

## Противоопухолевая активность кураксина CBL0137 на моделях острых лейкозов *in vitro*

Т.И. Фетисов<sup>1</sup>, К.И. Кирсанов<sup>1,2</sup>, А.А. Борунова<sup>1</sup>, М.Н. Зацепина<sup>3</sup>, Е.А. Лесовая<sup>1,4</sup>, Т.Н. Заботина<sup>1</sup>, Г.А. Белицкий<sup>1</sup>, М.Г. Якубовская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>2</sup>ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;

<sup>3</sup>ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет); Россия, 119991 Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2;

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова»; Россия, 390026 Рязань, ул. Высоковольная, 9

**Контакты:** Тимур Игоревич Фетисов timkatryam@yandex.ru

**Введение.** Кураксин CBL0137 — новое негенотоксичное соединение, обладающее противоопухолевой активностью, в основе которой лежит способность препарата нековалентно взаимодействовать с ДНК, вызывая транслокацию гистонового шаперона FACT в хроматиновую фракцию. Ранее противоопухолевая активность этого агента была продемонстрирована относительно широкого спектра солидных опухолей *in vitro* и *in vivo*.

**Цель исследования** — изучение противоопухолевой активности CBL0137 в отношении клеток острого миелобластного лейкоза (THP-1) и острого лимфобластного лейкоза (CCRF-CEM) *in vitro*.

**Материалы и методы.** Для определения цитотоксичности CBL0137 использовали МТТ-тест, влияние на клеточный цикл и индукцию апоптоза оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии, активность функционирования сигнальных путей при действии на клетки CBL0137 определяли с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени.

**Результаты.** Обработка клеток CBL0137 приводит к аресту клеточного цикла и активации апоптоза. При исследовании влияния CBL0137 на кластеры таргетных генов 10 сигнальных путей, вовлеченных в онкогенез острых лейкозов, его ингибирующее действие было выявлено для сигнальных путей WNT и Hedgehog в обеих клеточных линиях. В клеточной линии THP-1 также наблюдалось ингибирование эфферентных генов PPAR $\gamma$  и генов, активирующихся при гипоксии. В клетках CCRF-CEM при действии CBL0137, кроме того, наблюдалось усиление экспрессии всех исследованных таргетных генов сигнального пути Notch.

**Заключение.** На культурах клеток острых лейкозов продемонстрирована противоопухолевая активность CBL0137, препарат обладает цитотоксичностью, вызывает арест клеточного цикла и активацию апоптоза. При действии CBL0137 наблюдаются значительные изменения в экспрессии кластеров эфферентных генов сразу нескольких сигнальных путей.

**Ключевые слова:** кураксин CBL0137, противоопухолевая активность, острый миелобластный лейкоз, острый лимфобластный лейкоз, сигнальный путь

**Для цитирования:** Фетисов Т.И., Кирсанов К.И., Борунова А.А. и др. Противоопухолевая активность кураксина CBL0137 на моделях острых лейкозов *in vitro*. Успехи молекулярной онкологии 2019;6(4):58–68.

DOI: 10.17650/2313-805X-2019-6-4-58-68

### Anti-cancer activity of curaxin CBL0137 on the models of acute leukemia *in vitro*

T.I. Fetisov<sup>1</sup>, K.I. Kirsanov<sup>1,2</sup>, A.A. Borunova<sup>1</sup>, M.N. Zatsepina<sup>3</sup>, E.A. Lesovaya<sup>1,4</sup>, T.N. Zabolina<sup>1</sup>, G.A. Belitsky<sup>1</sup>, M.G. Yakubovskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup>N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia;

<sup>2</sup>Peoples' Friendship University of Russia; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;

<sup>3</sup>I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Ministry of Health of Russia; Build. 2, 8 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russia;

<sup>4</sup>I.P. Pavlov Ryazan State Medical University; 9 Vysokovol'naya St., Ryazan 390026, Russia

**Background.** Curaxin CBL0137 is a novel non-genotoxic compound with anti-cancer activity based on CBL0137 ability of non-covalent interaction with DNA causing histone chaperone FACT relocation. Anti-cancer activity of this drug was demonstrated previously on the wide panel of solid cancer models *in vitro* and *in vivo*.

**Objectives.** Estimation of anticancer effects of CBL0137 on the acute myeloblastic leukemia cells (THP-1) and acute lymphoblastic leukemia (CCRF-CEM).

**Materials and methods.** CBL0137 cytotoxicity was analyzed using the MTT test, the effects on the cell cycle and the induction of apoptosis was assessed by flow cytometry, the activity of signaling pathways in cells treated with CBL0137 was determined by real-time polymerase chain reaction.

**Results.** Cell treatment with CBL0137 led to cell cycle arrest and apoptosis induction. In the study of CBL0137 effect on target gene clusters of 10 signal transduction pathways involved in the pathogenesis of acute leukemia we have showed that CBL0137 inhibited the expression of down-stream genes of WNT and Hedgehog signaling in both cell lines. In THP-1 cells we also observed the inhibition of the expression of PPAR $\gamma$  target and hypoxia-activated genes. In CCRF-CEM cells CBL0137 also induced the expression of Notch signaling target genes.

**Conclusion.** The antitumor activity of CBL0137 was demonstrated on acute leukemia cell cultures, the drug possesses cytotoxicity, causes cell cycle arrest and activation of apoptosis. Significant changes in the expression of efferent gene clusters of several signaling pathways were observed in the cells treated with CBL0137.

**Key words:** curaxin CBL0137, anti-cancer activity, acute myeloblastic leukemia, acute lymphoblastic leukemia, signal transduction pathway

**For citation:** Fetisov T.I., Kirsanov K.I., Borunova A.A. et al. Anti-cancer activity of curaxin CBL0137 on the models of acute leukemia in vitro. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2019;6(4):58–68. (In Russ.).

## Введение

Острые лейкозы (ОЛ) — наиболее злокачественная группа опухолей кроветворной системы. В данную группу входят острые лимфобластные лейкозы (ОЛЛ), происходящие из клеток лимфоидного ростка кроветворения, и острые миелоидные лейкозы (ОМЛ) — из клеток миелоидного ряда. За последние десятилетия были достигнуты значительные успехи в лечении подростковых ОЛЛ, при этом 5-летняя безрецидивная выживаемость возросла до 70% [1]. Тем не менее ОЛЛ остается одной из основных причин смерти детей и лиц юношеского возраста. В отличие от ОЛЛ ОМЛ чаще встречается у пациентов старших возрастных категорий, пик заболеваемости приходится на возраст 65 лет, а 5-летняя выживаемость варьирует от 10 до 90% в зависимости от молекулярно-генетического подтипа [2]. При этом 7–18% летальных исходов связаны с токсическими последствиями терапии.

В настоящее время в терапии ОЛ применяют цитостатические химиотерапевтические препараты (цитарабин, ифосфамид, идарубицин, винкристин, доксорубицин и др.). Эти препараты не обладают избирательностью по отношению к опухолевым клеткам и оказывают токсическое действие на все активно пролиферирующие нормальные клетки организма. Это определяет развитие таких угрожающих жизни побочных эффектов, как нарушение гемопоэза, развитие гастроинтестинальной токсичности и др. Кроме этого, применение цитостатиков приводит к возникновению вторых первичных опухолей. В современной комбинированной химиотерапии лейкозов активно используются гормональные препараты — глюкокортикостероиды (дексаметазон, преднизолон). Однако и эта группа препаратов не лишена недостатков, среди которых наиболее опасными являются инфекционные осложнения на фоне стойкой иммуносупрессии, развитие диабета, асептический остеонекроз, нарушения водно-солевого баланса. Значительный вклад в повышение эффективности терапии опухолей кроветворной системы внесли таргетные препараты, такие как ингибиторы тирозиновых киназ, особенно ингибиторы химерного белка BCR-ABL (иматиниб, базатиниб и др.). Существенными ограничениями таргетной терапии являются узкая направленность пре-

парата на клетки, имеющие специфические генетические нарушения, и быстрая клonalная эволюция опухоли, приводящая к появлению резистентного клона опухолевых клеток. Кроме этого, множественность генетических изменений, 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 делает актуальным поиск новых подходов к терапии ОЛ.

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. Эти агенты влияют на структуру хроматина и работу ряда ферментов метаболизма ДНК. Это обуславливает широкий спектр их биологических эффектов, в том числе их эпигенетическую активность, способность ингибировать активность PARP1, влияние на сигнальный путь WNT [3–4]. Помимо этого в экспериментах *in vivo* и *in vitro* была выявлена их противоопухолевая активность относительно ряда солидных опухолей (рак толстой кишки, саркома матки и т.д.).

Одно из таких соединений — производное карбазола кураксин CBL0137. Это соединение нековалентно взаимодействует с ДНК, интеркалируя между парами оснований и связываясь с узкой бороздкой макромолекулы. Ранее противоопухолевая активность этого препарата была продемонстрирована относительно широкого спектра солидных опухолей *in vitro* и *in vivo* [5–8]. В основе противоопухолевого эффекта CBL0137 лежит его способность взаимодействовать с гистоновым комплексом FACT, выполняющим роль гистонного шаперона, что, в свою очередь, вызывает исключение комплекса FACT с транскрибируемых областей хроматина. Интегральным эффектом такого воздействия является активация p53- и IFN-зависимых сигнальных путей [9, 10]. Также, на разных

моделях было показано влияние на сигнальные пути NF- $\kappa$ B, WNT, Notch [8, 9, 11].

**Цель исследования** — изучение цитотоксической активности кураксина CBL0137 относительно клеток ОМЛ и ОЛЛ, его влияния на клеточный цикл, активацию апоптоза и уровень экспрессии таргетных генов 10 основных сигнальных путей, вовлеченных в опухолевую трансформацию и прогрессию.

### Материалы и методы

**Клеточные линии.** В работе использовали клеточные линии ОМЛ ТНР-1 (Институт цитологии РАН) и острого Т-клеточного лейкоза CCRF-CEM (ATCC). Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки телят (Biosera, FB-1001/500), 147 мг L-глутамина и антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) (ПанЭко, Россия) при температуре 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Кураксин CBL0137 был предоставлен LLC Incuron (США).

Для определения цитотоксической активности CBL0137 клетки лейкозов рассаживали в 96-луночные планшеты на 24, 48 и 72 ч по  $20 \times 10^3$ ,  $15 \times 10^3$  и  $10 \times 10^3$  клеток на лунку соответственно. Конечная концентрация составляла 0,1–10 мкМ. Затем вносили раствор МТТ-реагента (ПанЭко, Россия) до конечной концентрации 250 мг/мл и инкубировали 3 ч при температуре +37 °C, образовавшийся формазан растворяли в 100 мкл диметилсульфоксида (ПанЭко, Россия). После полного растворения определяли оптическую плотность содержимого лунок с помощью спектрофотометра MultiScan MCC 340 (Labsystems, США).

Способность CBL0137 активировать апоптоз в клетках опухолей кроветворной системы оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (Sigma-Aldrich, США), влияние на клеточный цикл исследовали с применением красителя PI (Invitrogen, США) на проточном цитофлуориметре FACSCalibur (BD, США).

РНК из опухолевых клеток была выделена с помощью TRI reagent (Sigma-Aldrich, США) в соответствии с инструкцией производителя, обратная транскрипция полученных образцов РНК была проведена с использованием набора ОТ-1 (Синтол, Россия). Анализ интегрального эффекта CBL0137 на основные сигнальные пути клеток, вовлеченные в патогенез ОЛ, был проведен с помощью системы Human Signal Transduction Pathway Finder RT2Profiler PCR Array (Qiagen, США). Данная система представляет собой панель из 84 пар праймеров к таргетным генам для сигнальных путей, а также 5 генов домашнего хозяйства (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HPRT1* и *RPLP0*). При анализе учитывали гены, экспрессия которых увеличивалась/уменьшалась более чем в 2 раза относительно уровня экспрессии генов необработанного контроля (в 2 и более биологических повторах). Обработку данных проводили с помощью программного

обеспечения, представленного на сайте производителя (<https://dataanalysis2.qiagen.com/pcr>).

### Результаты

**Цитотоксическая активность кураксина CBL0137 относительно клеток лейкозов.** Для того чтобы оценить цитотоксический эффект, а также отобрать эффективные концентрации для дальнейших исследований, был проведен МТТ-тест. Клетки инкубировали 24, 48 и 72 ч с различными концентрациями CBL0137. Было показано, что препарат оказывает время- и дозозависимый цитотоксический эффект относительно клеток обеих линий, при этом клетки линии ТНР-1 оказались более чувствительны к препарату. Значения IC<sub>50</sub> препарата составили для ТНР-1 и CCRF-CEM соответственно при 24 ч инкубации — 2 и 3,5 мкМ, при 48 ч — 1,7 и 1,9 мкМ, при 72 ч — 0,57 и 0,9 мкМ (рис. 1).

**Влияние CBL0137 на клеточный цикл и активацию апоптоза в клетках лейкозов.** На 1-м этапе исследования механизма клеточной гибели, вызываемой кураксином CBL0137, мы изучили влияние данного препарата на распределение клеток ОЛ по фазам клеточного цикла. Для этого через 24 ч после обработки CBL0137 в концентрациях 1,5; 1,25 и 1 мкМ клетки окрашивали йодидом пропидия. Концентрации препарата и продолжительность обработки клеток были выбраны на основании наших предыдущих исследований эффектов CBL0137 на культивируемые опухолевые клетки ряда линий, в которых было продемонстрировано, что эффект на локализацию гистона H1 и гистонового шаперона FACT развивается в течение 1 ч [12], а влияние на эпигенетическую регуляцию экспрессии проявляется через 6 ч после начала обработки клеток препаратом и достигает максимального эффекта к 24 ч [10]. С помощью проточной цитофлуориметрии было продемонстрировано, что обработка клеток CBL0137 приводила к значительному увеличению доли клеток в фазе G<sub>2</sub>/M (рис. 2). Кроме этого, выбранные концентрации вызывали увеличение интервала subG<sub>1</sub>, что характерно для клеточной гибели.

Ранее была показана способность CBL0137 индуцировать апоптоз в клеточных линиях солидных опухолей. При оценке апоптогенной активности CBL0137 в клетках лейкозов проводили анализ транслокации фосфатидилсерина и нарушения целостности клеточной мембраны, используя окраску аннексином V-FITC и йодидом пропидия. Обработка клеток CBL0137 приводила к индукции апоптоза, что отражалось в значительном сдвиге в составе клеточной популяции: наблюдали время- и дозозависимое увеличение доли клеток с ранними апоптотическими изменениями, а также увеличивалась доля клеток, подверженных поздней стадии апоптоза, сопровождающейся вторичным некрозом клеток (рис. 3). При увеличении концентрации CBL0137 доля клеток с выявленными апоптотическими событиями возрастала с 13 до 41% в клеточной линии CCRF-CEM и с 16

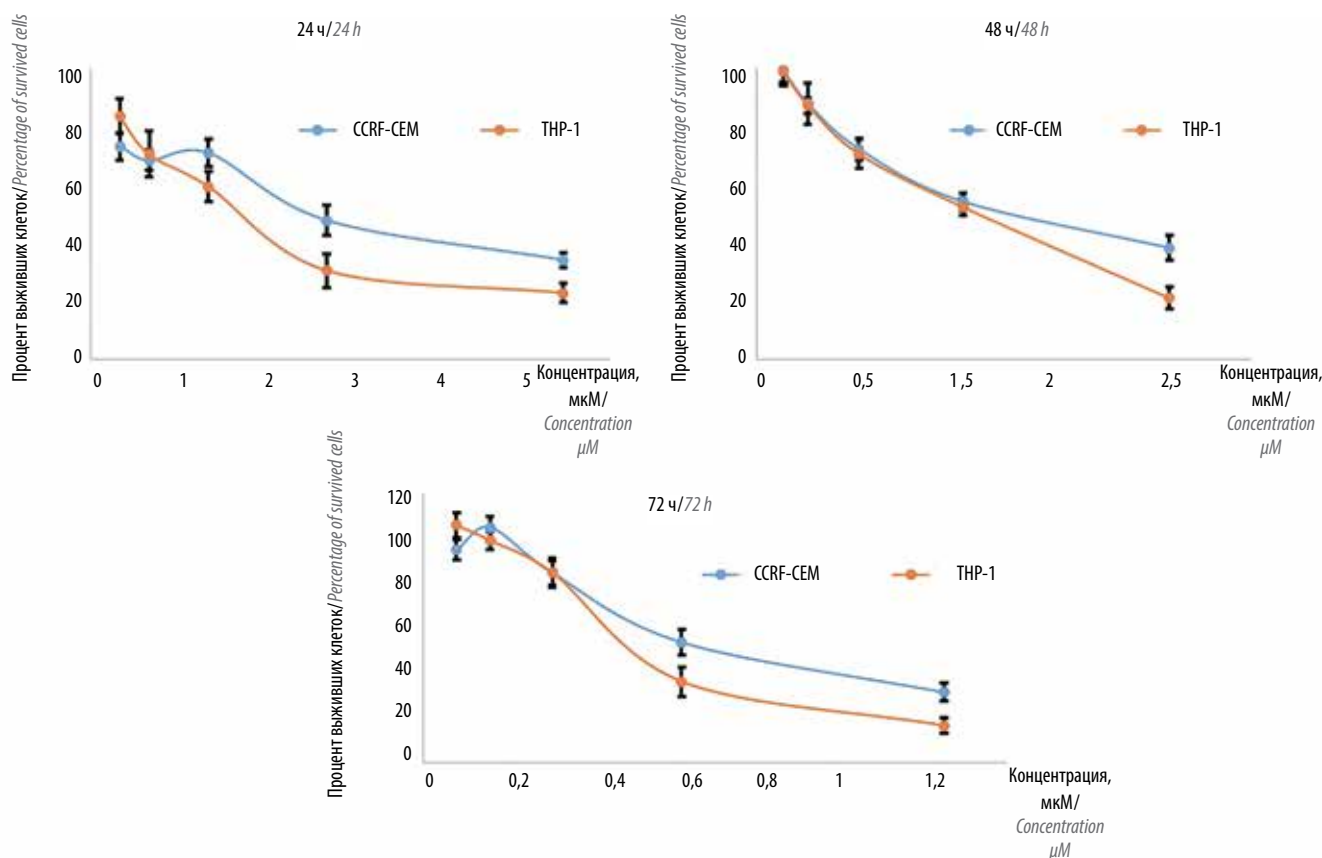


Рис. 1. Цитотоксический эффект кураксина CBL0137 на клетки острых лейкозов

Fig. 1. Cytotoxic effect of curaxin CBL0137 on acute leukemia cells

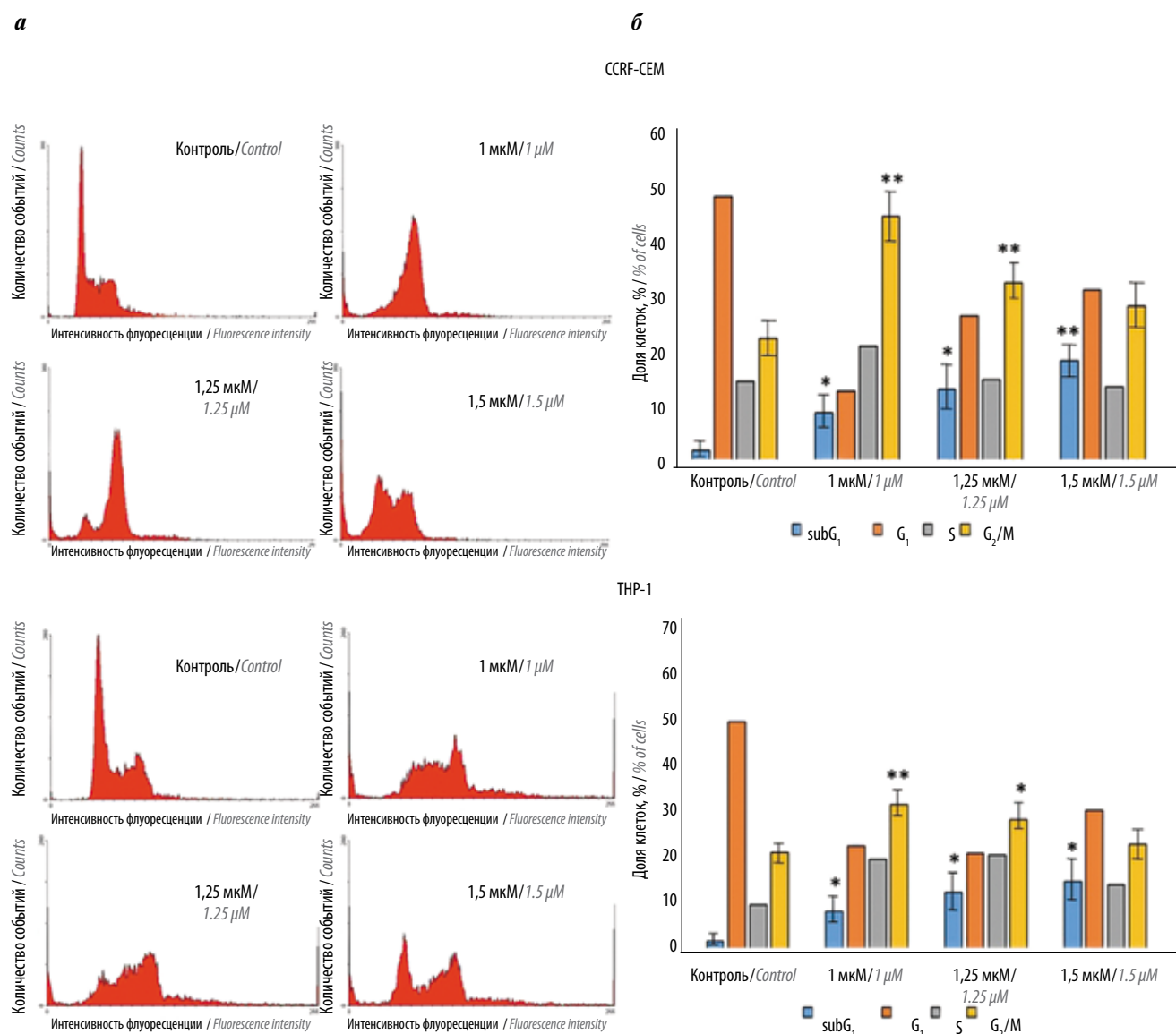
до 52% — в THP-1. Обработку клеток проводили в широком диапазоне концентраций, что позволяло сравнить эффекты не только эквимоларных доз, но также проанализировать уровень активации апоптоза в зависимости от дозы и интенсивности цитотоксического действия.

При эквимоларных концентрациях препарата соотношение количества клеток, находящихся в ранней и поздней стадиях апоптоза, в линиях было различным. При концентрации CBL0137 3 мкМ в клеточной линии CCRF-CEM на долю клеток, подверженных раннему апоптозу, приходилось 29%, а позднему — 12%, тогда как в клеточной линии THP-1 — 7 и 45% соответственно. Это согласуется с данными анализа цитотоксической активности CBL0137 на этих клеточных линиях и свидетельствует о большей чувствительности клеток THP-1 к препарату.

**Влияние кураксина CBL0137 на экспрессию генов различных сигнальных путей в клетках лейкозов.** Исследование влияния CBL0137 на экспрессию генов проводили с использованием набора Human Signal Transduction Pathway Finder RT2Profiler PCR Array (Qiagen, США), содержащего панель из 84 пар праймеров для таргетных генов следующих сигнальных путей: (1) WNT/ $\beta$ -катенин; (2) NF- $\kappa$ B; (3) Notch; (4) Hedgehog; (5) PPAR $\gamma$ ; (6) TGF $\beta$ ; (7) STAT/JAK; (8)

p53; а также генов, активация которых связана с (9) гипоксией и (10) оксидативным стрессом. Выбор продолжительности обработки клеток CBL0137 был основан на предыдущих данных о динамике его действия. Изменение уровней экспрессии после обработки CBL0137 (1,5 мМ, 24 ч) было зарегистрировано для 37 генов в линии THP-1 и для 36 генов в линии CCRF-CEM (рис. 4). В линии THP-1 наибольшему влиянию были подвержены кластеры генов, относящихся к сигнальным путям WNT (7 из 9 генов панели), Hedgehog (5/9), PPAR $\gamma$  (5/8), а также к путям, запускаемым в ответ на гипоксию (7/9). Для всех сигнальных путей было продемонстрировано снижение экспрессии эфферентных генов. Для других сигнальных путей обработка CBL0137 приводила к значимому изменению экспрессии не более чем 3 эфферентных генов, влияние препарата на экспрессию каждого из которых может изучаться отдельно. При действии препарата на клетки CCRF-CEM было показано изменение экспрессии генов сигнальных путей WNT (7/9), Notch (8/9) и Hedgehog (6/9). При этом экспрессия практически всех таргетных генов сигнальных путей WNT и Hedgehog снизилась, тогда как экспрессия всех эфферентных генов сигнального пути возросла в 2–8 раз.





**Рис. 2.** Влияние кураксина CBL0137 на клеточный цикл: а — типичные гистограммы, показывающие влияние CBL0137 на клеточный цикл в линиях острых лейкозов при разных концентрациях; б — диаграмма распределения субпопуляций клеточных линий в ответ на обработку CBL0137. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,001$  по сравнению с необработанными клетками

**Fig. 2.** Effect of curaxin CBL0137 on the cell cycle: а — typical histograms showing the effect of CBL0137 on the cell cycle in the acute leukemia cell lines at different concentrations; б — diagram of cell line subpopulation distribution in response to CBL0137 treatment. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$  compared to untreated cells

### Обсуждение

Кураксин CBL0137 является перспективным противоопухолевым препаратом. Механизм противоопухолевого действия этого агента основан на его способности нековалентно взаимодействовать с ДНК, изменять структуру хроматина и модулировать работу ферментов метаболизма ДНК и репарации, что опосредует широкий спектр эффектов этого агента [10, 12]. Противоопухолевая активность CBL0137 *in vivo* была продемонстрирована относительно ряда солидных опухолей, включая рак молочной железы [5], рак поджелудочной железы [6], глиобластома [7], рак легкого [8], рак толстой кишки [13]. Более того, было

показано, что этот препарат оказывает значительное антиканцерогенное действие при индукции рака толстой кишки химическим канцерогеном у мышей [11]. В то же время противоопухолевые свойства данного соединения относительно опухолей кроветворной системы остаются малоизученными и рассмотрены лишь в нескольких работах. В одной из них R. Lock и соавт. продемонстрировали цитотоксическую активность CBL0137 относительно ряда линий ОЛЛ и показали противоопухолевую активность данного препарата на моделях *in vivo* [14]. В другой работе K. Somers и соавт. продемонстрировали противоопухолевую активность CBL0137 на переживающих культурах ОЛ

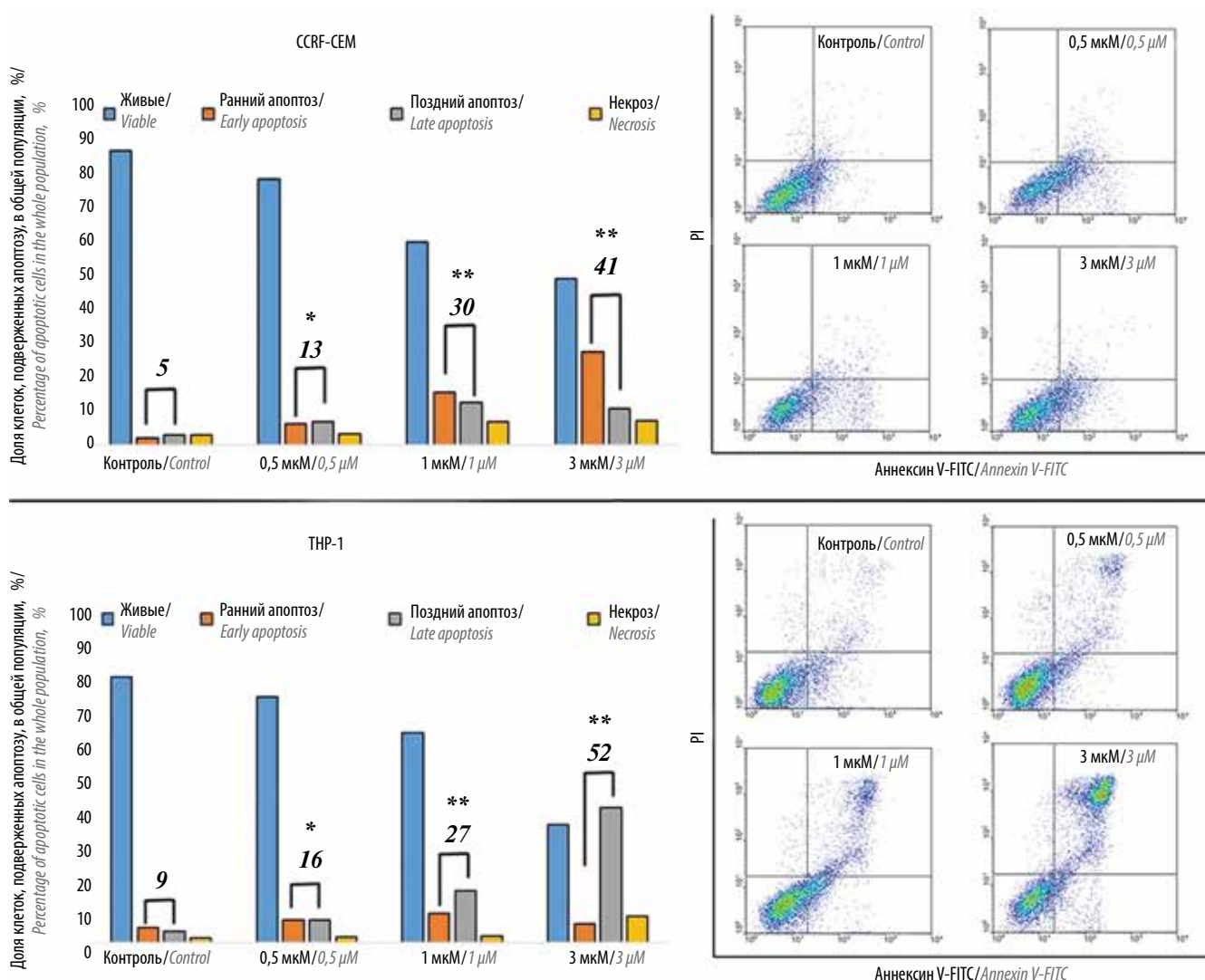


Рис. 3. CBL0137 индуцирует ранний и поздний апоптоз в клетках острых лейкозов. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$

Fig. 3. CBL0137 induces early and late apoptosis in acute leukemia cells. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.005$

с перестройкой гена *MLL* (Kmt<sup>2</sup>A) [15]. В нашей работе рассмотрены эффекты CBL0137 на опухолевые клетки ОМЛ линии THP-1 в сравнении с таковыми на клетки ОЛЛ линии CCRF-CEM. Эффективность лечения ОМЛ продолжает оставаться весьма низкой, и поиск новых химиотерапевтических препаратов для лечения этой формы онкологического заболевания актуален.

На 1-м этапе исследования мы продемонстрировали цитотоксичность CBL0137 относительно клеток THP-1 и CCRF-CEM. Полученные значения  $IC_{50}$  (THP-1—0,57 мкМ, CCRF-CEM—0,9 мкМ при 72-часовой обработке) выше значений, которые показаны в работе R. Lock и соавт. (0,15—0,3 мкМ), что связано с различием во времени инкубации с соединением. В последнем случае время обработки CBL0137 составляло 96 ч. В нашем исследовании мы продемонстрировали цитотоксический эффект, включающий индукцию апоптоза и арест клеточного цикла у клеток ОЛ,

уже через 24 ч после начала обработки препаратом. Выбор более короткого интервала воздействия препарата был основан на данных о быстром проникновении CBL0137 в ядра клеток [12]. Попадание этого соединения в ядро, нековалентное связывание с ДНК, изменение структуры хроматина и транслокация шаперона гистонов FACT регистрируются уже через несколько минут после обработки клеток этим агентом. С учетом того, что механизм избирательного противоопухолевого действия CBL0137 связывают с его способностью индуцировать транслокацию FACT в хроматиновую фракцию ядра, что приводит к изменению активности целого ряда сигнальных путей, мы сконцентрировали свое внимание на более ранних ответах клетки. Кроме этого, в исследовании К. Леоновой и соавт. установлено, что реактивирующее влияние CBL0137 на экспрессию эпигенетически подавленных генов начинает проявляться уже через 6 ч культивирования клеток в присутствии препарата и достигает

CCRF-CEM

Сигнальный путь Notch/*Notch signaling pathway*

<i>HES5</i>	<i>HEY1</i>	<i>HEY2</i>	<i>HEYL</i>	<i>ID1</i>	<i>JAG1</i>	<i>LFNG</i>	<i>NOTCH1</i>
4	6,7	3,9	4,9	6	7,8	3,3	4,4

Сигнальный путь WNT/*WNT signaling pathway*

<i>AXIN2</i>	<i>CCND1</i>	<i>CCND2</i>	<i>FOSL1</i>	<i>MMP7</i>	<i>MYC</i>	<i>WISP</i>
-10,5	-3,4	-5	5,1	-2,3	-5,8	2,9

Сигнальный путь Hedgehog/*Hedgehog signaling pathway*

<i>BCL2</i>	<i>PTCH1</i>	<i>WNT1</i>	<i>WNT2B</i>	<i>WNT3A</i>	<i>WNT6</i>
-2,9	4,3	-5,8	-4,5	-4,8	-5,7

Сигнальный путь NF-κB/*NF-κB signaling pathway*

<i>BCL2A1</i>	<i>BIRC3</i>	<i>CCL5</i>	<i>IFNG</i>	<i>TNF</i>
-2,9	-3,3	2,9	5,9	3,2

Сигнальный путь STAT/*JAK/STAT/JAK signaling pathway*

<i>IRF1</i>	<i>CCND1</i>	<i>SOCS3</i>
-7,6	-3,4	3,2

Сигнальный путь TGFβ/*TGFβ signaling pathway*

<i>IFRD1</i>	<i>MYC</i>	<i>TNFSF10</i>
-2	-5,8	6,4

Сигнальный путь p53/*p53 signaling pathway*

<i>BAX</i>	<i>EGFR</i>
-5	-3,9

Гипоксия/*Hypoxia*

<i>CA9</i>	<i>VEGFA</i>
-2,3	-5,3

Сигнальный путь PPARγ/*PPARγ signaling pathway*

<i>OLR1</i>	<i>SOCS3</i>
3,8	3,2

Окислительный стресс/*Oxidative stress*

<i>NQO1</i>
2,5

THP-1

Гипоксия/*Hypoxia*

<i>ADM</i>	<i>CA9</i>	<i>EPO</i>	<i>HMOX1</i>	<i>SERPINE1</i>	<i>SLC2A1</i>	<i>VEGFA</i>
-2,9	-13,3	-18,5	-2,5	-6,5	-3,2	-2,9

Сигнальный путь WNT/*WNT signaling pathway*

<i>AXIN2</i>	<i>CCND2</i>	<i>DAB2</i>	<i>MMP7</i>	<i>MYC</i>	<i>PPARD</i>	<i>WISP1</i>
-3,5	-4	-3,2	-5,9	-4,3	-2,9	-9,8

Сигнальный путь Hedgehog/*Hedgehog signaling pathway*

<i>BMP4</i>	<i>WNT1</i>	<i>WNT2B</i>	<i>WNT5A</i>	<i>WNT6</i>
-4,5	-5	-3,1	-13,9	-4,8

Сигнальный путь PPARγ/*PPARγ signaling pathway*

<i>CPT2</i>	<i>FABP1</i>	<i>OLR1</i>	<i>SLC27A4</i>	<i>SOCS3</i>
-3,2	-6,6	-7,1	-4,6	-2,1

Сигнальный путь TGFβ/*TGFβ signaling pathway*

<i>ATF4</i>	<i>EMP1</i>	<i>MYC</i>
-3,5	-4,1	-4,3

Сигнальный путь p53/*p53 signaling pathway*

<i>BBC3</i>	<i>EGFR</i>	<i>FAS</i>
-3,1	-23	2,4

Сигнальный путь Notch/*Notch signaling pathway*

<i>HEY1</i>	<i>HEY2</i>	<i>ID1</i>
-5,7	-8,1	-6,6

Сигнальный путь NF-κB/*NF-κB signaling pathway*

<i>CSF1</i>	<i>IFNG</i>
-2,9	-4,4

Сигнальный путь STAT/*JAK/STAT/JAK signaling pathway*

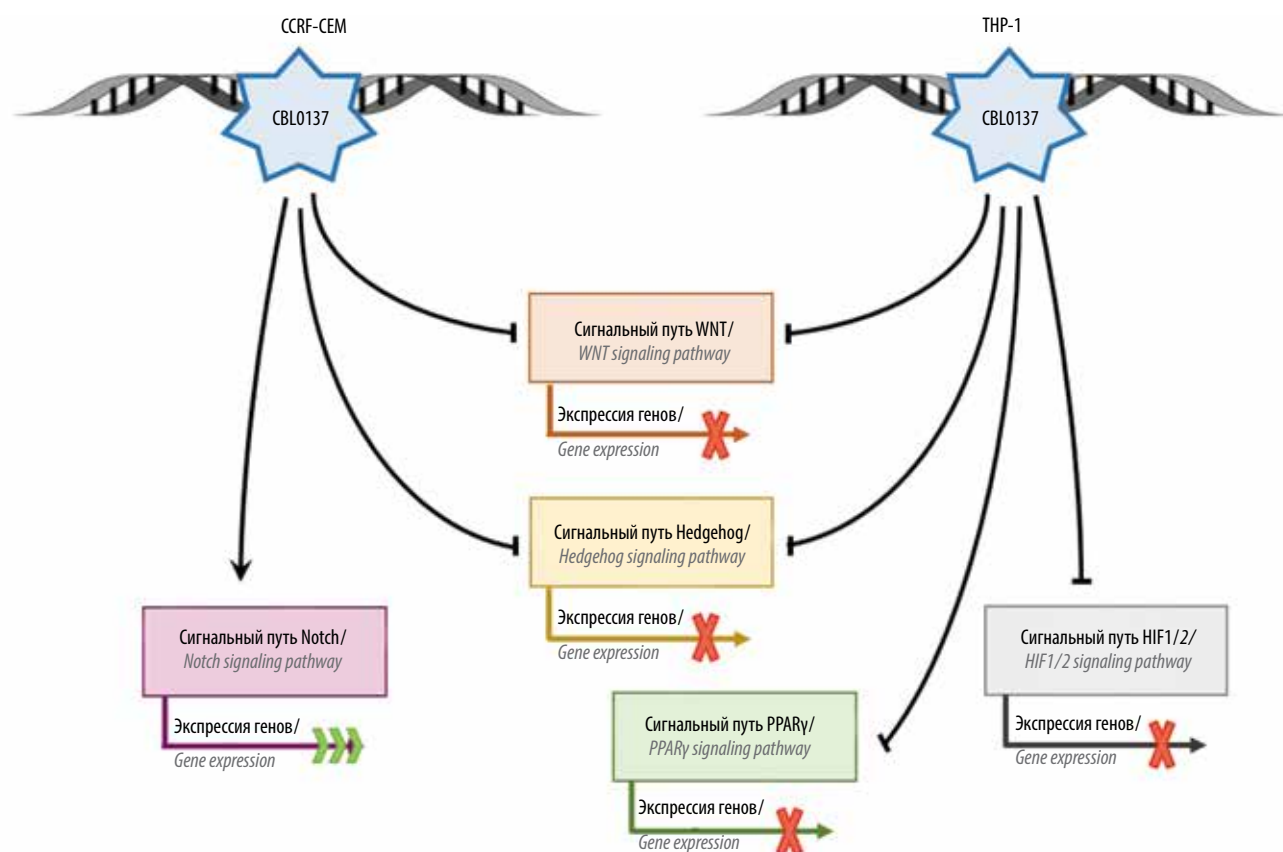
<i>SOCS3</i>	<i>FCER2</i>
-2,1	-16,6

Окислительный стресс/*Oxidative stress*

<i>GSR</i>	<i>HMOX1</i>
-3,3	-2,5

Рис. 4. Влияние CBL0137 на экспрессию целевых генов сигнальных путей, вовлеченных в патогенез острых лейкозов

Fig. 4. Effect of CBL0137 on expression of the target genes of the signal pathways involved in pathogenesis of acute leukemias



**Рис. 5.** Влияние CBL0137 на активность сигнальных путей в клетках CCRF-CEM и THP-1

Fig. 5. Effect of CBL0137 on signaling pathway activity in the CCRF-CEM and THP-1 cells

своего максимума к 24 ч [10], что также согласуется с необходимостью анализа более ранних эффектов CBL0137.

Несмотря на тот факт, что CBL0137 проявил несколько более низкую цитотоксичность в отношении клеток THP-1 по сравнению с CCRF-CEM, он оказал весьма близкие по величине эффекты на активацию апоптоза. Таким образом, мы продемонстрировали, что CBL0137 проявляет противоопухолевую активность в отношении клеток как ОЛЛ, так и ОМЛ.

При изучении влияния кураксина CBL0137 на экспрессию кластеров эфферентных генов сигнальных путей было установлено, что обработка клеток ОЛ CBL0137 приводит к снижению экспрессии целевых генов сигнальных путей WNT и Hedgehog в обеих клеточных линиях (рис. 5). Данные сигнальные пути участвуют в патогенезе ОЛ и рассматриваются как потенциальные мишени в их терапии. Так, сигнальный путь WNT участвует в регуляции множества клеточных процессов, включая дифференцировку, пролиферацию, миграцию, апоптоз и поддержание фенотипа стволовых клеток [16, 17]. Нарушение регуляции этого сигнального пути — важный элемент патогенеза ОЛ. Основными механизмами его нарушения, выявляе-

мыми в настоящее время в ОЛ, являются повышение чувствительности к WNT-лиганду, эпигенетическая репрессия WNT-антагонистов, гиперэкспрессия WNT-лигандов, нарушения деградации  $\beta$ -катенина в цитоплазме и изменение активности TCF/Lef [18]. Сигнальный путь Hedgehog является одним из регуляторов эмбрионального развития [19], у взрослых же функциональная активность белков этого пути заключается в поддержке гемопоэза, в частности в дифференцировке Т-клеток [20]. В патогенезе ОЛ Hedgehog выполняет роль положительного регулятора пролиферации и выживания, а также участвует в поддержании субпопуляции опухолевых клеток, имеющих стволовый фенотип, и потенцирует развитие множественной лекарственной устойчивости [21].

В клетках линии ОМЛ CBL0137 приводил к снижению экспрессии целевых генов сигнальных путей PPAR $\gamma$  и гипоксии. Ингибирование экспрессии генов, запускаемых гипоксией, способствует преодолению множественной лекарственной устойчивости в клетках ОМЛ [22], а ингибирование сигнального пути PPAR $\gamma$  должно приводить к ослаблению активации апоптоза и увеличению скорости пролиферации. Ранее было показано, что гиперактивация этого



сигнального пути приводит к редукции опухоли [23]. На клетках солидных опухолей неоднократно продемонстрировано, что CBL0137 приводит к активации эфферентных генов *P53*. В наших экспериментах при обработке клеток CBL0137 не выявлено одностороннего изменения кластеров таргетных генов *P53*, что отчасти может объясняться мутацией в гене *P53*, которая содержится в клетках обеих линий [24].

В линии Т-клеточного лейкоза кураксин CBL0137 повышал экспрессию таргетных генов сигнального пути Notch, который является регулятором клеточной пролиферации, выживания, апоптоза. Этот сигнальный путь гиперэкспрессирован более чем в 50% случаев ОЛЛ из-за активирующей мутации *NOTCH1* [25]. Клетки CCRF-CEM несут мутацию в гене *NOTCH1* [26], что отражается в более высоком базовом уровне экспрессии почти всех эфферентных генов этого сигнального пути по сравнению с соответствующими уровнями экспрессии в клетках THP-1 (данные не представлены), однако это не объясняет столь значительное увеличение экспрессии таргетных генов сигнального пути Notch при действии CBL0137. Ранее на клеточных линиях рака легкого было показано, что CBL0137 способен активировать экспрессию *NOTCH1* и его таргетных генов (*HEY1*, *HEY2*, *HES*) по следующему механизму: при взаимодействии с хроматином CBL0137 вытесняет негативный регулятор SP3 из промотора гена *NOTCH1*, что приводит к усилению экспрессии последнего [8]. В зависимости от типа клеток *NOTCH1* репрессирует или активирует пролиферацию недифференцированных стволовых клеток [27]. Считается, что при немелкоклеточном раке легкого [27], Т-клеточном лейкозе [25], глиобластоме [28] онкогенным фак-

тором является гиперактивация сигнального пути Notch, тогда как в ряде нейроэндокринных опухолей, в том числе в мелкоклеточном раке легкого, при котором этот сигнальный путь супрессирован, онкогенным фактором выступает именно его инактивация [29, 30]. В работе E. Kolundzic и соавт. показано, что FACT является модулятором активности сигнального пути Notch [31]. Возможное FACT-опосредованное активирующее влияние CBL0137 на сигнальный путь Notch обсуждается в работе M.Z. Jin и соавт. [32]. Можно предположить, что наблюдаемый нами эффект CBL0137 на клетки CCRF-CEM с высоким мутационно обусловленным конститутивным уровнем активности *NOTCH1* является FACT-опосредованным, однако для подтверждения данной гипотезы требуется проведение дополнительных исследований.

### Заключение

В представленном исследовании продемонстрирована потенциальная противоопухолевая активность кураксина CBL0137 в отношении ОЛ. Исследуемый препарат вызывал арест клеточного цикла и активацию апоптоза. В плане влияния этого соединения на активность сигнальных путей установлено, что CBL0137 приводит к значительным изменениям в экспрессии кластеров эфферентных генов сразу нескольких сигнальных путей, при этом эффект препарата зависит от типа клеток. Таким образом, одним из направлений исследования механизмов противоопухолевой активности кураксина CBL0137 в отношении лейкозов может стать поиск взаимосвязей между генетическими характеристиками клеток и эффектами, вызываемыми этим соединением.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Паровичникова Е.Н., Троицкая В.В., Соколов А.Н. и др. Промежуточные результаты по лечению острых Ph-негативных лимфобластных лейкозов у взрослых больных (итоги Российской исследовательской группы по лечению острых лимфобластных лейкозов (RALL)). Онкогематология 2014;9(3): 6–15. [Parovichnikova E.N., Troitskaya V.V., Sokolov A.N. et al. Interim results of the Ph-negative acute lymphoblastic leukemia treatment in adult patients (results of Russian research group of ALL treatment (RALL)). Onkogematologiya = Oncohematology 2014;9(3):6–15. (In Russ.)].
2. Клинические рекомендации по диагностике и лечению острых миелоидных лейкозов взрослых. Под ред. В.Г. Савченко, Е.Н. Паровичниковой, Б.В. Афанасьева и др. М., 2018. [Clinical recommendations for the diagnosis and treatment of acute myeloid leukemia in adults. Eds.: V.G. Savchenko, E.N. Parovichnikova, B.V. Afanasyeva et al. Moscow, 2018. (In Russ.)].
3. Grant M.A., Baron R.M., Macias A.A. et al. Netropsin improves survival from endotoxaemia by disrupting HMGA1 binding to the NOS2 promoter. Biochem J 2009;418(1):103–12. DOI: 10.1042/BJ20081427.
4. Kirsanov K.I., Kotova E., Makhov P. et al. Minor groove binding ligands disrupt PARP-1 activation pathways. Oncotarget 2014;5(2):428–37. DOI: 10.18632/oncotarget.1742.
5. Fleishman D., Prendergast L., Safina A. et al. Level of FACT defines the transcriptional landscape and aggressive phenotype of breast cancer cells. Oncotarget 2017;8(13):20525–42. DOI: 10.18632/oncotarget.15656.
6. Burkhardt C., Fleishman D., Kohn R. et al. Curaxin CBL0137 eradicates drug resistant cancer stem cells and potentiates efficacy of gemcitabine in preclinical models of pancreatic cancer. Oncotarget 2014;5(22):11038–53. DOI: 10.18632/oncotarget.2701.
7. Barone T.A., Burkhardt C.A., Safina A. et al. Anticancer drug candidate CBL0137, which inhibits histone chaperone FACT, is efficacious in preclinical orthotopic models of temozolomide-responsive and -resistant glioblastoma. Neuro Oncol 2017;19(2):186–96. DOI: 10.1093/neuonc/now141.
8. De S., Lindner D.J., Coleman C.J. et al. The FACT inhibitor CBL0137 synergizes with cisplatin in small-cell lung cancer by increasing NOTCH1 expression and targeting tumor-initiating cells. Cancer

- Res 2018;78(9):2396–406. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-17-1920.
9. Gasparian A.V., Burkhart C.A., Purmal A.A. et al. Curaxins: anticancer compounds that simultaneously suppress NF- $\kappa$ B and activate p53 by targeting FACT. *Sci Transl Med* 2011;3(95):95ra74.
10. Leonova K., Safina A., Nesher E. et al. TRAIN (Transcription of Repeats Activates INterferon) in response to chromatin destabilization induced by small molecules in mammalian cells. *Elife* 2018;7. DOI: 10.7554/eLife.30842.
11. Kirsanov K.I., Fetisov T., Lesovaya E.A. et al. Prevention of colorectal carcinogenesis by DNA binding small molecule curaxin CBL0137 involves suppression of Wnt signaling. *Cancer Prev Res (Phila)* 2019. DOI: 10.1158/1940-6207.CAPR-19-0198.
12. Safina A., Cheney P., Pal M. et al. FACT is a sensor of DNA torsional stress in eukaryotic cells. *Nucleic Acids Res* 2017;45(4):1925–45. DOI: 10.1093/nar/gkw1366.
13. Фетисов Т.И., Тилова Л.Р., Лесовая Е.А. и др. Противоопухолевое действие кураксина CBL0137 на моделях аденокарциномы толстой кишки. *Успехи молекулярной онкологии* 2016;3(3):67–72. [Fetisov T.I., Tilova L.R., Lesovaya E.A. et al. Antitumor effect of the curaxin CBL0137 on the models of colon cancer. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2016;3(3):67–72. (In Russ.)].
14. Lock R., Carol H., Maris J.M. et al. Initial testing (stage 1) of the curaxin CBL0137 by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer* 2017. DOI: 10.1002/pbc.26263.
15. Somers K., Kosciolk A., Bongers A. et al. Potent antileukemic activity of curaxin CBL0137 against MLL-rearranged leukemia. *Int J Cancer* 2019. DOI: 10.1002/ijc.32582.
16. Reya T., Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature* 2005;434:843–50.
17. Rulifson I.C., Karnik S.K., Heiser P.W. et al. Wnt signaling regulates pancreatic beta cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(15):6247–52. DOI: 10.1073/pnas.0701509104.
18. Fetisov T.I., Lesovaya E.A., Yakubovskaya M.G. et al. Alterations in WNT signaling in leukemias. *Biochemistry (Moscow)* 2018;83(12):1448–58. DOI: 10.1134/S0006297918120039.
19. Jia Y., Wang Y., Xie J. The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation. *Arch Toxicol* 2015;89(2):179–91. DOI: 10.1007/s00204-014-1433-1.
20. Rowbotham N.J., Hager-Theodorides A.L., Cebecauer M. et al. Activation of the Hedgehog signaling pathway in T-lineage cells inhibits TCR repertoire selection in the thymus and peripheral T-cell activation. *Blood* 2007;109(9):3757–66. DOI: 10.1182/blood-2006-07-037655.
21. Campbell V., Copland M. Hedgehog signaling in cancer stem cells: a focus on hematological cancers. *Stem Cells Cloning* 2015;8:27–38. DOI: 10.2147/SCCAA.S58613.
22. Griessinger E., Anjos-Afonso F., Pizzitola I. et al. A niche-like culture system allowing the maintenance of primary human acute myeloid leukemia-initiating cells: a new tool to decipher their chemoresistance and self-renewal mechanisms. *J Cell Physiol* 2012;227(6):2750–8.
23. Chapuis N., Poulain L., Birsan R. et al. Rationale for targeting deregulated metabolic pathways as a therapeutic strategy in acute myeloid leukemia. *Front Oncol* 2019;9:405. DOI: 10.3389/fonc.2019.00405.
24. Sak K., Everaus H. Established Human Cell Lines as Models to Study Anti-leukemic Effects of Flavonoids. *Curr Genomics* 2017;18(1):3–26. DOI: 10.2174/1389202917666160803165447.
25. Weng A.P., Ferrando A.A., Lee W. et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science* 2004;306(5694):269–71. DOI: 10.1126/science.1102160.
26. Sharma A., Gadkari R.A., Ramakanth S.V. et al. A novel monoclonal antibody against Notch1 targets leukemia-associated mutant Notch1 and depletes therapy resistant cancer stem cells in solid tumors. *Sci Rep* 2015;5:11012. DOI: 10.1038/srep11012.
27. Wang J., Sullenger B.A., Rich J.N. Notch signaling in cancer stem cells. *Adv Exp Med Biol* 2012;727:174–85. DOI: 10.1007/978-1-4614-0899-4\_13.
28. Purow B.W., Haque R.M., Noel M.W. et al. Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res* 2005;65(6):2353–63. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1890.
29. Platta C.S., Greenblatt D.Y., Kunimaimaiyaan M., Chen H. Valproic acid induces Notch1 signaling in small cell lung cancer cells. *J Surg Res* 2008;148(1):31–7. DOI: 10.1016/j.jss.2008.03.008.
30. George J., Lim J.S., Jang S.J. et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015; 524(7563):47–53. DOI: 10.1038/nature14664.
31. Kolundzic E., Ofenbauer A., Bulut S.I. et al. FACT sets a barrier for cell fate reprogramming in *caenorhabditis elegans* and human cells. *Dev Cell* 2018;46(5):611–26.e12. DOI: 10.1016/j.devcel.2018.07.006.
32. Jin M.Z., Xia B.R., Xu Y., Jin W.L. Curaxin CBL0137 exerts anticancer activity via diverse mechanisms. *Front Oncol* 2018;8:598. DOI: 10.3389/fonc.2018.00598.

# Вклад авторов

Т.И. Фетисов: получение данных, обработка результатов, подготовка рукописи;  
 К.И. Кирсанов: подготовка дизайна исследования, обсуждение результатов, подготовка текста рукописи;  
 А.А. Борунова: работа с клетками на проточном цитофлуориметре;  
 М.Н. Зацепина: подготовка растворов, приборов, проведение экспериментов;  
 Е.А. Лесовая: постановка МТТ, работа с рукописью;  
 Т.Н. Заботина: планирование экспериментов с использованием проточного цитофлуориметра, обсуждение результатов, работа с рукописью;  
 Г.А. Белицкий: обсуждение дизайна исследования и результатов, подготовка раздела рукописи «Обсуждение»;  
 М.Г. Якубовская: обсуждение дизайна исследования, деталей его выполнения, результатов, обсуждение и подготовка текста рукописи.

# Authors' contributions

T.I. Fetisov: planning and performance of the experiments, data analysis, manuscript preparation;  
 K.I. Kirsanov: preparing of the experiment design, data analysis, preparing of the manuscript text;  
 A.A. Borunova: performance of the experiments flow cytometer;  
 M.N. Zatepina: preparation of the solutions, equipment, experiments;  
 E.A. Lesovaya: MTT-test performance, manuscript text preparation;  
 T.N. Zabolina: planning of the experiments using flow cytometer;  
 G.A. Belitsky: discussion on the experiment design, data analysis, text preparation of the part "Discussion";  
 M.G. Yakubovskaya: discussion of the experiment design, data analysis, discussion and preparing of the manuscript text.

**ORCID авторов/ORCID of authors**

Т.И. Фетисов/T.I. Fetisov: <https://orcid.org/0000-0002-5082-9883>

К.И. Кирсанов/K.I. Kirsanov: <https://orcid.org/0000-0002-8599-6833>

Е.А. Лесовая/E.A. Lesovaya: <https://orcid.org/0000-0002-1967-9637>

М.Г. Якубовская/M.G. Yakubovskaya: <https://orcid.org/0000-0002-9710-8178>

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-315-90098).

**Financing.** The study was performed with support from the Russian Foundation for Basic Research (project No. 19-315-90098).