7, 10	7	Б-10, 10	9	Б-13, 10	7	Б-16, 10	7
Б-2, 1	6	Б-5, 1	7	Б-8, 1	6	Б-11, 1	7	Б-14, 1	7	Б-17, 1	5
Б-2, 2	6	Б-5, 2	5	Б-8, 2	7	Б-11, 2	6	Б-14, 2	7	Б-17, 2	5
Б-2, 3	5	Б-5, 3	5	Б-8, 3	8	Б-11, 3	7	Б-14, 3	7	Б-17, 3	5
Б-2, 4	7	Б-5, 4	7	Б-8, 4	8	Б-11, 4	8	Б-14, 4	6	Б-17, 4	5
Б-2, 5	7	Б-5, 5	6	Б-8, 5	6	Б-11, 5	5	Б-14, 5	5	Б-17, 5	7
Б-2, 6	5	Б-5, 6	5	Б-8, 6	6	Б-11, 6	6	Б-14, 6	7	Б-17, 6	7
Б-2, 7	5	Б-5, 7	6	Б-8, 7	6	Б-11, 7	8	Б-14, 7	5	Б-17, 7	5
Б-2, 8	6	Б-5, 8	7	Б-8, 8	6	Б-11, 8	7	Б-14, 8	5	Б-17, 8	7
Б-2, 9	7	Б-5, 9	5	Б-8, 9	5	Б-11, 9	6	Б-14, 9	5	Б-17, 9	8
Б-2, 10	5	Б-5, 10	5	Б-8, 10	7	Б-11, 10	7	Б-14, 10	5	Б-17, 10	5
Б-3, 1	5	Б-6, 6	7	Б-9, 1	7	Б-12, 6	7	Б-15, 1	7	Б-18, 6	7
Б-3, 2	6	Б-6, 7	9	Б-9, 2	7	Б-12, 7	6	Б-15, 2	7	Б-18, 7	7
Б-3, 3	6	Б-6, 8	7	Б-9, 3	6	Б-12, 8	9	Б-15, 3	7	Б-18, 8	5
Б-3, 4	5	Б-6, 9	5	Б-9, 4	7	Б-12, 9	8	Б-15, 4	9	Б-18, 9	5
Б-3, 5	6	Б-6, 10	6	Б-9, 5	5	Б-12, 10	5	Б-15, 5	6	Б-18, 10	7
M±m	6,04 ± 0,17 p >0,05		6,04 ± 0,20 p >0,05		6,40 ± 0,20 p >0,05		6,64 ± 0,23 p >0,05		6,36 ± 0,24 p >0,05		6,08 ± 0,20

Б1-Б18 – номера клеток; p – уровень статистической значимости различий между параметром в контрольной (группа К) и экспериментальной группах.

Приложение И (продолжение)

Таблица И2 - Средний объем перевиваемой опухоли «Акатол» (по группам)

Группы	Объем опухоли (см ³) / сутки после перевивки опухоли (M±m)						
	7 сут.	9 сут.	12 сут.	14 сут.	16 сут.	19 сут.	21 сут.
Группа CX5	0,02 ± 0,01	0,16 ± 0,03	1,39 ± 0,23	2,18 ± 0,25	3,10 ± 0,37	4,42 ± 0,46	5,22 ± 0,63
Группа CX10	0,02 ± 0,01	0,17 ± 0,02	1,76 ± 0,17	3,12 ± 0,16	3,94 ± 0,29	5,38 ± 0,32	6,12 ± 0,39
Группа CX15	0,02 ± 0,01	0,11 ± 0,02	1,55 ± 0,19	2,67 ± 0,27	3,40 ± 0,28	4,22 ± 0,26	5,26 ± 0,48
Группа CX20	0,01 ± 0	0,08 ± 0,02	0,97 ± 0,12	1,90 ± 0,20	2,47 ± 0,22	3,66 ± 0,30	3,95 ± 0,35
Группа 5-ФУ	0,02 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,28 ± 0,04	0,87 ± 0,12	1,54 ± 0,21	4,27 ± 0,69	5,40 ± 0,69
Группа К	0,02 ± 0,01	0,24 ± 0,10	1,71 ± 0,24	3,04 ± 0,27	4,41 ± 0,49	7,98 ± 0,89	9,41 ± 0,88
p1		> 0,05 (33%)*	> 0,05 (19%)*	< 0,05 (28%)*	< 0,05 (30%)*	< 0,001 (45%)*	< 0,001 (45%)*
p2		> 0,05 (29%)*			> 0,05 (11%)*	< 0,01 (33%)*	< 0,01 (35%)*
p3		> 0,05 (54%)*	> 0,05 (9%)*	> 0,05(12%)*	> 0,05 (23%)*	< 0,001 (47%)*	< 0,001 (44%)*
p4	> 0,05(50%)	> 0,05 (67%)*	< 0,01 (43%)*	< 0,01 (38%)*	< 0,001 (44%)*	< 0,001 (54%)*	< 0,001 (58%)*
p5		> 0,05 (54%)*	< 0,001 (84%)*	< 0,001 (71%)*	< 0,001 (65%)*	< 0,001 (46%)*	< 0,001 (43%)*

p1, p2, p3, p4, p5 - уровень статистической значимости различий между параметром в контрольной (группа К) и экспериментальной группах;

* - в скобках указан % торможения роста опухоли по объему.

Приложение И (продолжение)

Таблица И2 (продолжение) - Средний объем перевиваемой опухоли «Акатол» (по группам)

Группы	Объем опухоли (см ³) / сутки после перевивки опухоли						
	23 сут.	26 сут.	28 сут.	30 сут.	33 сут.	35 сут.	37 сут.
Группа CX5	5,84 ± 0,69	6,86 ± 0,85	7,99 ± 1,10	8,68 ± 1,19	10,89 ± 1,68	11,89 ± 1,83	13,02 ± 1,99
Группа CX10	6,26 ± 0,41	7,12 ± 0,48	7,82 ± 0,58	8,92 ± 0,63	11,17 ± 0,86	12,79 ± 0,94	13,71 ± 1,07
Группа CX15	5,85 ± 0,58	6,61 ± 0,69	7,19 ± 0,75	7,91 ± 0,79	9,72 ± 1,02	10,81 ± 1,16	12,22 ± 1,30
Группа CX20	4,37 ± 0,42	4,61 ± 0,44	5,01 ± 0,48	5,28 ± 0,47	6,20 ± 0,54	7,01 ± 0,61	7,31 ± 0,69
Группа 5-ФУ	6,93 ± 0,85	8,77 ± 1,08	10,91 ± 1,47	12,70 ± 1,66	15,65 ± 1,90	19,63 ± 2,18	22,13 ± 2,36
Группа К	10,80 ± 0,84	13,76 ± 0,95	15,26 ± 0,90	17,73 ± 1,19	21,32 ± 1,52	24,26 ± 1,72	27,64 ± 2,00
p₁	< 0,001 (46%)*	< 0,001 (50%)*	< 0,001 (47%)*	< 0,001 (51%)*	< 0,001 (49%)*	< 0,001 (51%)*	< 0,001 (53%)*
p₂	< 0,001 (42%)*	< 0,001 (48%)*	< 0,001 (49%)*	< 0,001 (50%)*	< 0,001 (48%)*	< 0,001 (47%)*	< 0,001 (50%)*
p₃	< 0,001 (46%)*	< 0,001 (52%)*	< 0,001 (53%)*	< 0,001 (55%)*	< 0,001 (54%)*	< 0,001 (55%)*	< 0,001 (56%)*
p₄	< 0,001 (60%)*	< 0,001 (66%)*	< 0,001 (67%)*	< 0,001 (70%)*	< 0,001 (71%)*	< 0,001 (71%)*	< 0,001 (74%)*
p₅	< 0,01 (36%)*	< 0,01 (36%)*	< 0,05 (29%)*	< 0,05 (28%)*	< 0,05 (27%)*	> 0,05 (19%)*	> 0,05 (20%)*

p₁, p₂, p₃, p₄, p₅ - уровень статистической значимости различий между параметром в контрольной (группа К) и экспериментальной группах;

* - в скобках указан % торможения роста опухоли по объему.

Приложение И (продолжение)

Таблица И2 (продолжение) - Средний объем перевиваемой опухоли «Акатол» (по группам)

Группы	Объем опухоли (см ³) / сутки после перевивки опухоли						
	40 сут.	43 сут.	48 сут.	51 сут.	54 сут.	56 сут.	58 сут.
Группа CX5	16,02 ± 2,35	16,61 ± 2,45	17,60 ± 2,95	18,91 ± 3,65	21,59 ± 4,38	22,76 ± 4,31	24,12 ± 4,70
Группа CX10	17,52 ± 1,52	20,81 ± 1,55	23,18 ± 1,62	27,30 ± 1,89	29,94 ± 2,14	32,23 ± 2,13	31,29 ± 2,27
Группа CX15	13,90 ± 1,54	15,71 ± 1,57	20,75 ± 1,95	24,43 ± 2,22	28,24 ± 2,45	31,70 ± 3,14	31,37 ± 2,79
Группа CX20	9,35 ± 0,99	10,76 ± 1,14	13,41 ± 1,33	16,79 ± 1,37	20,30 ± 1,63	24,19 ± 1,85	25,77 ± 2,09
Группа 5-ФУ	25,38 ± 2,70	30,28 ± 2,95	35,50 ± 3,15	37,56 ± 3,09	42,71 ± 3,69	43,63 ± 3,66	46,78 ± 3,99
Группа К	32,10 ± 2,23	36,22 ± 2,14	42,02 ± 2,35	43,46 ± 2,43	46,91 ± 2,91	50,39 ± 3,02	52,31 ± 3,21
p₁	< 0,001 (50%)*	< 0,001 (54%)*	< 0,001 (58%)*	< 0,001 (56%)*	< 0,001 (54%)*	< 0,001 (55%)*	< 0,001 (54%)*
p₂	< 0,001 (45%)*	< 0,001 (43%)*	< 0,001 (45%)*	< 0,001 (37%)*	< 0,001 (36%)*	< 0,001 (36%)*	< 0,001 (40%)*
p₃	< 0,001 (57%)*	< 0,001 (57%)*	< 0,001 (51%)*	< 0,001 (44%)*	< 0,001 (40%)*	< 0,001 (37%)*	< 0,001 (40%)*
p₄	< 0,001 (71%)*	< 0,001 (70%)*	< 0,001 (68%)*	< 0,001 (61%)*	< 0,001 (57%)*	< 0,001 (52%)*	< 0,001 (51%)*
p₅	> 0,05 (21%)*	> 0,05 (16%)*	> 0,05 (16%)*	> 0,05 (14%)*	> 0,05 (9%)*	> 0,05 (13%)*	> 0,05 (11%)*

p₁, p₂, p₃, p₄, p₅ - уровень статистической значимости различий между параметром в контрольной (группа К) и экспериментальной группах;

* - в скобках указан % торможения роста опухоли по объему.

Приложение И (окончание)

Таблица И2 (продолжение) - Средний объем перевиваемой опухоли «Акатол» (по группам)

Группы	Объем опухоли (см ³) / сутки после перевивки опухоли						
	61 сут.	63 сут.	65 сут.	68 сут.	70 сут.	72 сут.	74 сут.
Группа CX5	23,86 ± 5,14	29,14 ± 5,35	25,05 ± 5,85	34,23 ± 7,54	27,65 ± 4,75	29,37 ± 6,03	
Группа CX10	33,69 ± 3,13	33,38 ± 3,23	36,74 ± 5,28	41,14 ± 7,04	34,59 ± 4,91	26,33 ± 2,35	33,57 ± 4,92
Группа CX15	33,31 ± 4,53	25,76 ± 3,03	25,92 ± 3,57	25,58 ± 4,23	18,84 ± 3,36	23,32 ± 4,33	21,65 ± 8,59
Группа CX20	27,95 ± 2,29	30,91 ± 2,42	31,56 ± 1,89	33,68 ± 2,10	31,50 ± 2,21	33,49 ± 2,87	33,61 ± 2,62
Группа 5-ФУ	44,16 ± 3,99	45,42 ± 4,59	53,15 ± 6,02	39,90 ± 1,49	41,48 ± 2,61	38,25 ± 1,60	
Группа К	52,89 ± 3,16	53,78 ± 3,26	55,74 ± 3,02	52,23 ± 2,46	56,16 ± 3,29	56,83 ± 3,71	45,07 ± 2,17
р ₁	< 0,001 (55%)*	< 0,01 (46%)*	< 0,01 (55%)*	На 68 сутки осталось в живых: в Группе CX5 – 4 мыши; в Группе CX10 – 5 мышей; в Группе CX15 – 6 мышей; в Группе CX20 – 15 мышей; в Группе 5-ФУ - 2 мыши; в Группе К – 8 мышей. В связи с малым количеством мышей в некоторых группах, дальнейший статистический анализ является некорректным.			
р ₂	< 0,01 (36%)*	< 0,001 (38%)*	< 0,05 (34%)*				
р ₃	< 0,01 (37%)*	< 0,001 (52%)*	< 0,001 (53%)*				
р ₄	< 0,001 (47%)*	< 0,001 (43%)*	< 0,001 (43%)*				
р ₅	> 0,05 (17%)*	> 0,05 (16%)*	> 0,05 (5%)*				

р₁, р₂, р₃, р₄, р₅ - уровень статистической значимости различий между параметром в контрольной (группа К) и экспериментальной группах;

* - в скобках указан % торможения роста опухоли по объему.