

На правах рукописи

ФЕТИСОВ ТИМУР ИГОРЕВИЧ

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

14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2020

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

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Кирсанов Кирилл Игоревич

Официальные оппоненты:

Анисимов Владимир Николаевич, доктор медицинских наук, профессор член-корреспондент РАН, заведующий отделом канцерогенеза и онкогеронтологии федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Петрова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Григорьева Эльвира Витальевна, доктор биологических наук, заведующая лабораторией гликобиологии федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Ведущая организация: федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Казанский (приволжский) федеральный университет»

Защита состоится «16» апреля 2020 года в 14-00 часов на заседании диссертационного совета Д001.017.01 на базе ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России по адресу: 115478, г. Москва, Каширское шоссе, д. 23.

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

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

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Кадагидзе Заира Григорьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Опухоли системы крови (ОСК) – гетерогенная группа злокачественных новообразований органов кроветворения, таких как костный мозг, лимфатические узлы. Наиболее яркими представителями заболеваний данной нозологической группы являются лейкозы, множественная миелома и лимфомы, вносящие значительный вклад в структуру онкозаболеваемости (7%) и смертности (8%). Подходы к химиотерапии ОСК и результаты лечения зависят от возрастной группы пациентов и индивидуальных молекулярно-генетических особенностей. За последнее тридцатилетие значительные успехи были достигнуты в лечении подростковых острых лимфобластных лейкозов (ОЛЛ): пятилетняя безрецидивная выживаемость возросла до 70%. Тем не менее, ОЛЛ продолжает быть одной из основных причин смерти в подростковой группе. Для пациентов старше 30 лет пятилетняя выживаемость при ОЛЛ и остром миелоидном лейкозе (ОМЛ) продолжает оставаться сравнительно низкой, варьируя от 10% до 90% в зависимости от возрастной группы пациентов и молекулярно-генетических особенностей. При этом от 7% до 18% летальных исходов от ОМЛ обусловлены побочным токсическим действием химиотерапии.

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

В современной комбинированной химиотерапии лейкозов активно используются гормональные препараты - глюкокортикостероиды (дексаметазон, преднизалон). Однако и эта группа препаратов не лишена недостатков, среди

которых наиболее опасными являются инфекционные осложнения на фоне стойкой иммуносупрессии, развитие диабета, асептического остеонекроза и др.

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

Таким образом, все группы используемых препаратов имеют определенные недостатки, снижающие их эффективность и/или ограничивающие их применение, что актуализирует разработку новых подходов в терапии ОСК. В качестве одного из таких подходов можно рассматривать применение негенотоксичных ДНК-тропных малых молекул, которые, не взаимодействуя с ДНК ковалентно, способны формировать комплексы с макромолекулой за счет водородных связей, а также Ван-дер-Ваальсовых и электростатических взаимодействий. В эту группу входят как классические узкобороздочные лиганды (DAPI (4',6-диамино-2-фенилиндол), производные бисбензамидина пентамидин и диминазен, производные бисбензимидазола – хехст33342 и хехст33258, нетропсин), так и бифункциональные соединения, которые способны как интеркалировать между парами оснований, так и взаимодействовать с малой бороздкой макромолекулы, например, карбазольное производное кураксин SVL0137. Хотя эти агенты не обладают способностью ковалентно связываться с ДНК, их взаимодействие с узкой бороздкой приводит к изменению активности ряда ферментов (топоизомеразы I, хеликазы, ТАТА- связывающих белков, поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1, дестабилизации хроматина и, как следствие, изменению активности ряда сигнальных путей клетки, вовлеченных в патогенез

опухолей, в частности, сигнального пути WNT и сигнальные пути, активируемые гипоксией. Некоторые соединения уже применяются в медицинской или ветеринарной практике, кроме того, для некоторых из этих соединений уже показана противоопухолевая активность для ряда нозологий.

Цель исследования

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

Задачи исследования

- сравнить цитотоксическую активность CBL0137 и диминазена в отношении клеток ОСК *in vitro* и выбрать более активное соединение;
- сравнить противоопухолевую активность CBL0137 и диминазена в отношении ОСК на модели *in vivo* и выбрать более активное соединение;
- изучить влияние более эффективной ДНК-тропной малой молекулы на клеточный цикл при использовании ряда линий ОСК;
- проанализировать апоптогенную активность более эффективной ДНК-тропной малой молекулы на клетках ОСК;
- провести анализ влияния более эффективной ДНК-тропной малой молекулы на активность сигнальных путей в клетках ОСК;
- изучить влияние выбранной ДНК-тропной малой молекулы на функционирование PARP1;
- изучить лекарственные взаимодействия с другими препаратами, применяемыми в терапии;
- изучить противоопухолевую активность CBL0137 в отношении опухолевых клеток переживающих культур, полученных от пациентов с ОСК.

Методы и методология исследования

В исследовании в качестве методологической основы были применены комплексный и системный подходы с использованием молекулярно-

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

Научная новизна

Научная новизна исследования обусловлена тем, что впервые продемонстрированы: 1) цитотоксические эффекты ДНК-тропных негенотоксичных молекул на клетки ОСК; 2) противоопухолевые эффекты ДНК-тропных негенотоксичных молекул на модели ОСК *in vivo*; 3) большая эффективность CBL0137 по сравнению с диминазеном в отношении ОСК *in vitro* и *in vivo*; 4) вклад в противоопухолевый эффект *in vitro* CBL0137 активации апоптоза и ареста клеточного цикла; 5) действие CBL0137 на сигнальные пути в клетках ОСК, осуществляемое, прежде всего, на сигнальные пути WNT- и Hedgehog; 6) ингибирование кураксином ДНК-зависимой активации белка PARP-1; 7) потенцирующее влияние CBL0137 на цитотоксический эффект доксорубицина, даунорубицина и иматиниба в клетках ОСК.

Теоретическая и практическая значимость

Низкомолекулярные ДНК-тропные соединения необходимы для более безопасной и эффективной химиотерапии ОСК. В ходе выполнения диссертационной работы было протестировано противоопухолевое действие соединений, относящихся к узкобороздочным лигандам и соединениям со смешанным типом взаимодействия с ДНК. Для представителей двух классов была оценена цитотоксичность в отношении клеток ОСК и проведен анализ противоопухолевой активности *in vivo*. Для наиболее активного соединения – CBL0137, была продемонстрирована апоптогенная активность и способность ингибировать клеточный цикл. Также было показано, что во всех линиях CBL0137 модулирует активность сигнальные пути WNT/ β -катенин, Hedgehog, Notch и PPAR. Была оценена способность CBL0137 влиять на активность белка PARP-1. Была показана способность CBL0137 потенцировать цитотоксический эффект других препаратов, применяемых в терапии ОСК. Полученные данные свидетельствуют о том, что данное соединение является перспективным для дальнейшего проведения доклинических испытаний в качестве потенциального препарата для терапии ОСК в моно- и комбинированных режимах.

Личный вклад

Автор лично провел анализ научной литературы по теме диссертации, принимал непосредственное участие в постановке целей, задач и разработке плана исследования. Автором проведены экспериментальные исследования, анализ полученных данных, подготовлены публикации, отражающие полученные результаты, и доклады по теме диссертации, представленные на всероссийских и международных научных конференциях.

Соответствие паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.01.12 – Онкология («медицинские науки») и области исследования п.2. «Исследования по изучению этиологии и патогенеза злокачественных опухолей, основанные на достижениях ряда естественных наук (генетики, молекулярной

биологии, морфологии, биохимии и др.)» и п.6. «Внедрение в клиническую практику достижений фармакологии в области создания и использования цитостатиков, гормонов и биологически активных препаратов».

Положения, выносимые на защиту

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

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований используются в повседневной работе лаборатории канцерогенных веществ НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Основные положения диссертационной работы представлены на следующих конференциях: III Петербургский онкологический форум «Белые ночи» (Санкт-Петербург, 2017 г.), IV Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 2018 г.), 22-й Международный симпозиум по изучению рака (Томск, 2018 г.), Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019» (Москва, 2019 г.), V Всероссийская конференция по молекулярной онкологии (Москва, 2019 г.).

Апробация

Апробация диссертации состоялась 14 января 2020 года на совместной конференции отдела химического канцерогенеза, лаборатории механизмов

канцерогенеза, лаборатории генетики опухолевых клеток, лаборатории онкопротеомики, лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России.

Публикации

Материалы диссертационных исследований изложены в 9 научных работах, из них 9 статей опубликованы в журналах, которые внесены в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа написана в традиционной форме, изложена на 125 страницах машинописного текста, состоит из введения, глав «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты исследования», «Обсуждение результатов», заключения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 263 ссылки на отечественные и зарубежные источники, и содержит 22 рисунка и 5 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОЙ РАБОТЫ

Оценка цитотоксического и противоопухолевого эффекта ДНК-тропных молекул в отношении клеток опухолей системы крови

Анализ цитотоксического эффекта негеноотоксичных ДНК-тропных молекул относительно опухолей системы крови был проведен с помощью метода МТТ на 7 клеточных линиях ОСК человека и 1 клеточной линии мыши. IC₅₀ диминазена в отношении клеток ОСК, определенная с помощью МТТ-теста оказалась 10 раз выше в сравнение с IC₅₀ CBL0137 (Таблица 1).

С целью выявления наиболее эффективных концентраций для проведения последующих экспериментов была проведена оценка цитотоксического эффекта на временных интервалах 24 и 48 часов. Для каждой клеточной линии наблюдался время- и дозозависимый цитотоксический эффект, статистически значимый для всех линий клеток при экспозиции к CBL0137 в течение 72 часов (Таблица 2).

Таблица 1 - Сравнение значений IC50 через 72 часов после обработки кураксином CBL0137 и диминазеном

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

Таблица 2 - Таблица сравнения значений IC50 CBL0137

Клеточные линии	24 часа*		48 часов		72 часа*	
	IC50 (мкМ)	Стандартное отклонение ($\pm S$)	IC50 (мкМ)	Стандартное отклонение ($\pm S$)	IC50 (мкМ)	Стандартное отклонение ($\pm S$)
CCRF-Cem	3,5	$\pm 0,4$	1,8	$\pm 0,18$	0,9	$\pm 0,12$
K562	1,8	$\pm 0,37$	2,2	$\pm 0,135$	0,71	$\pm 0,17$
KG-1	1,3	$\pm 0,09$	0,85	$\pm 0,12$	0,56	$\pm 0,13$
CCRF-SB	1,2	$\pm 0,24$	0,9	$\pm 0,18$	0,74	$\pm 0,19$
WENI-3	1	$\pm 0,2$	0,5	$\pm 0,07$	0,46	$\pm 0,1$
THP-1	2	$\pm 0,2$	1,75	$\pm 0,3$	0,57	$\pm 0,09$
RPMI-8226	2,3	$\pm 0,1$	1,2	$\pm 0,18$	0,66	$\pm 0,28$
NCI-H929	1,2	$\pm 0,05$	1	$\pm 0,2$	0,41	$\pm 0,06$

Примечание: * - различия статистически значимы ($p < 0,05$)

На модели перевиваемого мышинового лейкоза WENI-3 была произведена оценка противоопухолевого эффекта CBL0137 и диминазена. При анализе степени поражения печени и селезенки использованы критерии, отраженные в таблице 3.

Таблица 3 – Ранжирование поражений органов опухолевыми клетками

Степень поражения органа	Селезенка	Печень
Степень 0	Интактный орган	Интактный орган
Степень 1	Узелки белой пульпы сохранны, наблюдаются отчетливые контуры и неповрежденной структурой с гермиальными центрами. Красная пульпа содержит мегакариоциты (как маркер гемопоэза) и отдельные опухолевые клетки	Единичные опухолевые клетки или малые инфильтраты
Степень 2	Наблюдается изменение структуры белой пульпы, но с отчетливыми контурами. Герминальные центры наблюдаются только у половины узелков. Красная пульпа содержит группы опухолевых клеток и мегакариоциты	Опухолевые инфильтраты среднего размера
Степень 3	Количество узелков белой пульпы снижено до 2 и менее в поле зрения, структура узелков изменена. Красная пульпа инфильтрирована опухолевыми клетками, очагов гемопоэза не наблюдается	Опухолевые инфильтраты большого размера
Степень 4	Цитоархитектоника селезенки нарушена, граница между красной и белой пульпой отсутствует, на всем протяжении наблюдается инфильтрация опухолевых клеток	Тотальное поражение печени с нарушением цитоархитектоники

Продемонстрировано, что инъекции CBL0137 приводили к редукции 50% случаев лейкозов, в остальных случаях CBL0137 снижал скорость развития поражений внутренних органов (печени и селезенки). Инъекции диминазена не приводили к редуцированию опухоли у мышей, тем не менее при его действии наблюдалось значительное торможение развития лейкоза (Рисунок 1).

Таким образом, на первом этапе для дальнейшего исследования был отобран кураксин CBL0137, как наиболее активная молекула в отношении опухолей системы крови.

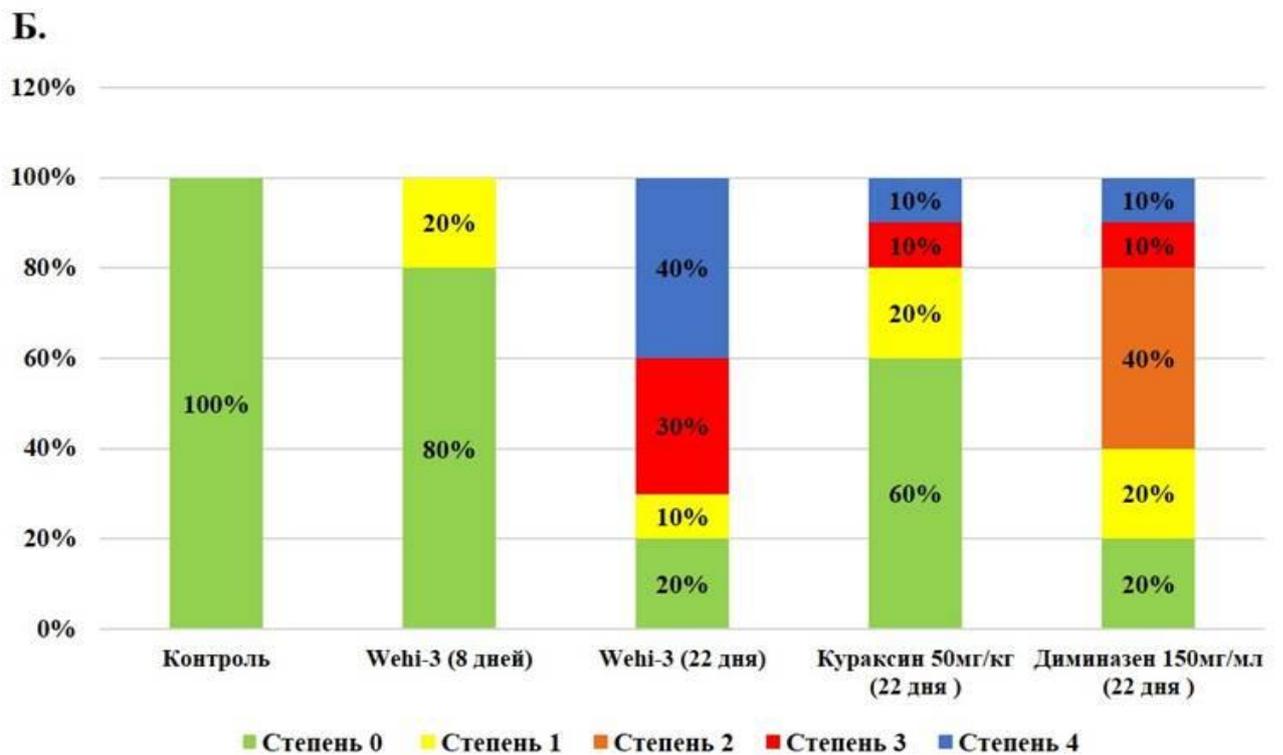
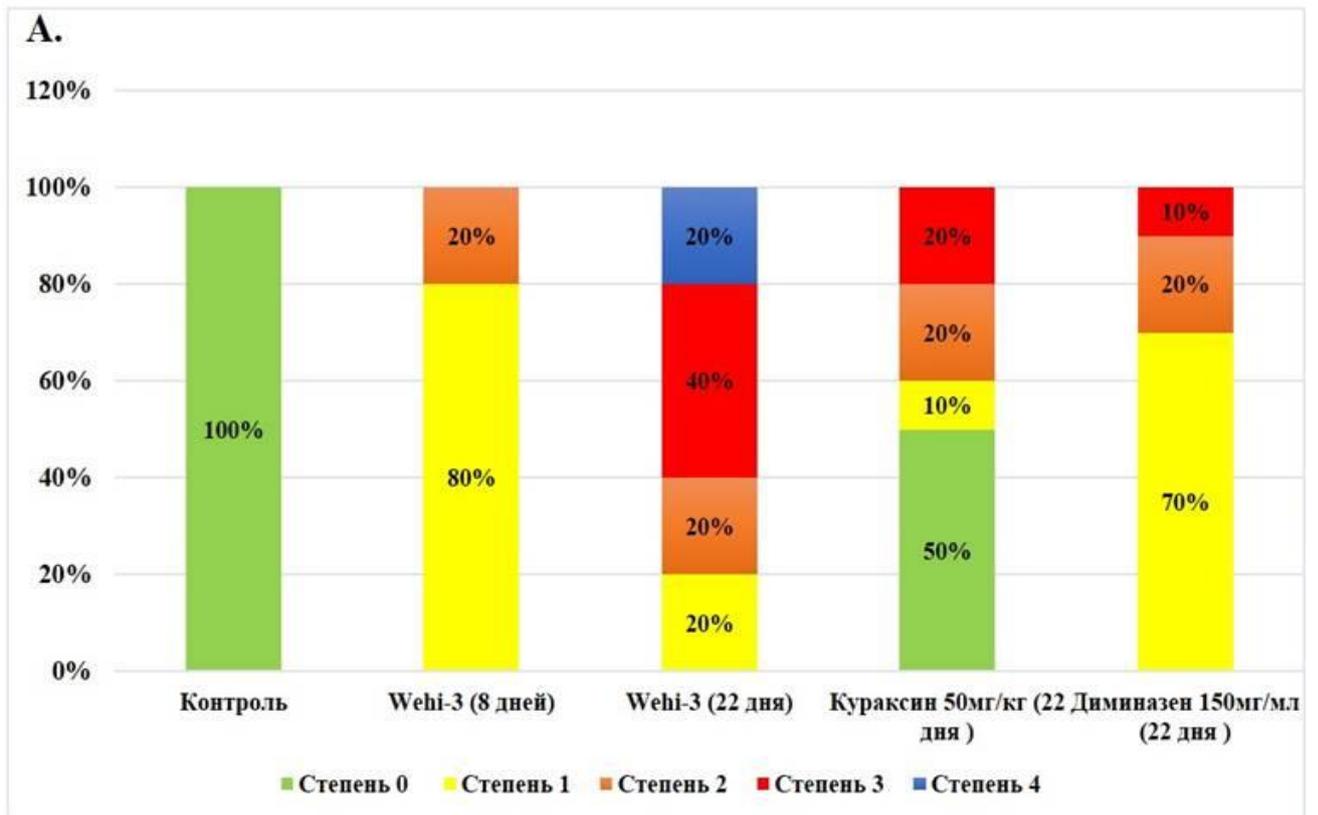


Рисунок 1 – А. Сравнение частоты и степени поражений селезенки не леченных животных и животных, которым вводили кураксин или диминазен. **Б.** Сравнение частоты и степени поражений печени не леченных животных и животных, которым вводили кураксин или диминазен

Влияние кураксина CBL0137 на клеточный цикл и апоптоз в клетках опухолей системы крови

Оценку влияния на клеточный цикл проводили с помощью проточной цитофлуориметрии клеток, окрашенных йодидом пропидия. Клетки инкубировали в течение 24 часов с CBL0137, концентрации которого не превышали значения IC50 и составляли: 1 мкМ, 0,75 мкМ и 0,5 мкМ для линий CCRF-SB, KG-1, WENI-3, RPMI-8226 и NCI-H929; 1,5 мкМ, 1,25 мкМ и 1 мкМ для линий CCRF-CEM, K562 и THP-1. Для ряда линий было продемонстрировано увеличение субпопуляции клеток, находящихся в G2/M-аресте клеточного цикла. Так, при обработке клеток линии CCRF-Cem минимальными концентрациями CBL0137 происходило увеличение доли клеток, находящихся в G2/M фазе клеточного цикла с 26% до 51%, в линии THP-1 - с 26% до 39%, в NCI-H929 - с 27% до 40%, а в линиях RPMI-8226 и K562 использование максимальных концентраций увеличивало долю клеток в этой фазе с 24% до 39% и с 26% до 50%, соответственно (Рисунок 2).

Для линий KG-1, WENI-3 и CCRF-SB доля популяции клеток, находящихся в G1 фазе увеличивалось с 54% до 79%, с 50% до 74% и с 54% до 66% соответственно (Рисунок 3). Кроме того, во всех линиях при действии CBL0137 наблюдалось увеличение пре-G1-пика.

Оценку проапоптотической активности проводили с помощью проточной цитофлуориметрии клеток, окрашенных аннексином V-FITC и йодидом пропидия. После обработки клеток CBL0137 наблюдалось дозо-зависимое увеличение доли клеток с ранними апоптотическими изменениями, а также клеток, находящихся на поздней стадии апоптоза. Так, в максимальной концентрации CBL0137 увеличивал долю клеток линии WENI-3, находящихся в апоптозе, на 76%, линии KG-1 - на 67%, линии NCI-H929 - на 74%, линии THP-1 - на 43%, линии CCRF-CEM - на 36%, линии K562 - на 34%, линии RPMI-8226 - на 57%, линии CCRF-SB - на 46%. (Рисунки 4 и 5).

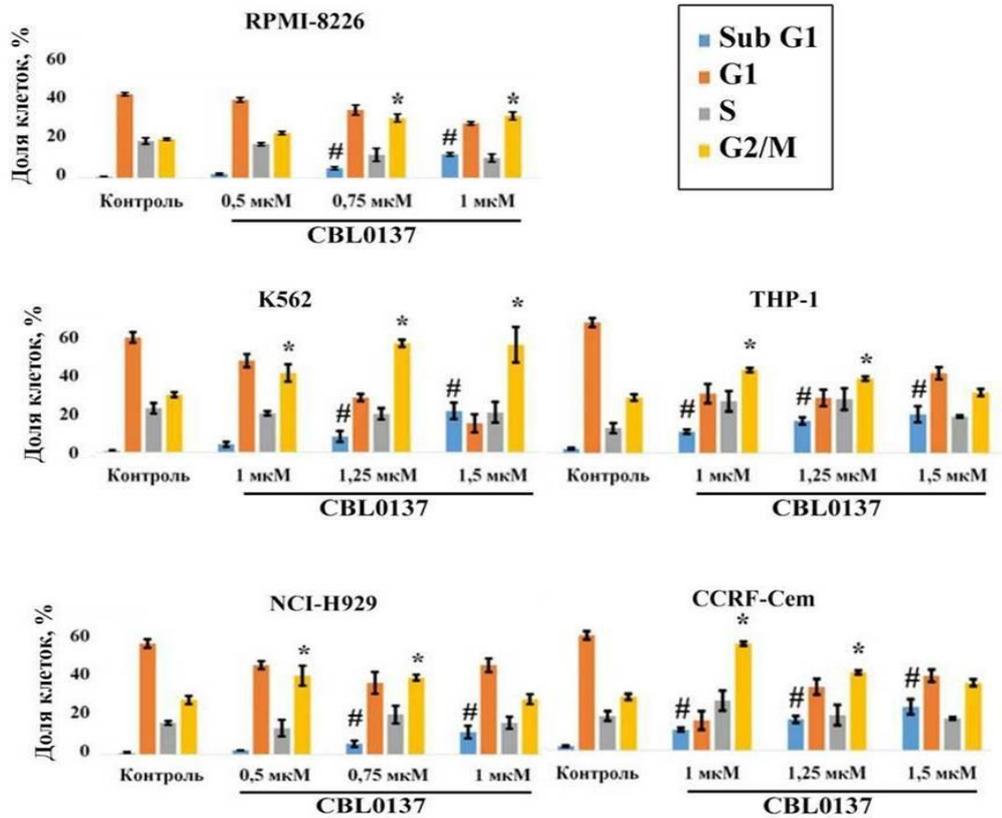


Рисунок 2 – Распределение клеток по фазам клеточного цикла после 24-часовой экспозиции к кураксину CBL0137. * - по доле клеток, находящихся в аресте клеточного цикла, $p < 0,05$; # - по доле клеток в пре-G1-пике, $p < 0,05$

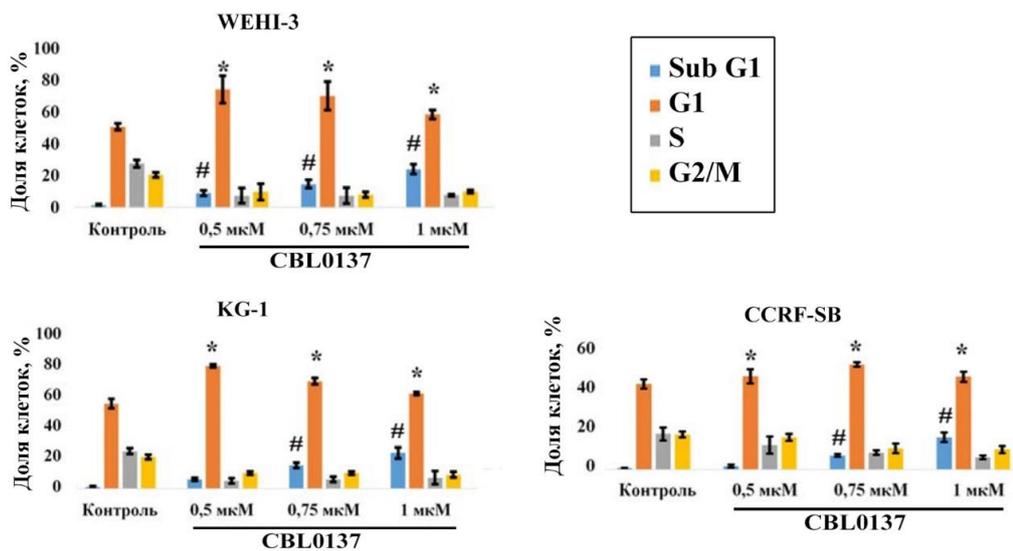


Рисунок 3 – Распределение клеток по фазам клеточного цикла после 24-часовой экспозиции к кураксину CBL0137. * - по доле клеток, находящихся в аресте клеточного цикла, $p < 0,05$; # - по доле клеток в пре-G1-пике, $p < 0,05$

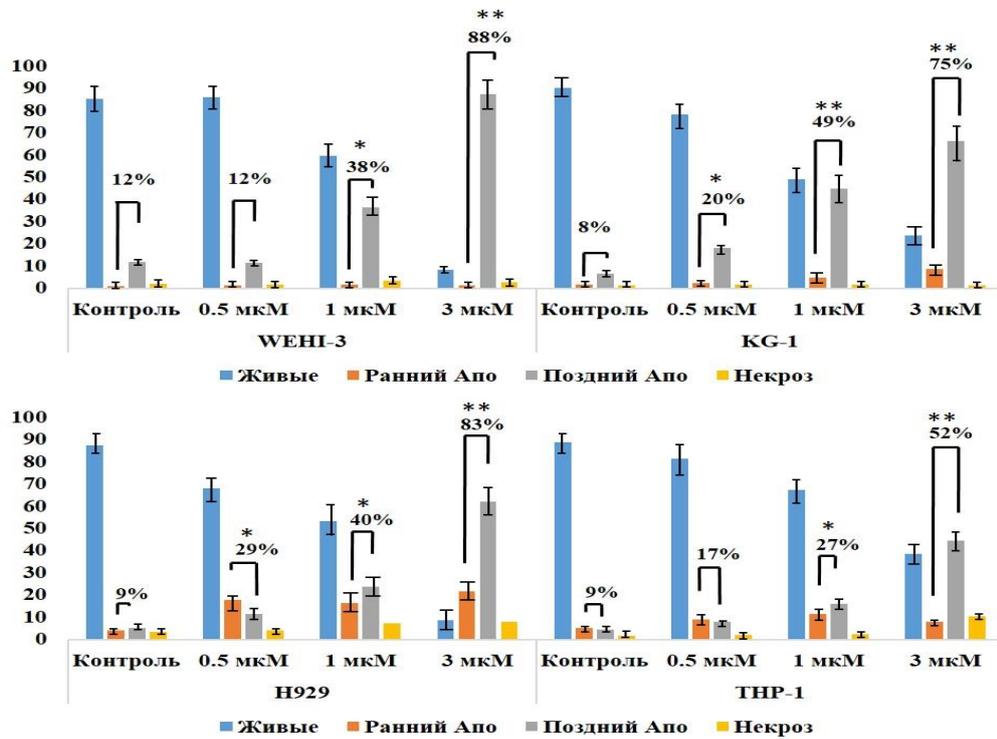


Рисунок 4 – Проапоптотический эффект CBL0137 на опухолевые клетки WENI3, KG-1, NCI-N929 и THP-1. * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$; ** - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,01$

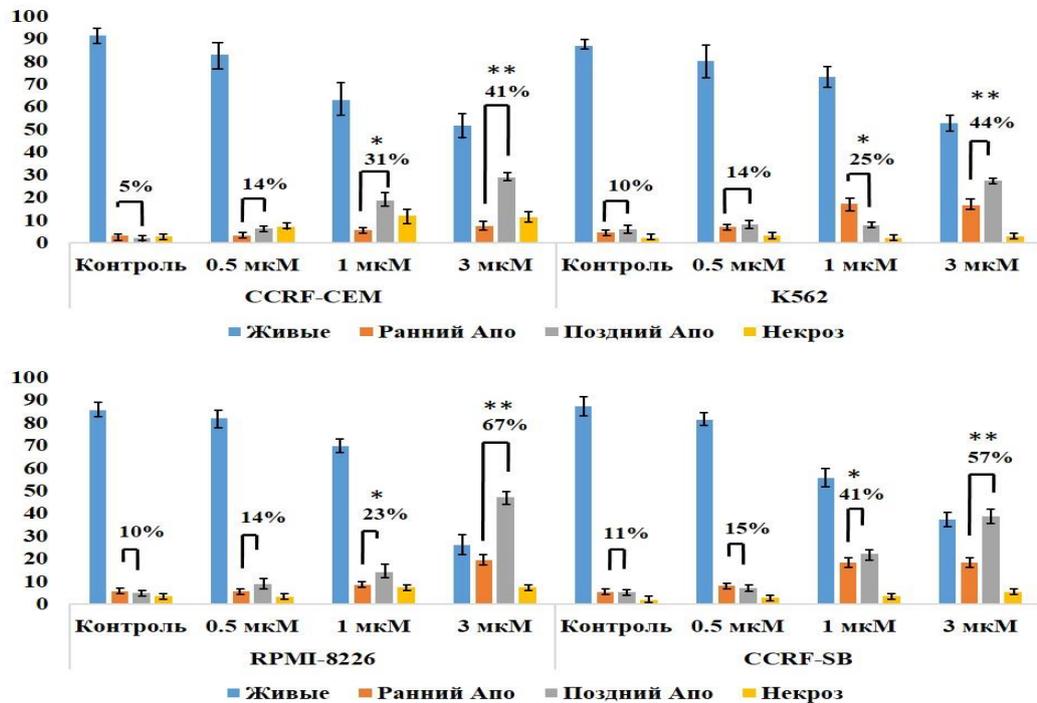


Рисунок 5 – Проапоптотический эффект CBL0137 на опухолевые клетки CCRF-Cem, K562, RPMI-8226 и CCRF-SB. * - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,05$; ** - статистически значимое отличие от контроля, $p < 0,01$

Таким образом, было продемонстрировано, что противоопухолевый эффект CBL0137 *in vitro* включает в себя как индукцию апоптоза, так и ингибирование клеточного цикла. Кроме того, учитывая данные МТТ-теста, показывающие, что CBL0137 демонстрирует как дозовую, так и временную зависимость, арест клеточного цикла и индукцию апоптоза можно рассматривать как последовательно идущие процессы.

Влияние кураксина на экспрессию кластеров генов таргетных путей

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

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

этом экспрессия практически всех таргетных генов сигнальных путей WNT и Hedgehog снизилась, тогда как, экспрессия всех таргетных генов сигнального пути Notch возросла. В клетки линии RPMI-8226 в ответ на применение CBL0137 изменялась экспрессия таргетных генов сигнальных путей WNT (7/9), Hedgehog (6/9), Nf-kB (5/8), TGF β (5/8), а также генов, активируемых в ответ на гипоксию (6/9). Стоит отметить, что в большинстве случаев экспрессия таргетных генов перечисленных путей снижалась. При обработке линии CCRF-SB было зарегистрировано изменение экспрессии таргетных генов путей TGF β (7/8), WNT (8/9), PPAR (6/8) и Hedgehog (5/9). Для сигнального пути Hedgehog данное воздействие носило однонаправленный характер в сторону снижения экспрессии генов, в то время как для ряда генов остальных сигнальных путей наблюдалось повышение экспрессии. Таким образом, при изучении влияния CBL0137 на экспрессию кластеров генов сигнальных путей в разных клеточных линиях нами было установлено, что наиболее общим эффектом является снижение экспрессии таргетных генов сигнальных путей WNT/ β -катенин и Hedgehog.

Ингибирующее действие кураксина на активность белка PARP-1

Исследование влияния CBL0137 на ДНК-зависимую активацию белка PARP-1 было проведено на реконструированной системе определения активности PARP-1 *in vitro*, включающей: субстрат (NAD), фермент (PARP-1) и активатор ферментативной реакции. В качестве активатора мы использовали 44-членный олигонуклеотид, содержащий две взаимно комплементарных области, которые способны образовывать двухцепочечную структуру ДНК, имеющую одноцепочечный разрыв. Была продемонстрирована способность CBL0137 ингибировать ДНК-зависимую активацию в реконструктивной системе (Рисунок 8).

Анализ влияния кураксина CBL0137 на препараты, применяемые в терапии опухолей ОСК

Влияние CBL0137 на цитотоксический эффект исследовали с помощью МТТ-теста на клетках K562 и подсчёта комбинационного индекса CI.

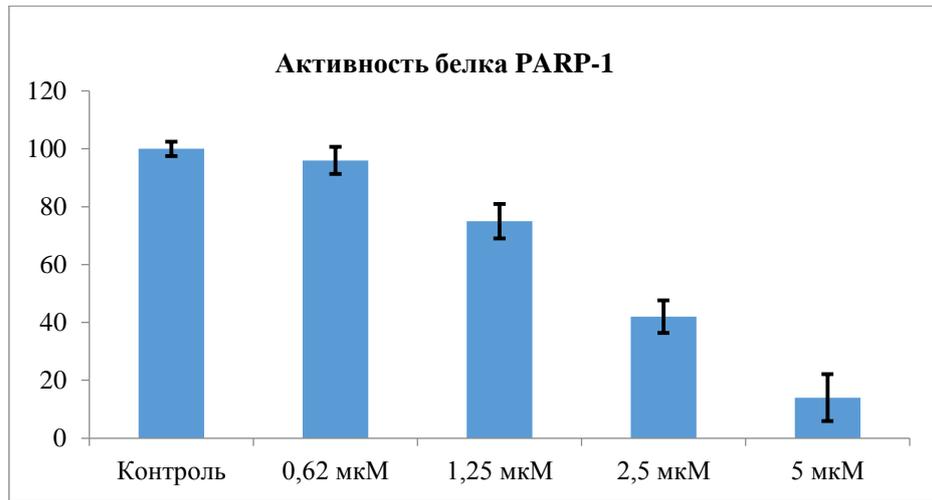


Рисунок 8 – Реакция поли(АДФ)-рибозилирования в присутствии ДНК-дуплекса h44, при разных концентрациях кураксина CBL0137. Значение IC50 кураксина составило 2 мкМ

В качестве лекарственных препаратов использовали доксорубицин, даунорубицин и иматиниб. Для анализа совместного эффекта CBL0137 была использована концентрация 0,62 мкМ, приводящая к гибели 20% клеток (IC20). CI для комбинации даунорубицина и CBL0137 составил 0,5; для комбинации доксорубицина и CBL0137 - CI = 0,56; а для комбинации CBL0137 с иматинибом - CI = 0,35. Таким образом, во всех случаях комбинационный индекс был < 1, что говорит о синергизме цитотоксического эффекта CBL0137 и выбранных лекарственных средств. (Рисунок 9).

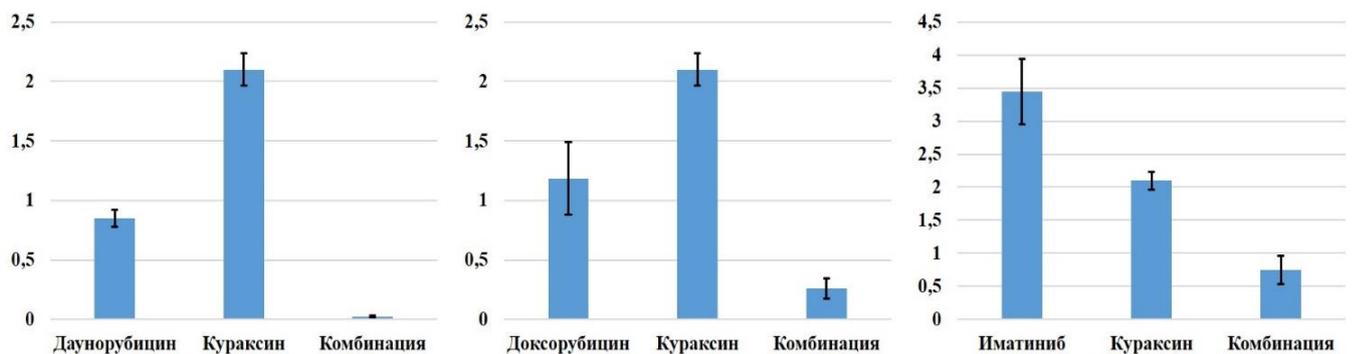


Рисунок 9 - Анализ лекарственного взаимодействия кураксина CBL0137 с даунорубицином, доксорубицином и иматинибом. Сравнение IC50 препаратов в монорежиме и в комбинации с CBL0137

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

Оценку цитотоксического эффекта CBL0137 в отношении переживающих культур ОСК проводили на выделенных бластных клетках, полученных из крови 7 пациентов отделения химиотерапии гемобластозов НИИ клинической онкологии ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. У 3 пациентов опухоль была диагностирована впервые, 4 пациента получали лечение не менее чем за 3 месяца до забора крови. Оценка цитотоксичности проводили с помощью МТТ-теста после 72 часов инкубации опухолевых клеток с CBL0137 в различных концентрациях. Среднее значение IC50 составило $8,9 \pm 4$ мкМ, минимальное значение – 1,1 мкМ и наблюдалось у пациента с острым миелоидным лейкозом М5 по Франко-американско-британской классификации (острый монобластный лейкоз), максимальное значение составляло 24 мкМ у пациента с Т-клеточным лимфобластным лейкозом. Для каждого случая были построены графики зависимости выживаемости от концентрации препарата (Таблица 4 и Рисунок 10).

Таблица 4 – IC50 CBL0137 в переживающих культурах, полученных от пациентов

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

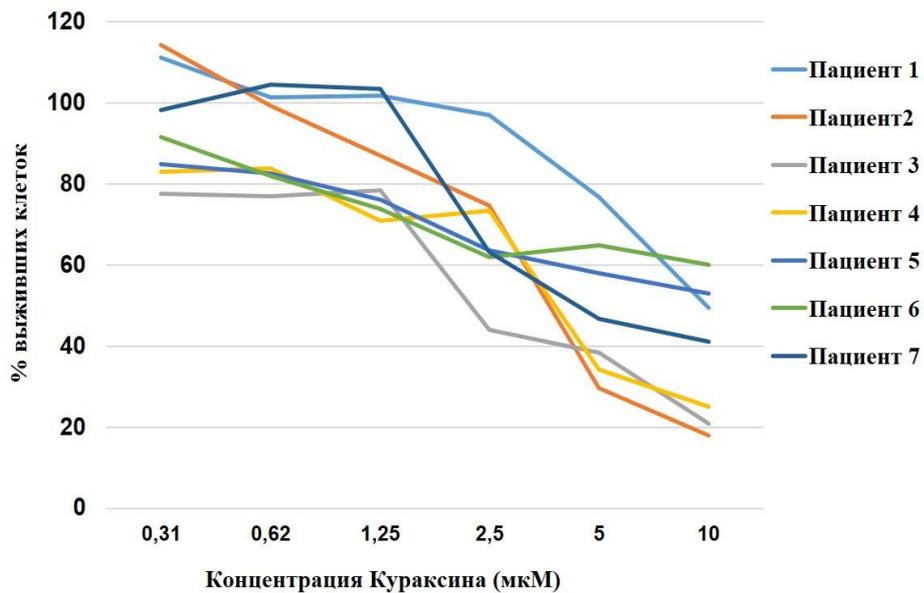


Рисунок 10 – Цитотоксический эффект кураксина CBL0137 на опухолевые клетки от пациентов со злокачественными новообразованиями системы крови

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние десятилетия внимание специалистов, разрабатывающих противоопухолевые препараты, вновь привлекли малые молекулы, тропные к ДНК. В последние десятилетия внимание специалистов, разрабатывающих противоопухолевые препараты, вновь привлекли малые молекулы, тропные к ДНК. В определенной степени это произошло вследствие того, что для анализа нарушений функций генома стали применять новые методы, позволившие выявить значительно более широкий спектр взаимосвязанных повреждений, происходящих при злокачественной трансформации клетки. В связи с этим приоритетность приобрели классы малых молекул, которые действуют мультитаргетно, так как в результате взаимодействия биополимера с малыми ДНК-тропными молекулами изменяются характеристики спирали ДНК, влияя на функционирование многих ферментов, обеспечивающих метаболизм, репарацию, репликацию ДНК, а также процессы транскрипции и ее регуляции. Это, с одной стороны, усложняет задачу создания новых противоопухолевых препаратов на основе малых молекул, поскольку одновременно должны учитываться как отдельные противоопухолевые эффекты этих соединений, так и сложная система

взаимозависимых изменений в функционировании генома клетки, а с другой стороны, раскрывают перспективу воздействия сразу на несколько механизмов, обеспечивающих реализацию ключевых особенностей опухолевой клетки, что замедляет процесс развития лекарственной резистентности. К перспективным малым молекулам в плане использования в химиотерапии опухолей можно отнести новый препарат кураксин CBL0137, взаимодействующий с ДНК по механизмам интеркаляции и связывания с узкой бороздкой, и антипаразитарный препарат диминазен, представляющий собой узкобороздочный лиганд, исследуемый в плане наличия противоопухолевой активности.

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

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

ВЫВОДЫ

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

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

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

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

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

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

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

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

системы крови.

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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

2. Nosova, Y. Enhancing the cytotoxic activity of anticancer Pt(IV) complexes by introduction of lonidamine as an axial ligand / Y. Nosova, L. Foteeva, I. Zenin, T. Fetisov, K. Kirsanov, M. Yakubovskaya, T. Antonenko, V. Tafeenko, L. Aslanov, A. Lobas, M. Gorshkov, M. Galanski, B. Keppler, A. Timerbaev, E. Milaeva, A. Nazarov // European Journal of Inorganic Chemistry. – 2017 – №12 – С. 1785-1791;

3. Okulova, Y.N. Antiproliferative activity of Pt(IV) complexes with lonidamine and bexarotene ligands attached via succinate-ethylenediamine linker / Y.N. Okulova, I.V. Zenin, I.A. Shutkov, K.I. Kirsanov, O.N. Kovaleva, E.A. Lesovaya, T.I. Fetisov, E.R. Milaeva, A.A. Nazarov // Inorganica Chimica Acta. – 2019 – №495 – С. 119010;

4. Kirsanov, K.I. Prevention of colorectal carcinogenesis by DNA binding small molecule curaxin CBL0137 involves suppression of Wnt signaling / K.I. Kirsanov, T.I. Fetisov, E.A. Lesovaya, V. Maksimova, L. Trukhanova, E. Antoshina, T. Gor'kova, O. Morozova, A. Safina, D. Fleyshman, R. Salimov, E. Shipaeva, R. Ivanov, A. Leonov, A.A. Purmal, G.A. Belitsky, A.V. Gudkov, K.V. Gurova // Cancer Prevention Research – 2019. – Т. 13. – № 1. – С.53-64.

5. Фетисов, Т.И. Роль нарушений сигнального пути WNT в патогенезе

лейкозов/ Т.И. Фетисов, Е.А. Лесовая, М.Г. Якубовская, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий // Биохимия – 2018. – Т.83. – №12. – С. 1779 – 1790;

6. Тилова, Л.Р. Молекулярно-генетические нарушения в патогенезе опухолей системы крови и соответствующие им изменения сигнальных систем клетки / Л.Р. Тилова, А.В. Савинкова, Е.М. Жидкова, О.И. Борисова, Т.И. Фетисов, К.А. Кузин, О.А. Власова, А.С. Антипова, О.Ю. Баранова, К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская, Е.А. Лесовая // Клиническая онкогематология. – 2017. – Т. 10. – № 2. – С.235-249;

7. Савинкова, А.В. Варианты и перспективы перепрофилирования лекарственных препаратов для использования в терапии онкологических заболеваний / А. В. Савинкова, Е. М. Жидкова, Л. Р. Тилова, М. Д. Лаврова, Е. С. Лылова, К. А. Кузин, А. Ю. Портянникова, В. П. Максимова, А. В. Холодова, О. А. Власова, Т. И. Фетисов, К. И. Кирсанов, Г. А. Белицкий, М. Г. Якубовская, Е. А. Лесовая // Сибирский онкологический журнал. – 2018. – Т. 17. – № 3. – С.77-87;

8. Кирсанов, К.И. Влияние ДНК-тропных антиканцерогенных соединений на механизмы регуляции экспрессии генов / К.И. Кирсанов, О.А. Власова, Т.И. Фетисов, Р.Г. Зенков, Е.А. Лесовая, Г.А. Белицкий, К. Гурова, М.Г. Якубовская // Успехи молекулярной онкологии. – 2018. – Т. 5. – № 4. – С.41-63;

9. Фетисова, Т.И. Противоопухолеваая активность кураксина CBL0137 на моделях острых лейкозов *in vitro* / Т.И. Фетисов, К.И. Кирсанов, А.А. Борунова, М.Н. Зацепина, Е.А. Лесовая, Т.Н. Заботина, Г.А. Белицкий, М.Г. Якубовская //Успехи молекулярной онкологии. – 2019. – Т. 6. – № 4. – С.58-68.