

УДК 577.29

Гипометилирующий агент 5-азацитидин усиливает действие ингибиторов RAS и Sp1 в клетках нейробластомы

К. А. Иваненко^{1*}, А. В. Снежкина¹, М. А. Золотовская^{2,3}, П. В. Спирин^{1,4}, О. Г. Леонова¹, В. И. Попенко¹, А. В. Кудрявцева^{1,4}, А. А. Буздин^{2,3,5,6}, В. С. Прасолов^{1,4}, Т. Д. Лебедев^{1,4}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

²Московский физико-технический институт, Долгопрудный, 141701 Россия

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991 Россия

⁴Центр высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

⁵Государственный научный центр Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

⁶PathoBiology Group, European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), Brussels, 1200, Belgium

*E-mail: karina.ivanenko@mail.ru

Поступила в редакцию 08.11.2024

Принята к печати 03.04.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27558

РЕФЕРАТ Нейробластома – злокачественная солидная опухоль, возникающая в результате трансформации клеток нервного гребня. Нейробластома встречается преимущественно у детей и характеризуется неблагоприятным течением. В связи с этим актуальна разработка новых подходов к терапии нейробластом, в том числе к комбинированной терапии. Увеличение уровня метилирования ДНК, обнаруженное в клетках нейробластомы, указывает на потенциальную возможность использования гипометилирующих агентов в комбинированной терапии этого заболевания. Для выявления эффективных комбинаций противоопухолевых препаратов нами проведен анализ изменений транскриптома клеток нейробластомы SH-SY5Y после обработки гипометилирующим агентом 5-азацитидином с последующей экспериментальной проверкой эффективности этих комбинаций. Обнаружены два препарата – митрамицин А и лонафарниб – совместное применение которых с 5-азацитидином синергически усиливает гибель клеток SH-SY5Y. Эти препараты ингибируют сигнальный путь, связанный с фактором транскрипции Sp1, и сигнальный путь RAS-MAPK, которые активируются под действием 5-азацитидина. Анализ сигнальных путей также выявил активацию сигнальных каскадов, связанных с дифференцировкой клеток нейробластомы и индукцией апоптоза, что было подтверждено методами мультиплексной и конфокальной микроскопии. Таким образом, анализ изменения сигнальных путей позволяет установить механизмы гибели клеток и их адаптации к гипометилирующим агентам, что может быть в дальнейшем использовано для разработки новых подходов к терапии нейробластомы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА детские злокачественные заболевания, комбинированная терапия, эпигенетические регуляторы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 5-Аза – 5-азацитидин; GD2 – дисialogанглиозид; ALK – киназа анапластической лимфомы; MDM2 – убиквитин-протеинлигаза E3; ДМСО – диметилсульфоксид; PKB – протеинкиназа B; NGF – фактор роста нервов; ILK – интегрин-связанная киназа; TRK – рецепторная тропомиозинкиназа; IGF1R – инсулиноподобный фактор роста 1; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; ERK – внеклеточная сигнал-регулируемая киназа; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; FGFR – рецептор фактора роста фибробластов, JAK – Янус-киназа; CHK – киназа контрольных точек клеточного цикла; mTOR – мишень рапамицина у млекопитающих; RAF – серин/треониновая протеинкиназа; CDK – циклинзависимая киназа; PTK – рецепторная тирозинкиназа; RAS – малый G-белок.

ВВЕДЕНИЕ

Нейробластома – это внечерепная солидная опухоль, которая образуется в результате злокачественного перерождения клеток нервного гребня во время формирования симпатической нервной системы [1]. Пятилетняя выживаемость детей с нейробластомой высокого риска (50% случаев) составляет 60% [2]. К основным методам лечения нейробластом высокого риска относятся интенсивная химиотерапия, лучевая терапия, трансплантация аутологичных стволовых клеток и иммунотерапия [3]. Разрабатываются таргетные препараты, направленные на дисаialogанглиозид (GD2) [4], киназу анапластической лимфомы (ALK) [5–7], убиквитин-протеинлигазу E3 (MDM2) [8], компоненты сигнальных путей PI3K/Akt/mTOR, Fos/Jun и RAS-MAPK [9]. Ингибиторы ALK уже находятся на стадии клинических испытаний для лечения пациентов с рецидивами и резистентными формами нейробластомы [10]. Существующие подходы к лечению таких пациентов не всегда эффективны, поэтому разрабатываются методы комбинированной терапии нейробластом [11].

Изменения в метилировании ДНК часто наблюдаются в злокачественных клетках разной природы, в частности, гиперметилирование промоторов опухолевых генов-супрессоров или глобальное гипометилирование [12]. На данный момент для лечения миелодиспластических синдромов одобрены два ингибитора ДНК-метилтрансферазы – 5-азациитидин (5-Аза) и его аналог децитабин [13, 14]. 5-Аза – гипометилирующий агент, являющийся синтетическим аналогом цитидина. Встраивание 5-Аза в ДНК приводит к нарушению работы ДНК-метилтрансфераз, гипометилированию и повреждению ДНК. Препарат одобрен для лечения пациентов с острыми миелоидными лейкозами и миелодиспластическими синдромами [15].

Повышенный уровень метилирования геномной ДНК в клетках нейробластомы связывают с неблагоприятным прогнозом [16]. Показано, что 5-Аза вызывает дифференцировку клеток нейробластом, снижает скорость пролиферации и формирование колоний, а также усиливает цитотоксический эффект таких препаратов, как доксорубицин, цисплатин и этопозид [17]. Децитабин ранее тестировали в сочетании с доксорубицином, но на первой стадии клинических испытаний выявили высокую токсичность такой комбинации [18]. Ингибиторы эпигенетических регуляторов, например ингибиторы гистоновых деацетилаз, могут проявлять синергический эффект в сочетании с ингибиторами рецепторных тирозинкиназ за счет повышения их экспрессии [19]. 5-Аза также может оказывать су-

щественное влияние на экспрессию генов, активно участвующих в онкогенезе, путем деметилирования ДНК. Поэтому перспективным представляется поиск новых подходов к терапии, основанных именно на комбинированном использовании 5-Аза с другими противоопухолевыми препаратами.

В представленной работе проанализированы изменения экспрессии генов и активности сигнальных путей в клетках нейробластомы SH-SY5Y под действием 5-Аза для отбора наиболее эффективных комбинаций 5-Аза с противоопухолевыми препаратами различных типов. Дополнительно проверяли функциональное значение изменений активности сигнальных путей на уровне транскриптома, изучая внутриклеточные процессы с помощью флуоресцентной микроскопии и оценивая совместное действие 5-Аза с ингибиторами различных сигнальных путей. Эти данные можно рассматривать как предпосылку для разработки нового подхода к лечению тех нейробластом, клетки которых чувствительны к действию деметилирующих агентов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток и ингибиторы

Перевиваемые клетки злокачественных опухолей человека: нейробластомы SH-SY5Y, рака молочной железы SK-BR-3, рака почки 786-O, рака шейки матки SiHa и рака яичника SK-OV-3 культивировали в среде RPMI-1640 (Capricorn Scientific, Германия), клетки колоректального рака HCT-116, аденокарциномы легкого H1299, глиобластомы LN-18, рабдомиосаркомы TE-671 культивировали в среде DMEM (Capricorn Scientific). Все клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США), 1 mM пирувата натрия (Gibco), 2 mM L-глутамин (Gibco), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Capricorn Scientific). Для пересева клеток использовали фосфатный буфер и трипсин (ThermoFisher Scientific). Клетки SH-SY5Y, H1299, LN-18 и TE-671 подарены Институтом экспериментальной вирусологии Генриха Петте (Гамбург, Германия), клетки SK-BR-3 получены из коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия), остальные клеточные культуры взяты из коллекции Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Москва, Россия). Клетки тестировали на отсутствие контаминации микоплазмой каждые две недели с помощью окрашивания красителем ДНК Hoechst-33342 (Sigma-Aldrich, США).

Все использованные в работе ингибиторы растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО), стоковые растворы хранили при -80°C (табл. S1).

Выделение РНК

РНК для анализа транскриптома выделяли из 1 млн клеток SH-SY5Y, обработанных 5 мкМ 5-Аза в течение 24 ч. РНК выделяли хлороформ-феноловым методом реагентом TRIzol (Ambion) с последующей обработкой ДНКазой (Zymo Research, США) и очисткой РНК с помощью колонок RNA Clean & Concentrator-25 (Zymo Research) согласно протоколам производителей.

Количество выделенной РНК определяли с помощью флуориметра Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific). Общую целостность РНК оценивали с помощью биоанализатора Agilent 2100 (Agilent Technology, США). Целостность РНК (RIN) каждого образца составила ≥ 8 .

РНК-секвенирование и анализ транскриптома

Для получения каждой библиотеки использовали в общей сложности 1 мкг РНК. Библиотеки для секвенирования РНК создавали с использованием набора для подготовки библиотеки мРНК TruSeq (Illumina, США) в соответствии с рекомендациями производителя. К каждому образцу прикрепляли различные адаптеры с одним индексом из наборов TruSeq RNA Single Index (Illumina) для облегчения мультиплексного секвенирования. Фрагменты ДНК длиной 250–300 п.н. отбирали с помощью магнитных шариков MagPure A4 XP (Magen Biotechnology, Китай). Затем библиотеки кДНК обогащали методом ПЦР и очищали. Качество библиотек оценивали с помощью биоанализатора Agilent 2100. Конечные библиотеки собрали в эквимольных соотношениях и секвенировали на системе NextSeq 2000 (Illumina) в режиме single-end с длиной прочтения 101 п.н. Результаты секвенирования были обработаны с помощью программы STAR aligner версии 2.7.4a [20] в режиме «GeneCounts» с аннотацией Ensembl human transcriptome (версия сборки GRCh38 и аннотация транскрипта GRCh38.89). Исходные значения экспрессии RNAseq (формат ReadsPerGene) нормировали по стандарту DESeq2 [21]. Мы рассчитали уровни активации путей (PALs) в общей сложности для 3024 путей, используя общедоступную коллекцию молекулярных путей, извлеченных из OncoboxPD [22].

Анализ активности сигнальных путей и анализ CMAP

Для поиска схожих или противоположных воздействий использовали алгоритм CMAP [23]. Алгоритм CMAP позволяет сравнить изменения экспрессии генов под определенным воздействием и под действием каждого из сотен тысяч измеренных воздействий, содержащихся в базе данных.

Алгоритм показывает, влияние каких воздействий на экспрессию генов оказалось наиболее сходным или противоположным анализируемому воздействию. Сравнивали уровни экспрессии 100 генов, экспрессия которых наиболее сильно повысилась, и 100 генов, экспрессия которых наиболее заметно снизилась, под исследуемым воздействием. В качестве контроля использовали клетки SH-SY5Y, обработанные ДМСО.

Оценка выживаемости клеток

Жизнеспособность клеток оценивали с использованием наборов Cell Proliferation Assay XTT (11465015001, Roche, Sigma-Aldrich, США) и AbiCell Resazurin Cytotoxicity Assay Kit резазурин (CEL-04-30ML, Abisense, Россия).

Клетки SH-SY5Y (2500 клеток на лунку 96-луночного планшета) инкубировали с препаратами в течение 6 дней, затем удаляли питательную среду и добавляли к клеткам резазурин или ХТТ. После 4 ч инкубации при 37°C и 5% CO₂ измеряли сигнал от клеток на спектрофотометре Multiscan FC как разницу поглощения на длинах волн 570 и 620 нм для резазурина и 450 и 605 нм для ХТТ. Изменение жизнеспособности клеток, вызванное комбинацией препаратов, рассчитывали как разницу общего эффекта препаратов и суммы их эффектов по отдельности. Использовали методику расчета выживаемости клеток и показателя AUC (area under the curve), аналогичную опубликованной ранее [24]. Для расчета AUC вычисляли площадь под графиком в координатах выживаемости клеток (в процентах) и концентрации препарата, используя для расчета площади разбиение графика на трапеции. На основании рассчитанных для всех клеточных линий значений определяли среднее значение показателя AUC для всех линий для последующей нормировки. Значение AUC нормировали таким образом, что показатель AUC, равный единице, соответствует среднему значению AUC для всех линий.

Подсчет клеток автоматическим микроскопом

Для подсчета клеток автоматическим флуоресцентным микроскопом мы применяли протокол подсчета клеток с экспрессией репортерной системы ERK-KTR H2B-mRuby, который использовали в лаборатории ранее [25]. Каждый эксперимент повторяли три раза; для подсчета клеток в каждой лунке выбирали четыре случайные поля для съемки. Измеряли четыре временные точки: 0, 24, 72 и 144 ч. Изображения клеток получали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI8 (Leica, Германия), подсчет количества клеток производили в программах Cellpose и CellProfiler.

Измерение механизмов гибели клеток

Клетки SH-SY5Y высевали на 96-луночные планшеты (2500 клеток на лунку). Окрашивание проводили через 72 ч после добавления 5-Аза. Для окрашивания митохондрий, тубулина, лизосом, ионов железа Fe^{II} , каспаз 3/7, ядер и ДНК использовали красители TMRE (Lumiprobe, Россия), Tubulin Tracker™ Deep Red (Invitrogen, США), LumiTracker® LysoGreen (Lumiprobe), HMRhoNox-M (Lumiprobe), NucView® 488 (Biotium, США), Hoechst-33342 и 7-аминоактиномицин Д (7-AAD) (BioinnLabs, Россия) соответственно. Окрашивание проводили при 37°C и 5% CO_2 , съемку – на флуоресцентном микроскопе Leica DMI8. Используемые концентрации, времена окрашивания, параметры съемки указаны в приложении (табл. S2).

Делали по четыре фотографии клеток, инкубированных с препаратом в каждой концентрации, опыт проводили в двух повторах. Индивидуальные клетки на фотографиях определяли с помощью программ Cellpose и CellProfiler. Протоколы сегментации клеток и расчета интенсивностей флуоресценции опубликованы ранее [24]. Активности митохондрий, лизосом, ионов Fe^{II} измеряли, используя интегральную интенсивность флуоресценции для каждой клетки. Для анализа активности каспаз 3/7 и выявления мертвых клеток по окрашиванию 7-AAD определяли процент окрашенных клеток в CellProfiler.

Конфокальная микроскопия

Клетки фиксировали 4% раствором формальдегида (Sigma-Aldrich, США) в 0.1 М фосфатном буфере (PBS) в течение 15 мин, затем блокировали с использованием раствора, состоящего из 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA) («ПанЭко», Россия), 22.52 мг/мл глицина (Sigma-Aldrich), 1% Tween (Sigma-Aldrich) в PBS. Для изучения распределения рецепторных белков TRK в цитоплазме клеток использовали конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa 647 антитела (ab194322, Abscam, Великобритания). Клетки инкубировали с антителами в течение ночи, разведение антител – 1 : 100 в 1% растворе BSA в PBS. Покровные стекла помещали на предметные стекла, на которых размещали 8 мкл Slowfade gold medium (Invitrogen, США) с 1 мкг/мл DAPI (Sigma-Aldrich) клетками вниз, покровные стекла заклеивали лаком для ногтей. Для детекции ядер использовали краситель DAPI. Данные получали методом конфокальной микроскопии на лазерно-сканирующем микроскопе Leica TCS SP5 (Leica), который оснащен объективом HCX PLAPO CS 63×1.4, используя масляную иммерсию. Полученные конфокальные

8-битные изображения обрабатывали в программном обеспечении LAS AF 4.0.

Обработка данных

Статистические тесты и визуализацию данных проводили в программных обеспечениях GraphPad Prism 8.0, Python, LAS AF. Средние значения, значения стандартного отклонения (SD) для оценки жизнеспособности клеток посчитали в R и GraphPad Prism 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для определения селективности 5-Аза в отношении клеток нейробластомы мы измерили действие 5-Аза в концентрациях 0.25–20 мкМ на клетки опухолей человека различной природы: нейробластомы SH-SY5Y, рака молочной железы SK-BR-3, рака почки 786-O, рака шейки матки SiHa, рака яичника SK-OV-3, колоректального рака HCT-116, аденокарциномы легких H1299, глиобластомы LN-18, рабдомиосаркомы TE-671 (рис. 1А). Наиболее чувствительными к действию 5-Аза оказались клетки нейробластомы SH-SY5Y (рис. 1Б).

Клетки нейробластомы SH-SY5Y были получены путем клонирования клеточной линии нейробластомы SK-N-SH [26]. Клетки SH-SY5Y являются наиболее часто используемыми в научных исследованиях: на сайте <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/> представлены 13789 публикаций, в которых применяли клеточную линию SH-SY5Y, а на долю сле-

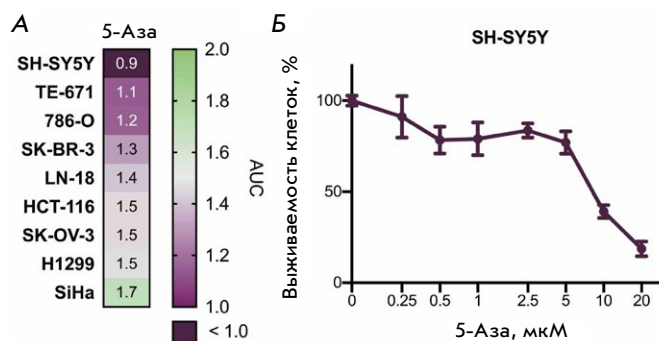


Рис. 1. Оценка токсичности 5-азациитидина (5-Аза) для клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. А – чувствительность злокачественных клеток разной природы к 5-Аза в течение 72 ч. Клетки обрабатывали препаратом в концентрации 0.25–20 мкМ, представлены значения показателя AUC (area under the curve). Б – выживаемость клеток нейробластомы SH-SY5Y после обработки 5-Аза в течение 72 ч. На графике приведены среднее значение из трех повторов и среднеквадратическое отклонение (SD). Контроль – клетки, инкубированные с диметилсульфоксидом (ДМСО)

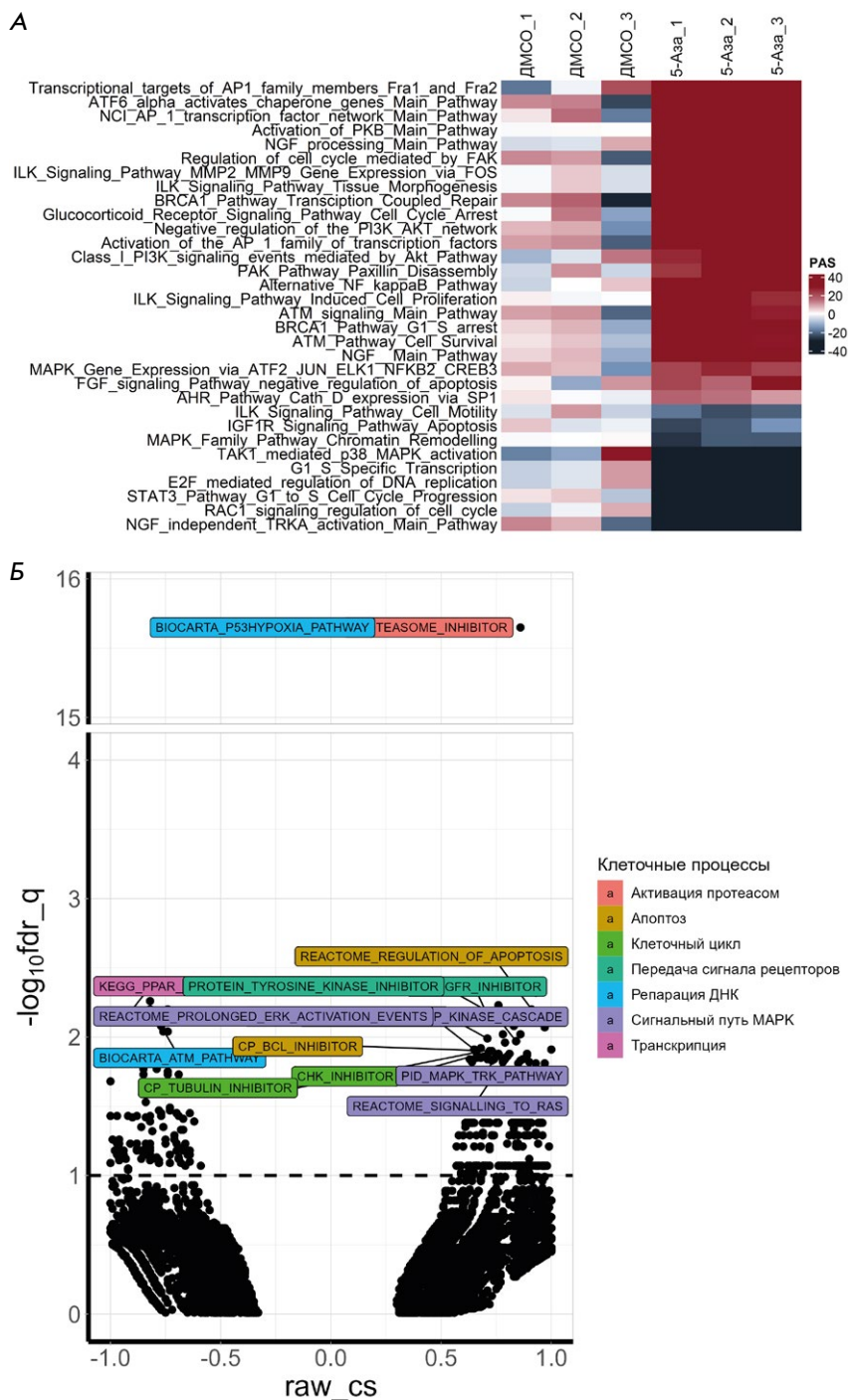


Рис. 2. Изменение сигнальных путей в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y после обработки 5-азациитидином (5-Аза). **А** – сила активации сигнальных путей в клетках SH-SY5Y после обработки 5 мкМ 5-Аза в течение 24 ч по результатам анализа Онкобокс [22]. Приведены результаты для каждого повтора отдельно. Сила активации сигнальных путей (PAS): красным обозначено позитивное изменение, черным – негативное. Показаны сигнальные пути, которые могут вносить вклад в прогрессию злокачественных опухолей и имеют статистически значимые изменения. **Б** – клеточные процессы, изменяющиеся в клетках SH-SY5Y, обработанных 5 мкМ 5-Аза в течение 24 ч, согласно анализу CMAP. Точками обозначены клеточные процессы из анализа CMAP. Цветом обозначены классы клеточных процессов, которые имеют статистически значимые совпадения или различия с набором генов, экспрессия которых изменяется под воздействием 5-азациитидина, согласно анализу CMAP. Результаты показаны как обратный десятичный логарифм q-значений после коррекции на множественные значения ($-\log_{10}fdr_q$) и connectivity scores (raw_cs) – степени совпадения дифференциально активированных генов на анализируемое изменение их экспрессии в ответ на воздействие 5-азациитидином. Положительные значения raw_cs указывают на наличие одинаковых изменений в экспрессии генов под воздействием 5-Аза и указанных пертурбаций. Отрицательные значения соответствуют противоположному изменению в экспрессии генов под воздействием 5-Аза и указанных пертурбаций

дующей по количеству упоминаний линии (NMB) приходится 5338 публикаций. Клетки SH-SY5Y содержат мутацию в гене *ALK* (F1174L) [27], они подходят для изучения дифференцировки клеток [28]. Клетки SH-SY5Y оказались самыми чувствительными к 5-Аза, поэтому дальнейшие исследования проводили на культуре этих клеток.

Чтобы определить, на какие процессы в клетках нейробластомы воздействует 5-Аза, нами проведен

анализ транскриптома клеток под воздействием 5 мкМ 5-Аза в течение 24 ч и сравнение с транскриптомом клеток SH-SY5Y, обработанных ДМСО в течение 24 ч. Результаты анализа транскриптома представлены в виде активности сигнальных путей и экспрессии генов (рис. 2А).

Наибольшие положительные изменения активности сигналинга наблюдали в сигнальных путях, связанных с транскрипционными факторами AP1,

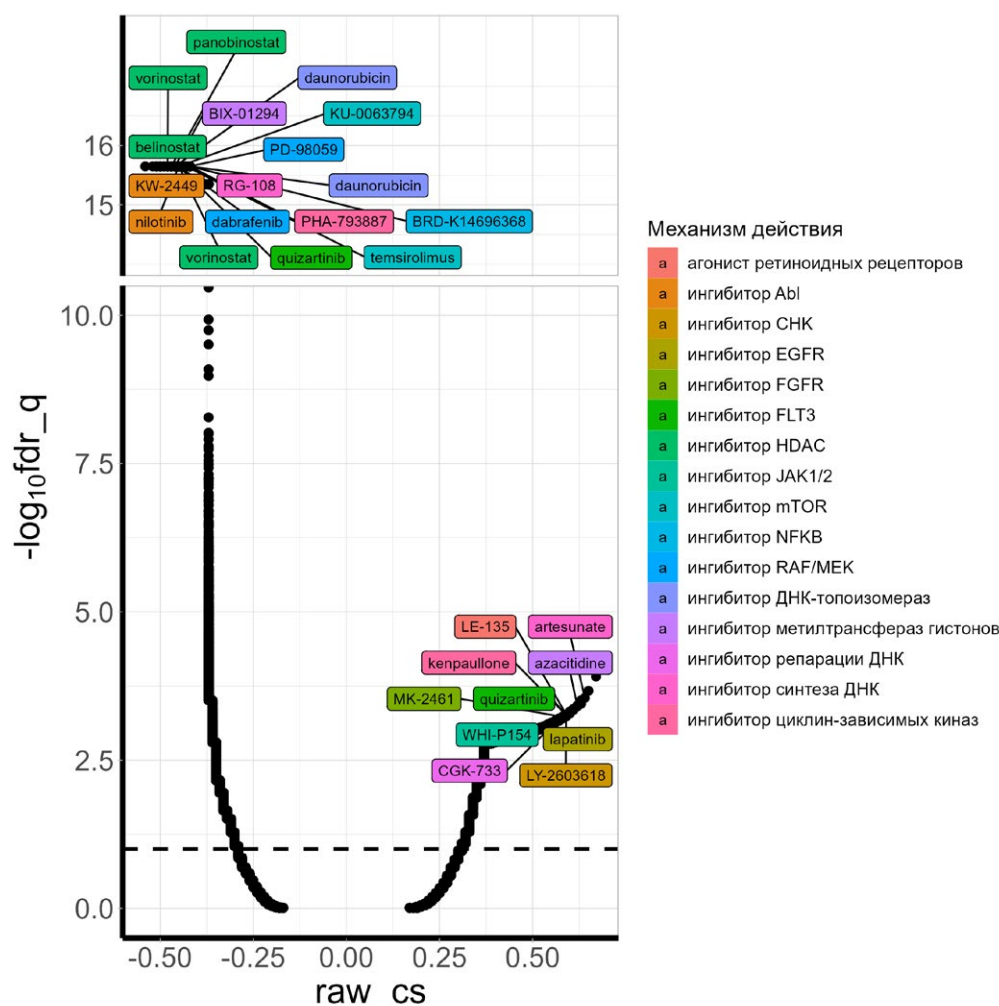


Рис. 3. Определение препаратов со сходным с 5-азацитидином (5-Аза) воздействием на экспрессию генов клеток SH-SY5Y нейробластомы человека с помощью CMAP. Клетки обрабатывали 5 мкМ 5-Аза и инкубировали их с препаратом в течение 24 ч. Точками обозначены воздействия ингибиторов, малых шпилечных РНК или сверхэкспрессии определенных генов. Цветом обозначены разные классы ингибиторов. Показаны препараты со статистически значимым максимальным эффектом. Результаты показаны как обратный десятичный логарифм q-значений после коррекции на множественные значения ($-\log_{10} \text{fdr}_q$) и connectivity scores (raw_cs) – степени похожести дифференциально активированных генов на анализируемое воздействие. Положительные значения raw_cs указывают на схожие воздействия с действием 5-Аза, а отрицательные – на противоположные

ATF6, Sp1, с активацией протеинкиназы В (PKB), процессингом фактора роста нервов (NGF), арестом клеточного цикла за счет рецептора глюкокортикоидов, сигнальными каскадами, связанными с интегринзависимой киназой (ILK) и сигнальным путем PI3K/Akt/mTOR (рис. 2А). Наибольшие отрицательные изменения выявлены в сигнальных путях, связанных с NGF-независимой активацией рецепторной тропомиозинкиназы А (TRKA), клеточным циклом, репликацией ДНК с участием транскрипционного фактора E2F, сигнальными путями митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK), апоптозом за счет рецептора инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF1R).

Чтобы определить, какие противоопухолевые препараты и клеточные процессы могут оказывать схожее или противоположное воздействие на транскриптом клеток, мы провели анализ алгоритмом CMAP [23] (табл. S3, S4, рис. 2, 3). Нами выявлены значимые изменения клеточных процессов в клетках SH-SY5Y, обработанных 5-Аза (рис. 2Б).

Схожие изменения касались процессов, связанных с регуляцией апоптоза и клеточного цикла, активностью протеасом, рецепторным сигналингом и MAPK-путем, в частности, связанных с внеклеточной сигнал-регулируемой киназой (ERK) и TRK. Противоположные изменения касались процессов, связанных с ответом на повреждения ДНК и транскрипцией.

Ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), рецептора фактора роста фибробластов (FGFR), Янус-киназы (JAK), киназы контрольных точек клеточного цикла (CHK) и ингибитор репарации ДНК действовали на экспрессию генов так же, как и 5-Аза (рис. 3). В числе соединений, вызывающих сходные эффекты, выявлен 5-Аза, что указывает на достоверность наблюдаемых нами изменений транскриптома. Противоположные эффекты вызвали ингибиторы гистондеацетилаз, ингибиторы mTOR, топоизомеразы, серин/треониновой протеинкиназы (RAF), тирозинкиназы Abl, транскрипционного фактора NF-kB. Ингибиторы циклин-

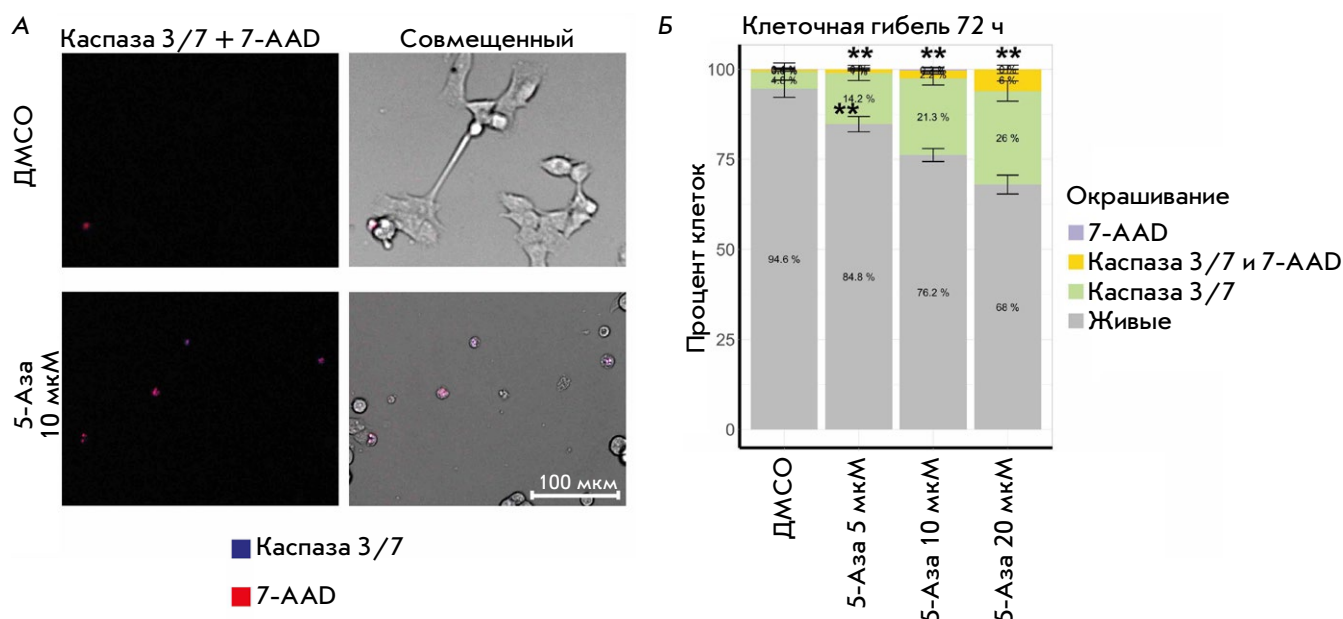


Рис. 4. Вклад апоптоза в гибель клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, обработанных 5-азацитидином (5-Аза) в течение 72 ч. А – окрашивание клеток SH-SY5Y красителем каспаз 3/7 и 7-аминоактиномицином Д (7-AAD) после обработки 10 мкМ 5-Аза. Б – доля апоптотических клеток (зеленый и желтый) в популяции клеток SH-SY5Y после обработки 5–20 мкМ 5-Аза. Фотографии клеток получены на автоматическом флуоресцентном микроскопе. Контроль – клетки, обработанные диметилсульфоксидом (ДМСО). Анализ проводили на основе интенсивности флуоресценции красителей в 350–2500 клетках, среднеквадратичное отклонение (SD) оценивали для среднего значения интенсивности восьми фотографий каждой концентрации 5-Аза. Статистическую значимость определяли с помощью теста Манна–Уитни по сравнению с ДМСО (** $p \leq 0.01$)

зависимых киназ (CDK), рецепторной тирозинкиназы (РТК) FLT3 и ингибиторы синтеза ДНК влияли на экспрессию генов по-разному.

Нами обнаружено увеличение активности семи клеточных путей, связанных с апоптозом (табл. S3). Поскольку существуют разные механизмы клеточной гибели, мы решили определить, как влияет обработка 5-Аза в течение 72 ч на активность каспаз 3/7, митохондрий, лизосом, содержание Fe^{II} в клетках и количество мертвых клеток SH-SY5Y. С помощью флуоресцентных красителей выявлено увеличение количества клеток в апоптозе до 26% (рис. 4А,Б), что подтверждает повышение активности сигнальных каскадов, связанных с апоптозом. Обнаружено увеличение активности лизосом в клетках SH-SY5Y после обработки 5-Аза (рис. 5А,Б). Также выявлено снижение активности митохондрий и повышение количества Fe^{II} , но эти изменения были незначительными и, вероятно, связаны с гибелью клеток (рис. 5В,Г).

Показано *in vitro*, что NGF способен замедлять рост нейрогенных опухолевых клеточных линий и вызывать их дифференцировку [29]. Поскольку 5-Аза влияет на активность сигнальных путей, связанных с NGF и его рецептором TRKA, мы оценили

распределение рецепторов TRK в цитоплазме клеток SH-SY5Y, обработанных 5-Аза в концентрации 10 мкМ в течение 72 ч (рис. 6).

Обнаруженное усиление окрашивания клеток антителами к белкам TRK в цитоплазме клеток SH-SY5Y может объяснять повышение активности сигнальных путей, связанных с NGF и белками TRK, на уровне экспрессии генов.

На основе полученных результатов (табл. S3, S4, рис. 2, 3) были выбраны 18 препаратов для дальнейшего тестирования в комбинациях с 5-Аза. В частности, отобран ряд ингибиторов РТК, гистон-деацетилаз, MAPK-пути, клеточного цикла, а также ингибиторы протеасом, глюкокортикоидных рецепторов, синтеза ДНК, восстановления поврежденной ДНК, индуктор апоптоза и активатор сигнального пути, связанного с p38 (табл. 1).

Мы одновременно обрабатывали клетки 5-Аза в концентрации 2.5 мкМ и вторым ингибитором в подобранной ранее действующей концентрации, которая снижает количество клеток на 20–50% за 72 ч. Далее мы инкубировали клетки в течение 144 ч и для оценки эффективности комбинаций препаратов измеряли жизнеспособность клеток резазурином (рис. 7А).

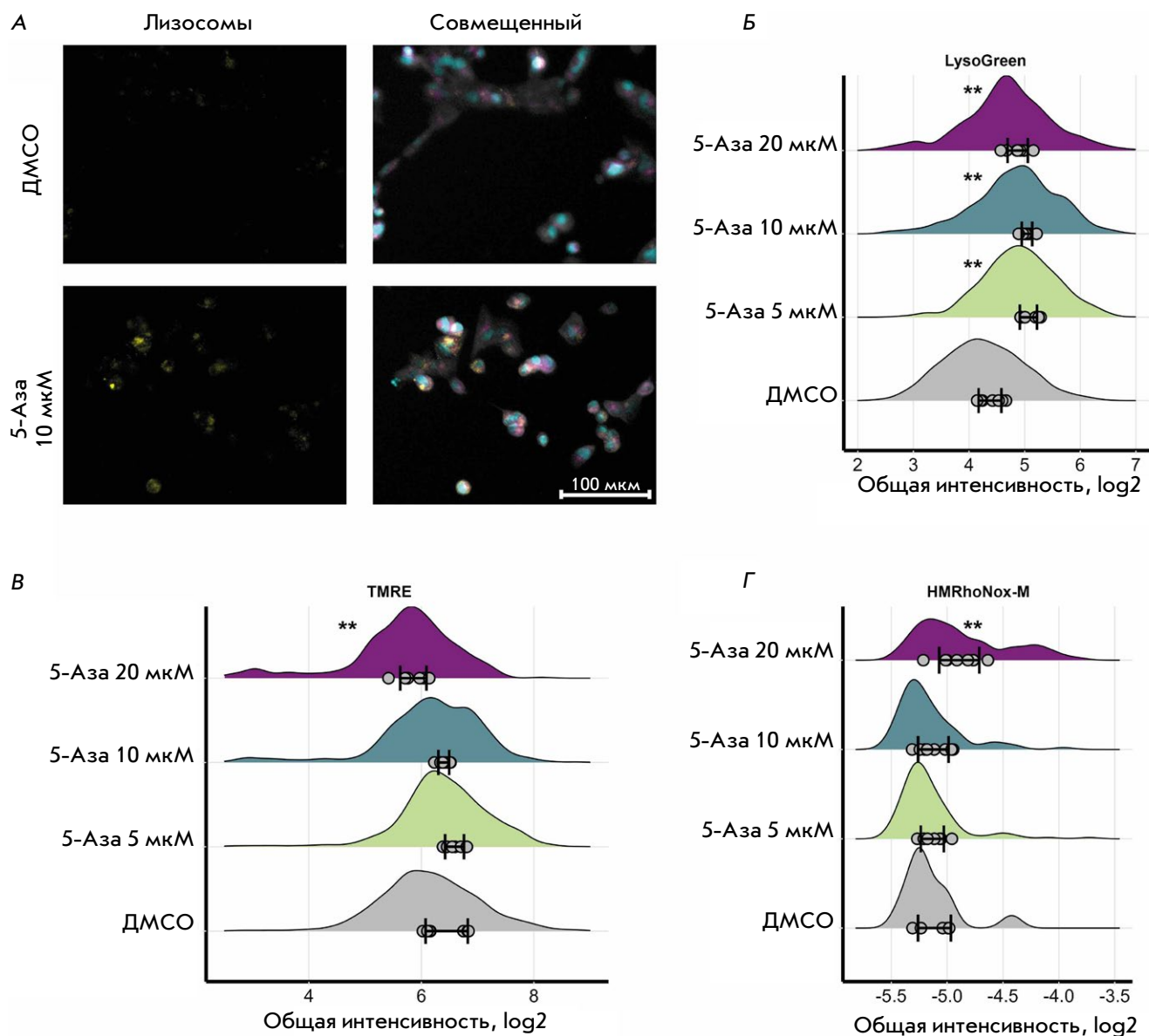


Рис. 5. Изменение активности лизосом в клетках нейробластомы человека SH-SY5Y после обработки 5-азацитидином (5-Аза) в течение 72 ч. **А** – окрашивание клеток SH-SY5Y красителем лизосом после обработки 10 мкМ 5-Аза. Фотографии клеток получили на флуоресцентном микроскопе. Желтым отмечены лизосомы, синим – ядра, фиолетовым – митохондрии, серым – тубулин. **Б** – изменение активности лизосом в клетках SH-SY5Y после обработки 5–20 мкМ 5-Аза. **В** – изменение активности митохондрий в клетках SH-SY5Y после обработки 5–20 мкМ 5-Аза. **Г** – изменение количества железа Fe^{II} в клетках SH-SY5Y после обработки 5–20 мкМ 5-Аза. Контроль – клетки, обработанные диметилсульфоксидом (ДМСО). Показаны распределения интегральной интенсивности красителей в 350–2500 клетках, точками отмечены средние значения для каждой из восьми фотографий, а также указано среднееквадратичное отклонение (SD). Статистическую значимость определяли с помощью теста Манна–Уитни по сравнению с ДМСО (** $p \leq 0.01$)

Обнаружены две наиболее эффективные комбинации – 5-Аза с акситинибом, с мультикиназным ингибитором и митрамицином А, ингибитором синтеза ДНК. Однако поскольку такой метод оценки пролиферации клеток показывает изменение метаболической активности клеток [24], мы решили

проверить жизнеспособность клеток после обработки комбинациями ингибиторов с 5-Аза с помощью подсчета числа клеток на автоматическом флуоресцентном микроскопе (рис. 7Б,В, S1). Выявили отличия от результатов эксперимента с резазурином: наиболее эффективными оказались сочетания 5-Аза

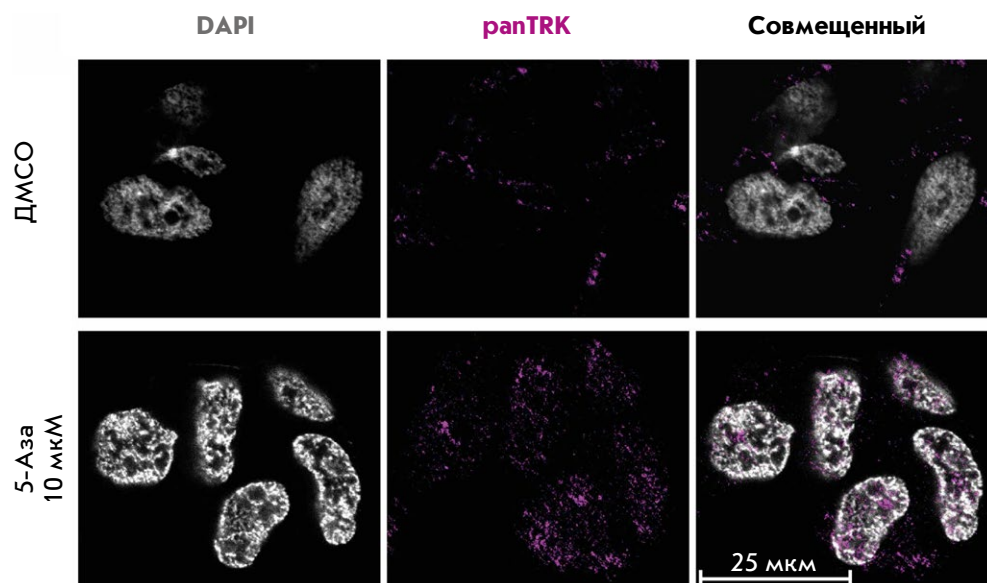


Рис. 6. Распределение белков TRK в цитоплазме клеток нейробластомы человека SH-SY5Y после обработки 10 мкМ 5-азацитидина (5-Аза) в течение 72 ч. Контроль – клетки, обработанные диметилсульфоксидом (ДМСО). Фотографии клеток получили на конфокальном микроскопе с использованием антител к белкам TRK (Alexa647, пурпурный) и окрашивания ядер фиксированных клеток с использованием DAPI (серый)

Таблица 1. Препараты, выбранные для оценки эффективности их совместного действия с 5-азацитидином на клетки SH-SY5Y

Препарат	Класс ингибитора
Акситиниб, энтректиниб, гефитиниб, сорафениб	Ингибиторы рецепторных тирозинкиназ
Белиностат, энтиностат, вориностат	Ингибиторы гистондеацетилаз
Бортезомиб	Ингибитор протеасом
Дексаметазон	Ингибитор глюкокортикоидных рецепторов, агент дифференцировки
Лонафарниб, PD184352	Ингибиторы MAPK
Митрамицин А	Ингибитор синтеза ДНК, ингибитор транскрипционной активности Sp1
Метформин	Активатор JNK/p38 MAPK-пути
В12536, пальбоциклиб, воласертиб	Ингибиторы клеточного цикла
Стауроспорин	Индуктор апоптоза, ингибитор PKC
Талазопариб	Ингибитор восстановления поврежденной ДНК

с митрамицином А и лонафарнибом, ингибитором малого G-белка (RAS) (рис. 7B). Комбинирование митрамицина А или лонафарниба с 5-Аза в концентрациях, которые сами по себе не оказывают значительного влияния на пролиферацию клеток, привело к существенному ингибированию роста клеток SH-SY5Y и практически полностью остановило их пролиферацию.

ОБСУЖДЕНИЕ

В нашей работе проанализировано изменение транскриптома клеток нейробластомы человека SH-SY5Y, обработанных 5-Аза, с целью выявления препаратов, которые можно будет использовать в комбинациях с 5-Аза. Определено также, посредством каких механизмов 5-Аза может активировать гибель клеток SH-SY5Y.

Обнаружено, что 5-Аза влияет на сигнальные пути, связанные с NGF: усиливается окрашивание клеток антителами к белкам TRK, изменяется морфология клеток. Ранее показано, что 5-Аза вызывает дифференцировку клеток нейробластом [30]. Возможно, что действие препарата обусловлено, в том числе, активацией процесса дифференцировки клеток. По некоторым данным, в клетках нейробластом, которые подверглись дифференцировке, в отсутствие NGF запускается апоптотическая гибель [31]. Индукция дифференцировки с помощью ретиноевой кислоты [32, 33] активно применяется в терапии нейробластомы низкой группы риска и в качестве поддерживающей терапии при более агрессивных формах заболевания [34]. Показано, что сочетание 5-Аза с ретиноевой кислотой усиливает дифференцировку клеток нейробластомы [35]. 5-Аза вызывает увеличение активности каспаз 3/7, что, возможно, связано с процессами дифференцировки клеток и увеличением экспрессии рецепторов TRK в отсутствие NGF.

Нами обнаружено увеличение активности лизосом в клетках SH-SY5Y. 5-Аза вызывает индукцию аутофагии в клетках острого миелоидного лейкоза [36]. Предполагается, что 5-Аза может запускать разные процессы гибели клеток нейробластом, од-

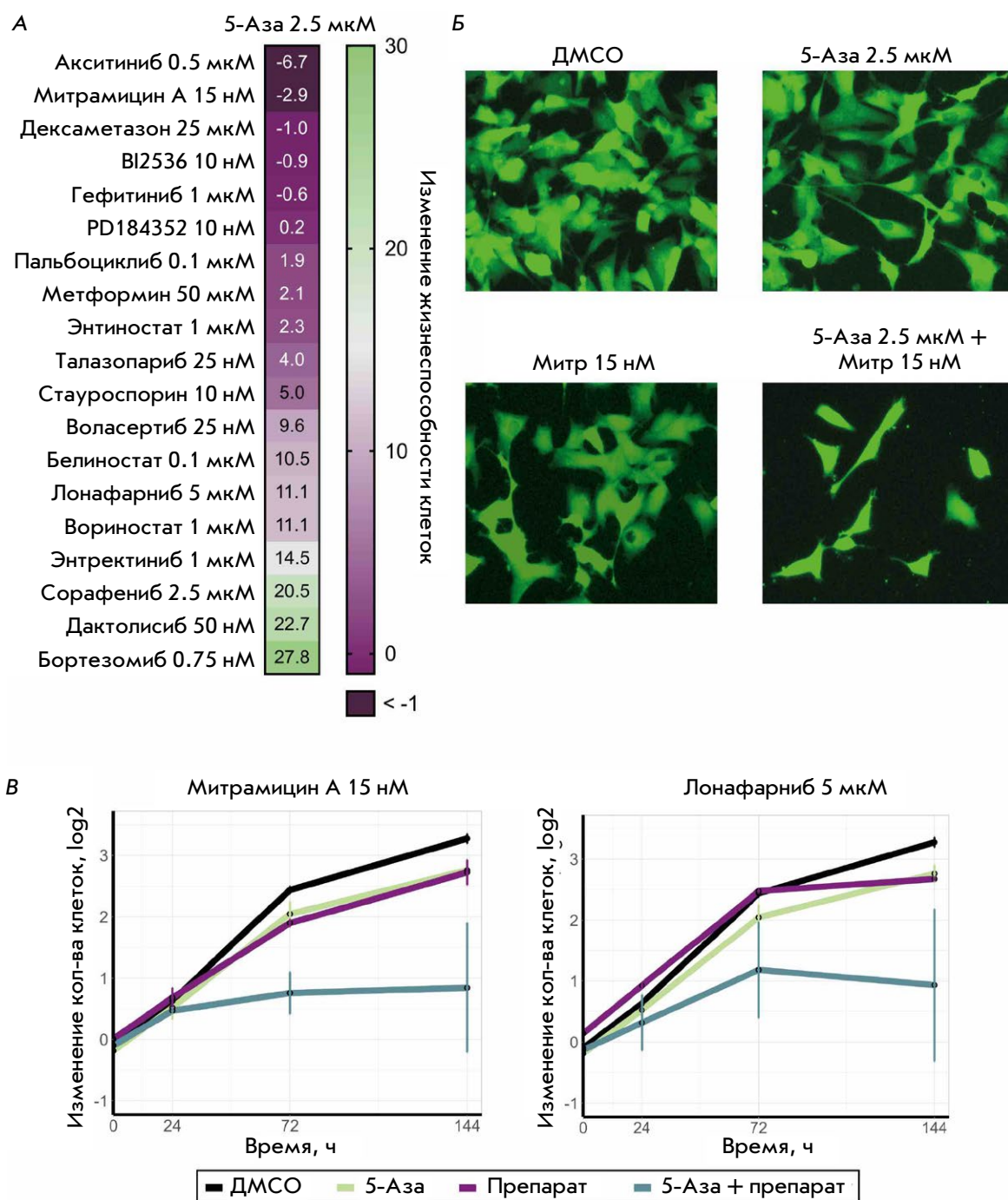


Рис. 7. Эффективность комбинаций 5-азацитидина (5-Аза) с противоопухолевыми препаратами для клеток нейробластомы человека SH-SY5Y. Клетки одновременно обрабатывали 2.5 мкМ 5-Аза и противоопухолевым препаратом (препараты и их концентрации приведены на рисунке), затем инкубировали в течение 144 ч. Контрольный сигнал – клетки, инкубированные с диметилсульфоксидом (ДМСО). А – тепловая карта, отражающая синергический эффект действия комбинации 5-Аза и ингибиторов разных классов на клетки SH-SY5Y. Б – фотографии клеток SH-SY5Y, содержащих репортерную систему ERK-KTR H2B-Ruby, после совместной обработки 2.5 мкМ 5-Аза и 15 нМ митрамицина А (Митр) в течение 144 ч. Представлены фотографии, сделанные с помощью автоматического флуоресцентного микроскопа. В – графики изменения количества клеток SH-SY5Y после одновременного добавления 2.5 мкМ 5-Аза и 15 нМ митрамицина А или 5 мкМ лонафарниба. На графиках показали среднее значение из трех повторов и среднеквадратичное отклонение (SD)

нако для подтверждения этого предположения необходимы дальнейшие исследования. При анализе изменений транскриптома клеток SH-SY5Y нами обнаружено изменение путей, связанных с митохондриями и клеточной гибелью, однако существенного изменения активностей митохондрий мы не наблюдали.

Митрамицин А – антибиотик, активный в отношении клеток рака легкого, пищевода [37], колоректального рака [38] и лейкозных клеток [39], однако этот препарат оказался высокотоксичным [40]. Лонафарниб тестировали в комбинациях с ингибиторами ALK на мутантных по ALK клетках нейробластомы *in vitro* и *in vivo* [41]. Показано, что митрамицин А и лонафарниб вызывают снижение уровня метилирования ДНК [42, 43]. Возможно, что усиление действия 5-Аза в клетках SH-SY5Y этими препаратами обусловлено воздействием на ДНК-метилтрансферазу 1 (DNMT1). Кроме того, клетки нейробластомы характеризуются высокой зависимостью от активации определенных рецепторов ростовых факторов [44, 45]. 5-Аза активирует ряд сигнальных каскадов, связанных с активностью РТК, а лонафарниб может блокировать передачу сигнала от РТК за счет ингибирования RAS [41].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что анализ изменения транскриптома клеток под действием 5-Аза позволил выявить препараты, оказывающие синергический эффект на гибель клеток нейробластомы, в частности, синергичность комбинации 5-Аза с митрамицином А и лонафарнибом в отношении клеток нейробластомы SH-SY5Y. Дальнейшее исследование эффективности сочетаний препаратов может быть направлено на более детальное изучение механизма совместного действия этих препаратов и тестирования на других моделях нейробластомы. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда грант № 22-14-00353. РНК-секвенирование выполнено на оборудовании ЦКП «Геном» ИМБ РАН (http://www.eimb.ru/rus/ckp/ccu_genome_c.php). Микроскопия генетически модифицированных клеток выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение № 075-15-2019-1660).

Приложения доступны на сайте <https://doi.org/10.32607/actanaturae.27558>.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Matthay K.K., Maris J.M., Schleiermacher G., Nakagawara A., Mackall C.L., Diller L., Weiss W.A. // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2016. V. 2. № 1. P. 16078. doi: 10.1038/nrdp.2016.78.
- Irwin M.S., Naranjo A., Zhang F.F., Cohn S.L., London W.B., Gastier-Foster J.M., Ramirez N.C., Pfau R., Reshmi S., Wagner E., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2021. V. 39. № 29. P. 3229–3241. doi: 10.1200/JCO.21.00278.
- Krystal J., Foster J.H. // *Children.* 2023. V. 10. № 8. P. 1302. doi: 10.3390/children10081302.
- Straathof K., Flutter B., Wallace R., Jain N., Loka T., Depani S., Wright G., Thomas S., Cheung G.W.-K., Gileadi T., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2020. V. 12. № 571. P. eabd6169. doi: 10.1126/scitranslmed.abd6169.
- Foster J.H., Voss S.D., Hall D.C., Minard C.G., Balis F.M., Wilner K., Berg S.L., Fox E., Adamson P.C., Blaney S.M., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2021. V. 27. № 13. P. 3543–3548. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-20-4224.
- Fischer M., Moreno L., Ziegler D.S., Marshall L.V., Zwaan C.M., Irwin M.S., Casanova M., Sabado C., Wulff B., Stegert M., et al. // *Lancet Oncol.* 2021. V. 22. № 12. P. 1764–1776. doi: 10.1016/S1470-2045(21)00536-2.
- Liu T., Merguerian M.D., Rowe S.P., Pratilas C.A., Chen A.R., Ladle B.H. // *Cold Spring Harb. Mol. Case Stud.* 2021. V. 7. № 4. P. 1–16. doi: 10.1101/MCS.A006064.
- Chen L., Pastorino F., Berry P., Bonner J., Kirk C., Wood K.M., Thomas H.D., Zhao Y., Daga A., Veal G.J., et al. // *Int. J. Cancer.* 2019. V. 144. № 12. P. 3146–3159. doi: <https://doi.org/10.1002/ijc.32058>.
- Georger B., Morland B., Jiménez I., Frappaz D., Pearson A.D.J., Vassal G., Maeda P., Kincaide J., Mueller U., Schlieff S., et al. // *Eur. J. Cancer.* 2021. V. 153. P. 142–152. doi: 10.1016/j.ejca.2021.05.023.
- Zage P.E. // *Children.* 2018. V. 5. № 11. P. 148. doi: 10.3390/children5110148.
- Pieniążek B., Cencelewicz K., Bzdziuch P., Młynarczyk Ł., Lejman M., Zawitkowska J., Derwich K. // *Int. J. Mol. Sci.* 2024. V. 25. № 14. P. 7730. doi: 10.3390/ijms25147730.
- Das P.M., Singal R. // *J. Clin. Oncol.* 2024. V. 22. № 22. P. 4632–4642. doi: 10.1200/JCO.2004.07.151.
- Kaminskas E., Farrell A., Abraham S., Baird A., Hsieh L.-S., Lee S.-L., Leighton J.K., Patel H., Rahman A., Sridhara R., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. № 10. P. 3604–3608. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-2135.
- Steensma D.P. // *Leuk. Res.* 2009. V. 33. P. S12–S17. doi: [https://doi.org/10.1016/S0145-2126\(09\)70228-0](https://doi.org/10.1016/S0145-2126(09)70228-0).
- Hollenbach P.W., Nguyen A.N., Brady H., Williams M., Ning Y., Richard N., Krushel L., Aukerman S.L., Heise C., MacBeth K.J. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 2. P. e9001.
- Gómez S., Castellano G., Mayol G., Suñol M., Queiros A., Bibikova M., Nazor K.L., Loring J.F., Lemos I., Rodríguez E., et al. // *Epigenomics.* 2015. V. 7. № 7. P. 1137–1153. doi: 10.2217/epi.15.49.
- Jubierre L., Jiménez C., Rovira E., Soriano A., Sábado C., Gros L., Lloret A., Hladun R., Roma J., de Toledo J.S., et al. // *Exp. Mol. Med.* 2018. V. 50. № 4. P. 1–12. doi: 10.1038/s12276-018-0077-2.
- George R.E., Lahti J.M., Adamson P.C., Zhu K., Finkelstein D., Ingle A.M., Reid J.M., Krailo M., Neuberg D., Blaney S.M., et al. // *Pediatr. Blood Cancer.* 2010. V. 55. № 4. P. 629–638. doi: <https://doi.org/10.1002/pbc.22607>.
- Vagapova E., Kozlov M., Lebedev T., Ivanenko K., Le-

- onova O., Popenko V., Spirin P., Kochetkov S., Prassolov V. // *Biomedicines*. 2021. V. 9. № 12. P. 1846. doi: 10.3390/biomedicines9121846.
20. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. // *Bioinformatics*. 2013. V. 29. № 1. P. 15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.
21. Love M.I., Huber W., Anders S. // *Genome Biol.* 2014. V. 15. P. 550. doi: 10.1186/s13059-014-0550-8.
22. Zolotovskaia M.A., Tkachev V.S., Guryanova A.A., Simonov A.M., Raevskiy M.M., Efimov V.V., Wang Y., Sekacheva M.I., Garazha A.V., Borisov N.M., et al. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2022. V. 20. P. 2280–2291. doi: 10.1016/j.csbj.2022.05.006.
23. Subramanian A., Narayan R., Corsello S.M., Peck D.D., Natoli T.E., Lu X., Gould J., Davis J.F., Tubelli A.A., Asiedu J.K., et al. // *Cell*. 2017. V. 171. № 6. P. 1437–1452.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.10.049.
24. Mikheeva A., Bogomolov M., Gasca V., Sementsov M., Spirin P., Prassolov V., Lebedev T. // *Cell Death Discov.* 2024. V. 10. P. 181. doi: 10.1038/s41420-024-01950-3.
25. Lebedev T.D., Khabusheva E.R., Mareeva S.R., Ivanenko K.A., Morozov A.V., Spirin P.V., Rubtsov P.M., Snezhkina A.V., Kudryavtseva A.V., Sorokin M.I., et al. // *J. Biol. Chem.* 2022. V. 298. № 8. P. 102226. doi: 10.1016/j.jbc.2022.102226.
26. Biedler J.L., Roffler-Tarlov S., Schachner M., Freedman L.S. // *Cancer Res.* 1978. V. 38. № 11. Part 1. P. 3751–3757.
27. George R.E., Sanda T., Hanna M., Fröhling S., Luther W. 2nd, Zhang J., Ahn Y., Zhou W., London W.B., McGrady P., et al. // *Nature*. 2008. V. 455. № 7215. P. 975–978. doi: 10.1038/nature07397.
28. Kovalevich J., Langford D. // *Methods Mol. Biol.* 2013. V. 1078. P. 9–21. doi: 10.1007/978-1-62703-640-5_2.
29. Aloe L., Rocco M.L., Balzamino B.O., Micera A. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2016. V. 35. № 1. P. 1–7. doi: 10.1186/s13046-016-0395-y.
30. Bartolucci S., Rossi M., Longo A., Rossi M., Estenoz M., Momparler R.L., Santoro B., Augusti-Tocco G. // *Cell Differ. Dev.* 1989. V. 27. № 1. P. 47–55. doi: https://doi.org/10.1016/0922-3371(89)90043-9.
31. Nakagawara A., Arima-Nakagawara M., Scavarda N.J., Azar C.G., Cantor A.B., Brodeur G.M. // *N. Engl. J. Med.* 1993. V. 328. № 12. P. 847–854. doi: 10.1056/NEJM199303253281205.
32. Bayeva N., Coll E., Piskareva O. // *J. Pers. Med.* 2021. V. 11. № 3. P. 211. doi: 10.3390/jpm11030211.
33. Лебедев Т.Д., Вагапова Э.Р., Прасолов В.С. // *Acta Naturae*. 2021. T. 13. № 4. С. 69–77. doi: 10.32607/actanaturae.11461.
34. Makimoto A., Fujisaki H., Matsumoto K., Takahashi Y., Cho Y., Morikawa Y., Yuza Y., Tajiri T., Iehara T. // *Cancers (Basel)*. 2024. V. 16. № 3. P. 544. doi: 10.3390/cancers16030544.
35. Almeida V.R., Vieira I.A., Buendia M., Brunetto A.T., Gregianin L.J., Brunetto A.L., Klamt F., de Farias C.B., Abujamra A.L., Lopez P.L. da C., et al. // *Mol. Neurobiol.* 2017. V. 54. № 10. P. 7610–7619. doi: 10.1007/s12035-016-0250-3.
36. Noronha N., Durette C., Cahuzac M., E Silva B., Courtois J., Humeau J., Sauvat A., Hardy M.-P., Vincent K., Laverdure J.-P., et al. // *Leukemia*. 2024. V. 38. № 5. P. 1019–1031. doi: 10.1038/s41375-024-02250-6.
37. Zhang M., Mathur A., Zhang Y., Xi S., Atay S., Hong J.A., Datrice N., Upham T., Kemp C.D., Ripley R.T., et al. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 16. P. 4178–4192. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-3983.
38. Quarni W., Dutta R., Green R., Katiri S., Patel B., Mohapatra S.S., Mohapatra S. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 15202. doi: 10.1038/s41598-019-50917-3.
39. Вагапова Э.Р., Лебедев Т.Д., Тихонова А.Д., Гойхман Б.В., Иваненко К.А., Спирин П.В., Прасолов В.С. // *Молекуляр. биология*. 2020. T. 54. № 3. С. 522–528. doi: 10.31857/S0026898420030192.
40. Baum M. // *Br. J. Cancer*. 1968. V. 22. № 2. P. 176–183. doi: 10.1038/bjc.1968.25.
41. Pucci P., Lee L.C., Han M., Matthews J.D., Jahangiri L., Schleder M., Mannes E., Sorby-Adams A., Kaggie J., Trigg R.M., et al. // *Nat. Commun.* 2024. V. 15. P. 3422. doi: 10.1038/s41467-024-47771-x.
42. Lin R., Hsu C.-H., Wang Y.-C. // *Anticancer. Drugs*. 2007. V. 18. № 10. P. 1157–1164. doi: 10.1097/CAD.0b013e3282a215e9.
43. Chen T., Cai C., Wang L., Li S., Chen L. // *Front. Pharmacol.* 2020. V. 11. P. 589780.
44. Lebedev T., Buzdin A., Khabusheva E., Spirin P., Suntsova M., Sorokin M., Popenko V., Rubtsov P., Prassolov V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 14. P. 7724. doi: 10.3390/ijms23147724.
45. Lebedev T., Vagapova E., Spirin P., Rubtsov P., Astashkova O., Mikheeva A., Sorokin M., Vladimirova U., Suntsova M., Kononov D., et al. // *Oncogene*. 2021. V. 40. № 44. P. 6258–6272. doi: 10.1038/s41388-021-02018-7.