

# ИНГИБИРОВАНИЕ РЕПАРАЦИИ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ ДНК КАК МЕХАНИЗМ ПРЕОДОЛЕНИЯ ХИМИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ ОСТРЫХ ЛЕЙКОЗАХ У ДЕТЕЙ

О.С. Вишкова, И.В. Пахомова, А.С. Романцова, А.В. Тарасова

Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии

Способность клеток распознавать повреждения ДНК и запускать системы репарации является одним из важных механизмов резистентности опухолевых клеток к химиотерапии, а ингибирование репарации ДНК предположительно может увеличить цитотоксичность некоторых противоопухолевых средств [1, 2]. Так как большинство лекарственных средств оказывает свое цитостатическое действие на генетический аппарат клетки, блокируя синтез и репарацию ДНК, то усиление и/или модификация функций репарационных систем может привести к формированию лекарственной резистентности [3]. При повреждении генетического материала клеток в них запускаются несколько систем репарации, специфически восстанавливающих определенный тип повреждений. Основными нарушениями структуры ДНК являются одно- и двуцепочечные разрывы ДНК, поперечные сшивки, повреждение оснований. Двойные разрывы ДНК всегда сопровождаются фосфорилированием гистона  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  в области поврежденного участка, формируя при этом платформу для белковых факторов, задействованных в клеточном ответе на образование повреждения [4]. Анализ динамики уровня фосфорилированного гистона  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  является одним из современных методов исследования систем репарации ДНК в клетке [5, 6].

**Цель работы** — оценка динамики чувствительности лейкоэмических клеток к химиопрепаратам *in vitro* в присутствии или отсутствии низкомолекулярных ингибиторов репарации ДНК.

**Материал и методы.** В исследование включено 11 образцов костного мозга детей с острым лимфобластным лейкозом (n=8) и острым миелоидным лейкозом (n=3), находившихся на лечении в ГУ «Республиканский научно-практический центр детской онкологии, гематологии и иммунологии». Мононуклеарные клетки из пунктата костного мозга пациентов выделяли в градиенте плотности Histopaque-1077. По данным фенотипирования на проточном цитометре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, США), во всех образцах более 50% выделенных клеток являлись опухолевыми.

Динамика чувствительности лейкоэмических клеток к химиопрепаратам *in vitro* в присутствии или отсутствии низкомолекулярных ингибиторов репарации ДНК оценивалась методом проточной цитометрии по образованию фосфорилированной формы гистона  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  в 3-х независимых экспериментах. Использованы первичные антифосфо-гистон- $\text{H}_2\text{AX}$  (Ser139) mouse IgG1к и вторичные Goat Anti-Mouse-IgG1 ( $\gamma 1$ ) Alexa Fluor488 антитела.

В качестве ДНК-повреждающих агентов были исследованы пять цитостатических средств (этопозид, флударабин, цитарабин, цисплатин и топотекан) в диапазоне терапевтических концентраций. Их цитостатическая активность оценена в присутствии низкомолекулярных ингибиторов репарации ДНК с различными механизмами действия (таблица).

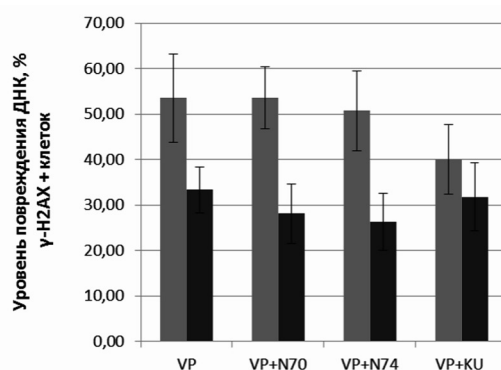
Таблица

Низкомолекулярные ингибиторы репарации ДНК с различными механизмами действия, использованные при проведении экспериментов

Ингибитор	Механизм действия
NU7441	Ингибитор DNA-РКcs-киназы негомологичного сшивания концов ДНК, ключевого фермента репарации двуниевых разрывов ДНК
BERi	Ингибитор эксцизионной репарации оснований, необходимой для репарации однониевых разрывов ДНК
KU55933	Ингибитор АТМ-киназы гомологичной рекомбинационной репарации ДНК, фактора, необходимого для репарации двуниевых разрывов ДНК
NU1025	Ингибитор PARP (poly ADP ribose polymerase) полимеразы эксцизионной репарации ДНК, важного фактора репарации однониевых разрывов и сшивков ДНК
NU7026	Ингибитор DNA-РКcs-киназы негомологичного сшивания концов ДНК

Для всех исследуемых ингибиторов была определена доза из диапазона рекомендуемой эффективной концентрации, которая не снижала жизнеспособность и пролиферативную активность клеток. Использовались концентрации: NU7441 — 0,25 мкМ, BERi — 10 мкМ, KU55933 — 10 мкМ, NU1025 — 100 мкМ и NU7026 — 10 мкМ.

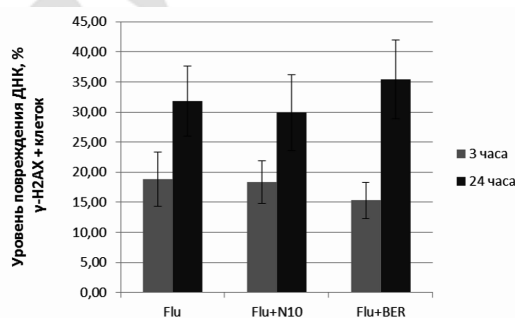
**Результаты и их обсуждение.** Одной из выявленных закономерностей было понижение уровня фосфорилированного  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  в клетках после 24 ч инкубации с препаратами, вызывающими двунитевые разрывы ДНК. Так, уровень фосфорилированного  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  в опухолевых клетках, и, соответственно, количество разрывов ДНК через 24 ч инкубации с этопозидом снижался в 1,6 раза по сравнению с таковым на 3 ч воздействия препарата. При добавлении в исследуемую систему «клетки+этопозид» ингибитора NU7026 уровень фосфорилированного  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  через сутки уменьшался в 1,9 раза, при добавлении ингибитора NU7441 — в 1,93 раза, а при добавлении KU55933 — в 1,26 раза (рисунок 1).



**Рисунок 1 — Влияние ингибиторов репарации ДНК на уровень фосфорилированного гистона  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  в лейкемических клетках после воздействия этопозид (VP)**

Эффективно понижал репарацию двунитевых разрывов ДНК в лейкемических клетках после воздействия на них этопозид только ингибитор киназы ATM — KU55933.

Широко применяемый в лечении острых лейкозов химиопрепарат флударабин встраивается в нить ДНК и при столкновении с репликативной вилкой или РНК-полимеразой вызывает одностебельные разрывы ДНК. При репарации одностебельных разрывов ДНК одной из промежуточных стадий может быть двунитевый разрыв нити. В эксперименте через 24 ч воздействия препарата уровень фосфорилированного  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  в клетках возрастал, что свидетельствует о репаративном процессе, за исключением апоптотических клеток (которые были исключены из анализа путем гейтирования области живых клеток по светорассеянию). Через 24 ч инкубации с флударабином уровень фосфорилированного  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  в клетках увеличивался в 1,69 раза, при добавлении ингибитора NU1025 — в 1,63 раза, а при добавлении ингибитора BERi — в 2,31 раза (рисунок 2).



**Рисунок 2 — Влияние ингибиторов репарации ДНК на уровень фосфорилированного гистона  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  в лейкемических клетках после воздействия флударабина (Flu)**

Можно предположить, что ингибитор эксцизионной репарации BERi приводит к запуску альтернативного пути репарации, такому как гомологичная рекомбинация, одним из промежуточных продуктов которой является неповрежденная нить ДНК с двунитевым надразрезом.

Так же как и флударабин, цитарабин вызывает одностранные разрывы ДНК; основным механизмом репарации таких повреждений является эксцизионная репарация ДНК. Динамика репарации в клетках при добавлении ингибитора NU1025 была понижена. Так, уровень фосфорилированного  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  в клетках через 24 ч инкубации с цитарабином увеличился в 2,41 раза, а при добавлении NU1025 — в 1,98 раза (рисунок 3).

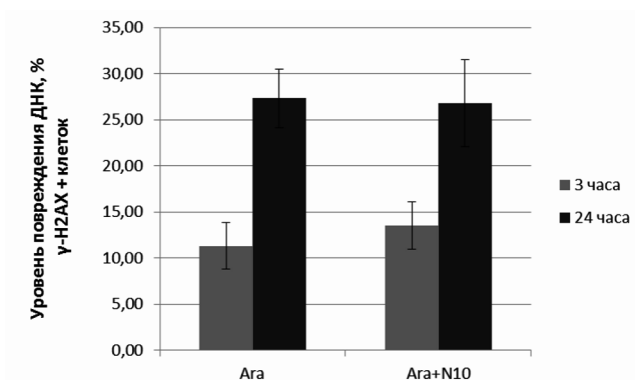


Рисунок 3 — Влияние ингибиторов репарации ДНК на уровень фосфорилированного гистона  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  в лейкемических клетках после воздействия цитарабина (Ara)

Химиопрепарат цисплатин вызывает множественные сшивки ДНК, которые впоследствии приводят к разрывам нити. Репарация таких повреждений происходит за счет нескольких систем, поэтому было исследовано несколько ингибиторов репарации с различным механизмом действия. Наибольшее снижение кинетики репаративных процессов было обнаружено в клетках через 24 ч инкубации с препаратом при добавлении ингибиторов NU7441 и NU1025. Как показано на рисунке 4, уровень  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  через 24 ч инкубации с цисплатином увеличился 2,32 раза, при добавлении NU7026 – в 2,18, NU7441 — в 1,18, NU1025 — в 1,34 раза, BERi — в 1,98, KU55933 — в 2,32. Значительных изменений в кинетике репарации повреждений ДНК, вызванных топотеканом, выявлено не было.

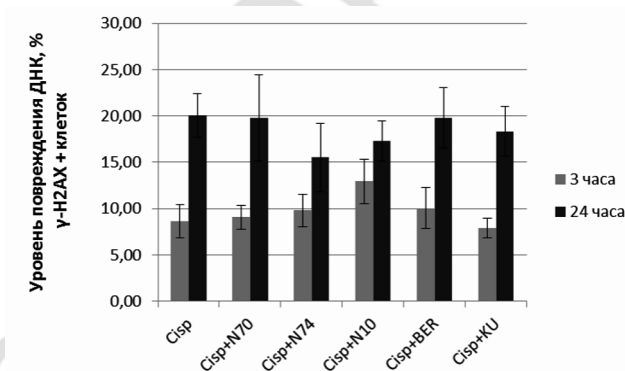


Рисунок 4 — Влияние ингибиторов репарации ДНК на уровень фосфорилированного гистона  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  в лейкемических клетках после воздействия цисплатина (Cisp)

**Заключение.** Только ингибитор киназы ATM KU55933 эффективно понижал репарацию двунитевых разрывов ДНК в лейкемических клетках после воздействия этопозиды. Ингибитор BERi приводил к повышению уровня фосфорилированного  $\gamma\text{H}_2\text{AX}$  в лейкемических клетках после инкубации с флударабином, что может свидетельствовать о запуске альтернативного пути репарации, такого как гомологичная рекомбинация, одним из промежуточных продуктов которой является неповрежденная нить ДНК с двунитевым разрывом. Понижение кинетики репарации ДНК наблюдалось в клетках после инкубации с цитарабином и ингибитором NU1025 по сравнению с таковой без ингибитора. Изменение кинетики репарации повреждений, вызванных цисплатином, было отмечено при добавлении ингибиторов с различным механизмом действия — NU7441 (ингибитор репарации двунитевых разрывов) и NU1025 (ингибитор эксцизионной репарации одностранных разрывов).

Дальнейшее исследование особенностей репарации ДНК в лейкемических клетках открывает перспективы выявления возможных мишеней, ингибирование которых может повысить эффективность терапии.

Однако необходимо также исследовать влияние предполагаемых ингибиторов на нормальные гемопоэтические клетки и здоровые ткани.

Исследование выполнено в рамках проекта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований «Исследовать репарацию ДНК как механизм резистентности опухолевых клеток к терапии при острых лейкозах у детей» (договор № М13М-117 от 16.04.2013).

## INHIBITION OF DNA DOUBLE-STRAND BREAK REPAIR AS STRATEGY TO OVERCOME CHEMORESISTANCE IN ACUTE LEUKEMIA IN CHILDREN

*O.S. Vshyukova, I.V. Pachomova, A.S. Romancova, A.V. Tarasova*

In current *in vitro* study acute leukemia chemotherapy efficiency in presence of DNA repair inhibitors was evaluated. Further studies allowed us to identify potential targets whose inhibition may increase the therapy efficiency. It allowed to determine the possibility of adjuvant therapy using repair inhibitors in cancer patients. It is also necessary to investigate the effect of inhibitors on normal tissue and healthy hematopoietic cells.

**Field of application:** acute leukemia chemotherapy, oncology.

### Литература

1. O'Connor, M.J. Targeted cancer therapies based on the inhibition of DNA strand break repair / M.J. O'Connor, N.M.B. Martin, G.C.M. Smith // *Oncogene*. — 2007. — Vol. 26. — P. 7816–7824.
2. Mellor, R. Resistance to chemotherapy in cancer: a complex and integrated cellular response / R. Mellor // *Pharmacol.* — 2008. — Vol. 81. — P. 275–300.
3. D'Andrea, A.D. Targeting DNA repair pathways in AML / A.D. D'Andrea // *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* — 2010. — Vol. 23. — P. 469–473.
4. Podhorecka, M. H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy / M. Podhorecka, A. Skladanowski, P. Bozko // *J. Nucleic. Acids*. — 2010. — doi: 10.4061/2010/920161.
5. Svetlova, M.P. Mechanism of elimination of phosphorylated histone H2AX from chromatin after repair of DNA double-strand breaks / M.P. Svetlova, L.V. Solovjeva, N.V. Tomilin // *Mutat. Res.* — Vol. 685, № 1–2. — P. 54–60.
6. Valdiglesias, V.  $\gamma$ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies / V. Valdiglesias, S. Giunta, M. Fenech // *Mutat. Res.* — 2013. — Vol. 753, № 1. — P. 24–40.