DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-89-103

CC BY 4.0

Влияние ингибитора обратной транскриптазы эфавиренза на индуцированную 5-азацитидином экспрессию длинных диспергированных повторов LINE1 и генетическую нестабильность в клетках острого миелоидного лейкоза

Х.М. Магомедова[1], И.А. Антонова[1], М.С. Стрелков[1, 2], В.А. Нуртдинова[1], В.Т. Чещевик[3], К.И. Кирсанов[1, 2], Г.А. Белицкий[1], М.Г. Якубовская[1, 2], О.А. Власова[1]

[1]ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;
[2]ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов»; Россия, 117198 Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6;
[3]УО «Полесский государственный университет»; Беларусь, 225710 Пинск, ул. Днепровской флотилии, 23

Контакты: Ольга Александровна Власова *olya_vlasov@mail.ru,* Марианна Геннадиевна Якубовская *mgyakubovskaya@mail.ru*

Введение. Использование гипометилирующих агентов в терапии острого миелоидного лейкоза позволило увеличить общую выживаемость пациентов на 12 %. Однако, наряду с мощным противоопухолевым эффектом, эти агенты оказывают негативное влияние на стабильность генома из-за транспозиции активированных LINE1, чем обусловлена малая продолжительность ремиссии. Поскольку для ретротранспозиции LINE1 необходима кодируемая ими обратная транскриптаза ORF2 LINE1, гомологичная ферменту ретровирусов, мы предложили использовать гипометилирующие агенты в комбинации с ненуклеозидным ингибитором этого фермента, чтобы снизить генотоксическое действие 5-азацитидина.

Цель исследования – оценить влияние эфавиренза на эффекты 5-азацитидина в отношении культивируемых клеток острого миелоидного лейкоза: цитотоксическую активность, экспрессию длинных диспергированных повторов LINE1 и уровень генетической нестабильности.

Материалы и методы. Исследование проведено на клетках острого миелоидного лейкоза THP-1 и KG-1. В качестве гипометилирующих агентов и ингибитора обратной транскриптазы использованы 5-азацитидин и эфавиренз соответственно. Цитотоксическое действие препаратов и их комбинаций определяли с помощью резазуринового теста, долю апоптотических и некротических клеток оценивали с использованием проточной цитофлуориметрии, экспрессию LINE1 – с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени. Для оценки уровня повреждения ДНК применяли метод ДНК-комет.

Результаты. Выявлено отсутствие влияния эфавиренза на цитотоксичность 5-азацитидина. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания 2-го кодируемого LINE1 белка – ORF1 – и проточной цитометрии продемонстрировано отсутствие воздействия эфавиренза на уровень экспрессии LINE1. В то же время данные теста ДНК-комет свидетельствуют о снижении генотоксического эффекта 5-азацитидина при его использовании в комбинации с эфавирензом.

Заключение. Результаты нашего исследования впервые показали перспективность развития нового подхода к терапии острого миелоидного лейкоза с использованием гипометилирующих агентов путем их комбинации с ингибиторами обратной транскриптазы.

Ключевые слова: острый миелоидный лейкоз, гипометилирующий агент, ингибитор обратной транскриптазы ретровирусов, длинные диспергированные повторы LINE1, 5-азацитидин, эфавиренз

Для цитирования: Магомедова Х.М., Антонова И.А., Стрелков М.С. и др. Влияние ингибитора обратной транскриптазы эфавиренза на индуцированные 5-азацитидином экспрессию длинных диспергированных повторов LINE1 и генетическую нестабильность в клетках острого миелоидного лейкоза. Успехи молекулярной онкологии 2025;12(2):89–103.
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-89-103

Effect of the reverse transcriptase inhibitor efavirenz on 5-azacytidine-induced LINE1 long interspersed repeat expression and genetic instability in acute myeloid leukemia cells

K.M. Magomedova[1], I.A. Antonova[1], M.S. Strelkov[1, 2], V.A. Nurtdinova[1], V.T. Cheshchevik[3], K.I. Kirsanov[1, 2], G.A. Belitsky[1], M.G. Yakubovskaya[1, 2], O.A. Vlasova[1]

[1]*N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115522, Russia;*
[2]*RUDN Universtiy; 6 Miklukho-Maklaya St., Moscow 117198, Russia;*
[3]*Polessky State University; 23 Dneprovskoy Flotilla St., Pinsk 225710, Belarus*

Contacts: Olga Aleksandrovna Vlasova *olya_vlasov@mail.ru,* Marianna Gennadievna Yakubovskaya *mgyakubovskaya@mail.ru*

Introduction. The use of hypomethylating agents in the treatment of acute myeloid leukemia has increased overall patient survival by 12 %. However, alongside their potent antitumor effect, hypomethylating agents negatively impact genome stability due to the transposition of activated LINE1 elements, which contributes to the short duration of remission. Since LINE1 retrotransposition requires the ORF2-encoded reverse transcriptase, homologous to the retroviral enzyme, we proposed combining hypomethylating agents with a non-nucleoside inhibitor of this enzyme to reduce the genotoxic effects of 5-azacytidine.

Aim. To evaluate the effect of efavirenz on 5-azacytidine in cultured acute myeloid leukemia cells regarding: cytotoxic activity, expression of long interspersed nuclear elements (LINE1), the level of genetic instability.

Materials and methods. The study was conducted on THP-1 and KG-1 acute myeloid leukemia cell lines. 5-Azacytidine (hypomethylating agents) and efavirenz (reverse transcriptase inhibitor) were used. Cytotoxicity was assessed via the resazurin assay, apoptosis and necrosis rates were measured by flow cytometry, LINE1 expression was quantified using real-time polymerase chain reaction, and DNA damage was evaluated via the comet assay.

Results. Efavirenz did not affect the cytotoxicity of 5-azacytidine. Immunofluorescence staining of LINE1-encoded ORF1 protein and flow cytometry confirmed that efavirenz did not alter LINE1 expression levels. However, comet assay data indicated that combining 5-azacytidine with efavirenz reduced its genotoxic effects.

Conclusion. Our findings demonstrate, for the first time, the potential of a novel acute myeloid leukemia treatment strategy combining hypomethylating agents with reverse transcriptase inhibitors.

Keywords: acute myeloid leukemia, hypomethylating agent, retroviral reverse transcriptase inhibitor, long interspersed repeats LINE1, 5-azacytidine, efavirenz

For citation: Magomedova K.M., Antonova I.A., Strelkov M.S. et al. Effect of the reverse transcriptase inhibitor efavirenz on 5-azacytidine-induced LINE1 long interspersed repeat expression and genetic instability in acute myeloid leukemia cells. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2025;12(2):89–103. (In Russ.).
DOI: https://doi.org/10.17650/2313-805X-2025-12-2-89-103

ВВЕДЕНИЕ

Лечение пожилых пациентов с острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) и миелодиспластическим синдромом представляет собой одну из наиболее сложных задач в онкогематологии [1, 2]. Эти заболевания системы крови наиболее распространены среди населения старше 60 лет [3]. Приобретенные в течение жизни сопутствующие заболевания приводят к невозможности применения интенсивной химиотерапии и трансплантации костного мозга у данной категории пациентов, что обусловливает низкий уровень их общей выживаемости. Существенный прогресс в лечении этих больных достигнут благодаря применению гипометилирующих препаратов (ГМА), первым среди которых был 5-азацитидин – аналог цитидина [2, 4]. Вследствие пиримидинового метаболизма 5-азацитидин перерабатывается в аналог дезоксицитидинтрифосфата (dCTP) Aza-dCTP, который встраивается в цепь ДНК и ковалентно захватывает самый важный эпигенетический регулятор – ДНК-метилтрансферазу 1 (DNMT1). При этом наблюдается снижение глобального метилирования ДНК, что приводит к активации эпигенетически репрессированных генов определенных областей генома [5, 6].

Однако, как показали результаты исследований последних лет, применение 5-азацитидина вызывает активацию экспрессии более 2000 точек старта в некодирующей части генома, в том числе экспрессии повторяющихся последовательностей, к которым, в частности, относятся классы мобильных генетических элементов LINE (long interspersed nuclear elements), SINE (short interspersed nuclear elements) и эндогенные ретровирусы [7, 8]. Наиболее изученными и распространенными мобильными генетическими элементами в геномах млекопитающих являются LINE1, активация которых приводит к двум разнонаправленным эффектам. Увеличение экспрессии двунитевых транскриптов LINE1 приводит, во-первых, к активации интерферонового сигналинга 1-го типа и таким образом вносит вклад в противоопухолевый эффект препарата, а во-вторых, к повышению генетической нестабильности из-за транспозиции LINE1 и других транспозонов, что способствует опухолевой прогрессии и, соответственно, развитию рецидива заболевания [9].

В состав LINE1 входят 2 последовательности ORF (open reading frame), кодирующие белки шаперона (ORF1), эндонуклеазы и обратной транскриптазы (ОТ) (ORF2). Эффект ГМА, обусловленный транспозицией LINE1, опосредован действием функционально активной ORF2, которая гомологична соответствующему ферменту ретровирусов.

К настоящему времени разработаны и успешно применяются в терапии пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ), ингибиторы ОТ ретровирусов [10]. Одним из препаратов, одобренных в 1998 г. для использования в клинической практике, является антиретровирусный препарат эфавиренз – ненуклеозидный ингибитор ОТ (NNRTI) [11]. Мы предположили, что использование 5-азацитидина в комбинации с эфавирензом позволит снизить генотоксичность терапии без влияния на активацию LINE1.

Цель исследования – оценить влияние эфавиренза на цитотоксическую активность 5-азацитидина в отношении культивируемых клеток ОМЛ, индуцированную 5-азацитидином экспрессию длинных диспергированных повторов LINE1 и уровень генетической нестабильности в клетках ОМЛ, обработанных 5-азацитидином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Использованы 5-азацитидин (Sigma Aldrich (Merck), Индия, A2385-100MG), резазурина натриевая соль («ЛенРеактив», Россия, 163004), ExtractRNA («Евроген», Россия, BC032), ОТ вируса лейкемии мышей (MMLV-RT, «Евроген», Россия, SK022L), случайные гексануклеотидные праймеры Random(dN)$_{10}$ («Евроген», Россия, SB002), эфавиренз (CaymanChemical, США, 14412), фосфатно-солевой буфер (PBS) (Servicebio, Китай, G4207-500ML), TopVision Low Melting Point Agarose (ThermoFisherScientific, Германия, R0801), Na_2EDTA («ПанЭко», Россия, Эл075), борная кислота («ПанЭко», Россия, Эл070), Tris Base («ПанЭко», Россия, Х270), Tris-HCl («ПанЭко», Россия, Х280), NaCl («Пущинские лаборатории», Россия, PL-0773), NaOH («Пущинские лаборатории», Россия, PL-0761), SYBR® Gold Nucleic Acid Gel Stain (Invitrogen, США), 3,7 % раствор формальдегида («ХимМед», Россия, CS-T-55012), 0,3 % Triton X-100 (Macklin, Китай, T6328-500mL), Mouse Monoclonal H2A.X phospho S139 antibody (Abcam, Ирландия, cat# ab26350), Donkey Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Fluor® 488) (Abcam, Ирландия, cat# ab150105), DAPI (Sigma Aldrich (Merck), Индия, D9542), Mowiol® 4-88 (Sigma Aldrich (Merck), Индия, 81381).

Клеточные линии. Клеточные линии ОМЛ THP-1 и KG-1 получены из коллекции клеток Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина. Клетки культивировали в питательной среде RPMI 1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 150 мг/мл L-глутамина, 50 ЕД/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия) и 10 % (для THP-1) и 20 % (для KG-1) эмбриональной бычьей сыворотки («ПанЭко», Россия). Клетки инкубировали при 37 °C и 5 % CO_2. Проверку на отсутствие микоплазмы проводили с помощью профилирования STR.

Измерение жизнеспособности клеток острого миелоидного лейкоза. Клетки линий ОМЛ высеивали в 96-луночные планшеты в ранее подобранных количествах (для THP-1 – 37,5 тыс. клеток/мл, для KG-1 – 150 тыс. клеток/мл) в 180 мкл среды. Далее их обрабатывали 5-азацитидином и/или эфавирензом общим объемом 20 мкл и инкубировали 72 ч с 5-азацитидином в максимальной конечной концентрации 100 мкМ с пошаговым уменьшением концентрации в 1,5 раза; эфавиренз добавляли в концентрации 50 мкМ как для THP-1, так и для KG-1. Жизнеспособность клеток анализировали на основе метаболической активности с добавлением 0,177 мг/мл резазурина за 8–10 ч до окончания времени инкубации. Результаты в виде интенсивности сигнала флуоресценции считывали на микропланшетном флуориметре Fluoroskan FL (Thermo Scientific, США).

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. Клетки THP-1 высеивали в количестве 100 тыс. клеток/мл в 24-луночных планшетах и инкубировали в течение 120 ч с ГМА в различных концентрациях. По прошествии 72 ч обновляли питательную среду с добавлением 50 % концентрации ГМА. Тотальную РНК экстрагировали реагентом ExtractRNA согласно протоколу производителя («Евроген», Россия). Общий пул РНК (1 мкг как из необработанных, так и из обработанных противоопухолевыми препаратами клеток) подвергали ОТ с использованием MMLV-RT и случайных гексануклеотидных праймеров в 20 мкл реакционной смеси в соответствии с протоколом производителя («Евроген», Россия). Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) в реальном времени проводили по стандартному протоколу с использованием 5 пар праймеров к 4 ампликонам (некодирующим последовательностям LINE1), а также гену *ORF1 LINE1* (табл. 1).

Каждая ПЦР основана на 5 нг ДНК, 1х ПЦР-буфере, 0,3 мМ dNTP, 3 мМ $MgCl_2$, 0,2 ед. ДНК-полимеразы Syn Taq и 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров в объеме реакционной смеси 25 мкл. ПЦР проводили с помощью системы CFX96 Touch™ (Bio-Rad Laboratories, #1855201, Россия) по протоколу: начальный этап денатурации путем нагревания при 95 °C в течение 5 мин, затем 40 циклов по 15 с денатурации (при 95 °C), 20 с при соответствующей температуре (в зависимости от значений Tm используемого праймера) и элонгация – 25 с при 72 °C. Экспрессию интересующего фрагмента LINE1 нормализовали по конститутивно экспрессируемым генам домашнего хозяйства *RPL$_0$* и *GAPDH*. Последовательности используемых праймеров представлены в табл. 1. Относительный уровень экспрессии рассчитывали для каждого

Таблица 1. *Последовательности праймеров, используемых для амплификации фрагментов длинных диспергированных повторов LINE1*
Table 1. *Sequences of primers used to amplify fragments of long interspersed repeats LINE1*

Амплифицируемый фрагмент Amplified fragment	Последовательность праймера Primer sequence	
	прямого (3' → 5') forward (3' → 5')	обратного (3'→ 5') reverse (3' → 5')
LINE1 set1	GCCAAGATGGCCGAATAGGA	AAATCACCCGTCTTCTGCGT
LINE1 set2	CGAGATCAAACTGCAAGGCG	CCGGCCGCTTTGTTTACCTA
LINE1 set3	TAAACAAAGCGGCCGGGAA	AGAGGTGGAGCCTACAGAGG
LINE1 set4	AGAGAGCAGTGGTTCTCCCA	CAGTCTGCCCGTTCTCAGAT
LINE1 set5 (*ORF1*)	ACCTGAAAGTGACGGGGAGA	CCTGCCTTGCTAGATTGGGG
RPL0	CCTTCTCCTTTGGGCTGGTCATCCA	CAGACACTGGCAACATTGCGGACAC
GAPDH	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA

образца методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Проводили не менее 5 биологических повторов на каждую точку.

Анализ активации экспрессии LINE1, индуцированной 5-азацитидином и эфавирензом, с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к ORF1 LINE1 и последующей проточной цитометрии. Для анализа активации экспрессии LINE1, индуцированной 5-азацитидином и эфавирензом, клетки ОМЛ высеивали в 6-луночные планшеты (10^5 клеток на лунку в 2 мл RPMI). Клетки обрабатывали интересующими соединениями в нетоксичных концентрациях и инкубировали в течение 72 ч. Затем промывали 3 раза PBS и фиксировали в холодном 4 % параформальдегиде в течение 15 мин. После следующих 3 промывок PBS их пермеабилизировали холодным 0,3 % Triton-X100 в течение 7 мин и блокировали бычьим сывороточным альбумином в течение 1 ч. Клетки были иммунофлуоресцентно окрашены антителами к LINE1-ORF1, последующее связывание со вторичными антителами AlexaFluor488 проводили в темноте. Клетки промыты PBS и проанализированы на проточном цитофлуориметре BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США). Оценивали долю клеток с высокоинтенсивным флуоресцентным сигналом и среднюю интенсивность флуоресценции клеток, нормализованную по отношению к контролю. Полученные данные проанализированы с помощью программного обеспечения Win-List™ 3D (версия 9.0.1, Verity Software House, США, https://www.vsh.com/products/winlist/index.asp).

Анализ количества апоптотических и некротических клеток с помощью двойного окрашивания аннексин-FITC/пропидий йодид и последующего анализа на проточном цитометре. Клетки окрашивали аннексином V-FITC и PI для оценки апоптоза методом проточной цитометрии в соответствии с инструкциями производителя для обнаружения апоптоза FITC Anexin V (Sigma-Aldrich, США). Клетки обрабатывали нетоксичными концентрациями 5-азацитидина и эфавиренза в течение 72 ч. После этого их собирали, дважды промывали ледяным PBS и ресуспендировали в 0,5 мл раствора аннексин/V-FITC/PI в течение 30 мин в темноте в соответствии с протоколом производителя. После окрашивания при комнатной температуре клетки анализировали с помощью проточного цитометра BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, США). Для каждого образца проанализированы 10 000 событий и проведена количественная оценка клеток с высокоинтенсивным флуоресцентным сигналом по FITC и/или PI с использованием программного обеспечения WinList™ 3D (версия 9.0.1, Verity Software House, США, https://www.vsh.com/products/winlist/index.asp).

Метод ДНК-комет. Клетки линий THP-1 и KG-1 высеивали по 100 тыс. клеток/мл в 6-луночных планшетах и инкубировали в течение 120 ч с 5-азацитидином в диапазоне концентраций от 0,5 до 20 мкМ для THP-1 и от 0,12 до 8,5 мкМ для KG-1 с 20 мкМ эфавирензом или без него. По прошествии 72 ч обновляли питательную среду с добавлением 50 % концентрации 5-азацитидина и эфавиренза. Важными данными, получаемыми при проведении теста ДНК-комет, являются характеристики «хвоста кометы», соответствующие доле поврежденной ДНК. «Хвост кометы» представляет собой фракцию относительно низкомолекулярной ДНК, образовавшейся в результате появления двух- и одноцепочечных разрывов в высокомолекулярной хромосомной ДНК. «Момент хвоста» рассчитывается по формуле:

«Момент хвоста» = % ДНК в «хвосте» × длина «хвоста».

Показателем генотоксического действия является индекс повреждения (ИП), который вычисляли по формуле:

$$ИП = \frac{\text{«Момент хвоста» в обработанных клетках}}{\text{«Момент хвоста» в контрольных клетках}}.$$

Значение ИП >2 указывает на то, что исследуемое соединение обладает генотоксическими свойствами. Для статистического анализа различий величины «момента хвоста» использовали непараметрический критерий Краскела–Уоллиса.

Клеточную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 1500 об/мин. Осадок промывали PBS и повторяли процедуру центрифугирования, далее осадок ресуспендировали в PBS из расчета 10 тыс. клеток/мл. Полученную суспензию смешивали с предварительно нагретой агарозой с низкой температурой плавления в соотношении 1:8 по объему, тщательно перемешивали и наносили 40 мкл суспензии на 20-луночное предметное стекло. После затвердевания стекла погружали в 25 мл холодного лизирующего раствора (10 мМ Tris HC; pH 10; 2,5 М NaCl; 100 мМ Na_2EDTA) и инкубировали 90 мин при 4 °С. После окончания инкубации лизирующий раствор аспирировали, слайды заливали 25 мл холодного щелочного раствора (500 мМ Na_2EDTA, pH 8; 300 мМ NaOH, pH >13) и инкубировали 30 мин при 4 °С. После лизиса слайды промывали TBE (Tris Base, Na_2EDTA, борная кислота), помещали в горизонтальную электрофорезную камеру, заполненную холодным TBE, и проводили электрофорез (1 В/см, 20 мин). Далее стекла промывали в дистиллированной воде 2 раза по 5 мин. Для дегидратации минигелей слайды помещали в 70 % этанол на 5 мин. После сушки на воздухе все образцы окрашивали красителем ДНК SYBR Gold для подсчета. Процент ДНК в «хвосте» подсчитывали с помощью программного обеспечения Comet Scoring Freeware (Version 2.0.0.0; http://rexhoover.com/). Для анализа взято не менее 100 клеток на каждую точку.

Статистическая обработка данных. Эксперименты выполнены минимум в 2 биологических повторах. Средние значения и среднеквадратичные отклонения рассчитывали с помощью пакетов программ Microsoft Excel, OriginLab и GraphPad Prizm. Сравнение данных экспериментальной и контрольных групп проведено с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) и апостериорного теста Даннетта. Различия между группами считались значимыми при значении p <0,05.

Основой статистической обработки результатов для определения наличия статистически значимых различий между несколькими группами для одной независимой переменной являются случайность выборок, равенство размера выборки и нормальность распределений использованных выборок. Нормальность распределения данных оценивали с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Статистический анализ проводили с использованием программного решения GraphPad Prism 8.3.0 (GraphPad Software Inc., США). Для теста ДНК-комет значимость различий между контрольными необработанными клетками и клетками, обработанными 5-азацитидином и эфавирензом, определялась с помощью теста ANOVA (непараметрический критерий Краскела–Уоллиса) и апостериорного теста Даннетта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние эфавиренза на цитотоксическую активность 5-азацитидина в отношении культивируемых клеток острого миелоидного лейкоза. При проведении сравнительной оценки уровней цитотоксичности 5-азацитидина с эфавирензом и без него в отношении клеток линий ОМЛ человека (KG-1 и THP-1) использован резазуриновый тест (рис. 1).

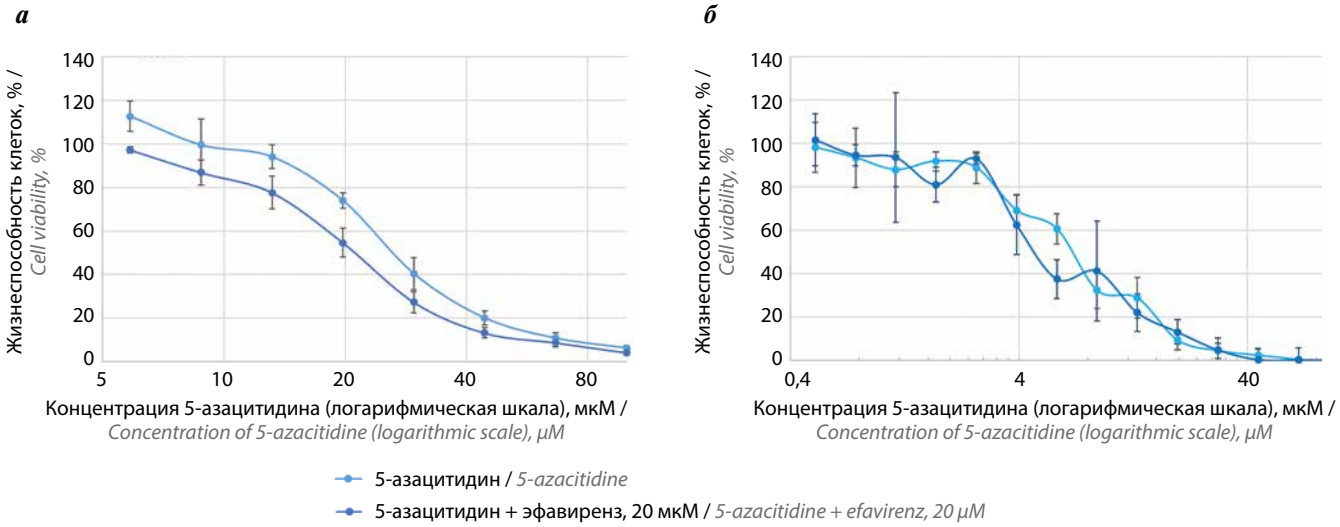

Рис. 1. *Зависимость жизнеспособности клеток от концентраций 5-азацитидина на клеточных линиях THP-1 (а) и KG-1 (б) в присутствии и в отсутствие эфавиренза*

Fig. 1. *The dependence of cell viability on the concentration of 5-azacytidine on THP-1 (a) and KG-1 (б) cell lines in the presence and absence of efavirenz*

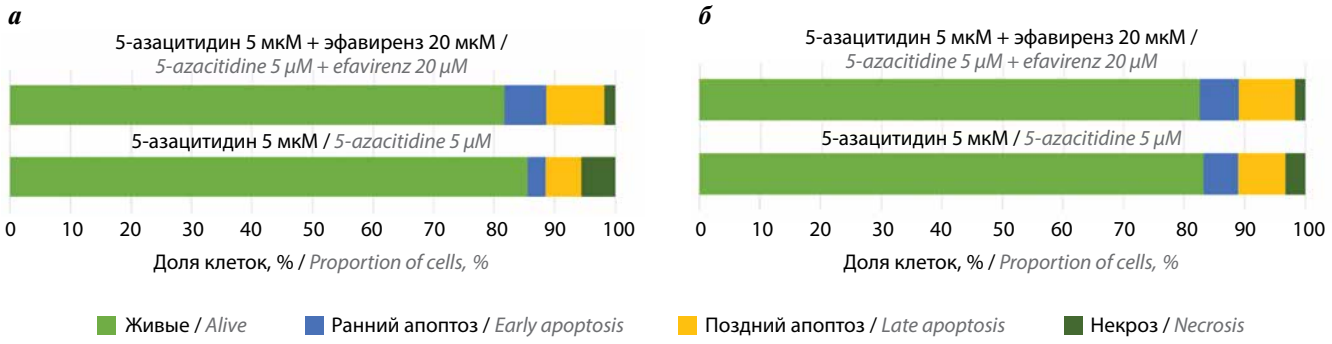

Рис. 2. *Распределение популяции клеток на живые, апоптотические и некротические под действием комбинации 5-азацитидина и эфавиренза в нетоксичных концентрациях: а – клеточная линия THP-1; б – клеточная линия KG-1*

Fig. 2. *Distribution of the cell population into live, apoptotic and necrotic cells under the influence of a combination of 5-azacytidine and efavirenz at non-toxic concentrations: a – THP-1 cell line; б – KG-1 cell line*

При этом эфавиренз использовали в нетоксичной для данных клеточных линий концентрации 20 мкМ (данные не представлены). На клеточной линии THP-1 добавление эфавиренза несколько снижало жизнеспособность клеток при всех исследуемых концентрациях 5-азацитидина. На клеточной линии KG-1 экспериментальные кривые по жизнеспособности клеток при воздействии 5-азацитидина в присутствии и в отсутствие эфавиренза неоднократно пересекались. Это указывает на то, что при воздействии эфавиренза жизнеспособность клеток, обработанных 5-азацитидином, не подвергалась значительным изменениям.

На основе полученных экспериментальных кривых для последующего анализа выбраны следующие нетоксичные концентрации 5-азацитидина: 5 мкМ для клеточной линии THP-1 и 0,5 мкМ для клеточной линии KG-1.

Проанализировано влияние нетоксичных концентраций 5-азацитидина на долю жизнеспособных клеток при добавлении эфавиренза в концентрации 20 мкМ с помощью определения доли клеток с маркерами раннего и позднего апоптоза и некроза. В обеих клеточных линиях эфавиренз не оказывал статистически значимого влияния на жизнеспособность опухолевых клеток (рис. 2).

Влияние эфавиренза на индуцированную 5-азацитидином экспрессию LINE1. Для анализа изменения уровня экспрессии ретротранспозонов в клеточных линиях ОМЛ человека использованы 2 альтернативных подхода, один из которых – анализ активации экспрессии длинных диспергированных повторов 5-азацитидином с помощью ПЦР в реальном времени с применением 5 пар праймеров к 4 ампликонам (некодирующим последовательностям LINE1), а также к гену *ORF1 LINE1*.

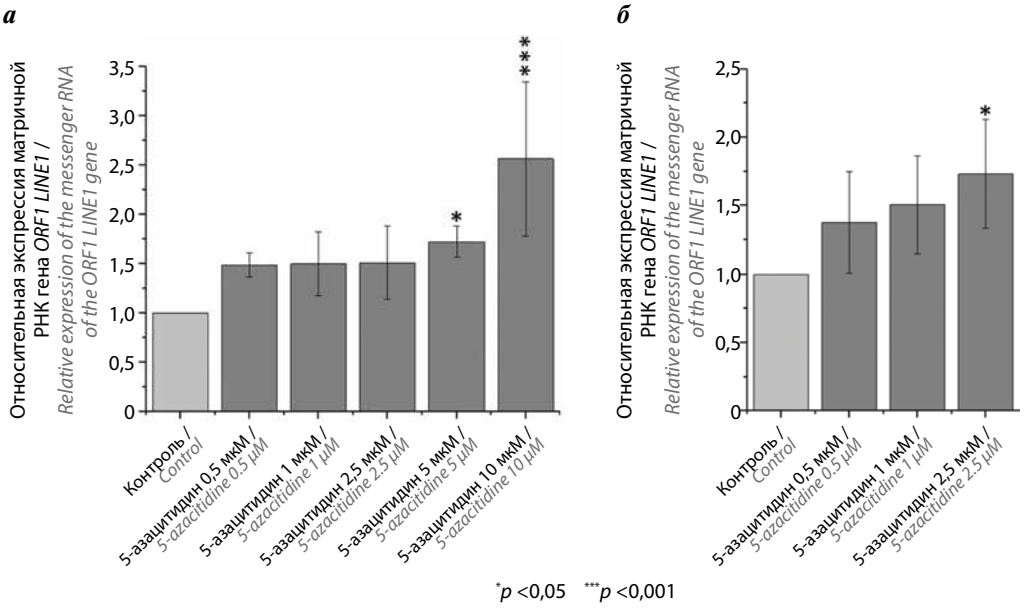

Рис. 3. *Относительная экспрессия гена ORF1 LINE1 на клеточных линиях острого миелоидного лейкоза под действием 5-азацитидина, среднее значение ± стандартное отклонение: а – клеточная линия THP-1; б – клеточная линия KG-1. Статистическая обработка проведена с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA)*

Fig. 3. *Relative expression of the ORF1 LINE1 gene under the influence of 5-azacytidine in acute myeloid leukemia cell lines, mean ± standard deviation: a – THP-1 cell line; б – KG-1 cell line. Statistical processing was performed using univariate analysis of variance (ANOVA)*

Таблица 2. *Уровень экспрессии ампликонов LINE1 при обработке клеток 5-азацитидином в концентрациях 5 мкМ (THP-1) и 0,5 мкМ (KG-1)*

Table 2. *LINE1 amplicon expression levels in cells treated with 5-azacytidine at concentrations of 5 μM (THP-1) and 0.5 μM (KG-1)*

Клеточная линия Cell line	Ампликон LINE1 LINE1 amplicon				
	1	2	3	4	ORF1
THP-1	–	+	+	+	+
KG-1	–	–	+	+	–

Результаты ПЦР-анализа продемонстрировали повышение уровня экспрессии гена *ORF1 LINE1* транспозона LINE1 и других ампликонов LINE1, что свидетельствует о целесообразности оценки уровня экспрессии белка ORF1 в популяциях обработанных и необработанных клеток, окрашенных антителами к ORF1 LINE1, с помощью проточной цитометрии (рис. 3, табл. 2).

Под действием ГМА 5-азацитидина мы наблюдали дозозависимое увеличение средней интенсивности флуоресценции клеток, которая ассоциирована с количеством белка ORF1 LINE1, причем для клеточной линии THP-1 при его концентрации 5 мкМ и выше увеличение этого показателя было статистически значимым (рис. 4, *а, б*). Эфавиренз снижал экспрессию белка ORF1 LINE1, однако различия не были статистически значимы относительно необработанных клеток (рис. 4, *в*).

Влияние эфавиренза на генотоксический эффект 5-азацитидина в клетках THP-1 и KG-1. Для оценки повреждений ДНК под действием гипометилирующих препаратов на клеточных линиях THP-1 и KG-1 использован метод ДНК-комет.

В контрольных клетках, не подвергавшихся обработке, «момент хвоста» для THP-1 составил 1,14 ± 0,33 %, для KG-1 – 1,12 ± 0,2 %. В клетках, инкубированных в течение 24 ч с ифосфамидом в дозе 5 мг/мл для THP-1 и 4 мг/мл для KG-1, «момент хвоста» оказался равен 4,31 ± 1,28 и 4,02 ± 0,47 % соответственно, что под-

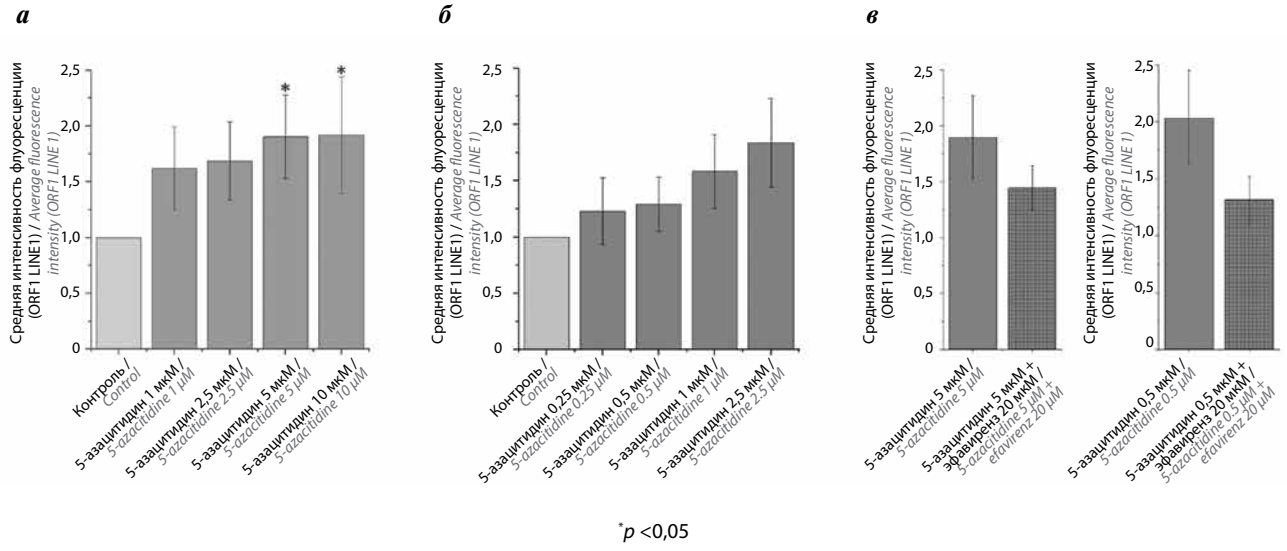

Рис. 4. *Влияние гипометилирующего препарата 5-азацитидин на экспрессию белка ORF1 LINE1 в клетках линии острого миелоидного лейкоза, среднее значение ± стандартное отклонение: а – клеточная линия THP-1; б – клеточная линия KG-1; в – в присутствии ингибитора обратной транскриптазы вирусов эфавиренза. Статистическая обработка проведена с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA)*

Fig. 4. *Effect of the hypomethylating drug 5-azacytidine on the expression of the ORF1 LINE1 protein in acute myeloid leukemia cell lines, mean ± standard deviation: a – THP-1 cell line; б – KG-1 cell line; в – in the presence of the viral reverse transcriptase inhibitor efavirenz. Statistical processing was performed using univariate analysis of variance (ANOVA)*

Таблица 3. *Уровень повреждений ДНК клеток THP-1 при обработке 5-азацитидином по данным теста ДНК-комет*

Table 3. *The level of DNA damage in THP-1 cells during treatment with 5-azacytidine according to the DNA comet assay*

Группа Group	«Момент хвоста», медиана (Q_{25}; Q_{75}) "Tail moment", median (Q_{25}; Q_{75})	Индекс повреждения Damage index
Контроль Control	1,14 ± 0,330 (0,000; 1,714)	–
Ифосфамид 5 мг/мл Ifosfamide 5 mg/ml	4,31 ± 1,281**** (0,06045; 4,295)	3,78
5-азацитидин 20 мкМ 5-azacytidine 20 μM	2,66 ± 0,656**** (0,008144; 2,839)	2,33
5-азацитидин 10 мкМ 5-azacytidine 10 μM	2,46 ± 0,355* (1,500e-005; 3,026)	2,16
5-азацитидин 5 мкМ 5-azacytidine 5 μM	1,89 ± 0,649*** (0,0005815; 2,673)	1,66
5-азацитидин 2 мкМ 5-azacytidine 2 μM	1,25 ± 0,204 (0,000; 1,647)	1,09

$^{*}p \le 0,05$. $^{***}p \le 0,001$. $^{****}p \le 0,0001$.

Примечание. *Звездочками обозначены статистически значимые различия относительно группы 5-азацитидина. Здесь и в табл. 4–6: Q_{25} – 25-й квартиль; Q_{75} – 7-й квартиль.*

Note. *The asterisks indicate statistically significant differences relative to the 5-azacitidine group. Here and in tables 4–6: Q_{25} – the 25th quartile; Q_{75} – the 7th quartile.*

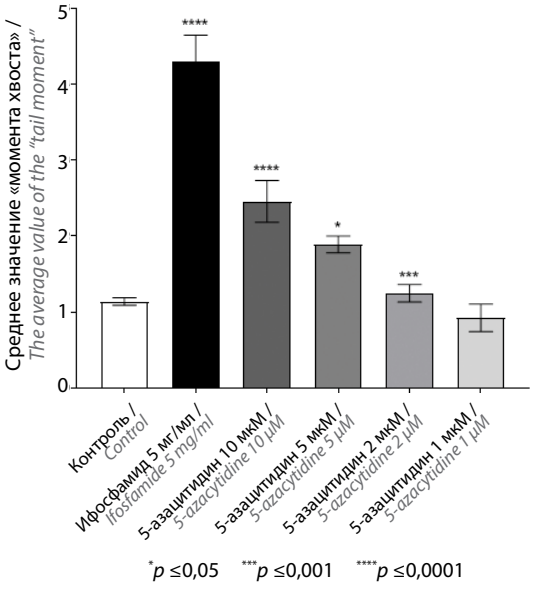

Рис. 5. *Повреждения ДНК клеток THP-1 при обработке 5-азацитидином в ходе теста ДНК-комет. Нормальность распределения значений определяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Значимость различий между клетками, обработанными 5-азацитидином и не обработанными им, оценивали с использованием теста ANOVA (непараметрический критерий Краскела–Уоллиса) и апостериорного теста Даннетта*

Fig. 5. *DNA damage in THP-1 cells treated with 5-azacytidine in the DNA comet assay. Normality of distribution of values was determined by the Kolmogorov–Smirnov test. The significance of differences between control untreated cells and cells treated with 5-azacytidine was determined using the ANOVA test (nonparametric Kruskal–Wallis test) and Dunnett's post hoc test*

тверждает генотоксические свойства ифосфамида, проявляемые в клетках человека, и обосновывает его использование в качестве положительного контроля. Для клеток THP-1, обработанных 5-азацитидином, показано, что уже при нетоксичной концентрации 5 мкМ происходит существенный рост величины «момента хвоста» относительно необработанных клеток. Доля повреждений ДНК в клетках после инкубации с эфавирензом статистически не отличались от доли повреждений в группе отрицательного контроля, что свидетельствует об отсутствии повреждений ДНК под действием данного препарата в исследуемых клеточных линиях (табл. 3, рис. 5).

При обработке клеток THP-1 нетоксичной концентрацией 5-азацитидина (5 мкМ) добавление эфавиренза вызывает значительное понижение количества повреждений ДНК (в среднем в 2,7 раза) (табл. 4, рис. 6).

Для клеток KG-1, обработанных 5-азацитидином, показано, что уже при нетоксичной концентрации 0,25 мкМ происходит существенный рост величины «момента хвоста» относительно необработанных клеток (табл. 5, рис. 7).

При обработке клеток KG-1 нетоксичной концентрацией 5-азацитидина (0,5 мкМ) эфавиренз вызывал значительное уменьшение количества повреждений ДНК (в среднем в 2 раза) (табл. 6, рис. 8).

Таблица 4. *Уровень повреждений ДНК клеток THP-1 при обработке 5-азацитидином в комбинации с эфавирензом по данным теста ДНК-комет*

Table 4. *The level of DNA damage in THP-1 cells during treatment with 5-azacytidine in combination with efavirenz according to the DNA comet assay*

Группа Group	«Момент хвоста», медиана (Q_{25}; Q_{75}) "Tail moment", median (Q_{25}; Q_{75})	Индекс повреждения Damage index
Без обработки (контроль) Without treatment (control)	1,14 ± 0,330 (0,000; 1,714)	–
Ифосфамид 5 мг/мл Ifosfamide 5 mg/ml	4,31 ± 1,281**** (0,06045; 4,295)	3,78
Эфавиренз 50 мкМ Efavirenz 50 μM	1,45 ± 0,498 (0,002182; 1,909)	1,27
5-азацитидин 5 мкМ 5-azacytidine 5 μM	1,89 ± 0,649*** (0,0005815; 2,673)	1,66
5-азацитидин 5 мкМ + эфавиренз 20 мкМ 5-azacytidine 5 μM + efavirenz 20 μM	0,69 ± 0,068** (0,00007; 0,8954)	0,60

***p ≤0,01. ***p ≤0,001. ****p ≤0,0001.*

Примечание. *Звездочками обозначены статистически значимые различия относительно группы 5-азацитидина (5 мкМ).*

Note. *The asterisks indicate statistically significant differences relative to the 5-azacitidine group (5 μM).*

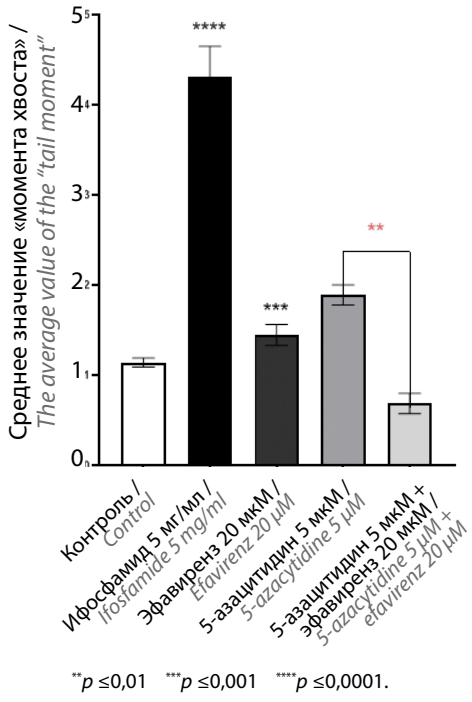

Рис. 6. *Повреждения ДНК клеток THP-1 при обработке 5-азацитидином и эфавирензом в монорежиме или в комбинации в ходе теста ДНК-комет. Нормальность распределения значений определяли с помощью критерия Колмогорова–Смирнова. Значимость различий между необработанными клетками и клетками, обработанными 5-азацитидином и эфавирензом, оценивали с использованием теста ANOVA (непараметрический критерий Краскела–Уоллиса) и апостериорного теста Даннетта. Черными звездочками обозначены статистически значимые различия относительно группы контроля, красными – различия между группами 5-азацитидина в комбинации с эфавирензом и 5-азацитидина*

Fig. 6. *DNA damage in THP-1 cells treated with 5-azacytidine and efavirenz alone or in combination in the DNA comet assay. Normality of distribution of values was determined by the Kolmogorov–Smirnov test. The significance of differences between control untreated cells and cells treated with 5-azacytidine and efavirenz was determined using the ANOVA test (nonparametric Kruskal–Wallis test) and Dunnett's post hoc test. The black asterisks indicate statistically significant differences relative to the control group, the red ones indicate the difference between the 5-azacitidine group in combination with efavirenz relative to the 5-azacitidine group*

Таблица 5. *Уровень повреждений ДНК клеток KG-1 при обработке 5-азацитидином по данным теста ДНК-комет*

Table 5. *The level of DNA damage in KG-1 cells during treatment with 5-azacytidine according to the DNA comet assay*

Группа Group	«Момент хвоста», медиана (Q_{25}; Q_{75}) "Tail moment", median (Q_{25}; Q_{75})	Индекс повреждения Damage index
Контроль Control	1,12 ± 0,197 (0,000; 1,524)	–
Ифосфамид 4 мг/мл Ifosfamide 4 mg/ml	4,02 ± 0,468**** (0,000004; 5,414)	3,59
5-азацитидин 8,5 мкМ 5-azacytidine 8.5 μM	5,43 ± 1,376**** (0,04131; 7,379)	4,85
5-азацитидин 5 мкМ 5-azacytidine 5 μM	3,22 ± 0,904**** (0,003877; 3,952)	2,88
5-азацитидин 2,5 мкМ 5-azacytidine 2.5 μM	2,70 ± 0,714**** (0,002830; 3,917)	2,41
5-азацитидин 1 мкМ 5-azacytidine 1 μM	2,59 ± 0,506**** (3,550e-005; 3,611)	2,31
5-азацитидин 0,5 мкМ 5-azacytidine 0.5 μM	2,08 ± 0,293* (0,000; 2,533)	1,86
5-азацитидин 0,25 мкМ 5-azacytidine 0.25 μM	1,61 ± 0,417* (0,000006; 2,030)	1,44
5-азацитидин 0,12 мкМ 5-azacytidine 0.12 μM	1,26 ± 0,039 (0,000; 1,239)	1,13

$^{*}p \leq 0,05$. $^{****}p \leq 0,0001$.

Примечание. *Звездочками обозначены статистически значимые различия относительно группы 5-азацитидина.*

Note. *The asterisks indicate statistically significant differences relative to the 5-azacitidine group.*

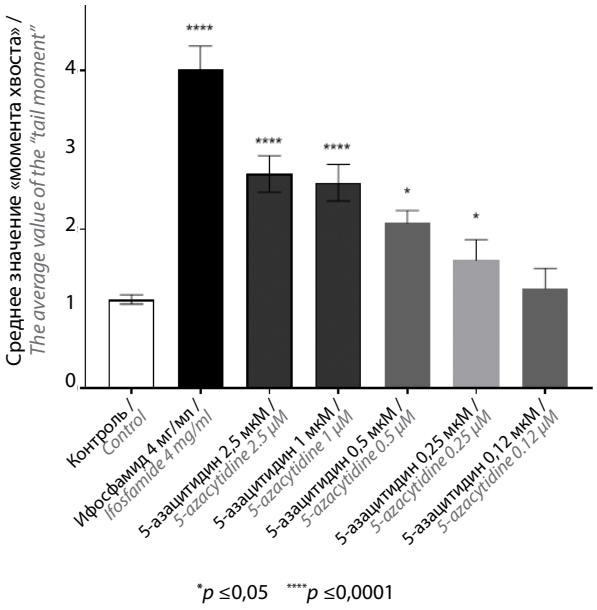

Рис. 7. *Повреждения ДНК клеток KG-1 при обработке 5-азацитидином в ходе теста ДНК-комет. Нормальность распределения значений определяли с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Значимость различий между клетками, не обработанными и обработанными 5-азацитидином, оценивали с помощью теста ANOVA (непараметрический критерий Краскела–Уоллиса) и апостериорного теста Даннетта*

Fig. 7. *DNA damage in KG-1 cells treated with 5-azacytidine in the DNA comet assay. Normality of distribution of values was determined by the Kolmogorov–Smirnov test. The significance of differences between control untreated cells and cells treated with 5-azacytidine was determined using the ANOVA test (nonparametric Kruskal–Wallis test) and Dunnett's post hoc test*

Таблица 6. *Уровень повреждений ДНК клеток KG-1 при обработке 5-азацитидином в комбинации с эфавирензом по данным теста ДНК-комет*

Table 6. *The level of DNA damage in KG-1 cells during treatment with 5-azacytidine in combination with efavirenz according to the DNA comet assay*

Группа Group	«Момент хвоста», медиана (Q_{25}; Q_{75}) "Tail moment", median (Q_{25}; Q_{75})	Индекс повреждения Damage index
Контроль Control	1,12 ± 0,197 (0,000; 1,524)	–
Ифосфамид 4 мг/мл Ifosfamide 4 mg/ml	4,02 ± 0,468**** (0,000004; 5,414)	3,59
Эфавиренз 50 мкМ Efavirenz 50 μM	1,01 ± 0,0001 (0,000; 0,7622)	0,90
5-азацитидин 0,5 мкМ 5-azacytidine 0.5 μM	2,08 ± 0,293* (0,000; 2,533)	1,86
5-азацитидин 0,5 мкМ + эфавиренз 20 мкМ 5-azacytidine 0.5 μM + efavirenz 50 μM	1,03 ± 0,0002**** (0,000; 0,7717)	0,92

**p ≤0,05. ****p ≤0,0001.*

Примечание. *Звездочками обозначены статистически значимые различия относительно группы 5-азацитидина (0,5 мкМ).*

Note. *The asterisks indicate statistically significant differences relative to the 5-azacitidine group (0.5 μM).*

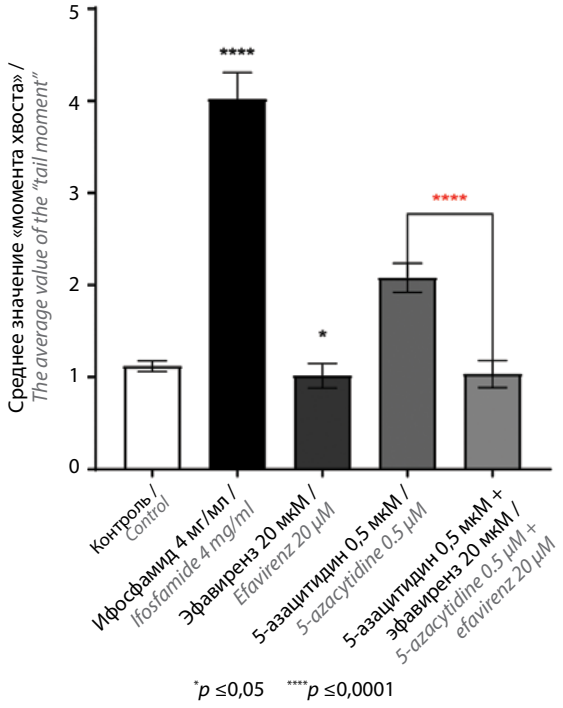

Рис. 8. *Повреждения ДНК клеток KG-1 при обработке 5-азацитидином в комбинации с эфавирензом в ходе теста ДНК-комет. Нормальность распределения значений определяли по критерию Колмогорова–Смирнова. Значимость различий между клетками, не обработанными и обработанными 5-азацитидином, оценивали с помощью теста ANOVA (непараметрический критерий Краскела–Уоллиса) и апостериорного теста Даннетта. Черными звездочками обозначены статистически значимые различия относительно группы контроля, красными – различия между группами 5-азацитидина в комбинации с эфавирензом и 5-азацитидина*

Fig. 8. *DNA damage in KG-1 cells treated with 5-azacytidine in combination with efavirenz in the DNA comet assay. Normality of distribution of values was determined by the Kolmogorov–Smirnov test. The significance of differences between control untreated cells and cells treated with 5-azacytidine was determined using the ANOVA test (nonparametric Kruskal–Wallis test) and Dunnett's post hoc test. The black asterisks indicate statistically significant differences relative to the control group, the red ones indicate the difference between the 5-azacitidine group in combination with efavirenz relative to the 5-azacitidine group*

ОБСУЖДЕНИЕ

Прогресс технологий секвенирования ДНК привел к открытию сложного ландшафта генома человека, в котором кодирующие последовательности составляют всего 1,2 % генома, в то время как остальная часть состоит из некодирующей ДНК [12, 13]. В результате стало очевидным, что некодирующая ДНК, долгое время считавшаяся «мусорной» [14], выполняет множество регуляторных функций. Около 45 % некодирующей ДНК состоит из различных семейств ретротранспозонов, среди которых наиболее распространены длинные диспергированные повторы LINE1, занимающие 17–20 % генома человека. В опухолевых клетках при многих злокачественных новообразованиях наблюдаются гипометилирование ДНК и дерепрессия ретротранспозонов LINE1 [15, 16], которые помимо влияния на профиль экспрессии генов сопровождаются массивной соматической ретротранспозицией [17–19]. При аберрантных интеграциях LINE1 может происходить инициация двухцепочечных разрывов ДНК и негомологичного воссоединения концов (non-homologous end joining, NHEJ), а также удаление целых областей хромосом, что приводит к сложным транслокациям и крупномасштабным перестройкам [20]. Таким образом, одним из последствий активации LINE1 является повышение нестабильности генома опухолевых клеток, способствующее опухолевой прогрессии.

Ретротранспозиция LINE1 реализуется благодаря экспрессии кодируемого ими белка ORF2 LINE1, выполняющего функции эндонуклеазы и ОТ – фермента, обеспечивающего синтез ДНК на матрице РНК [10]. Этот фермент гомологичен ОТ, закодированной в геномах РНК-содержащих вирусов, что открывает возможность использования в онкологии антиретровирусных препаратов, действие которых основано на ингибировании ОТ. Одним из наиболее эффективных ингибиторов ОТ ретровирусов, который в настоящее время используется в терапии почти 30 % ВИЧ-инфицированных пациентов, является эфавиренз [21]. Он относится к препаратам I поколения класса ненуклеозидных ингибиторов ОТ ретровирусов, которые действуют аллостерически, изменяя конформацию фермента [22]. Результаты доклинических исследований противоопухолевых эффектов эфавиренза продемонстрировали, что он оказывает радиосенсибилизирующее действие на клетки BxPC-3 аденокарциномы поджелудочной железы и ингибирует их колониеобразующий потенциал [23]. В клетках недифференцированной карциномы щитовидной железы ARO и FRO, меланомы A-375, аденокарциномы молочной железы MCF7 и карциномы предстательной железы PC3, культивируемых *in vitro*, эфавиренз вызывал снижение пролиферативной активности и индукцию процессов дифференцировки [10]. Кроме того, этот препарат успешно прошел II фазу клинических испытаний по оценке эффективности и безопасности при метастатическом кастрационно-резистентном раке предстательной железы [24].

В то же время возможности применения эфавиренза в комбинации с ГМА до настоящего времени не проанализированы. В нашем исследовании с помощью теста на жизнеспособность клеток по уровню метаболизма резазурина мы продемонстрировали, что данный препарат не изменяет цитотоксическое действие 5-азацитидина на культивируемые *in vitro* клетки линий ОМЛ THP-1 и KG-1. К настоящему моменту опубликовано лишь одно исследование, результаты которого показали, что слаботоксичная концентрация для клеток THP-1 составила 44 мкМ [25]. Это согласуется с полученными нами данными о цитотоксичности эфавиренза. В то же время такие результаты свидетельствуют о том, что эфавиренз не должен влиять на противоопухолевый эффект 5-азацитидина. Согласно полученным нами данным этот препарат статистически значимо не влиял на уровень экспрессии LINE1, индуцированой 5-азацитидином. Поскольку повышение уровня экспрессии LINE1 является одним из путей активации интерферонового сигналинга 1-го типа [26], мы рассматриваем этот факт как аргумент в пользу эффективности 5-азацитидина в комбинации с эфавирензом. Согласно результатам нашего исследования при применении такой комбинации препаратов отмечается статистически значимое снижение генотоксичности 5-азацитидина. Таким образом, на культивируемых *in vitro* клетках ОМЛ линий THP-1 и KG-1 мы продемонстрировали перспективность использования ГМА 5-азацитидина в комбинации с ненуклеозидным ингибитором ОТ ретровирусов эфавирензом в качестве препарата, не влияющего на противоопухолевое действие ГМА, но улучшающего отдаленные последствия такого воздействия путем повышения стабильности генома.

В то же время нельзя не отметить потенциальное ограничение возможности применения эфавиренза в клинической практике. При использовании данного препарата в стандартном протоколе лечения ВИЧ-инфицированных пациентов уже через 48 ч возникали гепатотоксические и нейротоксические эффекты, что являлось причиной прекращения антиретровирусной терапии в 1/3 случаев [27–30]. Одним из основных механизмов токсического действия эфавиренза было нарушение функционального состояния митохондрий путем ингибирования комплекса I дыхательной цепи и в результате активации оксидазы, индуцируемой оксидом азота [31–33]. Структурные нарушения митохондрий приводили к высвобождению цитохрома С и индукции митохондриального пути апоптоза [30, 34]. Предполагаемой причиной митохондриальной токсичности эфавиренза является его липофильность, которая обеспечивает накопление в митохондриях данного соединения в значительных количествах [29].

Следует учитывать и побочные эффекты 5-азацитидина. В частности, этот препарат является индуктором апоптоза, сопровождающегося снижением митохондриального мембранного потенциала и высвобождением

цитохрома С, вызывает разобщение процессов окисления и фосфорилирования в митохондриях, а также усиливает пролиферацию и хемирезистентность опухолевых клеток [35–38]. Перечисленные побочные эффекты эфавиренза и 5-азацитидина следует учитывать при дальнейшей разработке схем лечения онкологических заболеваний на основе комбинированного применения данных соединений.

Положительный опыт применения в клинической практике 5-азацитидина или децитабина в комбинации с ингибиторами ОТ ВИЧ, в том числе эфавирензом, описан в публикациях по терапии ВИЧ-инфицированных пациентов с миелодиспластическим синдромом и ОМЛ, что согласуется с результатами нашего исследования [39, 40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Согласно результатам исследования на клетках ОМЛ линий THP-1 и KG-1 ненуклеозидный ингибитор ОТ ретровирусов эфавиренз не влияет на индуцированные ГМА 5-азацитидином цитотоксический эффект и активацию LINE1. К настоящему моменту получены данные о том, что ГМА вызывают не только изменение профиля экспрессии генов, но и, активируя экспрессию ретротранспозонов, индуцируют интерфероновый сигналинг 1-го типа, что вносит вклад в их противоопухолевое действие. В то же время активация ретротранспозонов приводит к повышению уровня генетической нестабильности, что способствует прогрессии опухоли.

Полученные нами данные свидетельствуют о возможности снижения генотоксичности 5-азацитидина при его использовании в комбинации с эфавирензом. Это открывает новые возможности для поиска более безопасной и эффективной противоопухолевой терапии ОМЛ и свидетельствует о необходимости дальнейших доклинических и клинических испытаний по изучению комбинирования ГМА с ингибиторами ОТ ретровирусов в лечении ОМЛ.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Granatkin M.A., Nikitin E.A., Mikhailov E.S. et al. Combination of azacitidine and venetoclax in first-line therapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: first experience. Clin Oncohematol 2022;15(3):282–8. DOI: 10.21320/2500-2139-2022-15-3-282-288
2. Докшина И.А., Минаева Н.В., Поздеев Н.М. и др. Азацитидин – препарат выбора при лечении больных миелодиспластическим синдромом. Гематология и трансфузиология 2017;62(2):60–4. DOI: 10.18821/0234-5730-2017-62-2-60-64
Dokshina I.A., Minaeva N.V., Pozdeev N.M. et al. Azacitidine is the preparation of choice in the treatment of myelodysplastic syndromes patients. Gematologiya i transfusiologiya = Russian Journal of Hematology and Transfusiology 2017;62(2):60–4. (In Russ.). DOI: 10.18821/0234-5730-2017-62-2-60-64
3. Jani C.T., Ahmed A., Singh H. et al. 1990–2019: estimates from the global burden of disease study. JCO Glob Oncol 2023;9:e2300229. DOI: 10.1200/GO.23.00229
4. Seymour J.F., Döhner H., Butrym A. et al. Azacitidine improves clinical outcomes in older patients with acute myeloid leukaemia with myelodysplasia-related changes compared with conventional care regimens. BMC Cancer 2017;17(1):852. DOI: 10.1186/s12885-017-3803-6
5. Christman J. 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. Oncogene 2002;21:5483–95. DOI: 10.1038/sj.onc.1205699
6. Gu X., Tohme R., Tomlinson B. et al. Decitabine- and 5-azacytidine resistance emerges from adaptive responses of the pyrimidine metabolism network. Leukemia 2021;35(4):1023–36. DOI: 10.1038/s41375-020-1003-x
7. Brocks D., Schmidt C.R., Daskalakis M. et al. DNMT and HDAC inhibitors induce cryptic transcription start sites encoded in long terminal repeats. Nat Genet 2017;49(7):1052–60. DOI: 10.1038/ng.3889
8. Daskalakis M., Brocks D., Sheng Y.H. et al. Reactivation of endogenous retroviral elements via treatment with DNMT- and HDAC-inhibitors. Cell Cycle 2018;17(7):811–22. DOI: 10.1080/15384101.2018.1442623
9. Chiappinelli K.B., Strissel P.L., Desrichard A. et al. Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses. Cell 2015;162(5):974–86. DOI: 10.1016/j.cell.2015.07.011
10. Власова О.А., Антонова И.А., Магомедова Х.М. и др. Потенциальные возможности использования в онкологии ингибиторов обратной транскриптазы вирусов. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):8–28. DOI: 17650/2313-805X-2024-11-2-8-28
Vlasova O.A., Antonova I.A., Magomedova Kh.M. et al. Potential to use of viral reverse transcriptase inhibitors in oncology. Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(2):8–28. (In Russ.). DOI: 17650/2313-805X-2024-11-2-8-28
11. Singh A.K., Kumar A., Arora S. et al. Current insights and molecular docking studies of HIV-1 reverse transcriptase inhibitors. Chem Biol Drug Des 2024;103(1):e14372. DOI: 10.1111/cbdd.14372
12. Lander E.S., Linton L.M., Birren B. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature 2001;409(6822):860–921. DOI: 10.1038/35057062
13. Cordaux R., Batzer M.A. The impact of retrotransposons on human genome evolution. Nat Rev Genet 2009;10(10):691–703. DOI: 10.1038/nrg2640
14. Orgel L.E., Crick F.H. Selfish DNA: the ultimate parasite. Nature 1980;284(5757):604–7. DOI: 10.1038/284604a0
15. Ardeljan D., Taylor M.S., Ting D.T., Burns K.H. The human long interspersed element-1 retrotransposon: an emerging biomarker of neoplasia. Clin Chem 2017;63(4):816–22. DOI: 10.1373/clinchem.2016.257444
16. Howard G., Eiges R., Gaudet F. et al. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. Oncogene 2008;27(3):404–8. DOI: 10.1038/sj.onc.1210631
17. Payer L.M., Burns K.H. Transposable elements in human genetic disease. Nat Rev Genet 2019;20(12):760–72. DOI: 10.1038/s41576-019-0165-8
18. Scott E.C., Devine S.E. The role of somatic L1 retrotransposition in human cancers. Viruses 2017;9(6):131. DOI: 10.3390/v9060131
19. Burns K.H. Transposable elements in cancer. Nat Rev Cancer 2017;17(7):415–24. DOI: 10.1038/nrc.2017.35
20. Rodriguez-Martin B., Alvarez E.G., Baez-Ortega A. et al. Pan-cancer analysis of whole genomes identifies driver rearrangements promoted by LINE-1 retrotransposition. Nat Genet 2020;52(3):306–19. DOI: 10.1038/s41588-019-0562-0

21. Торопов С.Э., Рудакова А.В., Захарова Н.Г. и др. Фармакоэкономический анализ первой линии антиретровирусной терапии. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии 2015;7(1):29–39. DOI: 10.22328/2077-9828-2015-7-1-29-39
Toropov S.E., Rudakova A.V., Zakharova N.G. et al. Pharmacoeconomic analysis of firs-line antiretroviral therapy. VICH-infektsiya i immunosupressii = HIV Infection and Immunosuppressive Disorders 2015;7(1):29–39. (In Russ.). DOI: 10.22328/2077-9828-2015-7-1-29-39
22. Costa B., Vale N. Efavirenz: history, development and future. Biomolecules 2022;13(1):88. DOI: 10.3390/biom13010088
23. Hecht M., Harrer T., Körber V. et al. Cytotoxic effect of efavirenz in BxPC-3 pancreatic cancer cells is based on oxidative stress and is synergistic with ionizing radiation. Oncol Lett 2018;15(2):1728–36. DOI: 10.3892/ol.2017.7523
24. Houédé N., Pulido M., Mourey L. et al. A phase II trial evaluating the efficacy and safety of efavirenz in metastatic castration-resistant prostate cancer. Oncologist 2014;19(12):1227–8. DOI: 10.1634/theoncologist.2014-0345
25. Heaton B.J., Jensen R.L., Line J. et al. Exposure of human immune cells, to the antiretrovirals efavirenz and lopinavir, leads to lower glucose uptake and altered bioenergetic cell profiles through interactions with SLC2A1. Biomed Pharmacother 2022;150:112999. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.112999
26. Tang H., Yang J., Xu J. et al. The transcription factor PAX5 activates human LINE1 retrotransposons to induce cellular senescence. EMBO Rep 2024;25(8):3263–75. DOI: 10.1038/s44319-024-00176-9
27. Tan Z., Jia X., Ma F. et al. Increased MMAB level in mitochondria as a novel biomarker of hepatotoxicity induced by efavirenz. PLoS One 2017;12(11):e0188366. DOI: 10.1371/journal.pone.0188366
28. Martinez-Arroyo O., Gruevska A., Victor V.M. et al. Mitophagy in human astrocytes treated with the antiretroviral drug efavirenz: lack of evidence or evidence of the lack. Antiviral Res 2019;168:36–50. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.04.015
29. Ganta K.K., Mandal A., Chaubey B. Depolarization of mitochondrial membrane potential is the initial event in non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor efavirenz induced cytotoxicity. Cell Biol Toxicol 2017;33(1):69–82. DOI: 10.1007/s10565-016-9362-9
30. Apostolova N., Gomez-Sucerquia L.J., Gortat A. et al. Autophagy as a rescue mechanism in efavirenz-induced mitochondrial dysfunction: a lesson from hepatic cells. Autophagy 2011;7(11):1402–4. DOI: 10.4161/auto.7.11.17653
31. Blas-García A., Apostolova N., Ballesteros D. et al. Inhibition of mitochondrial function by efavirenz increases lipid content in hepatic cells. Hepatology 2010;52(1):115–25. DOI: 10.1002/hep.23647
32. Apostolova N., Funes H.A., Blas-Garcia A. et al. Involvement of nitric oxide in the mitochondrial action of efavirenz: a differential effect on neurons and glial cells. J Infect Dis 2015;211(12):1953–8. DOI: 10.1093/infdis/jiu825
33. Imaizumi N., Kwang Lee K., Zhang C., Boelsterli U.A. Mechanisms of cell death pathway activation following drug-induced inhibition of mitochondrial complex I. Redox Biol 2015;4:279–88. DOI: 10.1016/j.redox.2015.01.005
34. Li M., Sopeyin A., Paintsil E. Combination of tenofovir and emtricitabine with efavirenz does not moderate inhibitory effect of efavirenz on mitochondrial function and cholesterol biosynthesis in human T lymphoblastoid cell line. Antimicrob Agents Chemother 2018;62(9):e00691–18. DOI: 10.1128/AAC.00691-18
35. Khan R., Schmidt-Mende J., Karimi M. et al. Hypomethylation and apoptosis in 5-azacytidine-treated myeloid cells. Exp Hematol 2008;36(2):149–57. DOI: 10.1016/j.exphem.2007.10.002
36. Kim D.Y., Cheong H.T., Ra C.S. et al. Effect of 5-azacytidine (5-aza) on UCP2 expression in human liver and colon cancer cells. Int J Med Sci 2021;18(10):2176–86. DOI: 10.7150/ijms.56564
37. Derdak Z., Mark N.M., Beldi G. et al. The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells. Cancer Res 2008;68(8):2813–9. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0053
38. Dalla Pozza E., Fiorini C., Dando I. et al. Role of mitochondrial uncoupling protein 2 in cancer cell resistance to gemcitabine. Biochim Biophys Acta 2012;1823(10):1856–63. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2012.06.007
39. Boada M., Grille S. Myelodysplastic syndrome in patients living with HIV infection. Hematol Transfus Cell Ther 2023;45(1):119–23. DOI: 10.1016/j.htct.2021.06.006
40. Forghieri F., Nasillo V., Bettelli F. et al. Acute myeloid leukemia in patients living with HIV infection: several questions, fewer answers. Int J Mol Sci 2020;21(3):1081. DOI: 10.3390/ijms21031081

Вклад авторов

Х.М. Магомедова: работа с культурами клеток, анализ цитотоксического действия препаратов, выполнение полимеразной цепной реакции, анализ экспрессии белков с помощью проточной цитометрии, обработка полученных данных, написание текста статьи, подготовка иллюстративного материала;

И.А. Антонова: работа с культурами клеток, проведение теста ДНК-комет, анализ и интерпретация результатов, оформление текста рукописи;

М.С. Стрелков, В.А. Нуртдинова: работа с культурами клеток, выполнение полимеразной цепной реакции, анализ и интерпретация результатов;

В.Т. Чещевик: обзор литературы по теме статьи, сравнительный анализ эффектов эфавиренза с опубликованными данными, редактирование;

К.И. Кирсанов, Г.А. Белицкий: проведение системного анализа, редактирование;

М.Г. Якубовская: разработка концепции исследования, проведение системного анализа, обобщение данных, написание текста статьи, редактирование;

О.А. Власова: разработка концепции и дизайна исследования, обзор литературы по теме статьи, анализ и обобщение полученных данных, написание текста статьи, редактирование, подготовка иллюстративного материала, руководство проведением исследования.

Authors' contributions

Kh.M. Magomedova: working with cell cultures, analyzing the cytotoxic effects of drugs, performing polymerase chain reaction, analyzing protein expression using flow cytometry, processing the data obtained, article writing, preparing illustrative material;

I.A. Antonova: working with cell cultures, conducting a DNA comet test, analyzing and interpreting the results, formatting the text of the manuscript;

M.S. Strelkov, V.A. Nurtdinova: working with cell cultures, performing a polymerase chain reaction, analyzing and interpreting the results;

V.T. Cheshchevik: literature review on the topic of the article, comparative analysis of efavirenz effects with published data, editing;

K.I. Kirsanov, G.A. Belitsky: system analysis, editing;

M.G. Yakubovskaya: developing a research concept, conducting a system analysis, summarizing data, article writing, editing;

O.A. Vlasova: development of the research concept and design, review of the literature on the topic of the article, analysis and generalization of the data obtained, article writing, editing, preparation of illustrative material, management of the research.

ORCID авторов / ORCID of authors
Х.М. Магомедова / Kh.M. Magomedova: https://orcid.org/0009-0004-8514-3859
И.А. Антонова / I.A. Antonova: https://orcid.org/0009-0004-3482-8954
М.С. Стрелков / M.S. Strelkov: https://orcid.org/0009-0007-4778-0584
В.Т. Чещевик / V.T. Cheshchevik: https://orcid.org/0000-0002-1457-8570
К.И. Кирсанов / K.I. Kirsanov: https://orcid.org/0000-0002-8599-6833
Г.А. Белицкий / G.A. Belitsky: https://orcid.org/0000-0002-3167-7204
М.Г. Якубовская / M.G. Yakubovskaya: https://orcid.org/0000-0002-9710-8178
О.А. Власова / O.A. Vlasova: https://orcid.org/0000-0002-1498-849X

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 23-25-00276).
Funding. The study was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 23-25-00276).

Статья поступила: 12.12.2024. **Принята к публикации:** 17.04.2025. **Опубликована онлайн:** 23.06.2025.
Article submitted: 12.12.2024. **Accepted for publication:** 17.04.2025. **Published online:** 23.06.2025.