Федеральное государственное бюджетное учреждение науки ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

Ефремова Анна Сергеевна

РОЛЬ СИСТЕМЫ ПОЛИ(АДФ-РИБОЗИЛ)ИРОВАНИЯ БЕЛКОВ В МЕХАНИЗМАХ КАРДИОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ДОКСОРУБИЦИНА

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель: к.х.н. С.И. Шрам

Москва – 2016

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений	4
1. ВВЕДЕНИЕ	5
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
2.1. Кардиотоксическое действие антрациклиновых антибиотиков	11
2.1.1. Общая характеристика и фармакологические свойства	
антрациклиновых антибиотиков	11
2.1.2. Механизмы кардиотоксического действия доксорубицина	13
2.1.3. Разработка подходов для снижения кардиотоксического	
действия доксорубицина	24
2.1.4. Клеточные модели для исследования кардиотоксического	
действия доксорубицина	28
2.2. Система поли(АДФ-рибозил)ирования белков	31
2.2.1. Поли(АДФ-рибозил)ирование белков – универсальный	
механизм регуляции клеточных процессов	31
2.2.2 Структура и регуляция активности PARP-1	34
2.2.3. Роль PARP-1 в репарации ДНК	37
2.2.4. Роль PARP-1 в механизмах гибели клетки	41
2.2.5. Структура и функции PARP-2	45
2.3. Ингибиторы PARP	46
2.3.1. Первое поколение ингибиторов PARP – производные	
никотинамида и бензамида	47
2.3.2. Ингибиторы PARP второго поколения	48
2.3.3. Ингибиторы PARP третьего поколения	50
2.3.4. Селективные ингибиторы поли(АДФ-рибоза)-полимераз	52
2.3.5. Ингибиторы PARP нуклеозидной природы	55
2.4. Ингибиторы PARP – новая группа фармакологических веществ	56
2.4.1. Применение ингибиторов PARP в монотерапии опухолей	57
2.4.2. Применение ингибиторов PARP в качестве	
адъювантного средства при терапии опухолей	59
2.4.3. Фармакологические эффекты ингибиторов PARP	
при сердечно-сосудистых патологиях	61
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	63
3.1. Используемые реактивы и материалы	63
3.2. Культуры клеток	63
3.2.1. Кардиомиобласты крысы Н9с2	63
3.2.2. Кардиомиоциты из новорожденных крыс	64
3.2.3. Клетки опухоли яичника человека SKOV-3	65
3.2.4. Фибробласты человека	66
3.3. Методы исследования	66
3.3.1. Подготовка планшетов для культивирования кардиомиоцитов	66
3.3.2. Обработка культур доксорубицином и другими веществами	
при оценке их влияния на жизнеспособность клеток	66

3.3.3. Определение жизнеспособности клеток в культуре	
с применением МТТ-теста	_ 67
3.3.4. Флуоресцентная микроскопия	68
3.3.5. Анализ ДНК-комет	72
3.3.6. Анализ фрагментации ДНК методом электрофореза	_ 74
3.3.7. Анализ PARP-ингибирующей активности соединений в	
культуре клеток	75
3.3.8. Статистический анализ данных	75
4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	76
4.1. Характеристика используемых в работе культур кардиомиоцитов	76
4.2. Токсическое действие доксорубицина на культивируемые	
кардиомиоциты	78
4.2.1. Накопление доксорубицина в культивируемых кардиомиоцитах	78
4.2.2. Чувствительность кардиомиоцитов к действию доксорубицина	84
4.3. Влияние доксорубицина на уровень PAR в клетках H9c2	86
4.4. Влияние ингибиторов поли(АДФ-рибоза)полимераз на	
кардиотоксичность доксорубицина	_ 92
4.5. Влияние антиоксидантов и ингибитора NO-синтазы на	
кардиотоксичность доксорубицина	98
4.5.1. Влияние ингибитора NO-синтазы на кардиотоксичность	
доксорубицина	98
4.5.2. Влияние антиоксидантов на кардиотоксичность доксорубицина	_101
4.6. Повреждение и фрагментация ДНК при кардиотоксическом	
действии доксорубицина	_108
4.7. Внутриядерное накопление AIF в кардиомиоцитах при воздействии	
доксорубицина	_114
4.8. Влияние ингибиторов PARP на стимулируемую доксорубицином гибель	
клеток опухоли яичника человека SKOV-3	_116
4.9. Дисахаридные и диальдегидные производные пиримидиновых	
нуклеозидов – потенциальные ингибиторы PARP	_121
4.9.1. Ингибирование рекомбинантной PARP-1 человека аналогами	
нуклеозидов	121
4.9.2. Ингибирование PARP человека аналогами нуклеозидов в	
культуре клеток	_123
4.9.3. Влияние синтетических производных нуклеозидов – ингибиторов	
PARP на цитотоксичность доксорубицина в отношении	
кардиомиоцитов и опухолевых клеток	_127
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ	_130
	_136
7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	_137
Приложение А	_158
Благодарности_	164

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АП-сайт – Апуриновый/апиримидиновый сайт

АФА – Активные формы азотаАФК – Активные формы кислорода

ГР — Гомологичная рекомбинационная репарация хромосом

КФК – Креатинфосфокиназа **ЛДГ** – Лактатдегидрогеназа

НГР — Негомологичная рекомбинация в процессе соединения концов хромосом

ОС – Окислительный стресс **СОД** – Супероксиддисмутаза

СР – Саркоплазматический ретикулум
 УФ – Ультрафиолетовое излучение
 ФСБ – Фосфатно-солевой буфер

ЭР – Эндоплазматический ретикулум

ЭРН – Эксцизионная репарация нуклеотидовЭРО – Эксцизионная репарация оснований

AG – Аминогуанидин

AIF – Apoptosis-inducing factor (апоптоз-индуцирующий фактор)

ARC — Apoptosis repressor with caspase recruitment domen (репрессор апоптоза)

Bax — B-cell lymphoma 2-associated X protein (проапоптозный фактор)

Bcl-2 — B-cell lymphoma 2 protein (антиапоптозный фактор)

Bcl-XL – B-cell lymphoma – extra large protein (антиапоптозный фактор)

DCF – 2′,7′-дихлорфлуоресцеин

Dox – Доксорубицин

eIF5A — Эукариотический фактор инициации трансляции

Етх – Эмоксипин

eNOS — Эндотелиальная синтаза оксида азота

hrPARP-1 – Рекомбинантная поли(АДФ-рибоза)–полимераза-1 человека

iNOS – Индуцибельная синтаза оксида азота

MTP – Mitochondrial permeability transition pore (митохондриальная пора

проницаемости)

МТТ – 3-[4,5-Диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид

 NA
 – Никотинамид

 NAC
 – N-Ацетилцистеин

NFAT — Nuclear factor of activated T-cells (транскрипционный фактор)
NF-кВ — Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

(транскрипционный фактор)

РАRG — Поли(АДФ-рибоза)—гликогидролаза РАRР — Поли(АДФ-рибоза)—полимераза

STS — Стауроспорин **Thd** — Тимидин

TM — Tail moment (момент хвоста кометы)

TZ — Темозоломид **Urd** — Уридин

3-АВ — 3-Аминобензамид

4-ANI — 4-Амино-1,8-нафталимид **5-AIO** — 5-Аминоизохинолинон

∆Уm – Мембранный потенциал митохондрий

 $[{\bf Ca}^{2+}]_{\bf i}$ — Концентрация свободного цитозольного ${\bf Ca}^{2+}$

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Начиная с 70-х годов прошлого века в противоопухолевой терапии широкое распространение получили соединения антрациклинового ряда [9]. Наиболее известным препаратом этой фармакологической группы является доксорубицин (Dox). Он используется для лечения рака молочной железы, саркомы мягких тканей, агрессивных лимфом, а также твердых опухолей различного происхождения у детей [171]. Противоопухолевая активность Dox связана с его встраиванием (интеркаляцией) в ДНК, что приводит к нарушению транскрипции, ингибированию топоизомеразы II, активации белка р53 и индукции апоптоза [120, 171].

Главным ограничивающим фактором применения Dox в противоопухолевой терапии является его высокая кардиотоксичность [9, 171, 187]. Нарушения в работе сердечно-сосудистой системы, обусловленные действием Dox, могут приводить к развитию острой или хронической кардиомиопатии, а в крайних случаях – к тяжелой сердечной недостаточности и смерти [9]. Несмотря на продолжающиеся в течение последних десятилетий интенсивные исследования, молекулярные механизмы, посредством которых происходит повреждение кардиомиоцитов при действии Dox, еще не достаточно изучены, и во многом из-за этого до сих пор не выработаны эффективные подходы для лечения кардиомиопатий, вызываемых Dox и его аналогами.

Из-за большой фармакологической значимости Dox исследователями прикладываются огромные усилия по поиску действенных способов предотвращения или ослабления его кардиотоксичности [44]. В частности были опробованы подходы, заключающиеся в оптимизации дозы, применении липосомальных форм, использовании аналогов Dox с меньшей кардиотоксичностью, применении комбинированной терапии и использовании кардиопротекторов, преимущественно антиоксидантов [107, 130, 139, 237]. Однако ни один из предложенных подходов не привел к решению проблемы устранения высокой кардиотоксичности Dox. Особенно остро она стоит при лечении детей [8].

Кардиотоксическое действие Dox отличается от противоопухолевого, его связывают с повреждением митохондрий, дизрегуляцией обмена Ca²⁺, с увеличением экспрессии индуцибельной NO-синтазы, оксидативным и нитрозативным стрессами [171, 177, 187, 261]. В ряде исследований на животных было показано, что кардиотоксическое действие Dox может быть связано с системой поли(АДФ-рибозил)ирования, поскольку введение мышам ингибитора поли(АДФ-рибоза)-полимераз (PARP) значительно снижало

негативное воздействие Dox на физиологические показатели работы сердца и смертность животных [192, 193]. Однако молекулярные механизмы этого феномена не выяснены.

Поли(АДФ-рибозил)ирование является одной ИЗ разновидностей посттрансляционной модификации белков. Оно имеет большое значение для регуляции многих клеточных процессов, как в норме, так и в условиях патологии [66, 76]. Реакция поли(АДФ-рибозил)ирования осуществляется белками семейства PARP. Донором остатков АДФ-рибозы выступает НАД⁺. При этом доминирующая роль во всех процессах, связанных с поли(АДФ-рибозил)ированием белков, принадлежит ядерному белку PARP-1. Показано участие PARP-1 в таких клеточных процессах как репарация ДНК, реорганизация структуры хроматина, регуляция транскрипции и др. Влияние PARP-1 на эти процессы реализуется, главным образом, посредством поли(АДФ-рибозил)ирования разнообразных белков, таких как гистоны, топоизомеразы I и II, ДНК-лигазы I и II, ДНК полимеразы а и в, РНК-полимеразы I и II, р53, PCNA и др.; всего известно более 30 таких белков-мишеней [66, 254]. Базальная активность PARP-1 в клетке невысокая, однако, при возникновении повреждений ДНК активность PARP-1 возрастает многократно [138, 162, 197, 259]. В последнее время было обнаружено, что активность PARP-1 также регулируется посредством различных посттрансляционных модификаций: моно(АДФрибозил) ирования, фосфорилирования, ацетилирования и др. [99, 149]. PARP-1 играет важную роль в реализации различных механизмов клеточной гибели: некроза, аутофагии и каспаза-независимого апоптоза (партанатоза) [25, 266]. Активация PARP-1 также может приводить к развитию воспалительной реакции за счет усиления экспрессии различных провоспалительных генов [246]. Столь широкий спектр функций делает PARP-1 и всю систему поли(АДФ-рибозил)ирования белков перспективной мишенью для терапии ряда распространенных заболеваний, включая злокачественные новообразования [150], сердечно-сосудистые и нейродегенеративные заболевания, диабет и др. [195].

Поскольку применение ингибиторов PARP может быть весьма эффективным как снижения кардиотоксического действия Dox, так и для повышения ДЛЯ противоопухолевой активности, большой интерес представляет исследование поли(АДФ-рибозил)ирования вовлеченности системы белков В механизмы цитотоксического действия Dox в кардиомиоцитах и в опухолевых клетках.

Цель и задачи работы

Цель данной работы заключалась в выяснении роли системы поли(АДФрибозил)ирования белков в кардиотоксическом действии доксорубицина с применением клеточных экспериментальных моделей.

В ходе выполняемой работы планировалось решить следующие задачи:

- исследовать кинетику накопления и определить характер распределения Dox в культивируемых кардиомиоцитах крысы;
- изучить влияние Dox на уровни поли(АДФ-рибозы), активных форм кислорода и повреждений ДНК в культивируемых кардиомиоцитах крысы;
- исследовать влияние ингибиторов PARP, антиоксидантов и ингибиторов NOсинтазы на выживаемость культивируемых кардиомиоцитов при цитотоксическом действии на них Dox;
- установить возможные пути гибели кардиомиоцитов при цитотоксическом действии на них Dox и вовлеченность в них системы поли(АДФ-рибозил)ирования белков;
- исследовать влияние ингибиторов PARP на противоопухолевую активность Dox;
- определить PARP-ингибирующую активность ряда новых синтетических аналогов нуклеозидов и исследовать их влияние на кардиотоксическое действие Dox.

Научная новизна

На клеточной модели кардиотоксичности Dox (культура кардиомиобластов крысы H9c2, дифференцированных в кардиомиоциты) обнаружено временное возрастание уровня поли(АДФ-рибози)ированных ядерных белков после внесения повреждающего агента. Установлено, что этот процесс не связан с генерацией активных форм кислорода и окислительными повреждениями ДНК. Показано, что гибель кардиомиоцитов, вызванная действием Dox, не обусловлена развитием окислительного стресса и усилением экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS), поскольку антиоксиданты и ингибитор iNOS не оказывают защитного действия на клетки. Гибель кардиомиоцитов при действии Dox не связана с реализацией каспаза-зависимого апоптоза, т.к. не было обнаружено образования коротких, кратных 200 п.о., фрагментов ДНК. Было установлено, что при воздействии Dox в части кардиомиоцитов происходит запуск PARP-опосредованной гибели, поскольку ингибиторы PARP увеличивают выживаемость клеток, снижают внутриядерное накопления апоптоз-индуцирующего фактора AIF и степень фрагментации ДНК. При этом ингибиторы PARP не влияют на противоопухолевую активность Dox, что

было продемонстрировано в экспериментах на культивируемых клетках опухоли яичника человека SKOV-3. На основании полученных результатов был сделан вывод о том, что стимулируемая Dox активация поли(АДФ-рибоза)-полимераз запускает процессы, приводящие к каспаза-независимой гибели кардиомиоцитов - партанатозу.

Было обнаружено, что новые синтетические дисахаридные производные 2'дезокситимидина и 5-йод-2'-дезоксиуридина эффективно ингибируют PARP человека.
Уже по истечении одного часа инкубации они способны проникать в ядра клеток и
подавлять стимулированный ДНК-повреждающими агентами синтез поли(АДФ-рибозы).
Кроме того, было показано, что дисахаридное производное 2'-дезокситимидина оказывает
цитопротекторное действие на клеточной модели кардиотоксичности Dox.

Большинство из приведенных в работе результатов были получены и описаны впервые.

Теоретическая и практическая значимость

Данное исследование позволило выявить принципиально новый механизм кардиотоксического действия Dox и показало перспективность применения ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимераз в качестве кардиопротекторов при проведении химиотерапии злокачественных новообразований Dox и его аналогами. На клеточной модели кардиотоксичности Dox установлено, что вызываемая цитотоксическим действием Dox активация PARP запускает механизм каспаза-независимой гибели кардиомиоцитов – партанатоз. Обнаружено, что ингибиторы PARP способны эффективно ослаблять кардиотоксичность Dox, не снижая при этом его противоопухолевую активность.

Результаты анализа ингибирующего действия ряда новых дисахаридных нуклеозидов на активность PARP могут быть использованы для конструирования новых соединений с кардиопротекторным действием.

Методология и методы исследования

Для моделирования кардиотоксического действия Dox в данном исследовании использовали первичные культуры кардиомиоцитов, выделенных из новорожденных крыс, и культуры клеток линии H9c2 (кардиомиобласты крысы). В работе широко использованы методы работы с первичными и постоянными культурами клеток млекопитающих (культивирование, оценка жизнеспособности, получение первичных культур кардиомиоцитов). Значительная часть результатов была получена с применением флуоресцентной микроскопии: при анализе уровней поли(АДФ-рибозы), активных форм

кислорода, апоптоз-индуцирующего фактора, для исследования прижизненного накопления Dox и определения PARP-ингибирующей активности нуклеозидов. Степень повреждения ДНК количественно измеряли с применением ДНК-электрофореза и метода анализа ДНК-комет.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1. Система поли(АДФ-рибозил) ирования белков вовлечена в механизмы кардиотоксического действия Dox.
- 2. Вре́менное повышение уровня поли(АДФ-рибозил)ированных белков в кардиомиоцитах H9c2 при действии Dox не связано с окислительными повреждениями ЛНК.
- 3. Гибель кардиомиоцитов Н9с2 при действии Dox не обусловлена развитием окислительного стресса и не реализуется через механизмы каспаза-зависимого апоптоза.
- 4. Ингибиторы PARP защищают кардиомиоциты H9c2 от повреждающего действия на них Dox.
- 5. PARP-зависимая гибель кардиомиоцитов H9c2 при действии Dox реализуется по механизму партанатоза.
- 6. Дисахаридные пиримидиновые нуклеозиды являются принципиально новой группой проникающих в клетку синтетических ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимераз.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов диссертационной работы основана на применении стандартных, широко используемых методик и сертифицированных приборов, а также корректной, общепринятой статистической обработки результатов измерений. Для проверки воспроизводимости получаемых данных все эксперименты выполнялись несколько раз. Полученные результаты сравнивали и соотносили с известными литературными данными. Сформулированные выводы полностью основаны на полученном фактическом материале.

Основные результаты работы были представлены на VII Международной конференции «Молекулярная генетика соматических клеток» (Звенигород, 2009), 5-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Московская область, 2010), XVI Всероссийском симпозиуме «Структура и функции клеточного ядра» (Санкт-Петербург, 2010), 4-ой Международной конференции молодых ученых "Molecular biology: advances and perspectives" (Киев, 2011), 38-ом Конгрессе FEBS (Санкт-Петербург, 2013), VII Российском симпозиуме «Белки и

пептиды» (Новосибирск, Академгородок, 2015) и 6-ой Международной конференции «Биологические основы индивидуальной чувствительности к психотропным средствам» (Московская область, 2015).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 10 печатных работ: 3 статьи в рецензируемых научных журналах и 7 тезисов докладов в сборниках трудов научных конференций.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Кардиотоксическое действие антрациклиновых антибиотиков

2.1.1. Общая характеристика и фармакологические свойства антрациклиновых антибиотиков

Антрациклиновые антибиотики это фармакологическая группа противоопухолевых лекарственных соединений природного, синтетического полусинтетического происхождения. Природные антрациклины продуцируются микроорганизмами Streptomyces coeruleorubidus, Streptomyces peucetius, Actinomadura carminata и др. С химической точки зрения антрациклиновые антибиотики являются агликоновый остаток которых представляет гликозидами, собой тетрагидронафтаценхинон (антрациклинон), а углеводный - аминосахар, как правило, даунозамин. Благодаря такому строению антрациклины имеют характерный желтый или красный цвет. Даунорубицин является первым представителем группы антрациклиновых антибиотиков, изученным в качестве фармакологического вещества. Его структура была установлена в 1959 г. Фармакологическая группа антрациклиновых антибиотиков включает целый ряд препаратов, действующим веществом в которых являются даунорубицин, доксорубицин, идарубицин, эпирубицин И Эти соединения др. различаются структурой заместителей в остатке агликона и/или углевода [171, 229] (рис. 2.1).

Рисунок 2.1. Химическая структура наиболее распространенных антрациклиновых антибиотиков [229]. Различия в структурах обозначены стрелками.

Учитывая высокую эффективность в лечении значительного числа опухолей, антрациклины остаются одними из наиболее распространенных препаратов, используемых в онкологической практике, в частности в детской онкологии [8].

Доксорубицин оказался наиболее востребованным в медицине антрациклиновым антибиотиком. Прежде всего. это обусловлено широким спектром его противоопухолевого действия. Этот эффективный и доступный препарат является производным природного антибиотика даунорубицина. Он успешно используется при лечении рака молочной железы, саркомы мягких тканей, агрессивных лимфом, гемобластозов, адъювантной и неоадъювантной химиотерапии твердых опухолей у детей [171]. Идарубицин – синтетическое производное даунорубицина. Препараты на его основе являются эффективными средствами при лейкозах. Идарубицин, по сравнению с доксорубицином, обладает меньшей кардиотоксичностью. Эпирубицин полусинтетическим аналогом доксорубицина, получаемым эпимеризации путем доксорубицина (противоположное пространственное расположение гидроксильной группы в 4-ом положении аминосахара). Токсичность эпирубицина ниже, чем у доксорубицина [171].

Недавно на примере Dox был раскрыт механизм, с помощью которого происходит транспорт антрациклинов в клетку и ядро. Сначала Dox путем простой диффузии проникает в опухолевые клетки и связывается в цитоплазме с протеасомой. Образованный прочный комплекс Dox-протеасома транслоцируется через ядерные поры в ядро и после диссоциации комплекса, Dox встраивается (интеркалирует) в ДНК [126].

Несмотря на широкое клиническое применение, механизмы цитотоксического действия антрациклинов на опухолевые клетки до конца не ясны и являются предметом дискуссий. В литературе обсуждаются следующие возможные механизмы:

- подавление синтеза ДНК и РНК вследствие интеркаляции антрациклинов в ДНК;
- инициация повреждений ДНК через ингибирование топоизомеразы II и последующий запуск апоптоза;
- генерация свободных радикалов, повреждение ДНК, перекисное окисление липидов;
- активация р53 и запуск апоптоза;
- нарушение раскручивания ДНК (и разделения нитей ДНК) из-за влияния на активность хеликазы.

Подробно эти механизмы рассмотрены в ряде обзоров [93, 209, 229].

Основные проявления побочного действия антрациклинов типичны для большинства противоопухолевых препаратов – тошнота и рвота, подавление функции

костного мозга, повреждение волосяных фолликулов и эпителия слизистой оболочки кишечника, а также подавление репродуктивных функций и др. [8]. Характерной особенностью Dox и других антрациклиновых антибиотиков является их сильное кардиотоксическое действие. Дозозависимое нарушение функции сердечной мышцы считается самым значительным фактором, который ограничивает применение этих препаратов [6, 9, 171, 187]. Острая и особенно хроническая кардиотоксичность Dox приводит в конечном итоге к дилатационной кардиомиопатии и смерти. При кардиомиопатии происходит структурное и функциональное изменение сердечной мышцы в отсутствии патологии коронарных артерий, артериальной гипертензии и поражения клапанного аппарата. Рассматривают следующие факторы риска развития патологий сердца при применении Dox:

- достижение кумулятивной дозы препарата 550 мг/м² и выше;
- возраст (до 3 и после 65 лет);
- одновременное применение лучевой терапии;
- одновременное введение других кардиотоксических агентов;
- женский пол;
- сопутствующая сердечно-сосудистая патология и др. [9, 187].

Случаи развития хронической сердечной недостаточности были зарегистрированы также после получения суммарной дозы препарата, которая была в два раза ниже критической [6]. Показано, что у людей, перенесших курс противоопухолевой терапии с применением антрациклинов, через 5 лет риск смерти, связанный с патологией сердца, почти в 10 раз превышает данный показатель для всей популяции [7]. Это также характерно и для 60 % выживших после излечения рака детей, получавших препараты антрациклинового ряда [8]. Принимая во внимание все эти факты, поиск эффективных методов профилактики и смягчения кардиотоксического действия антрациклинов является чрезвычайно актуальной задачей.

2.1.2. Механизмы кардиотоксического действия доксорубицина

Для определения эффективных подходов кардиопротекторной терапии во время и после применения Dox необходимы знания о природе его кардиотоксичности. Однако, несмотря на продолжающиеся уже в течение десятилетий интенсивные исследования кардиотоксичности Dox, все молекулярные механизмы, посредством которых происходит повреждение кардиомиоцитов при использовании этого генотоксического агента, до сих пор не установлены [8]. На основе имеющихся в литературе данных можно выделить несколько возможных механизмов, лежащих в основе кардиотоксичности Dox (рис. 2.2).

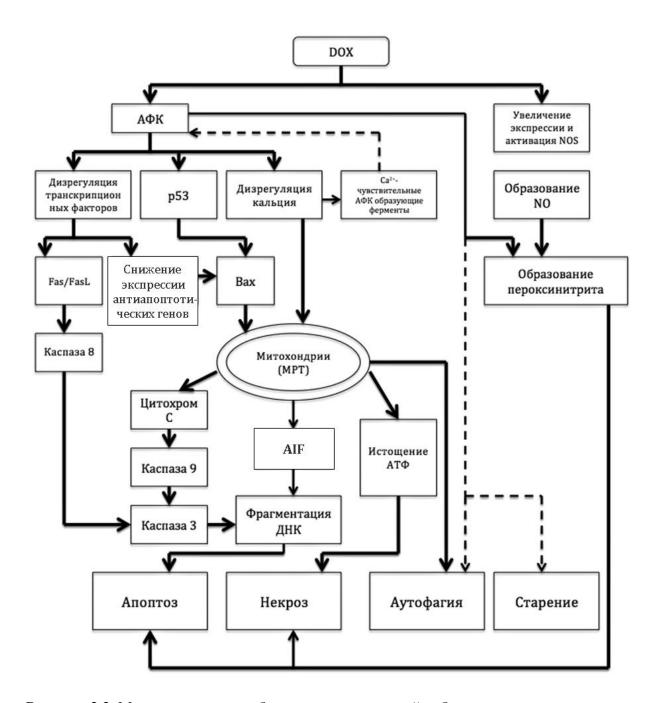


Рисунок 2.2. Механизмы доксорубицин-индуцированной гибели кардиомиоцитов.

Механизмы клеточной гибели включают апоптоз, некроз и аутофагию. Сплошными линиями выделены основные механизмы гибели, пунктирными – альтернативные пути [280, с изменениями].

Накапливаясь в кардиомиоцитах, Dox может вызывать в них оксидативный и нитрозативный стрессы, дизрегуляцию уровня внутриклеточного кальция, патологические изменения в работе митохондрий, селективное ингибирование экспрессии кардиомиоцитспецифических генов, что, в конечном счете, приводит к активации механизмов гибели клеток [171, 187, 280]. Растет число доказательств того, что вызываемая Dox гибель кардиомиоцитов протекает преимущественно по пути апоптоза, и что это является

основной причиной развития кардиомиопатии [148, 177, 217, 251, 280]. Гибель кардиомиоцитов по пути некроза или аутофагии, а также развитие патологических изменений, характерных для старения, при терапии Dox также происходят, но с меньшей вероятностью [280].

Роль митохондрий в кардиотоксическом действии доксорубицина

Считается, что повышенная чувствительность кардиомиоцитов к Dox, в отличие от особенностями других ТИПОВ клеток, связана cнекоторыми митохондрий кардиомиоцитов. На наружной поверхности внутренней мембраны митохондрий кардиомиоцитов обнаружена уникальная НАДН-дегидрогеназа (в дополнение к матриксной НАДН-дегидрогеназе). Молекула Dox, в силу своей гидрофильности, не способна внутреннюю мембрану митохондрий. проникать через Однако кардиомиоцитах «дополнительная» НАДН-дегидрогеназа восстанавливает Dox семихинона, внутримолекулярных перегруппировок радикалов которые после превращаются в липофильные соединения, способные проникать в матрикс митохондрий [62, 221] и вызывать оксидативный/нитрозативный стресс [141, 173, 177, 192, 193].

Предполагают, что молекула Dox может подвергаться одноэлектронному окислению по пара-гидроксильному остатку (p-OH) с участием иона двухвалентной меди (Cu (II)), результате чего образуется ион одновалентной меди (Cu(I)) и окисленная форма радикала семихинона (рис. 2.3). Одновалентные ионы меди при взаимодействии с молекулярным кислородом способны генерировать супероксид анион радикала (O_2 •-). На следующем этапе фермент супероксиддисмутаза (СОД) восстанавливает O_2 •- в пероксид водорода (O_2 0). Далее при участии ионов восстановленного железа, которыми насыщены митохондрии, O_2 1 превращается в крайне токсичное соединение - гидроксильный радикал (O_2 1) [62, 173].

Помимо окисления, Dox может подвергаться одноэлектронному восстановлению по остатку р-хинона под действием НАДФН-цитохром P450 редуктазы или НАДН-дегидрогеназы. Этот восстановленный радикал семихинона может реагировать с кислородом с образованием O₂•-, который на следующих этапах превращается в H₂O₂ и •OH согласно описанной выше схеме [173, 177, 261]. Показано, что Dox образует комплекс с кардиолипином на внутренней мембране митохондрий кардиомиоцитов, где он восстанавливается НАДН-дегидрогеназой в радикал семихинона [261].

Было показано, что редуктазный домен эндотелиальной синтазы оксида азота (eNOS) способен преобразовывать Dox в радикал семихинона, что также может приводить

к образованию АФК [181]. Кроме того, повреждения митохондриальной ДНК, вызванные АФК или непосредственно Dox, в дальнейшем приводят к нарушению работы дыхательной цепи и генерации АФК [139, 280].

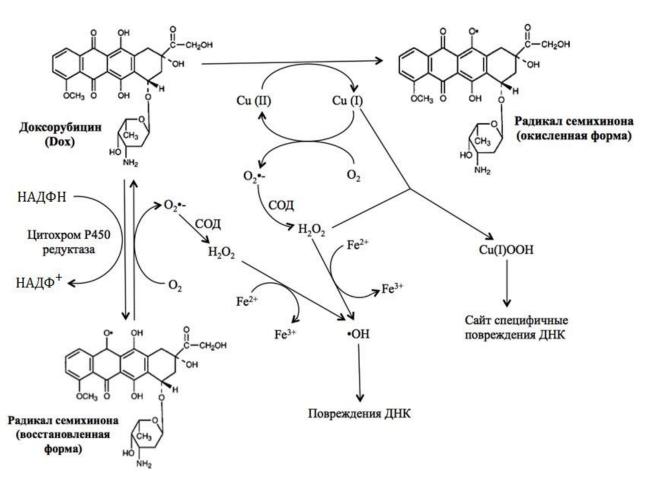


Рисунок 2.3. Пути генерации АФК и повреждений ДНК в кардиомиоцитах при накоплении в них доксорубицина [173, с изменениями]. Пояснения приведены в тексте.

В некоторых исследованиях было показано, что основным источником образования O_2 -- после воздействия Dox являются митохондрии. АФК образуются в митохондриях как продукт окислительного фосфорилирования и в норме (в низких концентрациях), участвуя в различных внутриклеточных сигнальных путях. Однако при нарушении работы митохондрий АФК могут образовываться в избытке, и в этом случае они уже могут выступать в качестве проапоптотического фактора [251]. Существуют данные, что увеличение генерации АФК митохондриями при воздействии Dox может происходить посредством гиперэкспрессии эукариотического фактора инициации трансляции 5A (eIF5A). Предполагают, что eIF5A может регулировать внутримитохондриальную концентрацию двухвалентных катионов, таких как Ca^{2+} . Образование $A\Phi K$ может быть связано с внутриклеточным накоплением Ca^{2+} . В некоторых типах клеток млекопитающих

eIF5A является РНК-связывающим белком, который индуцирует апоптоз [251].

В других работах было показано, что АФК не являются основными медиаторами митохондриальной фазы Dox-индуцированного апоптоза в кардиомиоцитах, а наиболее вероятным триггером гибели клетки является пероксинитрит (ONOO¯) - сильный окислитель, способный вызывать повреждения различных биомолекул, в том числе ДНК и белков. Образование ONOO¯ *in vivo* происходит в результате взаимодействия O₂•- и оксида азота (NO). NO в норме выполняет роль сигнальной молекулы. В организме синтез NO осуществляется ферментами NO-синтазами (NOS). Было показано, что Dox приводил к увеличению экспрессии индуцибельной NO-синтазы (iNOS), и, как следствие, - к гиперпродукции NO. Образование избыточного количества пероксинитрита может привести к изменениям митохондриальной энергетики и гомеостаза Ca²+, падению мембранного потенциала митохондрий (ΔΨm), открытию митохондриальных пор проницаемости (MPT) и высвобождению цитохрома с и апоптоз-индуцирующего фактора (AIF – арорtosis-inducing factor), которые опосредуют соответственно каспаза-зависимый и каспаза-независимый апоптоза [177, 181].

Активация доксорубицином апоптотических процессов в кардиомиоцитах

Было показано, что обработка культуры клеток Н9с2 (кардиомиобласты крысы) Дох приводила к фрагментации ДНК, конденсации хроматина и сжатию ядер, что характерно для апоптоза [217, 274, 280]. Апоптоз является высококонсервативной, жестко регулируемой, энергозависимой формой клеточной гибели. Апоптоз может протекать по внешнему или внутреннему сигнальным путям. Во внешнем пути, связывание лигандов «смерти» (FasL, TNF, TRAIL) со своими рецепторами вызывает активацию инициаторной каспазы-8, которая на следующем этапе активирует эффекторные каспазы, такие как каспаза-3 (рис. 2.2). Внутренний путь опосредован высвобождением из митохондрий цитохрома с; этот процесс находится под контролем белков семейства Вс1-2. Внешний и внутренний механизмы апоптоза пересекаются на этапе активации каспаз-3,-6 и -7. Эти два основных сигнальных пути апоптоза являются эволюционно консервативными. Однако точные молекулярные события, через которые реализуется тот или иной путь гибели, могут различаться в зависимости от типа клеток, стимула и других факторов [262, 280].

Основной сигнальный путь запуска апоптоза в кардиомиоцитах при действии Dox по-прежнему не установлен. Механизмы апоптоза кардиомиоцитов при острой и хронической Dox-индуцированной кардиотоксичности были изучены как на животных,

так и на клеточных моделях (табл. 2.1). Стоит отметить, что в этих исследованиях применялись разные протоколы эксперимента (схемы введения препарата, дозы препарата и др.), ввиду чего полученные количественные результаты трудно было сравнивать [280].

Таблица 2.1. Патологические процессы, приводящие к доксорубицин-индуцированному апоптозу кардиомиоцитов [280, с некоторыми изменениями].

Патологические процессы	Объект исследования	Ссылка
Увеличение [Ca ²⁺] _i , дисфункция	Крысы, мыши	[122, 250]
митохондрий	Кардиомиоциты взрослых крыс	
Дизрегуляция белков, связанных с	Мыши	[217]
апоптозом: p53, семейство белков Bcl-2	Кардиомиоциты взрослых крыс,	
и др.	кардиомиобласты крысы Н9с2	
Дизрегуляция транскрипционных	Крысы, мыши	[15, 26, 114,
факторов/ коактиваторов: GATA-4, NF-	Кардиомиоциты новорожденных	123]
кВ, NFAT, р300 и др.	крыс, кардиомиобласты крысы	
	H9c2	
Активация каспаза-12-опосредованного	Крысы	[112]
СР-пути апоптоза		
Накопление церамида	Кардиомиоциты новорожденных	[28, 196]
	крыс	
Снижение экспрессии ARC	Кардиомиоциты новорожденных	[23]
	крыс	
Увеличение экспрессии NOS	Мыши	[177, 181]
	Кардиомиобласты крысы Н9с2	

Введение животным Dox приводит к увеличению уровня AФК в кардиомиоцитах и к развитию окислительного стресса (см. выше). Это, в свою очередь, вызывает увеличение в клетке концентрации свободных ионов кальция ([Ca²+]_i) за счет нарушения системы откачки Ca²+ из клетки и высвобождения его из саркоплазматического ретикулума (СР) через открытие рианодиновых рецепторов [122, 250]. В кардиомиоцитах митохондрии находятся вблизи от Ca²+-высвобождающих сайтов СР и, поэтому, могут захватить большое количество высвобождаемых ионов кальция. В связи с существенным повышением уровня AФК, содержание Ca²+ в митохондриях многократно увеличивается. Эта перегрузка митохондрий Ca²+ вызывает открытие митохондриальной поры проницаемости (МРТ), в результате чего происходит падение митохондриального мембранного потенциала, набухание митохондрий, разрыв внешней митохондриальной мембраны, и, следовательно, высвобождение цитохрома с и AIF из митохондрий (см. табл. 2.1 и рис. 2.2) [59, 274].

Существуют разные мнения относительно того, каким образом и по каким механизмам развиваются апоптотические процессы в кардиомиоцитах при токсическом воздействии Dox. Некоторые авторы считают, что апоптотическая программа реализуется с участием каспаз [114, 177], тогда как другие это отрицают и рассматривают в качестве основного р53-зависимый путь [141, 148, 217, 274]. В ряде исследований было показано, что активация каспаз не является решающей для апоптоза кардиомиоцитов, вызванного Dox, поскольку использование универсального ингибитора каспаз z-VAD.FMK не предотвращало гибель клеток. На основе этих данных предположили, что Dox активирует в кардиомиоцитах каспаза-независимый, предположительно р53-зависимый путь апоптоза [274]. Dox довольно быстро проникает в ядро и уже через 2-3 ч после внесения в культуру кардиомиоцитов вызывает повреждения ДНК. Белок р53 (фактор транскрипции и опухолевый супрессор) выполняет важную роль в генерации клеточного ответа на определенные типы повреждений ДНК. В ситуациях, когда целостность ДНК сильно нарушена, р53 участвует в активации белков, ответственных за остановку клеточного цикла, репарацию ДНК и апоптоз. В ряде исследований было показано, что Doxиндуцированный апоптоз кардиомиоцитов связан с активацией белка р53 и повышенной экспрессией кодирующего его гена [141, 148]. Также были получены данные, свидетельствующие о том, что Dox способен подавлять синтез ДНК и вызывать остановку клеточного цикла в клетках Н9с2 [217].

Повреждения ДНК, вызванные как непосредственно Dox, так и генерируемыми им АФК, вызывают: 1)- активацию киназ ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinase), которые участвуют в регуляции пролиферации и постмитотических функций в дифференцированных клетках; 2)- повышение фосфорилирования p53; 3)- повышение экспрессии генов, регулируемых p53, таких как *Вах* и *Мdm*2. В результате активируется внутренний (митохондриально-зависимый) путь апоптоза. [148, 217, 280]. Белок Вах в норме находится в цитоплазме, а при появлении апоптогенных сигналах он перемещается к поверхности митохондриальной мембраны. После взаимодействия с интегральным белком наружной мембраны митохондрий VDAC (voltage-dependent anion channel) Вах стимулирует его открытие. Через образовавшийся канал в цитоплазму высвобождается цитохром с, который, активирует каспазный путь (каспаза-9 → каспаза-3), приводящий к гибели клеток [59, 262, 280]. Белок Мdm2, является природным ингибитором p53. Он связывается с *N*-концевым доменом p53 и действует как убиквитин-лигаза, вызывая протеолиз p53 протеасомой 26S. Существует отрицательная обратная связь в регуляции p53: p53 увеличивает экспрессию белка Mdm2, который в свою очередь увеличивает

деградацию белка p53. Как известно, Dox стимулирует фосфорилирование p53 по остатку Ser15, что играет важную poль в трансактивации этого белка. Оно также препятствует взаимодействию p53 с Mdm2 и, тем самым, предотвращает деградацию p53 [148].

Было показано, что фактор транскрипции GATA-4 является критическим фактором для сердца в период развития, и способствует выживаемости организма в послеродовой период [26]. GATA-4 транскрипционно регулирует апоптоз через активацию антиапоптотического гена *Bcl-XL* (B-cell lymphoma-extra large), обеспечивая таким образом нормальное функционирование митохондрий. Истощение GATA-4 является одним из наиболее ранних ответов кардиомиоцитов новорожденных на цитотоксическое действие Dox и вероятной причиной индукции апоптоза кардиомиоцитов [26, 123].

Еще один механизм токсичности может быть связан с изменением внутриклеточного содержания/активности белка р300 - транскрипционного коактиватора, необходимого для поддержания дифференцированного фенотипа кардиомиоцитов. Было показано, что мРНК белка р300 не обнаруживается в сердце мышей после введения Dox. Интересно, что гиперэкспрессия белка р300 в кардиомиоцитах может предотвращать Doxиндуцированный апоптоз и сердечную дисфункцию, предположительно за счет повышения концентрации белков Bcl-2 и Mdm2 [207].

Кроме того, при воздействии Dox наблюдали снижение концентрации мРНК белка ARC (apoptosis repressor with caspase recruitment domen) в сердце мышей и в культуре кардиомиоцитов новорожденных крыс. ARC является эндогенным ингибитором апоптоза, он «отключает» внутренний путь апоптоза, предотвращая транслокацию Bax в митохондрии или связываясь с компонентами внешнего пути апоптоза, такими как Fas, FADD, и каспазой-8. Стимулированная экспрессия ARC заметно ослабляет Doxиндуцированный апоптоз кардиомиоцитов, предотвращая активацию митохондриального пути гибели кардиомиоцитов [23].

Dox-индуцированное повышение внутриклеточного содержания церамида может также способствовать апоптозу кардиомиоцитов за счет их фрагментации, увеличения проницаемости внешней мембраны митохондрий и высвобождения цитохрома с [196].

Хотя кардиомиоциты, как правило, устойчивы к Fas-индуцированному апоптозу (внешнему пути апоптоза), были получены данные, свидетельствующие о том, что этот путь гибели тоже возможен в условиях Dox-индуцированной кардиомиопатии. Известно, что Fas-лиганд (FasL) взаимодействует с Fas-рецепторами на поверхности мембран клеток и таким образом происходит запуск внешнего пути апоптоза. Встраивание в кардиомиоциты экспрессионной системы для синтеза растворимого Fas (sFas;

конкурентный ингибитор FasL) ослабляло кардиотоксичность Dox, благодаря ингибированию апоптоза [183].

В других исследованиях было показано, что при обработке культивируемых кардиомиоцитов крысы Dox, после усиления генерации АФК в митохондриях, активируется кальций/кальцинейрин сигнальный путь, а затем - ядерный фактор активации Т-клеток 4 (NFAT4), который приводит к формированию комплекса Fas/FasL, запускающему апоптоз [114]. Транскрипционный фактор NF-kB активируется при увеличении уровня АФК в обработанных Dox кардиомиоцитах новорожденных крыс и оказывает проапоптическое действие через прямую активацию экспрессии генов апоптоза, в том числе FasL, Fas и p53 [123, 262, 280]. При токсическом воздействии Dox in vivo был опосредованный также обнаружен ПУТЬ апоптоза, эндоплазматическим/ саркоплазматическим ретикулумом (ЭР/СР). Показано, что при введении крысам Dox в кардиомиоцитах происходит активация кальпаинами каспазы-12 - необходимого компонента СР-пути апоптоза [112].

Таким образом, проведенный анализ литературы указывает на существование, по крайней мере, нескольких, возможных путей и механизмов Dox-индуцированного апоптоза кардиомиоцитов.

Активация доксорубицином аутофагии и некроза

Значительно меньше в литературе данных, касающихся стимуляции Dox других типов клеточной гибели – аутофагии и некроза. Аутофагия является строго регулируемым динамическим процессом. При аутофагии происходит деградация цитозольных белков и поглощения двухмембранными ИХ везикулами, аутофагосомами, которые затем сливаются с лизосомами. Аутофагия, при определенных условиях является механизмом выживаемости клетки, она запускается при стрессовых условиях (например, при голодании) и позволяет повторно использовать клеточный материал. Аутофагия также является наиболее распространенным механизмом обновления клеточных компонентов в миокарде и существенно усиливается при патологических состояниях, в том числе при гипертрофии сердца, кардиомиопатии и сердечной недостаточности. Проведенные исследования показывают, что при стрессе аутофагия в кардиомиоцитах может играть как положительную, так и отрицательную роль: с одной стороны, удаление белковых агрегатов и поврежденных органелл способствует выживанию клеток и поддержанию энергетического гомеостаза, а с другой, значительное усиление аутофагии может привести к гибели клеток сердца [253]. Хотя ранее и не сообщалось о том, что Dox-индуцированная кардиотоксичность связана с усилением аутофагии, вполне можно допустить наличие и этого пути гибели кардиомиоцитов [280]. Предполагают, что в условиях умеренного стресса, вызванного влиянием Dox, индукция аутофагии позволяет клетке удалять поврежденные компоненты цитоплазмы. При умеренном стрессе происходит запуск «внутреннего пути» апоптоза, а при сильном - нарушение функционирования митохондрий, истощение ATФ и запуск некроза. Чрезмерная аутофагия, вызванная тяжелыми повреждениями внутриклеточных структур, может привести к высвобождению лизосомальных ферментов или других факторов, вызывающих гибель клеток по одному из перечисленных путей. Также было показано, что некоторые связанные с апоптозом белки, такие как p53, играют важную роль и в аутофагии [155].

Некроз обычно описывается как неконтролируемый, энергетически-независимый сопровождаемый разрывом плазматической мембраны набуханием процесс, И цитоплазматических органелл, в частности – митохондрий [280]. Во многих исследованиях было показано, что введение лабораторным животным Dox приводит к усилению в сердце воспалительных процессов (экспрессии провоспалительных цитокинов, инфильтрации нейтрофилов) и некрозу [107, 143]. Окислительный стресс приводит к некротической гибели кардиомиоцитов, а использование ловушек свободных радикалов защищает кардиомиоциты от некроза, вызванного действием антрациклинов [107]. Нарушение гомеостаза ионов кальция в клетке, повреждение митохондриальной ДНК, дисфункция митохондрий и перекисное окисление липидов – все эти события способствуют развитию некротических процессов в клетке и могут быть решающими факторами в развитии и прогрессировании кардиомиопатии, связанной с применением Dox [139, 238, 261]. Кроме того, на ранних сроках воздействия Dox на кардиомиоциты происходит активация Ca^{2+} -зависимых протеаз – кальпаинов, в результате запускается процесс деградации миофиламентов и некроз [146].

Все три типа гибели клеток (апоптоз, аутофагия и некроз) могут обнаруживаться на разных этапах развития Dox-индуцированной кардиомиопатии (см. рис. 2.2) [280]. Есть много подтверждений взаимосвязи аутофагии, апоптоза и некроза. В частности известно, что белки семейства Bcl-2 участвуют в перекрещивании апоптоза и аутофагии [142, 155].

Индукция доксорубицином клеточного старения

Известно, что с возрастом усиливаются процессы, приводящие к нарушению целостности генома. Это связано как с увеличенной продукцией АФК, так и со снижением

эффективности антиоксидантной защиты и систем поддержания стабильности генома. Старение затрагивает в основном долгоживущие постмитотические клетки, такие как нейроны и кардиомиоциты [14]. Молекулярные и клеточные пути управления старением включают укорочение теломерных участков хромосом, накопление повреждений ДНК, а также повышенную экспрессию ингибиторов клеточного цикла - p16INK4a и p53. Известные факторы, влияющие на старение кардиомиоцитов, включают окислительный стресс, изменение экспрессии генов или мутации в них, воспаление, снижение эффективности репарации, изменения клеточного метаболизма, изменение механизма деградации белков и механизма аутофагии и др. (см. рис. 2.2) [35]. Старение кардиомиоцитов может играть определенную роль в «скрытом» Dox-индуцированном повреждении сердца, проявляющемся клинически через много лет после окончания лечения. Также было показано, что культивируемые изолированные кардиомиоциты из новорожденных крыс после инкубации с Dox, становились похожими на кардиомиоциты старых крыс. В них возрастала активность β-галактозидазы (маркер клеточного старения), увеличивалась экспрессия ингибиторов клеточного цикла, снижались фосфорилирование тропонина I сердца и активность теломеразы [153]. Сделано предположение, что окислительный стресс и ацетилирование р53 могут быть также вовлечены в процесс Doxиндуцированного старения кардиомиоцитов.

Возрастные особенности кардиочувствительности к доксорубицину

Как известно из клинических исследований, дети и подростки особенно чувствительны к кардиотоксическому действию антрациклинов. В этой группе больных после лечения Dox наблюдаются нарушение роста сердца (уменьшается вес левого желудочка сердца по сравнению со здоровыми детьми) и кардиомиопатии через год и более после прекращения химиотерапии [147].

В опытах на мышах было показано, что после введения Dox неполовозрелым животным наблюдается атрофия кардиомиоцитов, что может вызывать дисфункцию сердца. Изменение транскрипционной активности ряда генов в миокарде в ответ на воздействие Dox также может стать причиной большей уязвимости сердца новорожденных по сравнению с сердцем взрослых особей [15].

Различная восприимчивость кардиомиоцитов молодых и взрослых особей к Dox вероятно связана с разными уровнями экспрессии ряда критических для апоптоза генов. В недавних исследованиях *in vitro* было обнаружено, что у взрослых и незрелых особей Dox-индуцированная гибель кардиомиоцитов может протекать по разным

механизмам/путям. Внутренний путь апоптоза был более характерен для кардиомиоцитов молодых животных, что может объяснить их более высокую чувствительность к Dox [128]. Мадден с коллегами на модели *in vivo* (мыши) в ряде органов (сердце, мозге, скелетных мышцах) было выявлено снижение с возрастом уровней белков внутреннего пути апоптоза [152], что, в определенной мере, может обеспечивать более высокую устойчивость зрелых кардиомиоцитов к Dox. Также после воздействия Dox на кардиомиоциты новорожденных крыс наблюдается истощение транскрипционного фактора GATA-4 (см. выше), что, в свою очередь, стимулирует апоптоз кардиомиоцитов [26, 123].

Учитывая уникальные свойства кардиомиоцитов в постнатальный период развития, важно выяснить детально молекулярные события, связанные с Dox-индуцированным апоптозом кардиомиоцитов в этой возрастной группе.

2.1.3. Разработка подходов для снижения кардиотоксического действия доксорубицина

Из-за фармакологической значимости Dox для лечения многих видов рака, были приложены огромные усилия по поиску действенных способов предотвращения или ослабления проявляемых им побочных эффектов. Предложенные подходы включали оптимизацию дозы, применение липосомальных форм, использование аналогов и применение в составе комбинированной терапии [130, 273]. Использование альтернативных способов доставки Dox не привело к увеличению его безопасности. Кроме того, несколько исследованных аналогов Dox не показали большую противоопухолевую эффективность или меньшую кардиотоксичность, по сравнению с Dox [209]. Еще один перспективный подход заключается в удалении избыточных количеств антрациклинов или предотвращение их накопления в сердце. Некоторые другие подходы для снижения Dox-индуцированной кардиомиопатии приведены в табл. 2.2.

Использование ловушек активных форм кислорода и пероксинитрита

Поскольку образование АФК и пероксинитрита в большинстве исследований считается основным механизмом Dox-индуцированной кардиотоксичности, становится очевидным применение для кардиопротекции подхода, основанного на использовании антиоксидантов и ловушек свободных радикалов. Так, например, было показано, что обработка кардиомиоцитов амифостином (ловушка свободных радикалов) снижала уровень повреждений ДНК, вызванных Dox. Карведилол (блокатор адренергических рецепторов с мощной антиоксидантной активностью) снижает Dox-индуцированное

образование АФК и апоптоз [28, 151, 240]. Декстразоксан (внутриклеточный хелатор железа) защищает митохондрии сердца от повреждений, индуцированных Dox, за счет нейтрализации ионов железа и предотвращения образования гидроксильных радикалов [139]. Флавоноиды способствуют снижению кардиотоксичности Dox у мышей и, при этом, не влияют на его противоопухолевое действие [209]. Также было показано, что витамины С и Е и некоторые производные витамина С (антиоксиданты) способствовали увеличению выживаемости животных после введения им Dox, а также снижали уровень перекисного окисления липидов [209]. Хотя в исследовании на культурах кардиомиоцитов Н9с2 витамин Е и тролокс (аналог витамина Е) не предотвращали гибель клеток, вызванную Dox [217].

Убихинон (коэнзим Q) является компонентом дыхательной цепи митохондрий. Кроме того, находясь в составе биологических мембран и липопротеидов, коэнзим О действует как жирорастворимый антиоксидант. Поскольку митохондрии – одна из потенциальных мишеней кардиотоксического действия Dox, логично было предположить, что коэнзим О может снижать токсичность Dox. В ранних исследованиях было показано, что Dox ингибирует митохондриальное дыхание, а коэнзим Q частично предотвращает это ингибирование. По сравнению с витамином Е коэнзим Q менее эффективно защищал кардиомиоциты мыши (в культуре) от перекисного окисления липидов, вызванного [209], но более эффективно улучшал действием Dox сердечную перфузию, сократительную функцию левого желудочка и другие функциональные показатели работы сердца [62]. Витамин А (антиоксидант) не оказывал существенного влияния на токсичность Dox [209], а N-ацетилцистеин (NAC) лишь незначительно снижал кардиотоксическое действие Dox [217]. Индуцируемые Dox повреждения ДНК в кардиомиоцитах не могут быть связаны исключительно с действием генерируемых АФК, так как было замечено, что такого рода повреждения (вызванные обработкой клеток H₂O₂) в культуре клеток Н9с2 были полностью зарепарированы вскоре после удаления источника АФК, в то время как повреждения ДНК, вызванные Dox, оставались не репарированными в течение длительного времени [141]. Таким образом, окислительный стресс не является единственной и основной причиной гибели кардиомиоцитов, вызванной Dox.

Было показано, что после введения Dox у мышей в мышечной ткани сердца происходит накопление остатков 3-нитротирозина, являющегося маркером нитрозативного стресса. Увеличение образования 3-нитротирозина, скорее всего, происходит из-за повышенного эндогенного образования пероксинитрита. Введение

мышам ловушек пероксинитрита FeTMPyP (комплекс железо(III)- α , β , γ , δ -тетракис(4-N-метилпиридил)порфирин) или MnTMTPyP (комплекс марганец(III)- α , β , γ , δ -тетракис(4-N-метилпиридил)порфирин) существенно снижало патологические изменения миокарда, вызванные действием Dox [177]. В этом же исследовании было показано, что Dox вызывает гибель клеток H9c2 по пути апоптоза или некроза, а введение ловушек пероксинитрита снижало процент апоптотических и некротических клеток после обработки их Dox практически до контрольного уровня.

Таблица 2.2. Подходы для снижения доксорубицин-индуцированной кардиомиопатии.

Подходы	Потенциальные кардиопротекторы
Применение антиоксидантов	Карведилол [28, 151 240]
	Декстразоксан [139]
	Флаваноиды [209]
	Витамин С [209]
	Витамин Е [209, 217]
	Тролокс [217]
	Витамин А [209]
	<i>N</i> -ацетилцистеин [217]
Применение ловушек свободных	Амифостин [81]
радикалов и пероксинитрита	FeTMPyP [177]
	MnTMTPyP[177]
Применение ингибиторов iNOS	1,3-PB-ITU, L-NIL и др. [177]
Применение ингибиторов PARP	PJ34 [192, 193]
Применение ингибиторов р53	Пифитрин-α [141, 148, 217]

Альтернативой ловушкам пероксинитрита является использование ингибиторов индуцибельной NO синтазы, поскольку пероксинитрит образуется из NO и O2•-. Было показано, что ингибиторы iNOS - 1,3-PB-ITU (S,S'-[1,3-фенилэтилен-бис(1,2-этандиил)]бис-изотиомочевина) и L-NIL (L-N6-(1-иминоэтил)-лизин) - снижают вызванный Dox апоптоз клеток H9c2 [177]. Показатели сердечной функции у мышей с нокаутом по гену *inos* после введения им Dox также были гораздо лучше, чем у мышей дикого типа [177]. Однако некоторые авторы считают, что ингибирование iNOS может иметь негативные последствия [61]. Таким образом, подавление путей, ведущих к образованию пероксинитрита, или их эффективная нейтрализация могут иметь значительный кардиопротекторный эффект при проведении противоопухолевой терапии Dox [177].

Подавление активности поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1

В работах Пачер и коллег [192, 193] показано, что мыши с генетически удаленным (нокаутом) PARP-1 были более устойчивы к негативным кардиотоксическим эффектам Dox, по сравнению с мышами дикого типа (с функциональным геном PARP-1). Схожие результаты были получены с использованием фармакологического ингибитора PARP-1 - PJ34. Введение животным PJ34 одновременно с Dox также значительно увеличивало выживаемость животных. Так, например, в группе мышей, которым вводили только Dox, к 20-му дню оставалось примерно 30% животных, тогда как в группе, которой наряду с Dox вводили PJ34, на этом же сроке выживало примерно 70% животных.

Кроме того, было показано, что при введении мышам Dox в сыворотке крови происходит увеличение активности лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и креатинфосфокиназы (КФК), что указывает на активно протекающие процессы деструкции тканей. При фармакологическом ингибировании или генетическом удалении PARP-1 уровни активности ЛДГ и КФК в сыворотке крови мышей, которым вводили Dox, не превышали аналогичные показатели группы контрольных животных [192].

Ингибирование р53

Белок р53 играет решающую роль в регуляции клеточного цикла и апоптоза. После активации р53 перемещается в ядро, где он индуцирует экспрессию генов, контролирующих деление клеток, в частности - гена белка р21, что приводит к активации сигнального пути, ведущего к апоптозу. Было показано, что после обработки клеток Н9с2 Dox наблюдается заметное накопление и активация р53, а впоследствии - гибель клеток [141, 148, 217, 274]. Использование ингибитора р53 пифитрина-α способствовало увеличению выживаемости обработанных Dox клеток [141, 148, 217]. Кроме того, пифитрин-α частично предотвращал вызываемые Dox ультраструктурные изменения в миокарде: цитоплазматическую вакуолизацию, набухание митохондрий, а также образование плотных тел в митохондриях сердца [148]. Также было показано, что пифитрин-α предотвращал Dox-индуцированное увеличение активности КФК в сыворотке крови мыщей, что свидетельствует о снижении кардиотоксического действия Dox [148]. Кроме того, в кардиомиоцитах мышей с нокаутом гена, кодирующего р53, наблюдали более низкий уровень Dox-индуцированного апоптоза, по сравнению с контролем [232].

2.1.4. Клеточные модели для исследования кардиотоксического действия доксорубицина

В большинстве ранних исследований, выполненных на изолированных кардиомиоцитах, были использованы первичные культуры, полученные из эмбрионов или новорожденных животных (крыс, мышей, кур и др.) [111]. До сих пор такие культуры кардиомиоцитов широко применяются для исследования in vitro различных аспектов функционирования кардиомиоцитов в норме и в условиях патологии сердца [18]. Однако по ряду свойств они отличаются от кардиомиоцитов взрослых животных [111]. Изолированные кардиомиоциты, полученные из взрослых животных, в большинстве исследований считаются предпочтительным объектом, поддержание однако жизнеспособности таких клеток при физиологической температуре (37 °C) концентрации Ca^{2+} , является весьма затруднительным [111, 284]. По этой причине изолированные зрелые кардиомиоциты чаще всего используются для кратковременных экспериментов, и даже в этом случае, в течение нескольких часов после выделения метаболические свойства ЭТИХ клеток ΜΟΓΥΤ существенно измениться [1111].Эмбриональные культуры в этом отношении имеют некоторые преимущества: во-первых, они устойчивы к физиологической концентрации Ca^{2+} , поэтому удается достаточно легко получать жизнеспособные клетки при их выделении из миокарда (см. раздел 3.2.2), вовторых, при культивировании они сохраняют жизнеспособность в течение достаточно длительного времени - от нескольких недель до нескольких месяцев [18]. Несмотря на сложность работы с первичными культурами кардиомиоцитов, существует ряд работ, в которых кардиотоксичность Dox исследовали именно на них [15, 23, 26, 114, 122, 123].

Одним из недостатков первичных культур, получаемых из миокарда, является их гетерогенность. Несмотря на то, что кардиомиоциты составляют ок. 80% от общей массы сердца, по численности их доля в сердце не превышает 20%. Остальную часть клеточной популяции составляют фибробласты, нейроны, эндотелиальные клетки, а также клетки, образующие эндокард и эпикард. Такое многообразие клеток делает практически невозможным получение чистой культуры кардиомиоцитов. Работа со смешанными культурами сильно ограничивает выбор методов анализа и затрудняет интерпретацию получаемых результатов, так как реакции других клеточных популяций и разнообразие взаимодействий между различными типами клеток могут вносить свой вклад в наблюдаемые клеточные ответы [111]. При работе с первичными культурами следует также учитывать индивидуальные различия между культурами, поучаемыми из разных особей животных, обусловленные генетическими и другими факторами [235].

Другой подход к моделированию *in vitro* процессов, происходящих в кардиомиоцитах, заключается в использовании постоянных линий клеток, обладающих необходимым набором характерных для кардиомиоцитов свойств. Безусловным преимуществом постоянных линий клеток перед первичными является их однородность [18]. Однако при попытках вывести такие линии, большинство полученных штаммов отличались низкой стабильностью и жизнеспособностью: клетки либо погибали после нескольких пересевов, либо теряли маркерные признаки кардиомиоцитов. Исключением стала постоянная линия клеток Н9с2, она обладает рядом характерных признаков и свойств зрелых кардиомиоцитов [18].

Линия клеток Н9с2 была получена Кимс и Брандт [124] из ткани желудочков сердца 13-дневных эмбрионов крыс. После нескольких пересевов получили популяцию кардиомиобластов, из которой в дальнейшем методом клонирования вывели линию Н9с2, способную к пролиферации в среде с высоким содержанием эмбриональной сыворотки теленка (10%) [124]. Важным свойством клеток Н9с2 является их способность к дифференцировке. Снижение в среде концентрации сыворотки до 0,5-1 % приводит к подавлению митотической активности клеток, изменению их морфологии и повышению экспрессии различных маркерных белков мышц [44]. Было показано, что клетки Н9с2 имеют ряд признаков миоцитов: они способны сокращаться в ответ на электрическую стимуляцию и экспрессируют никотиновый ацетилхолиновый рецептор, мышечную изоформу креатинфосфокиназы [124] и тяжелую цепь миозина [44]. В ходе дальнейших исследований были получены новые доказательства сходства клеток Н9с2 с кардиомиоцитами. Было показано, что клетки Н9с2 синтезируют маркерные белки кардиомиоцитов: транскрипционный фактор GATA-4 и изоформу тропонина I сердца [132]. Сравнение экспрессии изоформ цитохромов Р450 в клетках Н9с2 и в сердце крысы показало, что они имеют схожий профиль [284]. На поверхности клеток Н9с2, как и у кардиомиоцитов, обнаруживаются микроворсинки [101]. Недавно продемонстрировано наличие единого механизма регуляции энергетического метаболизма в клетках H9c2 и кардиомиоцитах - через β-тубулин II [136]. Известно, что взаимодействие митохондрий с β-тубулином II играет ключевую роль в регуляции энергетического метаболизма в кардиомиоцитах.

Следует отметить, что делящиеся (недифференцированные) клетки H9c2 морфологически отличаются от зрелых кардиомиоцитов. Между клетками H9c2 (в отличие от кардиомиоцитов) не образуются щелевые контакты, и они лишены организованных саркомерных структур, хотя имеют обширную эндоплазматическую сеть.

Цитоскелет включает актиновые стрессовые волокна, что придает им сходство с кардиомиоцитами из эмбрионов [101]. Ряд авторов считает, что недифференцированные клетки H9c2 схожи с незрелыми кардиомиоцитами, выделенными из эмбрионов крысы, при этом они демонстрируют ряд электрофизиологических и гормональных сигнальных путей, характерных для зрелых кардиомиоцитов [101].

После перевода в покоящееся/стационарное состояние (дифференцировки) клетки Н9с2 в целом приобретают большее сходство со зрелыми кардиомиоцитами. Происходит переключение метаболизма с гликолитического пути образования АТФ на окислительное фосфорилирование [44]. Перевод в покоящееся состояние вызывает также существенные морфологические изменения: увеличение симметрии и размеров клетки, появление многоядерных клеток. При дифференцировке клеток Н9с2 происходит усиление синтеза ряда тканеспецифических белков: миогенина (транскрипционный фактор, отвечающий за дифференцировку мышечных клеток), тропонита Т [184] и миозина [44]. Было показано, что в клетках Н9с2, переведенных в стационарное состояние, обнаруживаются потенциалуправляемые (чувствительные) кальциевые каналы L-типа, сходные по кинетическим β-адренергической чувствительностью с параметрам кальциевыми каналами кардиомиоцитов (но не скелетных волокон); эти каналы чувствительны к действию дигидропиридинов и фенилалкиламинов (блокаторы кальциевых каналов) [101]. В недифференцированных пролиферирующих клетках Н9с2 каналы этого типа не обнаруживаются, либо их содержание незначительно [235].

Таким образом, можно сделать вывод, что проблема отсутствия удобной и адекватной клеточной модели кардиомиоцитов была отчасти решена после получения линии кардиомиобластов крысы Н9с2. В настоящее время культура клеток Н9с2 широко используется при проведении разнообразных кардиотоксикологических исследований, при изучении дифференцировки кардиомиоцитов, гипертрофии сердца, для моделирования различных кардиомиопатий [44, 136, 184] и для исследования новых кардиопротекторов [101, 240], а также для исследования регуляции метаболических процессов и трансмембранной передачи сигнала в кардиомиоцитах [101, 235, 284].

Линия клеток H9c2 также была успешно использована для моделирования Doxиндуцированной кардиомиопатии в работах, направленных на выяснение механизмов кардиотоксического действия Dox [217, 251, 274] и на поиск и исследование новых потенциальных кардиопротекторов [177, 217, 230, 240].

2.2. Система поли(АДФ-рибозил)ирования белков

2.2.1. Поли(АДФ-рибозил)ирование белков – универсальный механизм регуляции клеточных процессов

Поли(АДФ-рибозил)ирование является одной ИЗ разновидностей посттрансляционной модификации белков, в результате которой к белкам-субстратам по одному или нескольким сайтам (аминокислотным остаткам) ковалентно присоединяются АДФ-рибозильные группы [66, 76]. Открытие этой реакции было сделано группой исследователей под руководством Поля Манделя, которая в 1963 году обнаружила, что в экстрактах куриной печени в присутствии НАД+ образуется новый полимер нуклеотидной природы, позже идентифицированный как поли(АДФ-рибоза) (РАR) [14, 55, 258]. Эту реакцию осуществляют ферменты поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP, ЕС 2.4.2.30). Они обнаружены у большинства эукариотических организмов, но при этом не найдены у прокариот и дрожжей [49]. Источником АДФ-рибозильных групп в реакции поли(АДФ-рибозил)ирования являются молекулы НАД+, а побочным продуктом реакции – никотинамид. Присоединение первой молекулы АДФ-рибозы к акцепторному белку происходит по остаткам лизина [20, 167], хотя ранее считалось, что роль акцепторов АДФ-рибозильных групп выполняют остатки глутаминовой и аспарагиновой кислот [49, 66, 223]. Формирование полимера происходит за счет образования гликозидных связей, $1" \rightarrow 2'$ - в линейных участках или $2" \rightarrow 1"'$ - в местах разветвления (см. рис. 2.4) [121].

Рисунок 2.4. Структура поли(АДФ-рибозы) [121, с изменениями]. Обозначения: (**a**) -1" \rightarrow 2' гликозидные связи; (**b**) -2" \rightarrow 1" гликозидные связи.

Согласно международной классификации ферментов полное название ферментов NAD+: АДФ-D-рибозил-акцептор АДФ-D-рибозилтрансфераза семейства **PARP** (NAD+: ADP-D-ribosyl-acceptor ADP-D-ribosyltransferase - ADPRT), а рекомендуемое для употребления в литературе - АДФ-рибозилтрансфераза (ADP-ribosyltransferase - ART). анализе субстратной специфичности и структуре ферментов, Основываясь на катализирующих реакцию моно-, олиго- и поли(АДФ-рибозил)ирования Хоттигер и соавт. предложили новую систему классификации ферментов семейства PARP, согласно которой представители данной группы ферментов получили следующие названия (по номенклатуре EC и рекомендуемое к употреблению): NAD+:поли-АДФ-D-рибозил-АДФ-D-рибозилтрансфераза (NAD+:poly-ADP-D-ribosyl-acceptor ribosyltransferase - PADPRT), полимеризующая-АДФ-рибозилтрансфераза (polymerizing-ADP-ribosyltransferase - PART) [104]. Однако эти названия пока официально не утверждены и не получили сколько-нибудь широкого распространения.

Наиболее представленным в клетке и, в тоже время, наиболее изученным белком, катализирующим реакцию поли(АДФ-рибозил)ирования, является PARP-1. Использование биоинформационного подхода, основанного на анализе белковой базы данных NCBI (National Center for Biotechnology Information) позволило выявить ряд белков человека, имеющих очень высокую степень гомологии с каталитическим доменом PARP-1 [22]. Все эти белки были объединены в семейство PARP, которое сейчас насчитывает 18 представителей (рис. 2.5) [104]. Следует заметить, что способность катализировать реакцию поли(АДФ-рибозил)ирования была обнаружена только у шести белков семейства: PARP-1, PARP-2, PARP-3, vPARP/PARP4, танкиразы 1 и 2. Считается, что белки PARP6, tiPARP/PARP7, PARP8, PARP10, PARP11, PARP12, PARP14/BAL2 катализируют реакцию моно(АДФ-рибозил)ирования, а PARP9/BAL1 и PARP13/ZAP лишены АДФ-рибозилтрасферазной активности (см. обзор [131]).

В настоящее время структура и функция многих из них остается еще мало исследованными. Находясь в разных компартментах клетки (различные участки хромосом, митохондрии, веретено делений), они видимо выполняют специализированные функции [22, 150].

Расщепление PAR до мономеров АДФ-рибозы осуществляется ферментами поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазами (PARG) и АДФ-рибозиларгинин-гидролазой 3 (ADP-ribosylarginine hydrolase 3; ARH3). Остатки моно-АДФ-рибозы на акцепторных белках удаляются АДФ-рибозиллиазой [121, 131, 138, 223].

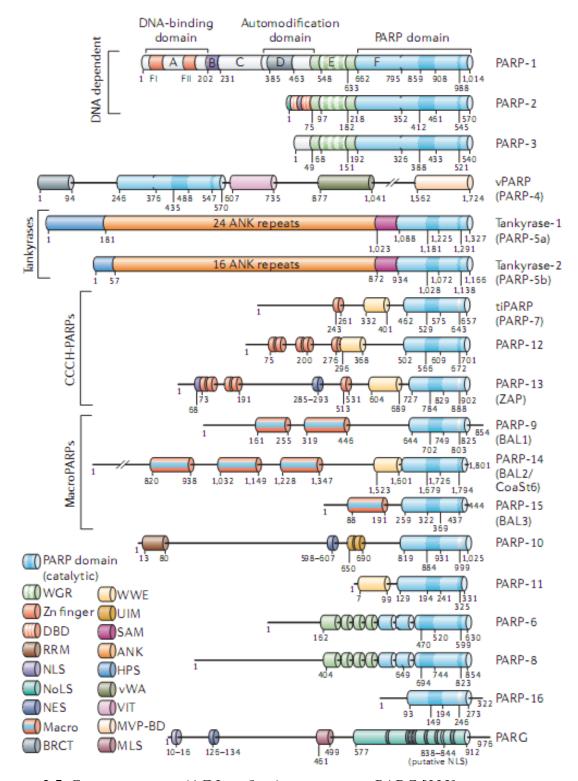


Рисунок 2.5. Структура поли-(АДФ-рибоза)-полимераз и PARG [223]

Базальная ферментативная активность PARP-1 в клетках невысокая, однако, в условиях генотоксического стресса, она может возрастать более чем в 500 раз [98, 233, 236]. Количество PAR в ядре строго контролируется в динамичной системе синтезрасщепление [66, 70]. Расщепление полимера ферментом PARG может начаться

непосредственно после запуска синтеза, а весь цикл может занять всего несколько минут [66, 121].

В настоящее время известно более 30 белков, являющихся акцепторами АДФрибозы в реакции поли(АДФ-рибозил)ирования. Большинство из них ассоциировано с хроматином: гистоны, PARP-1, топоизомеразы I и II, ДНК-лигазы I и II, ДНК полимеразы а и в, РНК-полимеразы I и II, р53, PCNA и др. [66, 254]. Модификация поли(АДФ-рибозой) приводит к изменению заряда белка-мишени; в случае, если белок взаимодействует с ДНК, приобретение отрицательного заряда будет способствовать электростатическому отталкиванию белка от ДНК [254]. Поли(АДФ-рибозил)ирование белков играет важную роль во многих клеточных процессах: поддержании стабильности генома (репарации), регуляции транскрипции, протеасомной деградации белков, эндосомальном транспорте, пролиферации, гибели клеток, формировании долговременной памяти и др. [76, 254, 265].

Помимо ковалентной модификации в реакции поли(АДФ-рибозил)ирования, модуляция активности некоторых белков может осуществляться посредством нековалентного взаимодействия с PAR. Известны четыре последовательности в структуре белков, нековалентно взаимодействующих с PAR [131]:

- 1)- поли(АДФ-рибоза)-связывающий мотив (РВМ);
- 2)- поли(АДФ-рибоза)-связывающий мотив с цинковым пальцем (PBZ);
- 3)- макродомен;
- 4)- WWE домен [131].

У многих известных белков были обнаружены поли(АДФ-рибоза)-связывающие домены. Так, например, PBM мотив обнаружен в последовательности белков р53, [156], гистонов Н3 и Н4, ДНК лигазы 3, ДНК топоизомераз и многих др. (см. обзор [131]).

Являясь своеобразным сенсором разрывов ДНК, PARP-1 выполняет множество функций в клетке: при низком уровне повреждений ДНК участвует в их репарации и функционирует как фактор выживания, а при высоком уровне - может запускать механизмы гибели клетки [48, 236]. Помимо этих функций, PARP-1 также вовлечена в регуляцию транскрипции, клеточной дифференцировки, клеточного цикла и модуляцию структуры хроматина [121, 172, 223, 236, 254].

2.2.2. Структура и регуляция активности PARP-1

Основной поли(АДФ-рибоза)-полимеразой, осуществляющей реакцию поли(АДФрибозил)ирования, является ядерный белок PARP-1. Показано, что PARP-1 ответственна за синтез около 90% всей образующейся в клетке PAR [12, 76]. В каждой клетке содержится от 0.2 до 2 млн. молекул этого белка. PARP-1 состоит из 1014 аминокислотных остатков, и имеет молекулярную массу 113 кДа [66, 223]. Анализ аминокислотной последовательности показал, что степень консервативности PARP-1 у различных видов позвоночных достигает 60% [12], при этом аминокислотные последовательности PARP-1 мыши и человека гомологичны на 92% [259]. В комплексе с ДНК PARP-1 находится в виде гомо- или гетеродимеров (с PARP-2 или PARP-3).

Структура PARP-1 хорошо изучена (рис. 2.5). Выделяют следующие функциональные домены PARP-1:

- 1. *N-концевой ДНК-связывающий домен*, который содержит три цинковых пальца (F1, F2 и F3), ответственных за взаимодействие с разрывами ДНК [12, 76, 149], и сигнал ядерной локализации, отвечающий за ядерное распределение PARP-1. Существуют также данные о центросомной локализации PARP-1 [115].
- 2. Центральный домен автомодификации, который содержит аминокислотные остатки, по которым PARP-1 может потенциально аутополи(АДФ-рибозил)ироваться [20], и структуру, называемую «leucine zipper», обеспечивающую гомодимеризацию этого белка [149]. В состав этого домена также входит BRCT-мотив (breast cancer susceptibility protein C terminus), являющийся общим для многих белков, обеспечивающих продвижение клеточного цикла и репарацию. BRCT-мотив также вовлечен в формирование белок-белковых взаимодействий с участием PARP-1 [12, 22].
- 3. С-концевой каталитический домен, отвечающий за ферментативную активность PARP-1. В результате установления кристаллической структуры каталитического домена PARP-1 курицы было показано, что он имеет большое структурное сходство с бактериальными токсинами (дифтерийным и коклюшным токсинами), обладающими моно(АДФ-рибозил)-трансферазной активностью [104]. В особенности это касается участка из 50 аминокислотных остатков (β-α-петля-β-α), участвующего в связывании НАД+. Он получил название "PARP signature", так как он абсолютно идентичен по аминокислотной последовательности (степень гомологии 100%) у всех позвоночных [22, 76, 223, 259].

Регуляция активности PARP-1 реализуется через:

- связывание с одноцепочечными или двухцепочечными разрывами ДНК (активация) [138, 162, 197, 259,];
- взаимодействие с нуклеосомами/гистонами;
- взаимодействие с крестообразными структурами ДНК;

- белок-белковые взаимодействия;
- изменение уровня внутриклеточных метаболитов или ионов;
- посттрансляционные модификации поли(АДФ-рибозил)ирование,
 фосфорилирование, ацетилирование, убиквитинилирование, сумоилирование (от «SUMO» small ubiquitin-like modifier) [99, 149].

Регуляция активности PARP-1 гистонами

Распределение PARP-1 в нуклеоплазме не является произвольным, фермент накапливается в ядрышках и находится в комплексе с хроматином, участвуя наряду с гистонами в компартментализации ДНК. С неповрежденной ДНК PARP-1, видимо, взаимодействует при помощи цинковых пальцев: F1 – y Drosophila melanogaster и F3 - у млекопитающих [254]. Гистоны также обеспечивают физическое взаимодействие между PARP-1 и хроматином.

Известно, что коровые гистоны (Н2А, Н3 и Н4) могут регулировать ферментативную активность PARP-1 (независимо от разрывов ДНК) при транскрипции и репарации ДНК, сами гистоны являются еще и акцепторами PAR [203, 129]. Раньше считалось, что активация PARP-1 является, главным образом, ответом на ДНКповреждения [259], но недавно было показано, что гистон H4 in vitro способен активировать PARP-1 намного эффективнее, чем разрывы ДНК [254]. Известно, что у млекопитающих гистон H2Ax фосфорилируется в ответ на генотоксический стресс. Считают, что этот процесс связан с активацией PARP-1, поскольку при ингибировании PARP-1 происходит накопление фосфорилированного, связанного с хроматином гистона H2Ax [254]. У Drosophila также было обнаружено, что PARP-1 и гистон H2Av (аналог гистона Н2Ах) участвуют в организации структуры гетерохроматина и репарации ДНК. После генотоксического стресса или при транскрипции происходит фосфорилирование гистона H2Av, приводящее к активации PARP-1. Предполагают, что активация происходит по следующему механизму фосфорилирование H2Av вызывает пространственное сближение гистона H4 и PARP-1, что позволяет гистону H4 активировать PARP-1 [129].

Посттрансляционные модификации

Поли(АДФ-рибозил) ирование. В результате реакции автомодификации, протекающей по межмолекулярному механизму, PARP-1 инактивируется [254]. Помимо автомодификации, PARP-1 может поли(АДФ-рибозил) ировать PARP-2 и PARP-3 при

образовании с ними гетеродимеров [149]. Также недавно было показано, что моно(АДФ-рибозил)ирование PARP-1 по остатку Lys-521, осуществляемое белком SIRT6, приводит к активации каталитической функции PARP-1 и способствует репарации двухцепочечных разрывов ДНК, вызываемых действием H_2O_2 на культивируемые фибробласты человека и мыши [157].

Фосфорилирование. Известно, что максимальная активность PARP-1 в ответ на повреждения ДНК обнаруживается после ее фосфорилирования по Ser-372 и Thr-373 киназами ERK1/2 [149]. Активация PARP-1 наблюдается также при ее фосфорилировании киназой JNK1 [279] и при белок-белковом взаимодействии с фосфорилированной киназой ERK2 [149]. Кроме того фосфорилирование PARP-1 может приводить и к подавлению ее активности, как например, при фосфорилировании протеинкиназой С [33].

Ацетилирование. В ответ на воспалительные стимулы наблюдается активация PARP-1 (независимая от наличия ДНК-повреждений) после ее ацетилирования белками р300/СВР по остаткам Lys-498, Lys-505, Lys-508, Lys-521 и Lys-524 [97].

2.2.3. Роль PARP-1 в репарации ДНК

Участие PARP-1 в репарации ДНК было продемонстрировано на трех независимых моделях с использованием нокаутных по гену PARP-1 (PARP-1^{-/-}) мышей. Такие мыши не погибали (видимо, за счет функционирования PARP-2, частично дублирующего функции PARP-1), однако оказались гиперчувствительными к действию ионизирующей радиации и алкилирующих соединений. Кроме того, эти животные проявляли повышенную устойчивость при искусственно вызванных воспалительных патологиях: септическом шоке, церебральной и сердечной ишемиях [22, 76, 201].

В клетках эукариот существует пять основных способов восстановления целостности структуры ДНК: прямая репарация, эксцизионная репарация оснований (ЭРО), эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН), гомологичная рекомбинационная репарация хромосом (ГР) и негомологичная рекомбинация в процессе соединения концов хромосом (НГР). Каждый путь репарации направлен на исправление определенных типов повреждений [219].

К настоящему времени известно, об участии PARP-1 во всех перечисленных выше системах репарации, кроме прямой репарации ДНК [14, 102 150, 197, 213, 264].

Участие PARP-1 в репарации одноцепочечных повреждений ДНК

Модифицированные, окисленные, дезаминированные, алкилированные основания, апуриновые/апиримидиновые сайты (АП-сайты) в клетках устраняются путем ЭРО [14, 37, 219]. Первый фермент ЭРО, который распознает и удаляет поврежденное азотисное основание с образованием АП-сайта - ДНК-гликозилаза. Основание удаляется за счет гидролиза *N*-гликозидной связи. Существует более 20 ДНК-гликозилаз, которые селективно распознают разные поврежденные основания. После удаления основания субстрат АП-эндонуклеазы 1, остается АП-сайт ДЛЯ которая расщепляет фосфодиэфирную связь по АП-сайту с образованием одноцепочечного разрыва, затем полимераза в вырезает АП-сайт и заменяет его корректным нуклеотидом. Лигирование ДНК осуществляет комплекс ДНК-лигазы IIIа и белка XRCC1 (X-ray crosscomplementing 1 protein) [75].

Несмотря на многочисленные исследования, конкретная роль PARP-1 в ЭРО до конца не известна. Предполагают, что после образования одноцепочечного разрыва с ним связывается PARP-1, активируется, образует гомодимер и поли(АДФ-рибозил)ирует соседнюю молекулу PARP-1. Известно, что белок XRCC1 имеет высокое сродство к PAR, поэтому после автомодификации PARP-1 привлекает XRCC1 и способствует сборке репарационного комплекса ЭРО вблизи места разрыва ДНК [85, 161]. Помимо связывания с разрывами ДНК, PARP-1 способна непосредственно связываться с АП-сайтами с образованием стабильных аддуктов, опосредованных образованием основания Шиффа. PARP-1 также способна расщеплять ДНК в АП-сайтах, хотя и с невысокой эффективностью, и проявляет слабую лиазную активность при взаимодействии с остатком 5'-дезоксирибофосфата [4].

Существует также другая точка зрения на роль PARP-1 в ЭРО [19, 197]. Парсонс с коллегами для исследования роли PARP-1 в ЭРО использовали нативные экстракты из клеток HeLa, к которым добавляли субстрат - олигонуклеотид ДНК шпилечной структуры, содержащий одну некомплементарную пару оснований G-U. Через определенные интервалы времени вызывали перекрестную сшивку, что позволяло фиксировать белки, связанные с олигонуклеотидом, и затем их идентифицировать. Так было показано, что на самых ранних этапах репарационного процесса с субстратом связывается именно PARP-1 [197]. После автополи(АДФ-рибозил)ирования PARP-1 приобретает заряд, теряет сродство к олигонуклеотиду и переходит в неактивное состояние [197, 218]. Максимальное количество PARP-1 связывается с субстратом через 30 секунд после смешивания клеточного экстракта и субстрата, тогда как полимераза β и

комплекс ДНК-лигаза IIIа/XRCC1 более эффективно взаимодействует с субстратом через 4 минут после диссоциации комплекса PARP-1 с олигонуклеотидом. Ингибиторы PARP-1 блокируют не только диссоциацию комплекса PARP-1 с субстратом, но и предотвращают связывание с субстратом полимеразы β и комплекса ДНК-лигаза IIIа/XRCC1. Таким образом, было показано, что удаление PARP-1 с разрыва - необходимое условие для прохождения репарации. При удалении PARP-1 из клеточных экстрактов скорость репарации увеличивается. Авторы данной работы высказали предположение, что основная роль PARP-1 заключается в защите одноцепочечного разрыва от атак нуклеаз, с тем, чтобы уменьшить вероятность возникновения двухцепочечных разрывов и избежать необратимых повреждений ДНК. Защита одноцепочечного разрыва с участием PARP-1 происходит до тех пор, пока он не будет устранен ферментами ЭРО [197].

В отличие от ЭРО система ЭРН удаляет повреждения ДНК, искажающие структуру спирали: фотопродукты типа 6-4, тиминовые и другие циклобутановые пиримидиновые димеры. Такие повреждения образуются при ультрафиолетовом облучении (УФ) [103, 213, 219]. Ключевыми белками ЭРН являются DDB2 (DNA damage-binding protein 2), распознающий повреждения ДНК после облучения УФ; белки ALC1 (amplified in liver cancer 1) и APLF-1(aprataxin and PNKP like factor 1), которые участвуют в ремоделировании хроматина, а также белки XPA и XPC (xeroderma pigmentosum protein A и protein C).

В целом ряде работ было продемонстрировано тесное взаимодействие системы поли(АДФ-рибозил)ирования с ЭРН [14, 94, 125, 213]. Так было показано, что белок DDB2 напрямую взаимодействует с PARP-1 после облучения клеток УФ и способен ее активировать, а также сам поли(АДФ-рибозил)ируется [213]. На культурах фибробластов человека (линии клеток GMU6 и BJ-h-Tert) и на мышах линии SKH1 ингибирование PARP значительно снижает эффективность удаления УФ-индуцированных повреждений ДНК, нарушает взаимодействие DDB2 с PARP-1 и XPC, а также предотвращает перемещение XPC к сайтам ДНК-повреждений [213]. Авторы этого исследования предложили следующую модель участия PARP-1 в ЭРН: в течение нескольких секунд после облучения клеток УФ PARP-1 распознает разрывы и активируется; практически одновременно в процесс включается белок DDB2, который усиливает активацию PARP-1, в результате происходит поли(АДФ-рибозил)ирование многих белков-мишеней (включая PARP-1 и DDB2) и привлечение к ДНК-повреждению других белков системы ЭРН (например, XPA и XPC), непосредственно устраняющих повреждение [213]. Помимо участия в сборке репарационного комплекса, PARP-1 также ремоделирует хроматин посредством

поли(АДФ-рибозил)ирования белков ALC1 и APLF-1, тем самым облегчая доступ факторов ЭРН к поврежденному участку ДНК [14, 213]. Следует отметить, что некоторые ферменты ЭРН содержат в своей структуре поли(АДФ-рибоза)-связывающий мотив, например белки XPA и APLF-1 [14, 131]

Участие PARP-1 в репарации двухцепочечных повреждений ДНК

Репарации двухцепочечных разрывов ДНК осуществляется по двум основным механизмам: ГР и НГР [14, 103, 219]. Репарация по механизму ГР является безошибочной и осуществляется только на S и G2-фазах клеточного цикла, когда доступна гомологичная сестринская хроматида [150]. В неделящихся клетках у высших эукариот репарация большинства разрывов осуществляется по классическому пути НГР, при котором часто возникают мутации [119, 150, 264]. После образования двухцепочечного разрыва происходит выбор запускаемого репарационного механизма. В случае если по месту ДНК-экзонуклеаза способна образовать 3'-одноцепочечный разрыва фрагмент, распознаваемый белком Rad51, происходит запуск процесса ГР [32]. НГР, в свою очередь, срабатывает при связывании с разрывом гетеродимера белка Ku (состоит из Ku70 и Ku80) и ДНК-зависимой протеинкиназы [80].

Роль PARP-1 в репарации двухцепочечных повреждений ДНК выяснена не до конца. Согласно одним данным, механизм ГР не нарушается в присутствии ингибиторов PARP и в PARP-1-/- клетках [100]. Однако при этих условиях в клетках наблюдается увеличение частоты сестринских хроматидных обменов, что свидетельствует о подавлении рекомбинации PARP-1 [100]. В другой работе [102] на линии В-лимфоцитов курицы DT40, с нарушенной функцией PARP-2 и с нокаутом гена PARP-1 (полностью отсутствовал ДНК-зависимый синтез PAR), было показано подавление ГР при действии генотоксических агентов. Дополнительный нокаут гена, кодирующего белок Ки70 (компонент системы НГР), приводил к восстановлению эффективности ГР. На основании этих данных был предложен следующий механизм участия PARP-1 в ГР: белок Ки70, взаимодействуя с разрывом, препятствует его репарации по пути ГР, при наличии активной PARP-1 происходит поли(АДФ-рибозил)ирование Ки70, он теряет сродство к разрыву и уходит с него, позволяя репарационным белкам ГР удалить повреждение [102]. Также известно, что PARP-1 конкурирует с белком Ки за связывание с разрывами ДНК [264].

Известно также, что клетки, имеющие дефекты в системе ГР (нарушение функции BRCA1, BRCA2, ATM и др.), являются очень чувствительными к подавлению активности

PARP-1 [102]. Поскольку белок BRCA2 защищает концы двухцепочечных разрывов от атаки нуклеаз, предполагают, что при отсутствии функционального BRCA2, его функцию на себя берет PARP-1. Этим объясняется чувствительность клеток, дефектных по BRCA2, к двухцепочечным разрывам ДНК при ингибировании PARP-1 [45].

НГР может осуществляться по двум механизмам: классическому (в котором задействованы ДНК-зависимая протеинкиназа, белок Ки, ДНК-лигаза IV, XRCC4, Artemis и др.) и альтернативному (для которого установлены только некоторые участники - PARP-1, ДНК-лигаза III и, возможно, XRCC1) [66, 263]. Точно установлено, что в системе классической НРГ PARP-1 способна образовывать единый комплекс с белками Ки и ДНК-зависимой протеинкиназой [102]. Поли(АДФ-рибозил)ирование ДНК-зависимой протеинкиназы *in vitro* приводит к ее активации. В свою очередь она подавляет активность PARP-1 [27]

Все эти данные еще раз подтверждают неоднозначную роль PARP-1 в механизмах репарации двухцепочечных разрывов ДНК [66, 102, 272]. Также есть работы, в которых считается, что PARP-1 напрямую не задействуется в механизмах репарации двухцепочечных разрывов [185, 224].

2.2.4. Роль PARP-1 в механизмах гибели клетки

Повреждение клеточных структур может вызвать активацию разных путей гибели клетки: апоптоз, некроз, аутофагию или партанатоз [25].

Каспаза-зависимый *апоптоз* характеризуется нарушением целостности митохондрий, активацией протеаз и нуклеаз, межнуклеосомной фрагментацией ДНК, конденсацией хроматина и формированием апоптотических тел; при этом для реализации этих процессов требуется АТФ [25, 84, 271]. На ранних этапах каспаза-зависимого апоптоза в клетке происходит расщепление PARP-1 каспазами-3 и -7 по сайту DEVD с образованием фрагментов массой 24 и 89 кДа. Расщепление PARP-1 является характерным маркером каспаза-зависимого апоптоза [22, 225, 237], оно необходимо для предотвращения возможной активации PARP-1 на более поздних этапах апоптоза при фрагментации ДНК и для предотвращения падения уровней НАД+ и АТФ [182, 237].

Кроме канонического каспаза-зависимого апоптоза выделяют каспаза-независимый апоптоз. Одним из механизмов каспаза-независимого апоптоза является *партанатоз* – гибель клетки с участием PAR, образующейся при активации PARP (рис. 2.6). При партанатозе накопление PAR является мощным стимулом для транслокации фактора AIF из митохондрий в ядро [24, 25, 275].

АІГ является проапоптотическим флавопротеидом [25, 266], он синтезируется в цитоплазме в виде белка-предшественника (pre-AIF, 67 кДа) [25], а в виде зрелого функционального белка (AIF, 62 кДа) обнаруживается в митохондриях [226] (рис. 2.6). В норме АІГ является структурообразующим белком митохондрий, он стабилизирует митохондриальные комплексы I и III [57, 226] и играет важную роль в окислительном фосфорилировании [255]. При запуске партанатоза происходит превращение АІГ в tAІГ (57 кДа) и его транслокация в ядро [25]. Перемещаясь в ядро, АІГ реализует процесс гибели клетки через фрагментацию ДНК [68, 244, 276]. В отличие от апоптоза при партанатозе не формируются апоптотические тела, и для его инициализации и реализации не требуется участие каспаз [266].

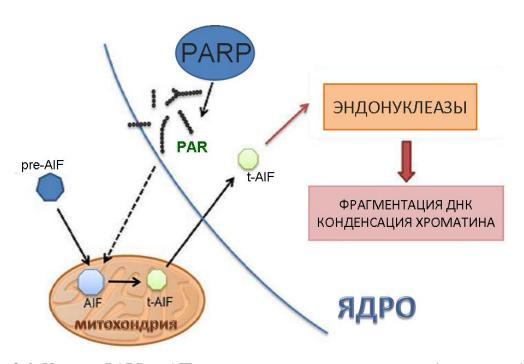


Рисунок 2.6. Участие PARP и AIF в каспаза-независимом апоптозе (партанатозе) [25, с изменениями].

Точный механизм передачи ядерного сигнала с PAR на высвобождение митохондриального AIF не известен [89, 266]. Относительно этого существуют две гипотезы. Согласно первой, активация PARP-1 приводит к истощению НАД+, открытию митохондриальной поры проницаемости и высвобождению через нее AIF [16]. Согласно второй гипотезе, именно связывание PAR с AIF вызывает его выход из митохондрий [24, 98]. Наличие у AIF PAR-связывающей последовательности (PBM) подтверждает эту гипотезу [267]. Существует также ряд экспериментальных данных в поддержку второй гипотезы: в митохондриях удавалось обнаружить комплекс AIF с PAR [77]. Также было показано, что после 15 мин обработки культур кортикальных нейронов NMDA

образующаяся PAR содержится главным образом в ядерной фракции, но небольшие ее количества обнаруживаются и в цитоплазме, а через 30 мин - в митохондриях [275]. Спустя 60 мин количество PAR в клетке достигает 80 нМ, что приводит к гибели более половины клеток. Согласно этим данным PAR может транслоцироваться в митохондрии. Интересно, что инъекция PAR в здоровые клетки вызывает высвобождение AIF из митохондрий и перемещение его в ядро [275].

Партанатоз наблюдали при действии генотоксических соединений, в частности алкилирующих агентов [266, 275, 276]. Однако наиболее часто этот механизм запускается при патофизиологических условиях, сопровождающихся окислительным стрессом: при последующей реперфузией, инфаркте, ишемии инсульте, глутаматной МФТП-индуцированном эксайтотоксичности, паркинсонизме, воспалении, стрептозотоцин-индуцированном диабете [121, 137, 172, 228, 248, 259]. Применение ингибиторов PARP на моделях этих патологий оказывает защитное действие. Животные с нокаутом по гену PARP-1 также проявляли значительную устойчивость к токсическому действию глутамата [202, 276] и стрептозотоцин-индуцированному диабету [163].

Апоптозу, как генетически детерминированному (программируемому) типу гибели клеток ранее противопоставляли «нерегулируемый» тип клеточной гибели — некроз. Однако обнаруженные недавно факты указывают на то, что некроз также протекает по детерминированным сценариям. В связи с этим было предложено ввести в обиход новый термин - «некроптоз» [25].

Считается, что образование большого количества повреждений ДНК в клетке приводит к гиперактивации PARP-1, истощению ATФ, энергетическому коллапсу и «переключению» апоптотического пути клеточной гибели на некротический [39, 48, 72, 283]. PARP-1, таким образом, играет центральную роль в запуске некроза при массированном повреждении ДНК [121]. Однако в недавних исследованиях было показано, что активация PARP-1 может не являться непосредственной причиной некроза, поскольку она находится под контролем серин-треониновых киназ RIP1 и RIP3 (receptorinteracting proteins) и происходит на более поздних этапах некроза [113]. Была обнаружена прямая связь между киназами RIP1/RIP3 и активацией PARP-1 в осуществлении TRAIL {tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis inducing ligand}-индуцированного некроптоза: PARP-1 активируется после ее фосфорилирования киназами RIP1 и RIP3. Поскольку из-за активации TRAIL-пути PARP-1 постоянно находится в активированном состоянии в течение длительного периода, это ведет к истощению АТФ. В этих условиях ингибитор киназы RIP1 (Nec-1) и ингибитор PARP (PJ34) препятствуют падению уровня АТФ и «переключают» сценарий клеточной гибели с некроптоза на апоптоз. TRAIL-индуцированный некроптоз также не может быть реализован в PARP-1⁻/- фибробластах эмбрионов мыши [113].

Еще один путь клеточной гибели, в котором задействована система поли(АДФ-рибозил)ирования, — это аутофагия (см. выше). Аутофагия регулируется работой серинтреониновой киназы mTOR (mammalian target of rapamycin) и АМФ-протеинкиназы. Оба фермента восприимчивы к метаболическим изменениям и обладают противоположным действием при запуске аутофагии: mTOR находится в активном состоянии при высоком энергетическом статусе клетки и подавляет запуск аутофагии, а при падении уровня АТФ в клетке происходит снижение активности mTOR и активация АМФ-протеинкиназы, что приводит к запуску аутофагии [25].

В процессе аутофагии PARP-1 не расщепляется, сохраняет активность и синтезирует избыточное количество PAR. Было показано, что при ингибировании PARP снижается активность АМФ-протеинкиназы и интенсивность процессов аутофагии, что является доказательством участия PARP в этом процессе, хотя точный механизм взаимодействия PARP-1 с белками, вовлеченными в процессы аутофагии, остается не выясненным [180]. Нельзя также исключать влияния PARP-1 на mTOR-сигнальный путь, поскольку у белка Rictor (входит в состав mTOR комплекса 2) обнаружен потенциальный PAR-связывающий мотив [25].

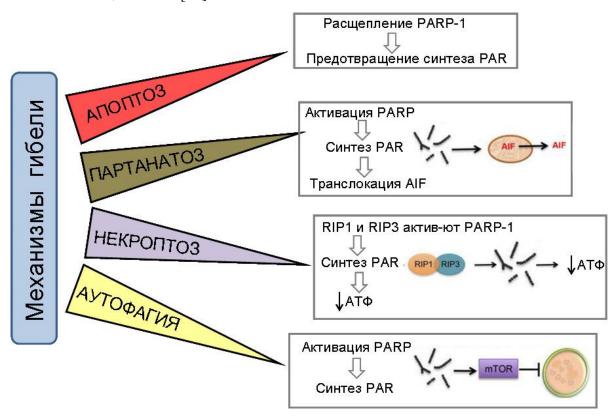


Рисунок 2.7. Участие PARP в разных типах клеточной гибели [25, с изменениями].

Таким образом, единственный тип клеточной гибели в котором PARP-1 не участвует - это каспаза-зависимый апоптоз, при котором происходит инактивация PARP-1 (рис. 2.7) [25]. При реализации других путей клеточной гибели, наоборот, происходит активация PARP-1 (рис. 2.7). Изменение активности PARP-1 (активация или ее подавление) позволяет регулировать процессы гибели клетки — усиливать гибель опухолевых клеток или способствовать выживаемости нормальных клеток и тканей в условиях патологии [25].

2.2.5. Структура и функции PARP-2

РАRP-2 локализована в ядре и выполняет схожие с PARP-1 функции, а отчасти их дублирует [71]. Она состоит из 570 аминокислотных остатков и имеет молекулярную массу 62 кДа [22, 223]. PARP-2 была выявлена после обнаружения того факта, что эмбриональные фибробласты мышей с PARP-1 дефектным геном сохраняли способность (примерно на 10%) к синтезу PAR [21].

РАRP-2 отличается от PARP-1 структурой ДНК-связывающего домена и отсутствием домена автомодификации (рис. 2.5) [223, 259]. ДНК-связывающий домен PARP-2 состоит из 64 аминокислотных остатков и лишен каких-либо цинковых пальцев, при этом PARP-2 способна связываться с ДНК-повреждениями и активироваться [22, 76, 259]. Предполагают, что взаимодействие PARP-2 и ДНК возможно благодаря высокому содержанию основных аминокислот в ДНК-связывающем домене PARP-2 [76, 259]. Каталитический домен PARP-2 имеет высокую (69%) гомологию с аналогичным доменом PARP-1, различия обнаруживаются в сайте связывания белка-акцептора, что выражается в различной субстратной специфичности. Например, известно, что PARP-1 избирательно поли(АДФ-рибозил)ирует гистон Н1, тогда как PARP-2 – гистон Н2В [22].

Так же как PARP-1, PARP-2 способствует сохранению целостности генома и выживание клетки, что, однако не исключает специфические функции обоих ферментов в этих процессах [71]. Как и PARP-1, PARP-2 рассматривается в качестве молекулярного сенсора ДНК-разрывов. Активность PARP-2 стимулируется в присутствии повреждений ДНК [223]. Считают, что PARP-2 способствует репарации ДНК, поскольку известно о взаимодействии PARP-2 с рядом белков, участвующих в различных репарационных механизмах, главным образом, с белками ЭРО (ХРСС1, ДНК-полимераза β, ДНК-лигаза III). PARP-2 способна образовывать гомодимеры и гетеродимеры с PARP-1 [71, 76, 172, 222]. Вопрос об участии PARP-2 в репарации двухцепочечных разрывов ДНК в целом

слабо исследован. Известно только о взаимодействии PARP-2 с некоторыми белками НГР, например, с ДНК-зависимой протеинкиназой [108].

Было показано, что в клетках кинетические параметры связывания PARP-1 и PARP-2 с индуцированными лазером сайтами повреждения ДНК отличаются. PARP-1 быстро накапливается по сайтам повреждений и кратковременно связывается с ДНК, для PARP-2 характерно медленное продолжительное накапливание в участках репарации. Вместе эти данные указывают на вовлечение PARP-2 в процесс репарации на более поздних стадиях по сравнению с PARP-1. Таким образом, PARP-2 имеет важную, но отличную от PARP-1 роль в пространственно-временной организации репарации [4].

В работе Кутузова и соавторов было показано, что PARP-2, как и PARP-1, взаимодействует с АП-сайтами с образованием стабильных аддуктов и способна выщеплять остаток 5'-дезоксирибофосфата из гидролизованного АП-сайта, а также ингибирует активность некоторых белков ЭРО (ДНК-полимераза β и FEN1 - flap endonuclease 1) [4, 134, 135]. Авторы работы указывают на регуляторную, но не равнозначную роль обеих PARP в процессе ЭРО. Различия касаются как стадий ЭРО, так и степени оказываемого ими влияния. В целом, PARP-2 оказывает более слабое воздействие на активность ферментов ЭРО, чем PARP-1 [4, 134, 135].

Помимо участия в репарации, PARP-2 также способствует сохранению целостности теломерных участков хромосом за счет регуляции активности TRF2 – telomeric repeat-binding factor 2 [67] и модулирует структуру центромер. Было показано, что в клетках PARP-2^{-/-} увеличивается количество разрывов ДНК именно в центромерных участках хромосом. Известно, что PARP-2 взаимодействует с белками кинетохора, что характерно для белков сверочной точки сборки веретена деления [71]. В процессе апоптоза PARP-2 расщепляется каспазой-8 [259].

Двойной нокаут PARP-1 и PARP-2 приводил к ранней эмбриональной гибели у мышей, из-за чего предполагают, что поли(АДФ-рибозил)ирование является критичным процессом для ранних стадий эмбриогенеза. [22, 76, 201, 223]. При этом интересно, что клетки лимфобластомы курицы DT40 (с нефункциональным геном PARP-2 и нокаутом по PARP-1) сохраняли жизнеспособность в процессе культивирования [102].

2.3. Ингибиторы PARP

2.3.1. Первое поколение ингибиторов PARP - производные никотинамида и бензамида

К простейшим ингибиторам PARP относится никотинамид (NA) (рис. 2.8) и некоторые близкие ему по структуре синтетические соединения. Никотинамид и его 5-

метил производное являются конкурентными ингибиторами PARP [60]. Структурное сходство с никотинамидом имеют бензамид и его производные — 3-аминобензамид (3-AB) (рис. 2.8) и 3-метоксибензамид. Их исследование в качестве ингибиторов PARP началось еще в 1970-х гг. Было показано, что по эффективности действия они значительно превосходят никотинамид [53, 63, 227]. Так IC₅₀ 3-AB для изолированного фермента PARP-1, полученного из тимуса коровы, равняется ок. 30 мкМ, тогда как IC₅₀ никотинамида — только 210 мкМ [30]. Исследования с производными бензамида показали важность карбоксамидной группы для PARP-ингибирующей активности [53, 239]. Предполагают, что бензамиды ингибируют PARP, препятствуя связыванию НАД+ с активным центром фермента [53, 239, 241]. Однако, бензамиды также могут связываться с ДНК, препятствуя распознаванию разрывов ДНК PARP, и, следовательно, предотвращая ее активацию [53, 239].

NH₂

$$NH_{2}$$

$$NH_{2}$$

$$NH_{2}$$

$$NH_{2}$$

$$NH_{2}$$

$$NH_{2}$$

$$NH_{2}$$

$$(IC_{50} = 210 \text{ MKM } [30])$$

$$(IC_{50} = 30 \text{ MKM } [30])$$

Рисунок 2.8. Строение никотинамида (NA) и 3-аминобензамида (3-AB).

Наиболее популярным ингибитором PARP является 3-АВ. Вплоть до настоящего времени его широко применяют в экспериментах на клеточных культурах и на животных. Во многом это связано с отсутствием у него сколь-нибудь существенной токсичности. Было показано, что 3-АВ оказывает защитное действие при воспалении, а также на моделях ишемии/реперфузии — кишечника [65], почек [158], сердца [41], печени [42], сетчатки [58]. Кроме того, 3-АВ и никотинамид *in vitro* препятствовали гибели островковых клеток поджелудочной железы при оксидативном стрессе [210] и *in vivo* предотвращали развитие стрептозотоцин-индуцированнного диабета [159]. Также 3-АВ способен повышать чувствительность опухолевых клеток к действию рентгеновского излучения [47] и усиливать цитотоксическое действие ДНК-алкилирующих соединений [38]. Таким образом, можно констатировать, что до настоящего времени получены

многочисленные данные, однозначно демонстрирующие явное цитопротективное действие этой группы соединений на разных моделях повреждения.

К недостаткам этих соединений следует отнести их относительно невысокую эффективность; концентрации/дозы этих соединений для ощутимого ингибирования PARP *in vitro* и *in vivo* достигают 3-10 мМ или несколько сотен мг/кг, соответственно [53, 239]. Так при внутрибрюшинном введении 3-АВ крысам (в дозе ок. сотни мг/кг) в сердце и других органах наблюдали только частичное подавление накопления PAR, вызванного ишемией/реперфузией этих органов [144]. Возможно, это связано с особенностями фармакокинетики или транспортом в клетку этих соединений.

Однако помимо ингибирования PARP соединения этой группы проявляют и другие фармакологические эффекты. При использовании в высоких концентрациях/дозах они действуют как антиоксиданты, что, видимо, вносит определенный вклад в их защитное действие на моделях различных патологий in vitro и in vivo [248]. Бензамид и 3-АВ в концентрации 5 мМ и выше также ингибируют ферменты, катализирующие реакции моно(АДФ-рибозил)рования [53, 239], подавляют метаболизм глюкозы, биосинтез de novo пуринов, синтез ДНК и деление клеток [53, 63]. В целом, бензамид и его производные как ингибиторы PARP имеют ряд недостатков, включая низкую активность неспецифичность действия, что ограничивает их применение в терапии различных заболеваний [53, 239].

2.3.2. Ингибиторы PARP второго поколения

В 1990-х годах были синтезированы новые ингибиторы PARP, которые отчасти были лишены недостатков никотинамида и бензамидов [53, 63, 201]. Второе поколение ингибиторов PARP разрабатывалось на основе никотинамида, при этом в структуре новых ингибиторов карбоксамидная группа ориентирована в цис-конформации, что необходимо для корректного взаимодействия с НАД+-связывающим сайтом PARP-1 [53]. Получение этих соединений стало возможным благодаря структурно-функциональным необходимые исследованиям, которые определили основные принципы, ДЛЯ эффективного ингибирования PARP (рис. 2.9):

- 1)- богатая электронами ароматическая или полиароматическая гетероциклическая система;
- 2)- нерасщепляемая связь по положению, соответствующему 3-положению у бензамидов;

3)- карбоксамидная группа, имеющая, по крайней мере, один протон, необходимый для образования предполагаемой водородной связи с ферментом; замена водорода на остаток метила приводила к потере PARP-ингибирующей активности [63].



Рисунок 2.9. Особенности структуры потенциальных ингибиторов PARP второго поколения [63, с изменениями].

Суто с коллегами [245] синтезировали ряд соединений, которые являются аналогами 3-АВ с ригидной структурой – дигидроизохинолиноны и изохинолиноны. 5-Одним ИЗ наиболее известных примеров таких соединений является аминоизохинолинон (5-AIQ) (рис. 2.10). Было показано, что эти соединения являются более сильными ингибиторами PARP, по сравнению с 3-AB [53, 245]. В свою очередь, исходя из структуры дигидроизохинолинонов и изохинолинонов, были получены еще более сильные ингибиторы PARP с тетрациклической структурой, например: GPI 6150 (рис. 2.10). Также на основе изохинолинонов сконструированы трициклические ингибиторы PARP, например: 4-амино-1,8-нафталимид (ANI) и PJ34 (рис. 2.10) [53].

Таким образом, соединения с ковалентно «заякоренной» карбоксамидной группой в составе гетероциклического кольца (5-AIQ, PJ34, ANI и др.) (рис. 2.10) являются более сильными ингибиторами PARP, по сравнению с ингибиторами первого поколения [63]. Закрепление карбоксамидной группы в нужной ориентации также возможно за счет образования внутримолекулярной водородной связи как у соединения NU1085 (рис. 2.10), которое является наиболее эффективным ингибитором PARP второго поколения (IC₅₀=80 нМ) [63].

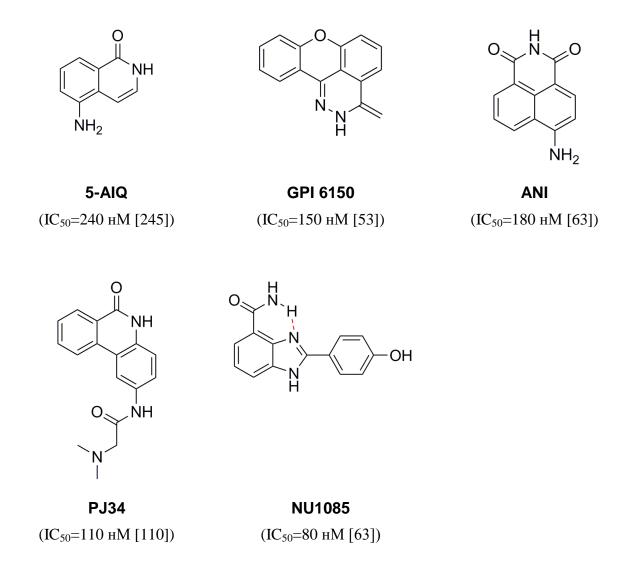


Рисунок 2.10. Структура ряда ингибиторов PARP второго поколения.

2.3.3. Ингибиторы PARP третьего поколения

Установление кристаллической структуры каталитического домена PARP-1 курицы позволило получить новые, еще более сильные ингибиторы третьего поколения [53, 63]. Кристаллизация PARP-1 курицы с ANI и NU1025 в НАД+-связывающем сайте показала, что карбоксамидная группа ингибиторов образует несколько водородных связей с остовом белка, поэтому закрепление карбоксамидной группы в гетероциклическом кольце предотвращает ее свободное вращение, как это происходит в случае 3-AB и значительно снижает свободную энергию образования комплекса ингибитора с PARP-1. В этих исследованиях было показано, что эффективность ингибирования PARP-1 зависит от ориентации карбоксамидного кислорода ингибитора в положении, при котором он образует две водородные связи с Ser904 и Gly863, тогда как соседний азот амидной группы создает водородную связь с Gly863 [53, 63, 241].

На основе кристаллографических данных было сконструировано несколько новых типов ингибиторов PARP, содержащих карбоксамидную группу, встроенную в семичленное кольцо (рис. 2.11): производные трициклических лактам-индолов и трициклических лактам-бензимидазолов [52, 63].

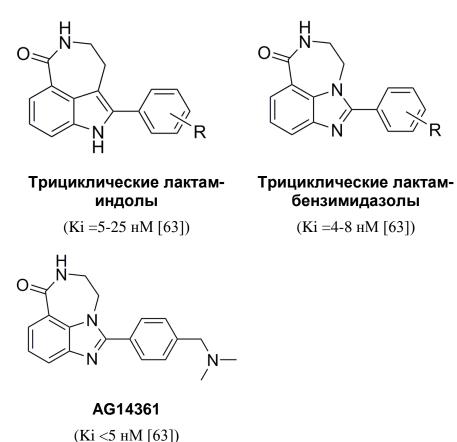


Рисунок 2.11. Структура ингибиторов PARP третьего поколения.

В этих соединениях карбоксамидная группа удерживается в нужной ориентации в НАД+-связывающем сайте фермента, при этом молекула ингибитора образует дополнительные водородные связи с белком в прилегающих к этому сайту областях (рис. 2.12, показано для ингибитора AG14361). Благодаря «неплоской» конформации семичленного лактамного кольца у такого рода соединений происходит максимальное сближение «лактамных» карбонильной и NH-групп с Ser904 и Gly863 фермента и образование между ними водородных связей. Кроме того, остатки Туг907, Туг889 и Туг896 каталитического домена PARP могут взаимодействовать с бензимидазольным ядром и заместителем в положении C2 этих соединений [63].

В настоящее время именно ингибиторы PARP третьего поколения рассматриваются в качестве перспективных фармакологических средств: AG014699, veliparib, olaparib, CEP9722 и др. (табл. 2.3) [150, 268].

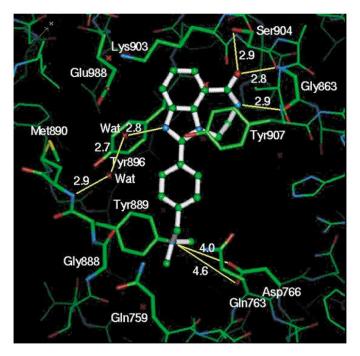


Рисунок 2.12. Ориентация ингибитора PARP AG14361 в активном центре каталитического домена PARP-1 курицы.

Структура ингибитора – белым, структура фермента – зеленым, желтые линии – водородные связи с расстоянием (в Å), wat – молекула воды [63].

2.3.4. Селективные ингибиторы поли(АДФ-рибоза)-полимераз

В настоящее время ингибиторы PARP проходят клинические испытания (см. ниже), и поэтому возникает проблема разработки и синтеза ингибиторов, селективных в отношении отдельных PARP [25]. Использование селективных ингибиторов также позволит установить функции каждого представителя этого семейства белков [25, 241], например, применение селективных ингибиторов PARP-1, -2 и -3 позволит прояснить роль каждой из них в клеточном ответе на повреждение ДНК [241].

После оценки связывания 185 известных ингибиторов с каталитическим доменом разных поли(АДФ-рибоза)-полимераз обнаруженные профили связывания показали отсутствие селективности у этих соединений [260]. Поскольку большинство ингибиторов PARP имеют структурное сходство с НАД+, они являются конкурентными и их действие осуществляется за счет связывания с донорным сайтом каталитического домена. Структура этого сайта у всех поли(АДФ-рибоза)-полимераз гомологична, что и обуславливает неселективность действия ингибиторов PARP [53, 201]. Следует отметить, что каталитический домен включает акцепторный (взаимодействует с белками-мишенями) и донорный сайт (связывает НАД+), в структуре донорного сайта, в свою очередь, выделяют никотинамид-связывающий карман и АДФ-рибоза-связывающий карман [241].

При разработке селективных ингибиторов PARP должна учитываться структура всех доменов. Кроме каталитического домена в состав поли(АДФ-рибоза)-полимераз входят и другие последовательности, определяющие отличия в структуре и функциях для каждого белка — цинковые пальцы (у PARP-1), домен WGR, содержащий последовательность Trp-Gly-Arg (у PARP-1, -2 и -3), BRCT (у PARP-1 и -4) и др. В структуре танкираз содержатся уникальные анкириновые повторы и SAM (sterile alpha motif)-последовательности, не обнаруженные у других белков семейства. Воздействуя на некаталитические домены, можно не только селективно ингибировать отдельные представители семейства PARP, но и «выключать» их специфические функции [241].

Между тем даже в каталитическом домене у белков семейства PARP присутствуют высоковариабельные участки, на основе которых можно разработать селективные ингибиторы, например, акцепторная петля акцепторного сайта и D-петля. Поскольку акцепторный сайт каталитического домена отвечает за связывание с разными белками-мишенями, модифицируемыми PAR, структура этого участка отличается у разных белков семейства [241].

Никотинамид-связывающие карманы в донорном сайте PARP-1 и PARP-2 практически идентичны, тогда как в структуре АДФ-рибоза-связывающих карманов наблюдаются незначительные отличия. Небольшие молекулы классических ингибиторов PARP (например, 3-AB) взаимодействуют только с никотинамид-связывающим карманом. Несмотря на высокую степень гомологии донорных сайтов PARP-1 и PARP-2, удалось получить ингибиторы с высокой избирательностью действия относительно этих двух ферментов. Ингибитор FR257517 (в 10 раз более селективен в отношении PARP-1 по сравнению с PARP-2) взаимодействует не только с никотинамид-связывающим карманом активного центра, но и с рядом аминокислотных остатков АДФ-рибоза-связывающего кармана. Другой пример - производное изохинолинона - ВҮК204165, который взаимодействует с донорным сайтом фермента и при этом в 100 раз более селективен в отношении PARP-1 по сравнению с PARP-2 [86]. Следует отметить, что селективные ингибиторы PARP-1 характеризуются объемными или «удлиненными» боковыми группами [241].

Разработаны соединения, способные необратимо ингибировать PARP-1. К ним относятся С-нитрозо-производные (3-нитрозобензамид и 6-нитрозо-1,2-бензопирон), полученные из соответствующих предшественников, содержащих аминогруппу. Механизм их действия основан на окислении остатков цистеина, участвующих в образовании координационных связей в F1-цинковом пальце фермента, что приводит к

образованию дисульфидных связей и потере иона Zn^{2+} [46]. Нарушение структуры F1цинкового пальца приводит к неспособности PARP-1 к активации при наличии ДНКповреждений [53, 236].

При сравнении ингибиторной активности хиноксалинов в отношении разных белков семейства PARP было обнаружено, что эти соединения избирательно ингибируют PARP-2, как выяснилось, за счет специфического взаимодействия с уникальными аминокислотными остатками в активном центре этого белка. Ряд изохинолинонов также селективно ингибирует PARP-2, некоторые - в 60 раз более эффективно, чем PARP-1 [200]. Считается, что эта избирательность достигается благодаря остатку Gln319 в активном центре PARP-2 (у PARP-1 в пространственно эквивалентном положении находится остаток Glu763) [200].

У PARP-3 АДФ-рибоза-связывающий карман немного больше по размеру и более гидрофобный чем у PARP-1 и PARP-2. Также структура D-петли каталитического домена PARP-3 отличается от структуры D-петли у PARP-1 и PARP-2. Учитывая эти структурные различия, были предприняты попытки создания новых селективных ингибиторов PARP-3. Одним из удачных примеров такого конструирования является производное хинозалинона – MEO328 [241].

Меньше трудностей возникает при конструировании конкурентных селективных ингибиторов танкираз. Это связано с тем что, в отличие от других PARP, они имеют меньший по размеру и более гидрофобный донорный сайт. Например, один из первых полученных ингибиторов танкираз XAV939 в 200 раз более эффективно ингибирует танкиразы по сравнению с PARP-1 [241].

Таким образом, знания о структурных сходствах и различиях между разными представителями семейства PARP являются важной основой для создания новых, более совершенных ингибиторов с высокой эффективностью, селективностью и улучшенными фармакокинетическими свойствами, а терапевтический потенциал ингибиторов PARP является стимулом для продвижения таких исследований [25, 165, 241]. С развитием новых методов скрининга появилась возможность поиска новых соединений, избирательно ингибирующих определенные представители этого семейства за счет взаимодействия с некаталитическими доменами, главным образом с аллостерическими центрами. Элементы структуры, вовлеченные в аллостерическую регуляцию, как правило, уникальны для каждой PARP, что позволяет создавать высокоселективные ингибиторы PARP [241].

2.3.5 Ингибиторы PARP нуклеозидной природы

За последние три десятилетия химия нуклеозидов достигла больших успехов в создании соединений, оказавшихся эффективными при лечении ряда вирусных заболеваний (СПИД, герпес, вирусный гепатит) и злокачественных заболеваний крови (лейкозы) [87, 92, 220]. Цитотоксическое действие аналогов нуклеозидов на опухолевые клетки реализуется через различные механизмы, но все они, в конечном счете, ведут к приостановлению деления и к гибели клетки [127, 145, 176]. В этой связи особый интерес представляет регуляция активности PARP-1 аналогами нуклеозидов.

В одной из первых работ, в которых исследовалось влияние нуклеозидов на активность PARP (в качестве препарата фермента использовали ядра, выделенные из клеток HeLa), было обнаружено, что помимо эндогенного ингибитора PARP - никотинамида, ингибирующую активность в отношении PARP проявляют некоторые компоненты нуклеиновых кислот – тимин и, в особенности, – тимидин (Thd). В отличие от ТМФ, ТДФ и ТТФ, Thd вызывает выраженное, дозозависимое ингибирование PARP. В этой работе также было впервые исследовано влияние заместителей в положении С5 азотистого основания на PARP-ингибирующую активность нуклеозидов. Показано, что аналог тимидина 5-фтор-2'-дезоксиуридин практически не ингибировал PARP ($K_i > 1000 \text{ мкM}$) [208]. Позже этот факт был подтвержден в другой работе [204]. Использование в положении С5 галогена большего размера усиливало PARP-ингибирующий эффект: для 5-бромуридина он был сопоставим с действием Thd ($K_i = 45 \text{ мкM}$), а для 5-бром-2'-дезоксиуридина - даже превышал его ($K_i = 35 \text{ мкM}$) [204, 208].

На очищенной PARP-1, выделенной из клеток линии L1210, Пивазян с коллегами структурно-функциональное исследование широкого ряда производных нуклеозидов: производных Thd и 2'-дезоксиуридина с разными заместителями в положениях С4 и С5 пиримидинового кольца, а также в положениях С3' и С5' остатка пентозы [204]. Было показано, что: 1)- 4-иминоксильные производные Thd и дезоксиуридина не способны ингибировать PARP-1; 2)- константа ингибирования PARP-1 для 5-алкилзамещенных производных уридина зависит от размера алкильного остатка, оптимальными заместителями оказались остатки этила и пропила ($\mathbf{K_i}$ для этих соединений была сопоставима с Кі для 3-АВ); 3)- увеличение длины алкильного остатка ухудшает ингибирующие свойства соединений: 4)-PARP-ингибирующие свойства галогензамещенных производных 2'-дезоксиуридина, как было показано ранее Прейс и соавторами [208], зависели от размера заместителя. Таким образом, авторы показали, что PARP-ингибирующая активность производных уридина с заместителями в положении C5 строго зависит от размера и заряда заместителя.

Изменения в структуре сахарного остатка также могут значительно повлиять на ингибиторный потенциал нуклеозидов [204, 242]. Тестирование производных Thd с модифицированным остатком пентозы показало, что наличие азидо- или аминогруппы в положениях СЗ' или С5' улучшает PARP-ингибирующие свойства этих соединений по сравнению с Thd [204].

Другие исследователи также изучали производные Thd и уридина в качестве потенциальных ингибиторов PARP [30, 212].

Еще одним примером ингибиторов PARP нуклеотидной природы является карбаникотинамидадениндинуклеотид (carba-NAD). Это соединение является аналогом НАД+, у которого кислород в сахарном остатке никотинамиднуклеотида замещен на метиленовую группу. Благодаря этому структурному отличию carba-NAD не расщепляется в донорном сайте и конкурентно ингибирует PARP [53].

В заключение этого раздела хотелось бы отметить, что для производных нуклеозидов (как и для большинства других ингибиторов PARP) характерен конкурентный тип ингибирования [234, 243].

2.4. Ингибиторы PARP – новая группа фармакологических веществ

В настоящее время в противоопухолевой терапии существуют две стратегии использования ингибиторов PARP, первая из которых направлена на усиление токсичности некоторых химиотерапевтических препаратов и радиотерапии (адъювантная терапия), либо непосредственно в качестве противоопухолевого лекарственного средства (монотерапия) [150]. Предпосылкой для использования ингибиторов PARP в адъювантной терапии стало предположение, что устойчивость опухолевых клеток к ДНК-повреждающим агентам во многом связана с участием PARP в репарации ДНК [201]. Кроме того, в опухолевых клетках активность PARP-1 выше, чем в нормальных клетках, что обуславливает их высокую лекарственную устойчивость [56, 231].

Как следует из накопленных к настоящему времени клинических данных, использование ингибиторов PARP в адъювантной терапии злокачественных заболеваний дает хорошие результаты в сочетании с алкилирующими химиотерапевтическими средствами и радиотерапией [63, 216]. Монотерапия опухолей, основанная на применении ингибиторов PARP, также может быть эффективна, но только в отношении опухолевых клеток, имеющих дефектные белки BRCA1, BRCA2 [73, 164]. В настоящее время порядка

10 ингибиторов PARP находятся на разных стадиях клинических испытаний как противоопухолевые средства (табл. 2.3) [64, 150].

Таблица 2.3. Клинические исследования ингибиторов PARP [150, с изменениями].

Ингибитор Терапия		Стадия клин.	Виды опухолей	Фарм.
типоптор	T opumin	испытаний		компания
	Адъювантная			
	терапия /		Меланома, опухоли молочной	
AG014699	Монотерапия	III	железы, яичников, матки	Pfizer
			Меланома, лимфомы,	
			лейкемия, опухоли молочной	
	Адъювантная		железы, яичников, матки,	
	терапия /		поджелудочной железы,	
Veliparib	Монотерапия	III	печени простаты и др.	Abbott
			Меланома, опухоли молочной	
			железы, яичников, матки,	
	Адъювантная		поджелудочной железы,	
	терапия /		пищевода, легких, мозга,	Astra
Olaparib	Монотерапия	III	прямой кишки и др.	Zeneca
	Адъювантная			
	терапия /			
CEP9722	Монотерапия	II	Лимфомы	Cephalon
	Адъювантная		Лимфомы, лейкемия, опухоли	
	терапия /		молочной железы, яичников,	LEAD
BMP-673	Монотерапия	II	простаты	Pharma
	Адъювантная			
	терапия /		Меланома, лейкемия, опухоли	
Niraparib	Монотерапия	III	мозга, яичников	Tesaro
	Адъювантная			
E7016	терапия	II	Меланома	Eisai
	Адъювантная			
INO-1001	терапия	I	Меланома	Inotek
	Адъювантная			
	терапия /		Опухоли яичника, В-клеточные	
E7018	Монотерапия	II	лимфомы	Eisai

2.4.1. Применение ингибиторов PARP в монотерапии опухолей

Известно, что опухолевые супрессоры BRCA1 и BRCA2 (BRCA1/2) играют ключевую роль в ГР, обеспечивающей точную репарацию двухцепочечных разрывов ДНК. Нарушение функции любого из них направляет репарационные механизмы на путь НГР, которая может приводить к мутациям, нестабильности генома и гибели клетки [31, 50]. Инактивация генов BRCA1/2 предрасполагает к раку яичников, молочной, поджелудочной и предстательной желез [256, 270].

Линии опухолевых клеток, имеющие дефектные белки BRCA1/2, проявляют повышенную чувствительность к ДНК-повреждающим агентам, вызывающим образование двухцепочечных разрывов [31]. Такие клетки также оказались очень восприимчивыми к действию ингибиторов PARP [45, 88, 102, 172]. Точные молекулярные механизмы такой селективной токсичности до конца не изучены [121].

Существует несколько гипотез, о том, как ингибиторы PARP вовлечены в гибель BRCA1/2-дефектных опухолевых клеток. Согласно одной ИЗ них, клетки инактивированными генами BRCA1/2 способны устранять только однонитевые повреждения ДНК, а в случае ингибирования PARP-1 они полностью теряют способность к репарации ДНК. В таких клетках происходит накопление одноцепочечных разрывов и увеличивается частота возникновения двухцепочечных разрывов, которые в силу дефекта BRCA1/2 не могут быть устранены через ГР. В результате запускаются механизмы НГР, что неизбежно приводит к геномной нестабильности, серьезным хромосомным нарушениям, летальным мутациям и гибели клеток [29, 45, 164, 175, 199, 201].

Согласно другой гипотезе PARP-1 может брать на себя функцию защиты от нуклеаз свободных концов цепи ДНК, образующихся при двухцепочечных разрывах, в отсутствие функционального белка BRCA2 [172].

Монотерапия опухолей ингибиторами PARP также может быть эффективной в случае нарушения функции белков PALB2, RAD51, RAD54, DSS1, RPA1, NBS1, ATR, ATM, CHK1, CHK2 и др. Как и в случае BRCA1/2 эти белки задействованы в механизмах ГР [73, 164]. Например, было показано, что ингибиторы PARP являются токсичными для опухолевых клеток, дефектных по белкам ATM и RAD51 [170, 269]. Ингибиторы PARP NCT01618136 и NCT01063517 сейчас находятся на I и II стадиях клинических испытаний для терапии опухолей дефектных по ATM [150].

Преимущество монотерапии с использованием ингибиторов PARP по сравнению с другими схемами лечения пациентов с опухолевыми заболеваниями заключается в селективном воздействии ингибиторов только на опухолевые клетки, поскольку в них нарушены определенные механизмы репарации, и они обладают высоким пролиферативным статусом. В отношении нормальных клеток эти соединения либо абсолютно не токсичны, либо проявляют минимальную токсичность [31, 53]. В настоящее время не менее 7 ингибиторов PARP проходят I-III стадии клинических испытаний в качестве лекарственного средства для монотерапии опухолей с нарушениями в системе ГР (табл. 2.3) [31, 91, 150].

2.4.2. Применение ингибиторов PARP в качестве адъювантного средства при терапии опухолей

Усиление токсичности генотоксических агентов ингибиторами PARP в отношении активно пролиферирующих клеток было обнаружено в начале 1980-ых гг. [83]. В последующих исследованиях была выявлена способность ингибиторов PARP усиливать противоопухолевое действие алкилирующих соединений [51, 74, 169], ингибиторов топоизомеразы I [43, 74, 198], рентгеновского и у-излучения [51, 186, 257], цисплатины [56, 169] и некоторых других ДНК-повреждающих агентов [105, 154, 160, 178].

Большинство экспериментальных данных по использованию ингибиторов PARP в адъювантной терапии опухолей получено *in vitro* в исследованиях на опухолевых линиях клеток [43, 56, 74] и в ходе доклинических исследований на животных [54].

Первые клинические испытания адъювантного действия ингибитора PARP AG014699 при химиотерапии алкилирующим препаратом темозоломидом (TZ) были проведены в 2003 г. [206]. Известно, что токсическое действие TZ обусловлено метилированием ДНК с образованием N^7 -метилгуанина, N^3 -метиладенина и O^6 -метилгуанина. Первые два продукта для опухолевых клеток практически не токсичны, т.к. они быстро устраняются системой ЭРО, тогда как O^6 -метилгуанин не распознается системой ЭРО и во время репликации ДНК образуется некомплементарная пара оснований - O^6 -метилгуанин-тимин. В местах возникновения таких некомплементарных пар оснований репарационная система вносит персистирующие разрывы, накопление которых может приводить к гибели клетки [54, 205]. Ингибиторы PARP препятствуют репарационному удалению метилированных оснований (N^7 -метилгуанина, N^3 -метиладенина и O^6 -метилгуанина) и таким образом усиливают токсичность TZ [54, 252].

Ингибиторы топоизомеразы I проявляют свою токсичность в отношении активно пролиферирующих клеток за счет стабилизации комплекса ДНК-топоизомераза I, что препятствует продвижению репликативной вилки вдоль цепи ДНК и приводит к возникновению разрывов ДНК. В репарации таких повреждений ДНК принимает участие PARP-1, поэтому подавление ее активности приводит к заметному усилению цитотоксического действия ингибиторов топоизомеразы I [43, 54]. При этом ингибиторы PARP не оказывали никакого влияния на цитотоксическое действие ингибиторов топоизомеразы II [43].

Токсичность Dox в опухолевых клетках также во многом связана с тем, что комплексы Dox-ДНК препятствуют работе топоизомеразы II [120, 154]. Данные об активации PARP при действии на клетку Dox противоречивы. Существует ряд работ, в которых было показано увеличение активности PARP *in vitro* после обработки

культивируемых клеток Dox [69, 178, 179, 180]. В других исследованиях Dox не влиял на активность PARP или даже снижал ее [106, 277]. Также нет однозначных данных об усилении ингибиторами PARP токсичности Dox в отношении опухолей и культивируемых клеток раковых линий. Например, Али и соавторами было показано, что ингибитор PARP AG014699 не усиливал токсичность Dox как *in vitro* (на культурах клеток MDA-MB-231, SW620, LoVo), так и *in vivo* (мыши), но при этом «смягчал» кардиотоксическое действие Dox [17]. Похожие результаты были получены и в исследовании Пачер и соавторов: ингибитор PARP INO-1001 не оказывал никакого влияния на рост опухоли и противоопухолевое действие Dox у мышей, которым вводили клетки аденокарциномы 4Т1, но проявлял кардиопротекторное действие [193]. В других работах (на опухолевых линиях клеток) было показано, что ингибиторы PARP усиливают противоопухолевую токсичность Dox [154, 160, 178, 179]. Также было установлено усиление ингибиторами PARP противоопухолевого действия 5-фтордезоксиуридина [105] и цисплатины [56, 169].

Облучение рентгеновскими и ү-лучами вызывает образование однодвухцепочечных разрывов, репарация которых затрудняется при ингибировании PARP [54]. На культурах клеток HeLa, подвергшихся у-облучению, ингибиторы PARP вызывали накопление большого количества повреждений ДНК, с которыми потенциально могут образовывать комплексы PARP-1 и PCNA, а также предотвращали взаимодействие белка XRCC1 с поврежденной ДНК и снижали скорость репарации одноцепочечных разрывов [95]. После синхронизации опухолевых клеток по фазам клеточного цикла было показано, что ингибитор PARP ANI повышал радиочувствительность клеток, находящихся только в S-фазе. Это происходит за счет того, что репликативная вилка сталкивается с персистирующими (в присутствии ингибиторов PARP) одноцепочечными разрывами, что приводит к накоплению летальных двухцепочечных разрывов [82, 95, 186]. В доклинических исследованиях ингибиторы PARP повышали радиочувствительность опухолевых клеток in vitro и in vivo [51, 78, 214]. Эти работы стали предпосылкой для проведения I стадии клинических испытаний препарата Veliparib (действующее вещество - ингибитор PARP) в адъювантной терапии (совместно с радиотерапией) у пациентов с метастазами мозга [166]. Сейчас ряд препаратов на основе ингибиторов PARP, такие как Olaparib (AZD2281), Veliparib (ABT 888), Iniparib и др. проходят клинические испытания в комбинации с ТZ, топотеканом, гемцитабином, карбоплатиной и др. [109, 117, 133, 190, 211, 215].

В экспериментах на животных было показано, что ингибиторы PARP практически не влияют на токсичность противоопухолевых препаратов в отношении нормальных

тканей. Однако в ходе клинических испытаний ингибиторов PARP как адъювантных средств наблюдали усиление не только противоопухолевой активности исследуемых препаратов, но и их миелотоксичности (повреждающее действие на кроветворную ткань костного мозга) [34, 150, 206]. Например, такой побочный эффект наблюдался на II стадии клинических испытаний комбинации TZ / AG014699 [206].

Еще одним аргументом в пользу применения ингибиторов PARP при химиотерапии злокачественных новообразований Dox является их способность опосредованно, через влияние на секретом сенесцентных клеток, подавлять рост и метастазирование опухолевых клеток [188].

2.4.3. Фармакологические эффекты ингибиторов PARP при сердечно-сосудистых патологиях

Помимо применения в противоопухолевой терапии, в настоящее время обсуждается перспективность использования ингибиторов PARP и для лечения других заболеваний, в частности, различных сердечно-сосудистых патологий: ишемии, инфаркта, кардиомиопатий различного генеза, гипертрофий и старения миокарда, атеросклероза и др. [64, 194]. Все вышеперечисленные патологии сопровождаются кратковременным или хроническим повышением уровня активных форм кислорода и азота в кардиомиоцитах или эндотелиальных клетках, что может вызвать увеличение уровня повреждений ДНК, активацию PARP, снижение интенсивности процессов гликолиза, превращения трикарбоновых кислот в цикле Кребса, окислительного фосфорилирования и, как следствие, – падение уровня НАД+ и АТФ. Эти нарушения могут приводить к клеточной дисфункции и гибели клеток [36; 41, 194]. Кроме того, через активацию PARP может запускаться партанатоз [24, 266] и хроническое воспаление (вследствие коактивации транскрипционного фактора NF-кВ) [189, 282].

Негативная роль PARP при ишемии/реперфузии сердца была впервые продемонстрирована в работе Зингарелли и соавторов в 1997 г [281]. Авторами этого исследования было показано, что введение животным (крысам) ингибитора PARP 3-AB значительно улучшало состояние миокарда, снижало уровень КФК, способствовало уменьшению размера инфаркта и предотвращало падение уровня АТФ. В экспериментах на изолированном сердце крысы 3-AB также вызывал снижение размера инфарктной зоны после ишемии/реперфузии [40]. Эти эффекты были воспроизведены и в более поздних исследованиях *in vivo* и *in vitro* с применением ингибиторов PARP нового поколения: INO-1001, 1,5-DIQ, PJ34, KR-33889 [90, 116, 118].

Известно, что наиболее сильная активация PARP при инфаркте наблюдается в периинфарктной зоне и участках некротического повреждения [278]. Фармакологическое или генетически-детерминированное подавление активности PARP предотвращает истощение клеточных запасов НАД+ и АТР при оксидативном и нитрозильном стрессах, что позволяет клеткам выживать или, в случае повреждения, переключать программу клеточной гибели с некротической на апоптотическую [36, 41, 194]. В отсутствие функциональной PARP у нокаутных мышей наблюдается снижение экспрессии большинства провоспалительных медиаторов, включая цитокины, хемокины, молекулы адгезии и провоспалительные ферменты, а также происходит снижение инфильтрации лейкоцитов в ткани [247].

Исходя из этих данных, ряд авторов предполагает, что ингибиторы PARP могут быть успешно использованы в терапии ряда сердечно-сосудистых заболеваний, сопровождающихся острым или хроническим воспалением, а также при хирургических операциях на сердце и в трансплантологии [64, 90, 194, 248]. Недавно была проведена I фаза клинических испытаний ингибитора PARP INO-1001, рассматриваемого как потенциального кардиопротектора при комбинированной терапии ряда сердечно-сосудистых патологий. Также была изучена его фармакокинетика и фармакодинамика у больных с инфарктом миокарда [174].

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Используемые реактивы и материалы

В работе использовали: флаконы для культивирования клеток, 4-, 24- и 96луночные планшеты, чашки Петри («Corning & Costar», США); чашки Петри со стеклянными вставками ("MatTek", США); среды ДМЕМ и RPMI-1640 с глутамином для культивирования клеток («ПанЭко», Россия); сыворотку крови теленка эмбриональную отборную («PAA Laboratories», Австрия); пенициллин/стрептомицин («БиолоТ», Россия); гентамицин («ПанЭко», Россия); фосфатно-солевой буфер с рН 7.4 («БиолоТ», Россия); предметные и покровные стекла («Menzel», Германия); трипсин («Life Technologies», США); доксорубицин («Teva», Нидерланды); РЈ34 («Tocris Bioscience», Великобритания); эмоксипин и гепарин («Московский эндокринный завод» ФГУП, Россия); NMP- и LMPагарозу («Fermentas», Литва); первичные антитела к поли(АДФ-рибозе) (sc-56198, клон 10H) и к апоптоз-индуцирующему фактору (AIF; sc-9416, клон D-20) - производства «Santa Cruz Biotechnology» (США); вторичные анти-мышиные и анти-козьи антитела, конъюгированные с Alexa-488 (А-11059 и А-21467, соответственно) – производства 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-тетразолия «Invitrogen» (США); бромид (MTT), Hoechst 33258, DAPI и йодид пропидия, 5-AIQ, 3-аминобензамид, BYK204165, аминогуанидин, N-ацетилцистеин (NAC) и стауроспорин – все производства «Sigma-Aldrich» (США). Моноклональные антитела к тропонину Т сердца, конъюгированные с Alexa-555, любезно предоставлены С.А. Антоновым (Федеральное государственное учреждение науки Институт молекулярной генетики РАН, Москва). Все исследуемые в данной работе нуклеозидов были любезно производные предоставлены д.х.н. С.Н. Михайловым (Федеральное государственное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва).

3.2. Культуры клеток

3.2.1. Кардиомиобласты крысы Н9с2

Культура кардиомиобластов крысы H9c2 была получена из коллекции клеточных культур ATCC (American Type Culture Collection; каталожный номер CRL-1446; "LGC Standarts", Великобритания). Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, L-глутамин (2 мМ) и антибиотики (50 ЕД./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина). Субкультивирование производилось при достижении культурами плотности около 70% от монослоя, в соотношении 1:3 или 1:4.

Все эксперименты проводили на культурах покоящихся (дифференцированных) клеток Н9с2. Для этого клетки высевали на чашки Петри, 4- или 24-луночные планшеты (в зависимости от условий эксперимента) в среде ДМЕМ, обогащенной эмбриональной сывороткой теленка (10%). Культуры доращивали до монослойного состояния, затем снижали содержание сыворотки в среде до 0.5 - 1% и культивировали еще 48 ч.

3.2.2. Кардиомиоциты из новорожденных крыс

Для получения первичных культур кардиомиоцитов использовали однодневных крыс из одного помета. Перед выделением сердец каждому животному вводили внутрибрюшинно по 100 ЕД. гепарина. Выделение осуществляли согласно методике, описанной в работе [286]. Изолированные сердца помещали в буфер с рН 7.4 следующего состава: HEPES - 20 мМ, D-глюкоза - 5.55 мМ, NaCl - 137 мМ, KCl - 5.36 мМ, $MgSO_{4*}7H_2O - 0.81$ мМ, $KH_2PO_4 - 0.44$ мМ, $Na_2HPO_{4*}12H_2O - 0.34$ мМ. После удаления предсердий и сосудов препарированные и измельченные желудочки сердца переносили в стакан с 0.1% раствором трипсина в приведенном выше буфере (ферментный раствор). Затем содержимое стакана перемешивали при комнатной температуре на магнитной мешалке со скоростью OK. 100 об./мин и через каждые 5 мин раствор с диссоциированными клетками отбирали, а в стакан вносили свежий ферментный раствор. Всего проводили 12 циклов обработки ткани ферментным раствором. В конце каждой 5минутной инкубации для инактивации трипсина в получаемые суспензии клеток вносили эмбриональную сыворотку теленка до конечной концентрации 2% и в течение 1-2 минут полученную смесь осторожно пипетировали. Суспензии клеток, полученные после циклов 3-12, объединяли и помещали в охлажденную до +4°C питательную среду ДМЕМ, обогащенную эмбриональной сывороткой теленка (5%), L-глутамином (2 мМ) и антибиотиками (100 ЕД./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина). полученную суспензию клеток помещали в стерильные пробирки и центрифугировали 5 мин при 1000 об./мин. Осажденные клетки ресуспендировали в 6-8 мл питательной среды, фильтровали через стерильный кусочек нейлоновой ткани, переносили в чашки Петри диаметром 35 мм и оставляли в СО₂-инкубаторе на 1 ч. Эта процедура позволяет удалить из полученной суспензии значительную часть примесных клеточных элементов (фибробластов, эндотелиальных клеток, лейкоцитов), обладающих, в отличие от кардиомиоцитов, хорошей адгезией к необработанной желатином поверхности пластика. После этого супернатант с не прикрепившимися кардиомиоцитами аккуратно отбирали и вносили в 4- или 24-луночные планшеты, покрытые желатином (см. раздел 3.3.1). Клетки культивировали в среде ДМЕМ, содержащей 5% эмбриональной сыворотки теленка, 2 мМ L-глутамин и антибиотики (100 ЕД./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) в атмосфере 5% СО₂ при 37°С (рис. 3.1). Через 24 ч после посева производили замену среды на свежую, а через 48 ч для индукции дифференцировки культур содержание эмбриональной сыворотки теленка снижали до 0.5%.

После 48 ч культивирования в среде с пониженным содержанием эмбриональной сыворотки теленка наблюдали развитие характерных признаков дифференцированных кардиомиоцитов – клетки приобретали поперечно-полосатую исчерченность и начинали сокращаться.

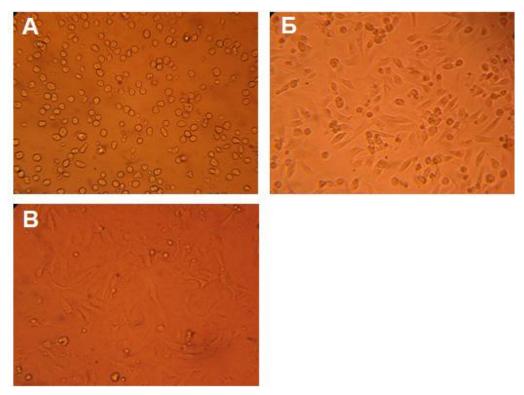


Рисунок 3.1. Вид культуры кардиомиоцитов крысы на поверхности роста на разных сроках культивирования (×250).

А - культивирование 10 мин; клетки только начинают прикрепляться к подложке. **Б** - культивирование 24 ч; значительная часть клеток уже прикреплена к подложке и хорошо распластана. **В** - культивирование 48 ч; практически все живые клетки вытянуты и хорошо распластаны.

3.2.3. Клетки опухоли яичника человека SKOV-3

Клетки SKOV-3 были любезно предоставлены д.б.н. Г.А. Посыпановой (Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московский научно-исследовательский институт организации здравоохранения и медицинской экологии). Клетки SKOV-3 культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка, L-глутамин (2 мМ) и гентамицин (50 мкг/мл).

3.2.4. Фибробласты человека

Линия фибробластов легких эмбриона человека была любезно предоставлена д.б.н. Н.Н. Вейко (Федеральное государственное учреждение науки Медико-генетический научный центр РАМН, Москва). Фибробласты культивировали в среде ДМЕМ с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка, L-глутамина (2 мМ) и антибиотиков (50 ЕД./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина).

Все клеточные культуры растили в атмосфере 5% CO₂ при температуре +37°C.

3.3. Методы исследования

3.3.1. Подготовка планшетов для культивирования кардиомиоцитов

В экспериментах с культурами кардиомиоцитов использовали 4- или 24-луночные планшеты. Предварительно поверхность роста покрывали желатином. Для этого в лунки планшетов вносили по 0.5 мл стерильного 0.5% раствора желатина в 100 мМ фосфатносолевом буфере (ФСБ), выдерживали планшеты 2 ч при 37°С, а затем удаляли раствор желатина (оставляя на поверхности лунок только тонкий слой) и подсушивали в ламинаре в течение 15 мин.

3.3.2. Обработка культур доксорубицином и другими веществами при исследовании их влияния на жизнеспособность клеток

Кардиомиобласты крысы Н9с2

Клетки высевали в 4- или 24-луночные планшеты с плотностью 30 тыс. клеток на лунку. Все эксперименты проводили на культурах дифференцированных клеток (см. раздел 3.2.1). Перед обработкой исследуемыми веществами проводили замену среды, в которой культивировались клетки, на свежую (среда ДМЕМ с 0.5 – 1% эмбриональной сывороткой, 2 мМ L-глутамином и антибиотиками). Жизнеспособность культур определяли после 48-часовой обработки Dox в заданной концентрации. Анализируемое на цитопротекторное действие вещество (ингибиторы PARP, NAC. аминогуанидин, нуклеозиды) вносили в соответствующие лунки за 2 часа до добавления Dox. Контрольные культуры ничем не обрабатывали. В зависимости от цели эксперимента применяли один из перечисленных методов анализа жизнеспособности клеток: колориметрический вариант МТТ-теста (см. раздел 3.3.3), анализ плотности культуры после окрашивания Hoechst 33258 или двойное окрашивание Hoechst 33258 и йодидом пропидия, позволяющее дифференциально анализировать живые/ апоптотические/ некротические клетки (см. раздел 3.3.4).

Кардиомиоциты из новорожденных крыс

Клетки культивировали в 4- или 24-луночных планшетах. Эксперименты начинали с замены среды, в которой культивировались клетки, на свежую (среда ДМЕМ с 0.5% эмбриональной сыворотки, 2 мМ L-глутамином и антибиотиками). Жизнеспособность кардиомиоцитов, анализировали после 72 ч инкубации с Dox с применением колориметрического варианта МТТ-теста (см. раздел 3.3.3) или двойного окрашивания Ноесhst 33258 и йодидом пропидия (см. раздел 3.3.4). Потенциальный цитопротектор (ингибиторы PARP, NAC, эмоксипин, аминогуанидин) добавляли в среду за 2 часа до внесения Dox. Контрольные культуры ничем не обрабатывали.

Клетки опухоли яичника человека SKOV-3

Клетки SKOV-3 высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 2.5 тыс. клеток на лунку, культивировали в течение 24 ч, а затем, в зависимости от цели эксперимента, добавляли тестируемые вещества: нуклеозиды, Dox или темозоломид. Ингибиторы PARP и нуклеозиды в экспериментах по исследованию их влияния на цитостатическую активность Dox или темозоломида добавляли за 2 часа до внесения последних. Во всех экспериментах инкубация с исследуемыми веществами продолжалась 72 ч. Жизнеспособность клеток SKOV-3 анализировали с помощью колориметрического или морфометрического вариантов МТТ-теста (см. раздел 3.3.3).

Фибробласты человека

Фибробласты человека высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 2.5 тыс. клеток на лунку, культивировали 24 ч, а затем добавляли тестируемые на цитотоксичность вещества (Dox или нуклеозиды) и инкубировали 72 ч. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью колориметрического варианта МТТ-теста (см. раздел 3.3.3).

3.3.3. Определение жизнеспособности клеток в культуре с применением МТТ-теста Колориметрический вариант анализа

Используемые в работе культуры клеток, в зависимости от условий эксперимента, инкубировали в присутствии исследуемого вещества (Dox, ингибиторы PARP, NAC, эмоксипин, аминогуанидин, нуклеозиды, темозоломид) в течение определенного времени. При этом контрольные культуры, как правило, ничем не обрабатывали. По окончании инкубации проводили замену среды, в которой культивировались клетки, на среду, содержащую 0.5 мг/мл МТТ, и продолжали инкубировать клетки еще в течение 1.5 ч (кардиомиоциты новорожденных крыс) или 3 ч (культуры клеток Н9с2, SKOV-3 и

фибробластов) в СО₂-инкубаторе. Затем среду с МТТ удаляли, добавляли в лунки лизирующий раствор и оставляли планшет в темном месте при +4°C на 24 ч. Перед проведением колориметрического анализа планшет помещали на 15 мин в сухой термостат с температурой 37°C, после чего измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 540 нм на микропланшетном фотометре Multiskan Ascent V1.24 (США). Из полученных значений оптической плотности вычитали фоновые значения (образцы без клеток). Жизнеспособность клеток в культурах выражали в процентах относительно значений, полученных для контрольных образцов. Средние значения оптической плотности в контрольных образцах принимали за 100%.

Лизирующий раствор готовили следующим образом. Навеску цитрата натрия (410 мг) растворяли в 100 мл деионизированной воды, добавляли 4 мл ледяной уксусной кислоты и 40 г додецилсульфата натрия. После полного растворения всех реагентов вносили 100 мл диметилформамида. Полученный лизирующий раствор хранили при комнатной температуре.

Морфометрический вариант анализа

В ряде экспериментов по оценке выживаемости клеток линии SKOV-3 при инкубации с Dox, темозоломидом и/или нуклеозидами применяли морфометрический вариант МТТ-теста. Клетки высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 2.5 тыс. клеток на лунку, через 24 ч после посева фотографировали определенные поля и добавляли исследуемые вещества; контрольные культуры, как правило, ничем не обрабатывали. По окончании инкубации (через 72 ч) проводили замену старой среды на среду, содержащую 0.5 мг/мл МТТ, и продолжали инкубировать клетки в СО₂-инкубаторе еще в течение 3 ч. После накопления в живых клетках формазана фотографировали выбранные ранее поля. Жизнеспособность клеток в культурах оценивали исходя из изменения числа клеток в выбранных полях до и после инкубации с исследуемыми веществами. Средние значения в контрольных культурах принимали за 100%.

3.3.4. Флуоресцентная микроскопия

Все работы по микроскопическому анализу флуоресцентно-окрашенных образцов клеток проводили на сканирующем конфокальном микроскопе LSM 510 META («Zeiss», Германия). В зависимости от задач эксперимента использовали один из следующих объективов: EC Plan-Neofluar $10 \times /0.30$ M27, LD Plan-Neofluar $40 \times /0.6$ Korr или EC Plan-Neofluar $40 \times /1.30$ Oil DIC M27. Объектив EC Plan-Neofluar $40 \times /1.30$ Oil DIC M27.

использовался в режиме масляной иммерсии. Анализ изображений проводили с использованием программ AxioVision 4.8 («Zeiss», Германия) и ImageJ 1.42q (National Institutes of Health, США).

Таблица 3.1. Настройки микроскопа при работе с используемыми флуоресцентными индикаторами.

Флуоресцентное вещество	Возбуждение ^а , нм	Эмиссия ⁶ , нм
Hoechst 33258	405	420–490
Alexa-488	488	505–530
Alexa-555	543	560–615
Йодид пропидия	543	560-615
Dox	488	560–615
DCF	488	505–530

<u>Примечания:</u> ^а длина волны излучения лазера; ^б диапазон длин волн пропускания фильтра.

Анализ плотности клеточных культур

Для экспериментов с культурами клеток Н9с2 использовали 4- или 24-луночные планшеты. Клетки высевали с плотностью 30 тыс. клеток на лунку. Все эксперименты проводили на культурах дифференцированных клеток (см. раздел 3.2.1). После 48-часовой инкубации с исследуемыми соединениями клетки фиксировали метанолом (0.5 мл на лунку) на льду в течение 20 мин, промывали ФСБ (2 раза по 0.5 мл на лунку) и окрашивали ядерным красителем Hoechst 33258 (0.25 мкг/мл; 10 мин). После промывки клеток ФСБ (2 раза по 1 мл на лунку) проводили флуоресцентную микроскопию (табл.3.1). Для каждой лунки (образца) получали не менее 5 изображений произвольно выбранных полей (объектив ЕС Plan-Neofluar 10×/0.30 M27). За 100% принимали средние значения показателя плотности культуры (число клеток в поле зрения) в контрольных образцах.

Двойное окрашивание клеток Hoechst 33258 и йодидом пропидия

Для дифференциального анализа живых, апоптотических и некротических клеток в культурах кардиомиоцитов и клеток H9c2 проводили их прижизненное окрашивание флуоресцентными красителями Hoechst 33258 и йодидом пропидия. Для этого по окончании инкубации клеток с исследуемыми веществами (культивировали в 4- или 24-луночных планшетах) в среду роста последовательно вносили раствор Hoechst 33258

(конечная концентрация - 5 мкг/мл; инкубация - 25 мин) и йодида пропидия (конечная концентрация - 1 мкг/мл; инкубация - 10 мин). После удаления среды, содержащей красители, клетки промывали холодным ФСБ (2 раза по 1 мл на лунку) и фиксировали метанолом (0.5 мл на лунку) на льду в течение 20 минут. Затем фиксированные клетки промывали ФСБ (2 раза по 0.5 мл на лунку) и проводили флуоресцентную микроскопию с использованием настроек, указанных в таблице 3.1. Для каждого образца (что соответствует отдельным лункам планшета) получали микрофлуоресцентные снимки 7-8 случайным образом выбранных полей (объектив LD Plan-Neofluar 40×/0.6 Когг), которые далее подвергали количественному анализу.

При использовании этого метода живые клетки умеренно окрашиваются Ноеchst 33258 и практически не окрашиваются йодидом пропидия, апоптотические клетки более интенсивно окрашиваются Hoechst 33258 и слегка окрашиваются йодидом пропидия, а некротические клетки, наоборот, интенсивно окрашиваются йодидом пропидия и умеренно – Hoechst 33258 (рис. 3.2).

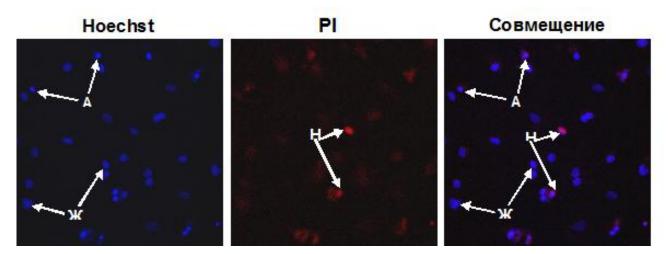


Рисунок 3.2. Двойное прижизненное окрашивание кардиомиоцитов крысы Hoechst 33258 и йодидом пропидия (PI) после трех суток инкубации с доксорубицином.

Увеличение объектива $\times 40$. Обозначения: **Ж** — живые клетки; **A** — апоптотические клетки; **H** — некротические клетки.

Средние значения процента живых и апоптотических клеток рассчитывали исходя из данных, полученных при анализе трех-четырех одинаковых образцов (соответствуют отдельным лункам планшета). За 100% принимали общее число клеток (живых, апоптотических и некротических) в контрольных образцах. Процент апоптотических клеток рассчитывали исходя из общего числа клеток в соответствующей лунке (образце).

Прижизненный анализ доксорубицина

Клетки H9c2, изолированные кардиомиоциты или клетки SKOV-3 высевали на чашки Петри со стеклянными вставками (\emptyset 35 мм) – по 100 тыс. клеток/чашку. После 48 ч SKOV-3) культивирования (культура или после перевода клеток покоящееся/дифференцированное состояние (культура H9c2 И изолированные кардиомиоциты) клетки инкубировали в присутствии 1 мкМ Dox в течение 0.5 – 24 ч в атмосфере 5% СО₂ при температуре 37 С. Для контрастирования ядер за 20 мин до окончания инкубации в среду вносили Hoechst 33258 (до концентрации 5 мкг/мл), затем клетки отмывали ФСБ (2 раза по 2 мл) и проводили микрофлуоресцентный анализ при настройках, указанных в таблице 3.1.

Иммунофлуоресцентное окрашивание поли(AД Φ -рибозы) и апоптоз-индуцирующего фактора (AIF)

Клетки Н9с2 высевали на стерильные стекла, помещенные в лунки 4-луночных планшетов с плотностью 30 тыс. клеток на лунку. После перевода клеток в покоящееся состояние (см. раздел 3.2.1) проводили обработку культур Dox (1 мкМ; 1, 3, 6 или 24 ч). Если это было необходимо, за 2 ч до добавления Dox в соответствующие образцы вносили ингибитор PARP PJ34 (конечная концентрация - 2 мкМ) или эмоксипин (конечная концентрация – 0.5 мМ). Контрольные культуры ничем не обрабатывали. По окончании инкубации культуры промывали ФСБ и фиксировали метанолом (0.5 мл на лунку) в течение 20 мин на льду. Фиксированные клетки промывали ФСБ (2 раза по 0.5 мл на лунку) и оставляли на 30 мин в блокирующем неспецифическое связывание буфере (ФСБ, содержащий 5% эмбриональной сыворотки теленка и 0.25% тритона X-100). После этого образцы инкубировали в течение 15 ч при +4°C в буфере того же состава с моноклональными антителами мыши к PAR (разведение 1:300) или с поликлональными антителами козы к АІГ (разведение 1:200). Затем промывали ФСБ (0.5 мл на лунку; 4 раза по 5 мин) и инкубировали с соответствующими вторичными антителами (см. раздел 3.1), конъюгированными с Alexa-488 (разведение 1:1000 в ФСБ), в течение 1 ч при комнатной температуре. После окончания инкубации образцы промывали ФСБ (1 мл на лунку; 2 раза по 5 мин), окрашивали ядра йодидом пропидия (0.3 мкг/мл; 5 мин) и снова промывали ФСБ (1 мл на лунку; 2 раза). На нескольких контрольных образцах проводили оценку неспецифического связывания вторичных антител. Полученные препараты помещали на предметные стекла в каплю глицерина и проводили флуоресцентную микроскопию. Флуоресценцию Alexa-488 и йодида пропидия анализировали при настройках микроскопа, указанных в таблице 3.1.

Иммунофлуоресцентное окрашивание тропонина Т сердца

Культуры дифференцированных клеток H9c2 и кардиомиоцитов крысы, выращенные на чашках Петри со стеклянными вставками (Ø 35 мм), фиксировали 2% параформальдегидом (20 мин при комнатной температуре), промывали ФСБ (2 раза по 2 мл) и оставляли на 15 мин в ФСБ, содержащем 5% эмбриональной сыворотки теленка и 0.25% тритона X-100. Затем полученные препараты клеток инкубировали в течение 45 мин при комнатной температуре в буфере того же состава, содержащем моноклональные антитела к тропонину Т сердца, конъюгированные с Alexa-555 (разведение 1:500). После окончания инкубации препараты промывали ФСБ (2 раза по 2 мл), окрашивали ядра Ноесhst 33258 (0.25 мкг/мл; 10 мин) и проводили флуоресцентную микроскопию с использованием настроек, приведенных в табл. 3.1.

Анализ содержания в клетках активных форм кислорода

В чашки Петри со стеклянными вставками (Ø 35 мм) высевали по 100 тыс. клеток Н9с2. После перевода культур в дифференцированное состояние проводили их обработку Dox (1 мкМ, 6-часовая инкубация) и, если это было необходимо, ингибитором PARP PJ34 (конечная концентрация - 2 мкМ) или эмоксипином (конечная концентрация - 0.5 мМ). РЈ34 и эмоксипин вносили в среду культивирования за 2 ч до Dox. Контрольные культуры ничем не обрабатывали. За 30 мин до завершения инкубации с Dox в среду флуоресцентный (2',7'культивирования вносили индикатор DCFH-DA дихлордигидрофлуоресцеина диацетат) до конечной концентрации 10 мкМ. Для контрастирования ядер за 20 мин до окончания инкубации в среду вносили Hoechst 33258 до конечной концентрации 5 мкг/мл. На всех этапах обработки и окрашивания клетки находились в атмосфере 5% СО2 при температуре 37 С. После окрашивания клетки промывали раствором Хэнкса (2 раза по 2 мл) и проводили микрофлуоресцентный анализ, используя настройки, указанные в таблице 3.1.

3.3.5. Анализ ДНК-комет

В чашках Петри (\emptyset 35 мм) получали культуры дифференцированных клеток H9c2 (см. раздел 3.2.1). Перед обработкой культур исследуемыми веществами производили замену среды роста на свежую (ДМЕМ с 0.5-1% эмбриональной сывороткой, 2 мМ L-глутамином и антибиотиками).

В определенные образцы за 2 ч до добавления Dox вносили ингибиторы PARP PJ34 (конечная концентрация - 2 мкМ), 3-AB (конечная концентрация - 1 мМ) или

антиоксидант эмоксипин (конечная концентрация – 0.5 мМ). Инкубацию с Dox (конечная концентрация – 1 мкМ) продолжали в течение 6 или 24 ч. Затем клетки снимали с подложки 0.12% раствором трипсина, подсчитывали с помощью счетчика клеток TC-20 («ВіоRad», США) и осаждали центрифугированием (4 мин, 2 500 об./мин) на настольной центрифуге «Ерреndorf mini-spin» («Ерреndorf AG», Германия). Осажденные клетки ресуспендировали в растворе Хенкса и доводили концентрацию до 500 тыс. клеток/мл. В каждом эксперименте в качестве положительного контроля использовались клетки Н9с2, выдержанные в течение 20 мин в среде с 50 мкМ Н₂О₂.

Для анализа ДНК-комет предварительно готовили слайды, покрытые агарозой. На предметные стекла наслаивали 1.5 % водный раствор расплавленной NMP-агарозы, после чего стекла выдерживали в термостате при 37°C до полного высыхания агарозы. Аликвоту суспензии клеток, объемом 15 мкл, смешивали с 50 мкл нагретого до 37°C 0.8 % раствора LMP-агарозы в ФСБ. Полученную смесь наслаивали на поверхность слайда с NMPагарозой, а сверху помещали покровное стекло. Приготовленный «сэндвич» оставляли на 10 мин при +4°C, после чего покровное стекло удаляли, а слайды помещали на 1.5 ч при +4°C в лизирующий буфер (pH 10) следующего состава: трис-HCl - 10 мM; NaCl -2.5 M; Na₂×ЭДТА - 100 мМ; ДМСО - 10 % и Triton-X100 - 1%. Затем слайды отмывали от лизирующего буфера дистиллированной водой и помещали на 20 мин в темное место при +4°C в водный раствор для электрофореза (300 мМ NaOH, 1 мМ Na₂*ЭДТА), а затем помещали в камеру для электрофореза, и подвергали электрофоретическому разделению (25 В, 300 мА) в течение 30 мин при +4°С. После окончания электрофореза слайды два раза промывали нейтрализующим буфером (0.4 М трис*HCl, pH 7.5) и проводили окрашивание ДНК с использованием красителя DAPI (0.6 мкМ, 5 мин при комнатной температуре). Затем слайды промывали ФСБ и получали флуоресцентные изображения окрашенных препаратов на микроскопе Zeiss Axio Imager.Z1 («Zeiss», Германия), с использованием объективов ×10 и ×20.

Количественный анализ полученных изображений (ДНК-комет) проводили с использованием приложения «Comet assay» программы ImageJ 1.42q (National Institutes of Health, США). Мерой повреждения ДНК при анализе ДНК-комет является интегральный показатель «момент хвоста кометы» (TM - tail moment), при его расчете учитывается длина «хвоста» кометы (tail length) и соотношение содержания ДНК в «голове» и «хвосте» ДНК-кометы (tail % DNA): TM = tail length × tail % DNA.

Для анализа использовали данные двух независимых экспериментов, в каждом из которых было проанализировано не менее 100 ДНК-комет для каждого образца.

3.3.6. Анализ фрагментации ДНК методом электрофореза

Кардиомиобласты Н9с2 выращивали в чашках Петри (Ø 35 мм) и переводили в дифференцированное состояние (cm. раздел 3.2.1). Определенные образцы прединкубировали 2 ч в присутствии РЈ34 (2 мкМ) или эмоксипина (0.5 мМ), а затем вносили Dox (до концентрации 0.5 мкМ) и продолжали инкубацию еще в течение 24 или 48 ч. В качестве положительного контроля использовали культуры, обработанные в течение 24 ч стауроспорином (1 мкМ). По окончании инкубации из чашек отбирали среду с открепившимися клетками, затем снимали оставшиеся на подложке клетки 0.12% раствором трипсина, обе фракции объединяли и подсчитывали количество клеток. После этого клетки осаждали в течение 4 мин при 8 000 об./мин на настольной центрифуге «Eppendorf mini-spin» («Eppendorf AG», Германия) и лизировали (3 ч; 60°C) в 100 мкл буфера (pH 8,0) следующего состава: трис*HCl - 100 мM, $Na_2 \times EДTA - 20 \text{ мM}$, SDS - 0.5%и протеиназа K - 0.05 мг/мл. Затем в каждую пробу добавляли раствор РНК-азы до концентрации 0.1 мг/мл и инкубировали при 60°C еще 30 мин. Для очистки ДНК каждый образец смешивали с равным объемом фенола, насыщенного 0.1 М трис-буфером (рН 8.0), аккуратно встряхивали в течение 3-4 мин до получения эмульсии молочного цвета и центрифугировали 15 сек при 13 400 об./мин (центрифуга «Eppendorf mini-spin»). Верхний водный слой, содержащий ДНК, переносили в пробирку. Дальнейшую очистку ДНК осуществляли экстракцией смесью хлороформа и изоамилового спирта в соотношении 24:1 (об./об.). К каждому образцу добавляли 100 мкл экстрагента, встряхивали и разделяли слои центрифугированием. После двукратной экстракции к образцам, содержащим ДНК, добавляли 1/10 часть от объема образца 3 М раствора ацетата натрия и 200 мкл 96% этанола и оставляли на ночь при -20°C. Затем образцы центрифугировали 10 мин при 13 400 об./мин (центрифуга «Eppendorf mini-spin»), удаляли супернатант, а пробирки с осадком оставляли при комнатной температуре до полного испарения растворителя. Все образцы растворяли в буфере ТЕ (10 мМ трис-HCl и 1 мМ Na₂×ЭДТА; рН 7.5) и до проведения анализа хранили при -20°C [5].

Разделение ДНК проводили в 1.5% агарозном геле. В лунки для образцов («карманы») вносили по 0.5 мкг ДНК. Разделение проводили в трис-боратном буфере (0.089 М трис-HCl, 0.089 М Н₃ВО₃, 2 мМ Nа₂×ЭДТА, рН 8.3) при 30 В и 100 мА, в течение примерно 2 ч при комнатной температуре. После окрашивания гелей бромистым этидием, проводили визуализацию флуоресценции на приборе «ChemiDoc MP» («BioRad», США). Для количественного анализа полученных изображений использовали программы Image Lab и ImageJ 1.42q.

3.3.7. Анализ PARP-ингибирующей активности соединений в культуре клеток

Для анализа PARP-ингибирующей активности ряда производных нуклеозидов клетки SKOV-3 высевали в 1 мл среды роста на стерильные стекла, помещенные в 4-х луночные планшеты, с плотностью 30 тыс. клеток на лунку. После 48-часового культивирования в среду роста вносили анализируемые нуклеозиды или 3-АВ (ингибитор PARP, использованный в качестве вещества сравнения) и продолжали инкубацию при стандартных условиях культивирования в течение 1 или 24 ч. Затем клетки обрабатывали H_2O_2 (1 мМ; 5 мин) в присутствии тестируемых веществ, отмывали ФСБ, фиксировали метанолом в течение 20 мин на льду и проводили иммунофлуоресцентное окрашивание PAR, как было описано выше (см. раздел 3.3.4).

3.3.8. Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы "Sigma Plot 11" (Systat Software Inc.). Для оценки достоверности различий средних значений показателей жизнеспособности клеток в сравниваемых выборках применяли t критерий Стьюдента. Для статистического анализа данных, полученных в методе ДНК-комет, применяли U-критерий Манна-Уитни.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Характеристика используемых в работе культур кардиомиоцитов

Для моделирования кардиотоксического действия Dox в данной работе использовали первичные культуры кардиомиоцитов из новорожденных крыс и культуры клеток линии H9c2 (кардиомиобласты крысы). В обоих случаях клетки перед проведением экспериментов подвергались манипуляциям, благодаря которым они приобретали свойства, характерные для зрелых кардиомицитов.

Как известно из литературы, в получаемых первичных культурах кардиомиоцитов всегда присутствуют «примесные» клетки, причем их содержание может сильно зависеть возраста животных процедуры выделения кардиомиоцитов. иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к тропонину Т сердца (специфический маркер кардиомиоцитов) показано, что в культурах кардиомиоцитов, полученных согласно выбранному нами протоколу (см. раздел 3.2.2), содержание «примесных» клеток не превышало 30% (рис. 4.1). Относительно высокого содержания кардиомиоцитов в культуре удалось достичь благодаря следующим подходам: 1) - использованию для выделения только препарированных желудочков сердца (сосуды и предсердия удаляли); 2) - удалению клеточных фракций, легко извлекаемых из ткани при обработке трипсином; 3) - избирательному удалению из суспензии «примесных» клеток, обладающих хорошей адгезией к поверхности пластика.

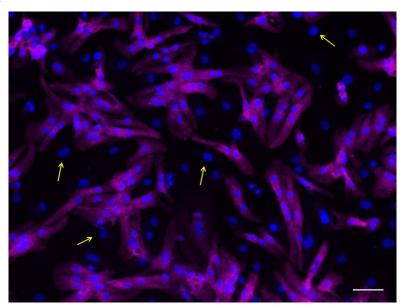


Рисунок 4.1. Первичная культура кардиомиоцитов новорожденных крыс после иммунофлуоресцентного окрашивания на кардиоспецифический маркер – тропонин Т.

Клетки были иммунофлуоресцентно окрашены антителами к тропонину Т сердца, конъюгированными с Alexa-555, ядра окрашены Hoechst 33258. Объектив ×40. Масштабная планка соответствует расстоянию 50 мкм. Стрелками указаны некоторые ядра клеток, не окрашенные на тропонин Т, т.е. не являющиеся кардиомиоцитами.

Поскольку первичные культуры имеют некоторые недостатки (см. раздел 2.1.4), большая часть экспериментов проводилась на культуре дифференцированных клеток Н9с2. Мы, также как и авторы других работ [44, 124], наблюдали морфологические изменения клеток в ходе дифференцировки (рис. 4.2). Делящиеся клетки имели ассиметричную (неправильную) форму (рис. 4.2 A). После 48 ч инкубации в среде с высоким содержанием сыворотки (10%) и достижения практически монослойного состояния (рис. 4.2 Б) культивирование клеток продолжали в условиях, способствующих их дифференцировке - в среде роста с 0.5% сыворотки. Такие условия способствовали переходу клеток в покоящееся состояние. Уже через 48 ч культивирования клетки приобретали веретенообразную форму (рисунки 4.2 В, 4.2 Г и 4.3 Б) и появлялись многоядерные клетки. Нами также было показано, что в дифференцированных клетках Н9с2 заметно увеличивался уровень тропонина Т сердца по сравнению с делящимися клетками (рис. 4.3). Окрашивание на данный кардиоспецифический маркер служит доказательством дифференцировки клеток именно в кардиомиоциты, а не в скелетные волокна.

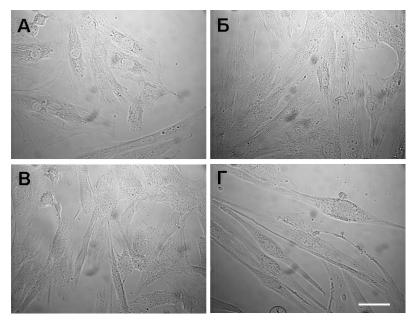
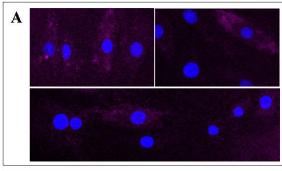


Рисунок 4.2. Микрофотографии культуры клеток H9c2 на разных этапах дифференцировки.

 ${\bf A}$ – пролиферирующие клетки через 24 ч после посева в среде роста, содержащей 10% эмбриональной сыворотки теленка; ${\bf B}$ – после 48 ч инкубации в среде, содержащей 10% сыворотки, непосредственно перед переводом в дифференцирующие условия; ${\bf B}$ – покоящиеся (стационарные) клетки после 48 ч инкубации в среде роста с 0,5% сыворотки; ${\bf \Gamma}$ – покоящиеся клетки после 96 ч инкубации в среде роста с 0,5% сыворотки.

Объектив ×40, режим масляной иммерсии. Масштабная планка соответствует расстоянию 50 мкм.

Таким образом, обе культуры в покоящемся/дифференцированном состоянии проявляют характерные морфологические признаки зрелых кардиомиоцитов, а также окрашиваются на кардиоспецифический белок тропонин Т, что позволяет их использовать в качестве клеточных моделей для изучения кардиотоксического действия Dox.



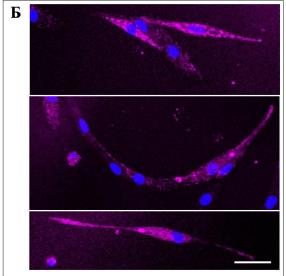


Рисунок 4.3. Культура клеток H9c2 после иммунофлуоресцентного окрашивания на кардиоспецифический маркер тропонин Т. \mathbf{A} — делящиеся клетки, \mathbf{F} — покоящиеся (стационарные) клетки.

Клетки были иммунофлуоресцентно окрашены антителами к тропонину Т сердца, конъюгированными с Alexa-555, ядра окрашены Hoechst 33258. Объектив ×40, режим масляной иммерсии. Масштабная планка соответствует расстоянию 50 мкм.

4.2. Токсическое действие доксорубицина на культивируемые кардиомиоциты

4.2.1. Накопление доксорубицина в культивируемых кардиомиоцитах

Чувствительность клеток к Dox в значительной степени определяется их способностью к накоплению этого токсического агента. В связи с этим в работе была подробно исследована кинетика накопления Dox и его распределение в клетках H9c2 и кардиомиоцитах из новорожденных крыс. Проведение такого исследования позволило на следующих этапах работы сопоставить динамику развития различных патологических процессов, вызываемых Dox, с динамикой его накопления в клетке.

В работе Киомиа [126] был описан многоступенчатый механизм транспорта Dox в ядро клетки. Показано, что Dox путем простой диффузии проникает через плазматическую мембрану внутрь клетки, в цитоплазме связывается с протеасомой и уже

в составе такого комплекса транслоцируется в ядро. Затем, после диссоциации комплекса, Dox встраивается в ДНК. В опухолевых клетках скорость и степень накопления Dox могут зависеть от работы ABC-транспортеров, в частности Р-гликопротеина, ответственного за множественную лекарственную устойчивость опухолей [1].

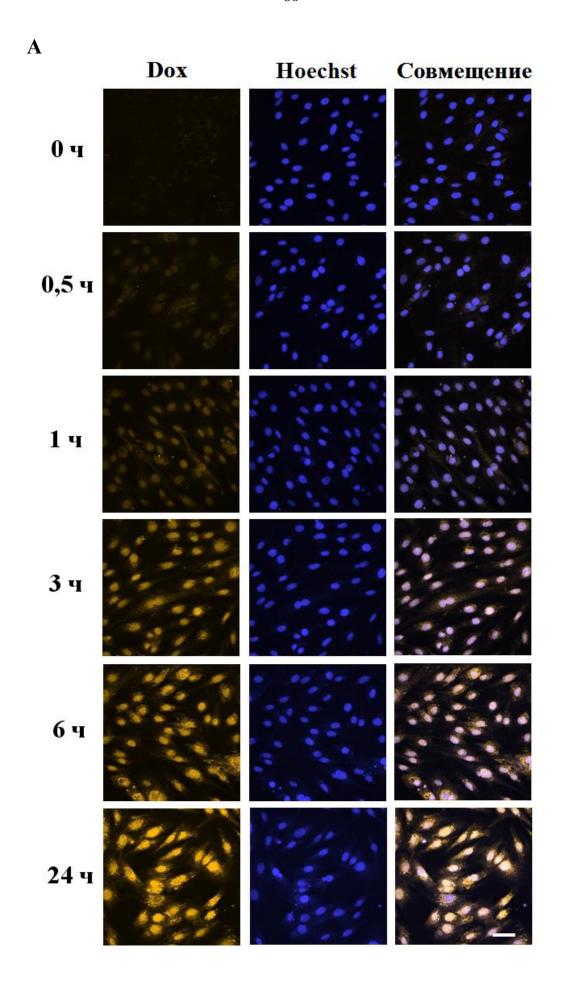
Благодаря тому, что Dox является флуорофором, его достаточно удобно детектировать в живых клетках (см. табл. 3.1). В наших исследованиях мы применяли Dox в концентрации 1 мкМ, что соответствовало области его эффективных доз в культурах клеток -0.5-1 мкМ [44, 217, 274]. Временной интервал, в котором исследовался транспорт Dox в клетки, варьировал в пределах 0.5-24 ч.

В культурах клеток H9c2 определяли содержание Dox как во всей клетке, так и отдельно в ядре. Было показано, что флуоресценция Dox обнаруживается в клетках уже через 0.5 ч после его внесения в среду культивирования, а через 24 ч ее интенсивность достигает значений, близких к максимальным (рисунки 4.4 А и 4.4 В). Расчетные значения максимальной степени накопления и времени полунасыщения Dox всей клетки и ядра приведены в таблице 4.1. На ранних сроках инкубации (0.5 – 3 ч) содержание Dox в ядрах было значительно выше, чем в цитоплазме (определяли по разности флуоресценции Dox во всей клетке и в ядре), однако при более длительной инкубации (6 и 24 ч) доля Dox в цитоплазме значительно увеличивалась (рис. 4.4 Г). Следует также отметить, что распределение Dox в цитоплазме через 6 ч и, особенно, через 24 ч является неоднородным, на изображениях четко видны крупные Dox-содержащие гранулы (рисунки 4.4 А и 4.4 Б).

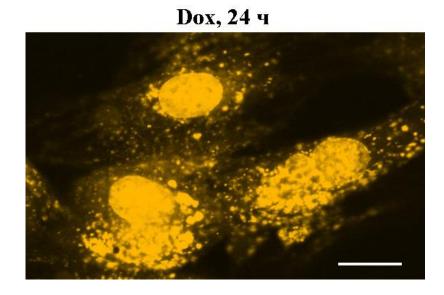
Таблица 4.1. Расчетные значения показателей накопления доксорубицина в кардиомиошитах.

Клеточная культура	Локализация	Максимальная степень накопления ^а , отн. ед.	Время полунасыщения, ч	
H9c2	Вся клетка	2.39 ± 0.10	5.92 ± 0.48	
	Ядро	1.33 ± 0.05	4.29 ± 0.34	
Первичная культура кардиомиоцитов	Вся клетка	_	_	
	Ядро	0.62 ± 0.02	1.61 ± 0.14	

<u>Примечания</u>: ^а Максимальную степень накопления клетки/ядра доксорубицином определяли по уровню максимальной флуоресценция доксорубицина. Все данные представлены в виде среднее \pm ошибка среднего. Расчеты произведены методом нелинейной регрессии.



Б



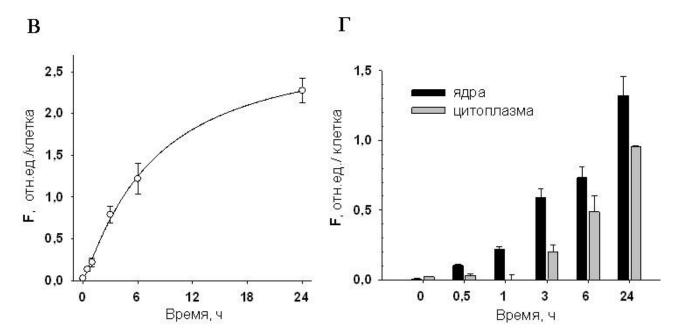


Рисунок 4.4. Временная динамика накопления доксорубицина (Dox) в клетках H9c2. **A** – прижизненный микрофлуоресцентный анализ Dox и Hoechst 33258 (Hoechst) в клетках H9c2 после указанных времен инкубации и отмывки. **Б** – после 24 ч инкубации в клетках H9c2 видны Dox-содержащие гранулы. **B** – общее содержание Dox в клетках H9c2. Γ - содержание Dox в ядрах и цитоплазме клеток H9c2.

Концентрация Dox в среде культивирования – 1 мкМ.

Ядра (**A**) прижизненно окрашены Hoechst 33258 за 20 мин до съемки. Объектив ×40, режим масляной иммерсии. Масштабные планки соответствуют расстоянию 50 мкм (**A**) и 20 мкм (**Б**). Количественные данные представлены в виде среднего значения интенсивности флуоресценции (**F**) Dox на клетку, выраженной в отн. ед.

Также исследовали накопление Dox в культивируемых кардиомиоцитах, выделенных из новорожденных крыс. Как уже отмечалось выше (см. раздел 4.1) в получаемых первичных культурах помимо кардиомиоцитов (ок. 70 % от общего числа клеток) присутствуют и другие типы клеток, которые тоже способны накапливать Dox. По этой причине анализ общего клеточного содержания Dox в кардиомиоцитах в таких препаратах был весьма затруднительным и заведомо неточным. Поэтому мы ограничились измерением флуоресценции Dox только в ядрах кардиомиоцитов. При этом области ядер определялись с помощью красителя Hoechst 33258, а кардиомиоциты отличали от других типов клеток по характерной веретенообразной морфологии.

Флуоресценция Dox в ядрах кардиомиоцитов обнаруживается уже через 0.5 ч после начала инкубации, а максимального уровня достигает к 6 ч (рисунки 4.5 А и 4.5 В). Расчетные значения максимального накопления Dox в ядрах и времени полунасыщения Dox ядер приведены в таблице 4.1. Таким образом, «насыщение» ядер изолированных кардиомиоцитов Dox наступает намного быстрее, чем клеток Н9с2. При этом уровни средней флуоресценции Dox в ядрах клеток Н9с2 и кардиомиоцитов в промежутке времени от 0.5 до 6 ч сопоставимы (см. рисунки 4.4 Г и 4.5 В). Выявленные различия в кинетике накопления Dox в ядрах двух типов кардиомиоцитов могут быть вызваны как различиями в транспорте Dox через плазматическую мембрану, так и размерами ядра, а также свойствами внутриядерной среды и самого хроматина, обуславливающими распределение Dox между отделами клетки и сродство к ДНК. Кроме того, как и в случае культур клеток Н9с2, в цитоплазме кардиомиоцитов через 6 ч и, особенно, через 24 ч инкубации с Dox обнаруживаются четко очерченные гранулы с высоким уровнем флуоресценции Dox (рис. 4.5 Б).

Следует заметить, что в первичной культуре кардиомиоцитов присутствуют клетки, отличные по своей морфологии от кардиомиоцитов, в ядрах которых Dox практически не накапливается (рис. 4.5 Б). Пока трудно объяснить, чем вызван такой необычный характер распределения Dox.

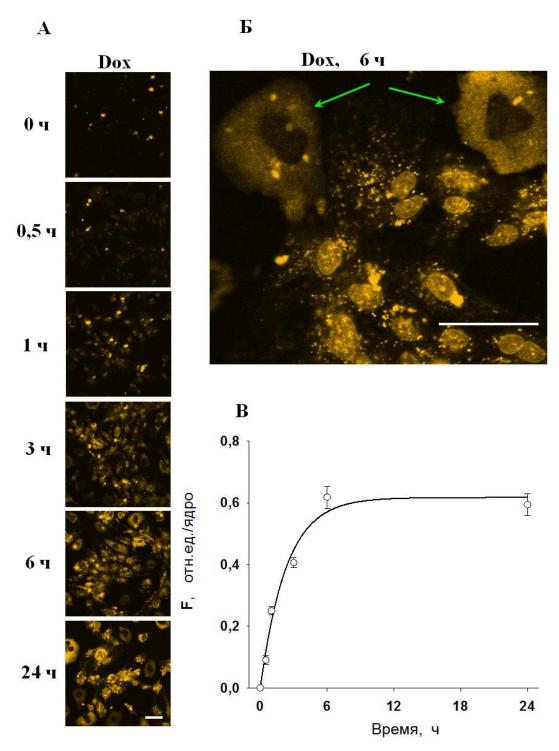


Рисунок 4.5. Временная динамика накопления доксорубицина (Dox) в культивируемых кардиомиоцитах, полученных из новорожденных крыс.

 ${\bf A}$ и ${\bf B}$ - прижизненный микрофлуоресцентный анализ Dox в кардиомиоцитах после указанных времен инкубации и отмывки. ${\bf B}$ - содержание Dox в ядрах кардиомиоцитов.

Концентрация Dox в среде культивирования – 1 мкМ.

Объектив $\times 40$, режим масляной иммерсии. Масштабные планки соответствуют расстоянию 50 мкм. Зелеными стрелками (\mathbf{F}) показаны клетки (не кардиомиоциты), устойчивые к ядерному накоплению Dox. Количественные данные представлены в виде среднего значения интенсивности флуоресценции (\mathbf{F}) Dox на ядро, выраженной в отн. ед.

4.2.2. Чувствительность кардиомиоцитов к действию доксорубицина

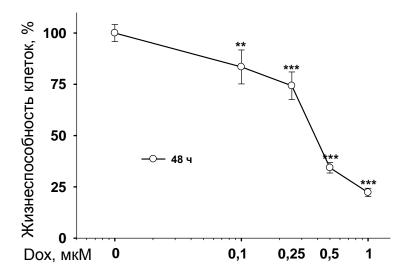
Для исследования цитотоксических эффектов Dox, выяснения механизмов его кардиотоксичности и роли PARP в данном процессе, а также эффектов различных потенциальных кардиопротекторов, необходимо было определить эффективные концентрации и времена обработки Dox для каждой культуры. Для этого оценивали жизнеспособность клеток методом МТТ-теста через 48 или 72 ч после однократного внесения в культуры Dox.

Исследовали влияние Dox на выживаемость клеток H9c2 через 48 ч после концентраций 0.1 – 1 мкМ однократной обработки в диапазоне (рис. 4.6 A). Выживаемость первичной культуры кардиомиоцитов оценивали через 72 ч после однократного внесения Dox в концентрациях 0.5 – 10 мкМ (рис. 4.6 Б). Выбор исследуемых диапазонов концентраций Dox был основан на анализе литературных данных. Следует отметить, что при клиническом применении препаратов на основе Dox его концентрация в крови пациентов обычно не превышает 1 – 2 мкМ [96]. Для определения оптимальных условий исходили из предположения, что после воздействия Dox должно оставаться примерно 50% живых клеток по сравнению с контролем, поскольку в этом случае очевидна индукция гибели клеток Dox, а также наиболее выражено могут проявиться свойства потенциальных цитопротекторов.

Было показано, что через 48 ч инкубации Dox в концентрациях 0.25, 0.5 и 1 мкМ вызывает гибель 25%, 65% и 75% клеток H9c2, соответственно (рис. 4.6 A). Основываясь на полученных результатах, в последующих экспериментах с данной культурой, как правило, применяли 48-часовую обработку клеток Dox в концентрации 0.5 мкМ.

Зависимость выживаемости диссоциированных кардиомиоцитов от концентрации Dox имела более сложный вид (рис. 4.6 Б). Наблюдали двухфазное снижение жизнеспособности клеток: первое – в области концентрации Dox 0.5 мкМ, а второе – 10 мкМ. При этом в диапазоне концентраций Dox 1 - 5 мкМ жизнеспособность клеток практически не менялась и составлялаоколо 40% от контрольного уровня. Вероятно, такой концентрационной обусловлен присутствием вид зависимости культурах кардиомиоцитов «примесных» клеток, обладающих более высокой по сравнению с кардиомиоцитами устойчивостью к Dox. При концентрации Dox больше 5 мкМ выживаемость клеток резко снижалась (рис. 4.6 Б). Исходя из полученных данных, во всех последующих экспериментах первичные культуры кардиомиоцитов подвергали 72часовой инкубации с Dox в концентрации 1 мкМ.

A



Б

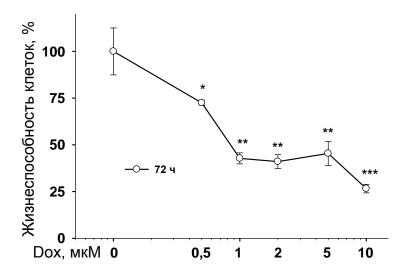


Рисунок 4.6. Чувствительность кардиомиоцитов к токсическому действию Dox. **A** — клетки H9c2 инкубировали в присутствии Dox 48 ч. **B** — изолированные кардиомиоциты крысы инкубировали 72 ч в присутствии Dox.

Все культуры однократно обрабатывали Dox и культивировали без замены среды, за 100% принимали выживаемость клеток в контроле. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 по сравнению с контролем.

4.3. Влияние доксорубицина на уровень PAR в клетках H9c2

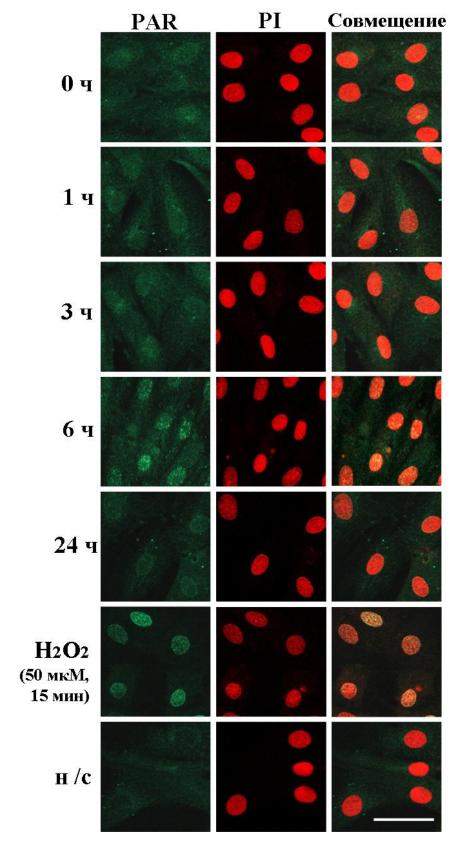
Исследование влияния Dox на уровень PAR (продукта реакции поли(АДФ-рибозил) ирования) в клетках H9c2 проводили при тех же условиях, что и в случае анализа кинетики накопления Dox (см. раздел 4.2). Клетки H9c2 инкубировали в присутствии 1 мкМ Dox в течение 1, 3, 6 или 24 ч, после чего препараты культур фиксировали и проводили иммунофлуоресцентный анализ PAR методом конфокальной микроскопии. Такая постановка экспериментов позволяла сопоставить динамику накопления Dox и его влияние на активность PARP. В качестве положительного контроля использовали культуры клеток H9c2, обработанные H_2O_2 (50 мкМ, 15 мин).

Было показано, что базальный (контрольный) уровень PAR в ядрах клеток H9c2 относительно не высокий, он оказался примерно в два раза ниже уровня PAR, который достигается при активации PARP после 15-минутной инкубации этих клеток в среде с $50 \text{ мкM H}_2\text{O}_2$ (рис. 4.7 A) или в 10-15 раз меньше количества PAR, образующейся после 10-минутной обработки клеток $1 \text{ мM H}_2\text{O}_2$.

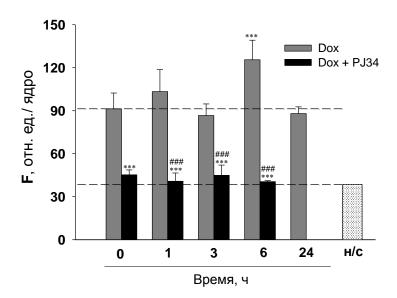
Было обнаружено, что после 6-часового воздействия Dox вызывает достоверное увеличение содержания PAR в клетках H9c2 – почти в два раза по сравнению с контролем (после вычитания величины неспецифического сигнала; рис. 4.7). Наблюдаемое увеличение уровня PAR происходит главным образом в ядрах клеток (рисунки 4.7 A и 4.7 Б). В цитоплазме было выявлено небольшое, примерно на 20%, и статистически не достоверное увеличение уровня PAR (рис. 4.7 В). Повышение уровня PAR в цитоплазме может происходить из-за активации неядерных PARP (например, митохондриальной) или быть следствием попадания в цитоплазму фрагментов PAR из ядра после расщепления полимера ферментом PARG. На других сроках инкубации (1, 3 и 24 ч) Dox в заданной концентрации не оказывал влияния на активность PARP: уровень PAR при этих условиях не превышал базальный уровень (рис. 4.7 Б).

Следует отметить, что усиление активности клеточных PARP примерно соответствует времени полунасыщения клеток Dox $(5.92 \pm 0.48 \text{ ч})$. Как было отмечено ранее (см. раздел 4.2.1), через 6 ч инкубации также наблюдается существенное накопление Dox в цитоплазме клеток H9c2 и появление в ней Dox-содержащих гранул.





Б



B

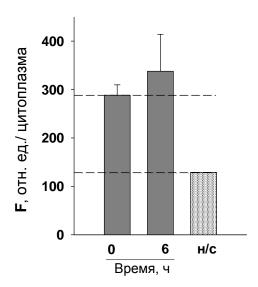


Рисунок 4.7. Влияние доксорубицина (Dox) на образование поли(АДФ-рибозы) (PAR) в клетках H9c2.

 ${\bf A}$ — характерные изображения клеток H9c2, полученные после иммунофлуоресцентного анализа PAR. Времена инкубации клеток в присутствии Dox указаны слева. ${\bf G}$ - количественный анализ содержания PAR в ядрах клеток H9c2. ${\bf B}$ - количественный анализ содержания PAR в цитоплазме клеток H9c2 в контроле (0 ч) и после 6 ч обработки Dox.

Концентрация Dox -1 мкM, PJ34 -2 мкM. Ядра окрашивали иодидом пропидия (PI), объектив - $\times 40$, режим масляной иммерсии. Масштабная планка соответствует расстоянию 50 мкм.

Обозначения: н/с - неспецифическое окрашивание (при иммунофлуоресцентном окрашивании не использовали первичные антитела); 0 ч - контрольный уровень PAR (культуры не обрабатывали Dox). «Dox» — клетки обработаны только доксорубицином; «Dox+PJ34» — клетки обработаны доксорубицином в присутствии PJ34.

Количественные данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение интенсивности флуоресценции (**F**) PAR на клетку, выраженной в отн. ед. *** p<0.001 - по сравнению с контролем; ### p<0.001 - по сравнению с клетками, обработанными только Dox в течение того же времени.

Инкубация клеток H9c2 в присутствии ингибитора PARP PJ34 (2мкМ) приводила к снижению как базального, так и стимулированного Dox уровня PAR. Более того, во всех случаях ингибитор подавлял образование PAR практически полностью, так как остаточная иммунореактивность PAR существенно не превышала неспецифический уровень флуоресценции в клетках (рисунки 4.7 Б и 4.8).

A **PAR** PI Совмещение 0ч (контроль) **PJ34** Emx Dox Dox+ **PJ34** Dox+ **Emx**

Б

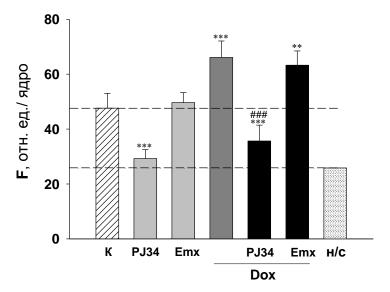


Рисунок 4.8. Влияние РЈ34 и эмоксипина (Emx) на образование поли(АДФ-рибозы) (PAR) в клетках Н9с2 после 6-часовой инкубации с доксорубицином (Dox).

A - характерные изображения клеток H9c2, полученные после иммунофлуоресцентного анализа PAR. **Б** - количественный анализ содержания PAR в ядрах клеток H9c2.

Концентрация Dox - 1 мкM, PJ34 - 2 мкM, Emx - 0.5 мM; PJ34 и Emx вносили в среду культивирования за 2 ч до Dox.

Ядра окрашивали иодидом пропидия (PI), объектив – ×40, режим масляной иммерсии. Масштабная планка соответствует расстоянию 50 мкм.

Обозначения: H/c - неспецифическое окрашивание (при иммунофлуоресцентном окрашивании не использовали первичные антитела); 0 ч или K - контрольный уровень PAR (культуры не обрабатывали Dox).

Количественные данные представлены в виде среднего значения \pm стандартное отклонение интенсивности флуоресценции (**F**) PAR на клетку, выраженной в отн. ед. ** p<0.01; *** p<0.001 - по сравнению с контролем; ### p<0.001 - по сравнению с клетками, обработанными Dox в течение того же времени.

Исходя из того, что наблюдаемое увеличение уровня PAR через 6 ч после обработки клеток Dox может быть связано с усилением продукции AФК и окислительными повреждениями ДНК, было исследовано влияние синтетического антиоксиданта эмоксипина (3-окси-6-метил-2-этилпиридина гидрохлорида) на содержание PAR в клетках после воздействия Dox. Антиоксидант эмоксипин способен нейтрализовать перекисное окисление липидов, образование гидроксильных радикалов, первичных и вторичных радикалов пептидов. Однако, в отличие от ингибитора PARP, эмоксипин (0.5 мМ) не повлиял ни на базальный уровень PAR, ни на стимулированное Dox повышение содержания PAR после 6-часовой обработки клеток этим агентом (рис. 4.8). Это может свидетельствовать о том, что повышение стимулированного Dox уровня PAR не связано с возможным увеличением продукции АФК, способных вызывать повреждения ДНК и активацию PARP.

Было показано, что в клетках H9c2 интенсивность флуоресценции индикатора АФК 2',7'-дихлорфлуоресценна (DCF) практически не отличается для контрольных культур и культур, обработанных в течение 6 ч Dox (1 мкМ; рис. 4.9). Это значит, что при данных условиях Dox не усиливает генерацию АФК в культивируемых клетках H9c2. Эмоксипин (0.5 мМ) и PJ34 (2 мкМ) также не повлияли на флуоресценцию DCF на фоне воздействия Dox (рис. 4.9).

Таким образом, нами впервые было показано, что обработка клеток H9c2 Dox приводит к временному увеличению уровня PAR, вероятнее всего вследствие активации PARP. При этом дисбаланс синтеза PAR не связан с увеличением продукции АФК.

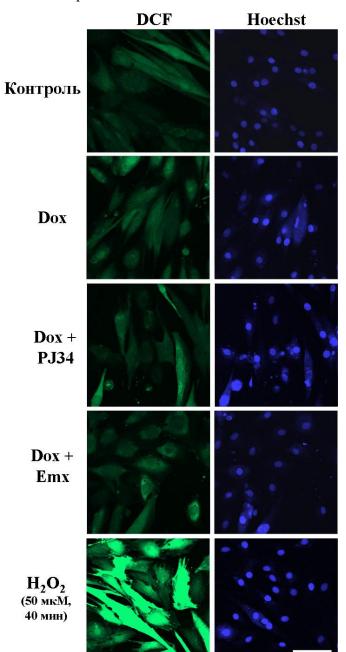


Рисунок 4.9. Влияние доксорубицина (Dox) на образование АФК в клетках H9c2 после 6-часового воздействия.

Прижизненный микрофлуоресцентный анализ АФК (по флуоресценции DCF) и Hoechst 33258 (Hoechst) в клетках H9c2 после 6-часовой инкубации с Dox (1 мкМ), а также при совместной инкубации с Dox и PJ34 (2 мкМ) или эмоксипином (Етх; 0.5 мМ). РЈ34 и Етх вносили в среду культивирования за 2 ч до Dox. Положительный контроль клетки Н9с2, инкубированные 40 мин с 50 мкМ Н₂О₂. Ядра прижизненно окрашены Hoechst 33258 за 20 мин до съемки. Непосредственно перед съемкой проводили отмывку от всех добавок. Объектив ×40, режим масляной иммерсии. Масштабная планка соответствует расстоянию 100 мкм.

4.4. Влияние ингибиторов поли(АДФ-рибоза)полимераз на кардиотоксичность доксорубицина

Как было показано выше (см. раздел 4.3), Dox вызывает временное повышение уровня PAR в клетках Н9с2. Известно, что активация PARP, вызванная различными стимулами, во многих случаях приводит к гибели клеток. Причем в зависимости от интенсивности и длительности стимула гибель клеток может протекать по механизмам партанатоза или некроза. Ингибиторы PARP в этих случаях оказывают значительное цитопротекторное действие [16, 36, 41, 281]. В этой связи логично было исследовать влияние ингибиторов PARP на выживаемость клеток после воздействия Dox. Следует отметить, что ингибитор PARP (PJ34) оказывал выраженное кардиопротекторное действие на модели кардиотоксичности Dox *in vivo* [192, 193]. Авторами этих исследований было сделано предположение, что кардиотоксическое действие антрациклинов может реализовываться через активацию PARP.

В предварительных экспериментах в качестве ингибитора PARP мы использовали 3-AB. На культурах клеток H9c2 было показано, что в условиях цитотоксического действия Dox 3-AB достоверно увеличивал жизнеспособность клеток (рисунки 4.10 A и 4.10 Б) и снижал процент апоптотических клеток (рис. 4.10 В). При этом наблюдалась хорошая воспроизводимость защитного действия 3-AB от эксперимента к эксперименту (рис. 4.10 Г). Данный цитопротекторный эффект также хорошо был заметен визуально после окраски клеток ядерным красителем Hoechst 33258 (рис. 4.11).

Для первичной культуры кардиомиоцитов кардиопротекторный эффект ингибитора PARP был менее выражен: 3-AB незначительно (в 1.2 раза) уменьшал цитотоксическое действие Dox (рис. 4.12).

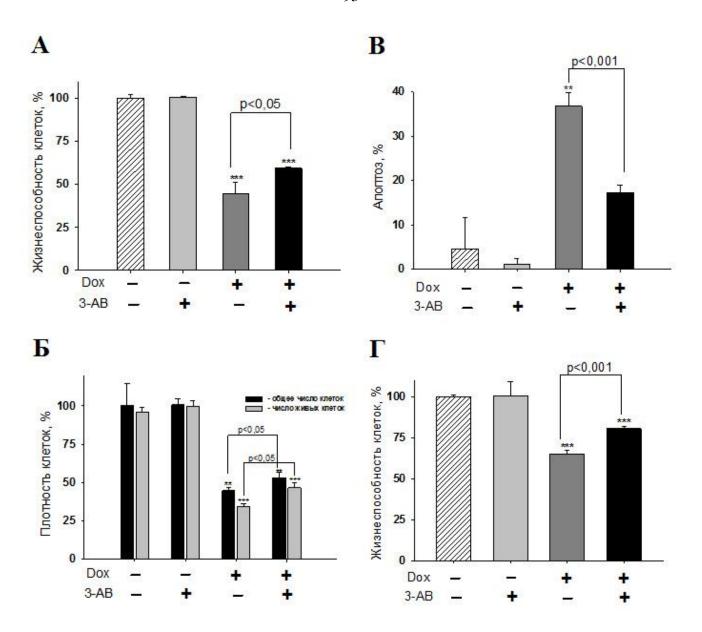


Рисунок 4.10. Влияние 3-аминобензамида (3-AB) на цитотоксическое действие доксорубицина (Dox) на культивируемые клетки H9c2.

А — жизнеспособность клеток; МТТ-тест (денситометрия). *** p<0.001 по сравнению с контролем. **Б** — плотность клеток в культуре; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и йодидом пропидия. ** p<0.01 по сравнению с контролем (общее число клеток); +++ p<0.001 по сравнению с контролем (число живых клеток). **В** - процент апоптотических клеток; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и йодидом пропидия. ** p<0.01 по сравнению с контролем. Γ - результаты определения жизнеспособности клеток в повторном эксперименте, проведенном при аналогичных условиях; МТТ-тест (денситометрия). *** p<0.001 - по сравнению с контролем.

Концентрация Dox в среде культивирования -0.5 мкМ, концентрация 3-AB-1 мМ. 3-AB добавляли за 2 ч до внесения Dox. Анализ жизнеспособности и числа апоптотических клеток проводили через 48 ч после начала обработки клеток Dox. 3a 100% принимали жизнеспособность клеток в контроле.

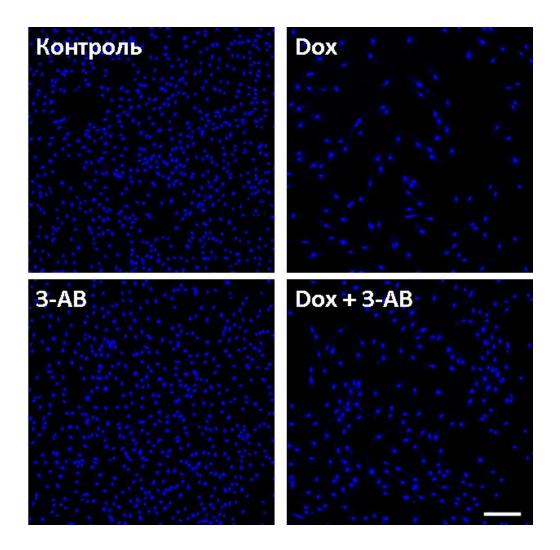


Рисунок 4.11. Влияние доксорубицина (Dox) и 3-аминобензамида (3-AB) на плотность клеток H9c2 в культуре.

На панели представлены характерные поля клеток H9c2 после 48 ч инкубации с Dox $(0.5 \, \text{мкM})$ в присутствии 3-AB $(1 \, \text{мM})$ или без него, а также контрольные культуры без Dox. После фиксации клеток ядра окрашивали Hoechst 33258. Объектив $\times 10$. Масштабная планка соответствует расстоянию 200 мкм.

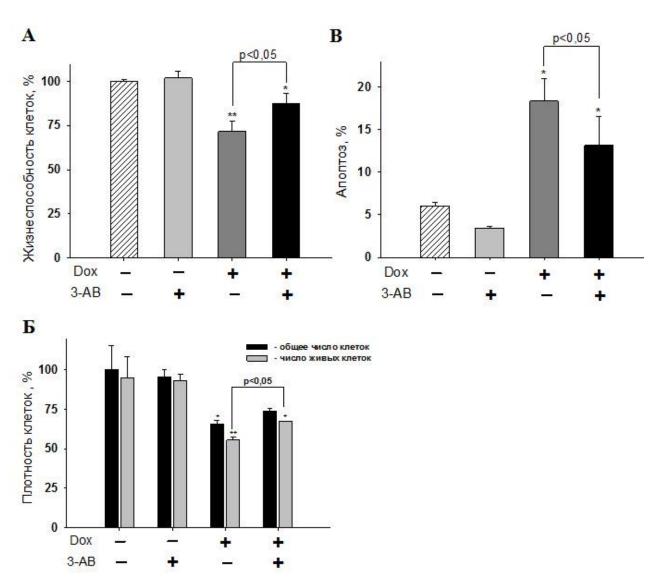


Рисунок 4.12. Влияние 3-AB на выживаемость изолированных кардиомиоцитов крысы в условиях цитотоксического действия Dox.

А — жизнеспособность клеток; МТТ-тест (денситометрия). * p<0.05; ** p<0.01 по сравнению с контролем. **Б** — плотность клеток в культуре; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и йодидом пропидия. * p<0.05 по сравнению с контролем (общее число клеток); + p<0.05; ++ p<0.01 по сравнению с контролем (число живых клеток). **В** - процент апоптотических клеток; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и йодидом пропидия; * p<0.05 по сравнению с контролем.

Концентрация Dox в среде культивирования - 1 мкМ, концентрация 3-AB – 1 мМ. 3-AB добавляли за 2 ч до внесения Dox. Анализ жизнеспособности и числа апоптотических клеток проводили через 72 ч после начала обработки клеток Dox. За 100% принимали жизнеспособность клеток в контроле.

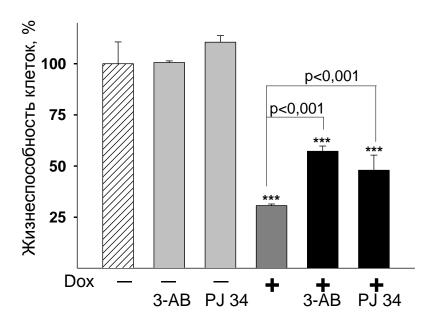
Для того, чтобы доказать, что данный эффект обусловлен именно ингибированием PARP, а не возможными «побочными» активностями 3-AB [248], мы проверили в качестве потенциальных кардиопротекторов еще три ингибитора PARP: 5-AIQ, PJ34 и BYK204165, последний из которых является селективным ингибитором PARP-1 [86]. Экспериментально были подобраны концентрации ингибиторов, при которых происходит

полное подавление активности PARP в клетках H9c2 после 10-минутной обработки их $1\,\mathrm{MM}$ H₂O₂: для 5-AIQ и BYK204165 это достигалось при их концентрации в среде $10\,\mathrm{mkM}$, а для PJ34 - $2\mathrm{mkM}$. В данной серии экспериментов выживаемость клеток после цитотоксического действия Dox оценивали морфометрическим анализом, по показателю плотности прикрепленных к подложке клеток после их фиксирования и окрашивания красителем Hoechst 33258 (см. раздел 3.3.4). После проведения предварительных экспериментов данный метод, несмотря на трудоемкость, характеризовался меньшей дисперсией получаемых значений по сравнению с МТТ-тестом и методом двойного окрашивания.

Было показано, что ни один из исследованных ингибиторов PARP не проявлял токсичность в отношении клеток H9c2 (рис. 4.13). При этом все четыре ингибитора оказывали ярко выраженное защитное действие на выживаемость клеток H9c2 на фоне цитотоксического действия Dox. 3-AB, PJ34, 5-AIQ и BYK204165 способствовали увеличению выживаемости клеток в 1.9, 1.6, 2.6 и 1.3 раза, соответственно. Различия в величине кардиопротекторного эффекта могут быть обусловлены разной скоростью внутриклеточной деградации исследуемых ингибиторов. Например, для селективного ингибитора PARP-1, BYK204165, время полудеградации в клеточных гомогенатах составляло 23 мин [86]. Видимо, поэтому его защитное действие оказалось менее выраженным.

Можно предположить, что обнаруженные нами временное повышение уровня PAR (см. раздел 4.3) и кардиопротекторное действие ингибиторов PARP в культурах клеток Н9с2, подвергавшихся цитотоксическому действию Dox, взаимосвязаны. Вероятно, активация PARP в этих условиях запускает какие-то ключевые процессы, приводящие к гибели клеток, а ингибирование синтеза PAR (как в ядре, так и в цитоплазме) частично предотвращает их развитие.

A



Б

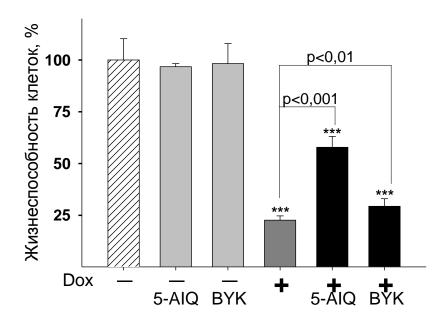


Рисунок 4.13. Влияние ряда ингибиторов PARP на выживаемость клеток H9c2 в условиях цитотоксического действия Dox.

А – цитопротекторное действие 3-AB (1 мМ) и PJ34 (2 мкМ). ***p<0.001 по сравнению с контролем. **Б** - цитопротекторное действие 5-AIQ (10 мкМ) и BYK204165 (10 мкМ); в контрольные образцы и образцы с Dox добавляли ДМСО до конечной концентрации 0.1%, что соответствует содержанию ДМСО в образцах с 5-AIQ и BYK204165. ***p<0.001 по сравнению с контролем.

Концентрация Dox в среде культивирования — 0.5 мкМ. Ингибиторы PARP добавляли за 2 ч до внесения Dox. Жизнеспособность оценивали по плотности клеточных культур через 48 ч инкубации с Dox. За 100% принимали выживаемость клеток в контроле.

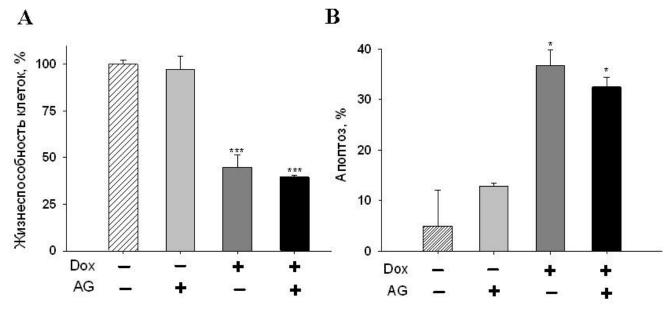
4.5. Влияние антиоксидантов и ингибитора NO-синтазы на кардиотоксичность доксорубицина

Как было показано выше (см. раздел 4.3), временное повышение уровня PAR в клетках Н9с2 в результате 6-часового воздействии на них Dox не обусловлено увеличением уровня АФК. Однако усиленное образование АФК при действии Dox [79] может происходить на более поздних сроках инкубации и быть причиной гибели кардиомиоцитов через 24-72 ч с момента обработки их Dox. Среди возможных механизмов кардиотоксичности Dox также рассматривают активацию индуцибельной NOсинтазы (iNOS) и нарушение баланса между образованием и утилизацией активных форм азота, что приводит к развитию окислительного стресса [191]. В условиях увеличенной продукции NO и AФК можно ожидать возрастания уровня пероксинитрита (ONOO), обладающего чрезвычайно высокой реакционной способностью относительно различных биологических соединений [177, 191]. Учитывая это, можно предположить, что подавление активности индуцибельной NO-синтазы и нейтрализация активных форм кислорода и азота в клетке будут оказывать кардиопротекторное действие, аналогичное тому, которое наблюдалось при действии ингибиторов PARP. Поэтому мы рассматривали в качестве потенциальных кардиопротекторов избирательный ингибитор iNOS аминогуанидин (AG) и соединения-антиоксиданты: N-ацетилцистеин (NAC) и эмоксипин (Emx).

4.5.1. Влияние ингибитора NO-синтазы на кардиотоксичность доксорубицина

В ряде работ [177, 191] основной механизм токсичности Dox связывают с усилением экспрессии iNOS и синтеза NO, приводящим к накоплению в клетке ONOO; при этом ингибиторы iNOS (1,3-PB-ITU и L-NIL) повышали выживаемость клеток H9c2 на фоне цитотоксического действия Dox за счет снижения доли апоптотических клеток. Кроме того, мыши с нокаутом гена *inos* оказались более устойчивыми к токсическому действию Dox [177].

Из результатов проведенных нами исследований видно, что AG (30 мкМ) не оказывает влияния на выживаемость клеток H9c2 при инкубации их с Dox (рис. 4.14).



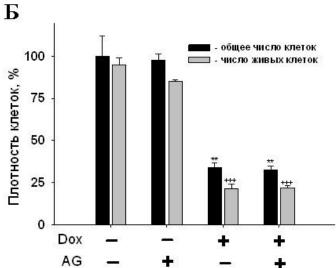
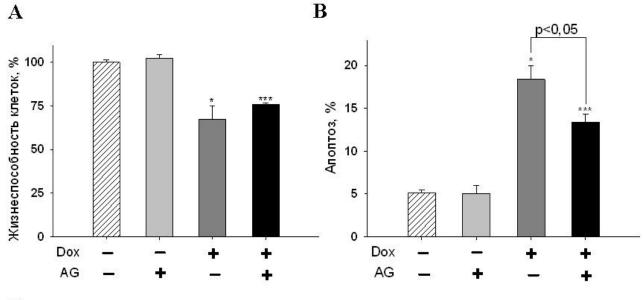


Рисунок 4.14. Влияние аминогуанидина (AG) на выживаемость клеток H9c2 в условиях цитотоксического действия Dox.

A — жизнеспособность клеток; МТТ-тест (денситометрия). *** p<0.001 по сравнению с контролем. **Б** — плотность клеток в культуре; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и иодидом пропидия. ** p<0.01 по сравнению с контролем (общее число клеток); +++ p<0.001 по сравнению с контролем (число живых клеток). **В** - процент апоптотических клеток; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и иодидом пропидия. * p<0.05 по сравнению с контролем.

Концентрация Dox в среде культивирования -0.5 мкM, концентрация AG -30 мкM. AG добавляли за 2 ч до внесения Dox. Анализ жизнеспособности и числа апоптотических клеток проводили через 48 ч после начала обработки клеток Dox. 3a 100% принимали жизнеспособность клеток в контроле.

Также AG существенно не повлиял на выживаемость изолированных кардиомиоцитов крысы (рисунки 4.15 A и 4.15 Б) при обработке их Dox. При этом он заметно снижал процент апоптотических клеток - с 18 % до 13 % (рис. 4.15 В).



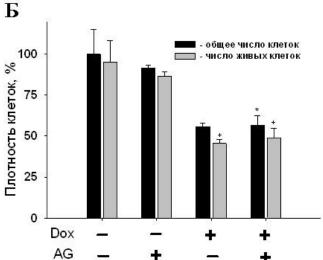


Рисунок 4.15. Влияние аминогуанидина (AG) на выживаемость кардиомиоцитов крысы в условиях цитотоксического действия Dox.

 ${\bf A}$ — жизнеспособность клеток; МТТ-тест (денситометрия). * p<0.05; *** p<0.001 по сравнению с контролем. ${\bf F}$ — плотность клеток в культуре; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и иодидом пропидия. * p<0.05 по сравнению с контролем (общее число клеток); + p<0.05 по сравнению с контролем (число живых клеток). ${\bf B}$ - процент апоптотических клеток; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и иодидом пропидия. * p<0.05; *** p<0.001 - по сравнению с контролем.

Концентрация Dox в среде культивирования - 1 мкМ, концентрация AG — 30 мкМ. AG добавляли за 2 ч до внесения Dox. Анализ жизнеспособности и числа апоптотических клеток проводили через 72 ч после начала обработки клеток Dox. 3a 100% принимали жизнеспособность клеток в контроле.

4.5.2. Влияние антиоксидантов на кардиотоксичность доксорубицина

Действие N-ацетилцистеина

N-ацетилцистеин (NAC) — биотиол, близкий по структуре глутатиону, способен выполнять роль антиоксиданта:

В литературе существуют противоречивые данные о влиянии NAC на токсичность Dox в отношении клеток H9c2. В исследовании Сардао и коллег [217] было показано, что NAC в концентрации 0.1 мМ приблизительно на 10% увеличивал выживаемость клеток H9c2 после воздействия Dox, а в исследовании Ши и коллег [230] ни NAC, ни амид NAC в концентрации 0.75 мМ не влияли на выживаемость культуры клеток H9c2 при действии Dox.

Нами было показано, что NAC в концентрации 1 мМ достоверно усиливал токсическое действие Dox на культуру клеток H9c2, он почти в два раза уменьшал число живых клеток по сравнению с культурами, обработанными только Dox (рис. 4.16). Такой результат был получен при оценке жизнеспособности культур двумя разными методами: МТТ-тестом (рис. 4.16 A) и морфометрическим анализом с использованием двойного окрашивания флуоресцентными ядерными красителями (рис. 4.16 Б). При этом, что было удивительным, NAC не влиял на процент апоптотических клеток (рис. 4.16 В). Следует отметить, что NAC (1 мМ) демонстрировал собственную цитотоксичность в отношении клеток H9c2, хотя и не столь значительную, как на фоне Dox: по данным морфометрического анализа число живых клеток при инкубации с NAC уменьшалось примерно на 10% по сравнению с контролем (рис. 4.16 Б). Колориметрический вариант МТТ-теста не выявил снижения жизнеспособности культур H9c2, обработанных 1 мМ NAC, по сравнению с контрольными культурами (рис. 4.16 A). Это хорошо согласуется с данными Ши и коллег [230], проводившими аналогичные исследования на культурах клеток H9c2.

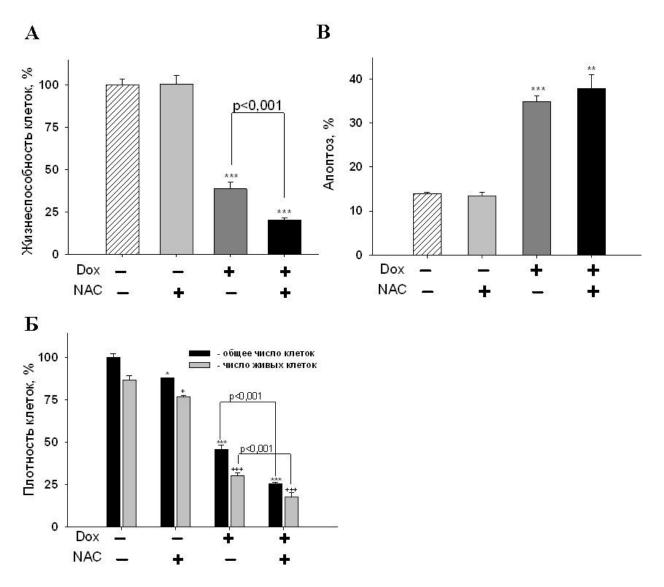


Рисунок 4.16. Влияние *N*-ацетилцистеина (NAC) на выживаемость клеток H9c2 в условиях цитотоксического действия Dox.

А — жизнеспособность клеток; МТТ-тест (денситометрия). *** p<0.001 по сравнению с контролем. **Б** — плотность клеток в культуре; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и иодидом пропидия. * p<0.05; *** p<0.001 по сравнению с контролем (общее число клеток); + p<0.05; +++ p<0.001 по сравнению с контролем (число живых клеток). **В** - процент апоптотических клеток; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и иодидом пропидия. ** p<0.01; *** p<0.001 по сравнению с контролем.

Концентрация Dox в среде культивирования -0.5 мкM, концентрация NAC - 1 мМ. NAC добавляли за 2 ч до внесения Dox. Анализ жизнеспособности и числа апоптотических клеток проводили через 48 ч после начала обработки клеток Dox. 3a 100% принимали жизнеспособность клеток в контроле.

В экспериментах на первичных культурах кардиомиоцитов крысы мы не выявили какого-либо влияния NAC (1 мМ) на снижение выживаемости клеток, вызываемое токсическим действием Dox (рис. 4.17). При этом, при оценке жизнеспособности клеток методом МТТ было обнаружено, что NAC проявляет собственную цитотоксичность (рис. 4.17 A).

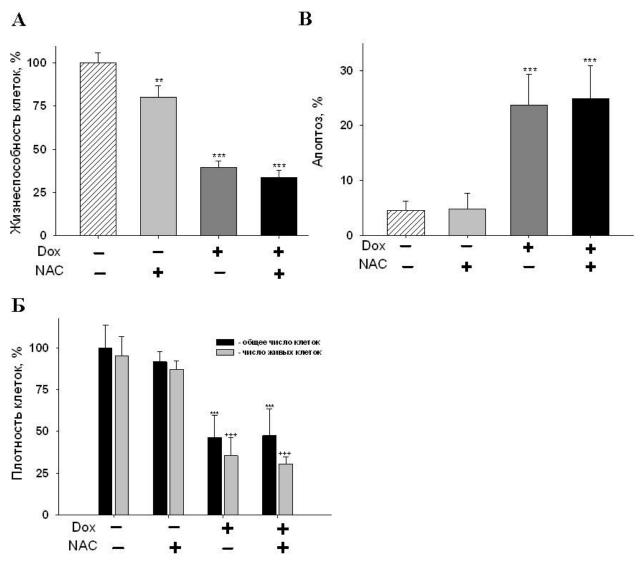


Рисунок 4.17. Влияние N-ацетилцистеина (NAC) на выживаемость кардиомиоцитов крысы в условиях цитотоксического действия Dox.

 ${\bf A}$ — жизнеспособность клеток; МТТ-тест (денситометрия). ** p<0.01; *** p<0.001 по сравнению с контролем. ${\bf F}$ — плотность клеток в культуре; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и иодидом пропидия. *** p<0.001 по сравнению с контролем (общее число клеток), +++ p<0.001 по сравнению с контролем (число живых клеток). ${\bf B}$ - процент апоптотических клеток; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и иодидом пропидия. *** p<0.001 по сравнению с контролем.

Концентрация Dox в среде культивирования - 1 мкМ, концентрация NAC - 1 мМ. NAC добавляли за 2 ч до внесения Dox. Анализ жизнеспособности и числа апоптотических клеток проводили через 72 ч после начала обработки клеток Dox. За 100% принимали жизнеспособность клеток в контроле.

Действие эмоксипина

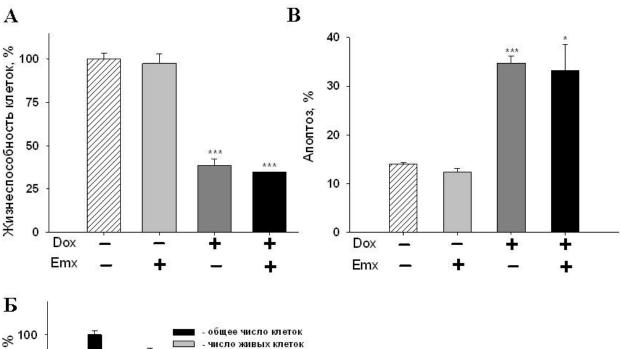
Эмоксипин (3-окси-6-метил-2-этилпиридина гидрохлорид) является синтетическим лекарственным препаратом, обладающим антигипоксической, ангиопротекторной и антиагрегационной активностями. Антиоксидантные свойства эмоксипина (нейтрализация перекисного окисления липидов, а также гидроксильных радикалов, первичных и вторичных радикалов пептидов) обусловлены его химической структурой [11]:

Эмоксипин является универсальным синтетическим ингибитором свободнорадикальных процессов. Благодаря своему механизму действия и широкому спектру фармакологических эффектов эмоксипин оказывает влияние на основные звенья патогенеза различных заболеваний, связанных с процессами свободнорадикального окисления и кислород-зависимыми патологическими состояниями [285]. Данное соединение уже относится к лекарственным препаратам, тем не менее, активные исследования новых фармакологических свойств эмоксипина продолжаются.

В работах Я.Г. Топоровой и коллег было продемонстрировано защитное действие эмоксипина при различных патологиях сердца [13]. В настоящее время эмоксипин применяют в кардиологии при комплексной терапии острого инфаркта миокарда, «синдрома реперфузии» и нестабильной стенокардии [11].

В исследованиях А.В. Сипрова и коллег [10] на крысах был обнаружен кардиопротекторный эффект эмоксипина после проведения противоопухолевой терапии Dox. Данный эффект проявлялся в уменьшении выраженности дистрофических и некробиотических изменений в ткани миокарда. Однако эмоксипин пока не применяется в онкологии для снижения кардиотоксических эффектов Dox.

Мы исследовали влияние эмоксипина на кардиотоксические эффекты Dox на культуры клеток H9c2 и первичные культуры кардиомиоцитов крысы. Показано, что сам эмоксипин в концентрации 0.5 мМ незначительно снижал число жизнеспособных клеток H9c2 (рис. 4.18 Б) и изолированных кардиомиоцитов крысы (рис. 4.19 А) в культуре (эти эффекты не являются статистически достоверными). При этом он примерно на 10 % увеличивал жизнеспособность кардиомиоцитов крысы в первичных культурах, обработанных 1 мкМ Dox (рис. 4.19 А), но не влиял на токсичность Dox в культурах клеток H9c2 (рис. 4.18).



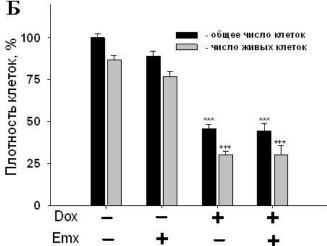


Рисунок 4.18. Влияние эмоксипина (Emx) на выживаемость клеток H9c2 в условиях цитотоксического действия Dox.

А — жизнеспособность клеток; МТТ-тест (денситометрия). *** p<0.001 по сравнению с контролем. **Б** — плотность клеток в культуре; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и иодидом пропидия. *** p<0.001 по сравнению с контролем (общее число клеток); +++ p<0.001 по сравнению с контролем (число живых клеток). **В** - процент апоптотических клеток; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и иодидом пропидия. * p<0.05; *** p<0.001 по сравнению с контролем.

Концентрация Dox в среде культивирования — 0.5 мкМ, концентрация Emx- 0.5 мМ. Emx добавляли за 2 ч до внесения Dox. Анализ жизнеспособности и числа апоптотических клеток проводили через 48 ч после начала обработки клеток Dox. За 100% принимали жизнеспособность клеток в контроле.

Методом двойного окрашивания также было показано, что при данных условиях эмоксипин незначительно снижал процент апоптотических клеток в первичных культурах кардиомиоцитов (рис. 4.19 В).

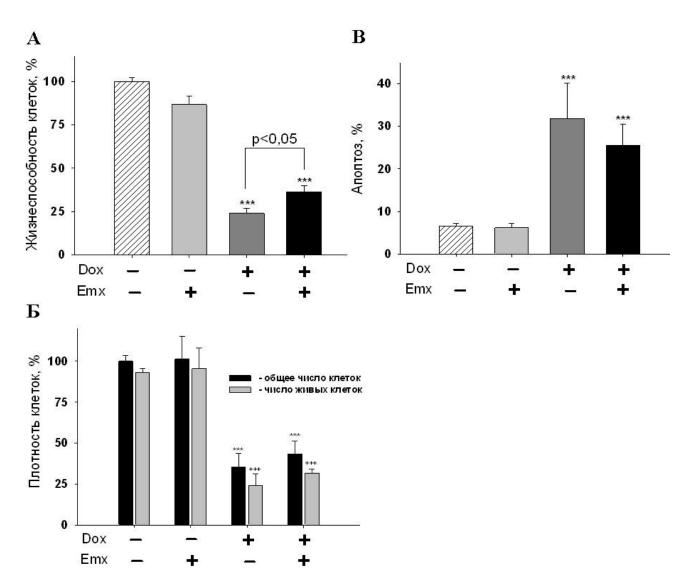


Рисунок 4.19. Влияние эмоксипина (Emx) на выживаемость кардиомиоцитов в условиях цитотоксического действия Dox.

A — жизнеспособность клеток; МТТ-тест (денситометрия). *** p<0.001 по сравнению с контролем. **Б** — плотность клеток в культуре; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и иодидом пропидия. *** p<0.001 по сравнению с контролем (общее число клеток), +++ p<0.001 по сравнению с контролем (число живых клеток). **В** - процент апоптотических клеток; двойное окрашивание клеток красителями Hoechst 33258 и иодидом пропидия. *** p<0.001 по сравнению с контролем.

Концентрация Dox в среде культивирования - 1 мкM, концентрация Emx -0.5 мM. Emx добавляли за 2 ч до внесения Dox. Анализ жизнеспособности и числа апоптотических клеток проводили через 72 ч после начала обработки клеток Dox. За 100% принимали жизнеспособность клеток в контроле.

Ввиду того, что эмоксипин обладает разными активностями и, возможно, имеет несколько мишеней фармакологического действия, нельзя однозначно утверждать, что выявленные нами *in vitro* кардиопротекторные эффекты этого препарата связаны с его антиоксидантными свойствами, поскольку другой известный антиоксидант NAC не оказывал кардиопротекторного действия в данной модели (см. выше в данном разделе).

В ходе проведенных исследований были получены следующие принципиальные результаты (табл. 4.2): 1)- ингибитор индуцибельной NO-синтазы аминогуанидин не оказывал защитного действия на клетки H9c2 и изолированные кардиомиоциты крысы на фоне цитотоксического действия Dox; 2)- антиоксидант NAC не влиял на токсичность Dox в первичных культурах кардиомиоцитов и усиливал его токсическое действие в культуре клеток H9c2; 3)- другой антиоксидант, эмоксипин, не влиял на выживаемость клеток H9c2 и оказывал слабое защитное действие на изолированных кардиомиоциты крысы в условиях цитотоксического действия Dox. Следует отметить, что кардиопротекторные эффекты эмоксипина на клетки H9c2 оказались слабее по сравнению с эффектами ингибиторов PARP (см. раздел 4.4). Также сравнение полученных результатов с литературными данными [177, 217] обнаруживает ряд несоответствий.

Таблица 4.2. Влияние ряда соединений на кардиотоксичность Dox.

Соединение	Фармакологическая активность	Клетки Н9с2		Изолированные кардиомиоциты	
		МТТ-тест	Hoe/PI	МТТ-тест	Hoe/PI
Аминогуанидин	Ингибитор iNOS	-	-	-	\
N-ацетилцистеин	Антиоксидант	↑	↑	-	-
Эмоксипин	Антиоксидант	-	-	\	-

Обозначения: «-» – отсутствие эффекта; «↑» - усиление токсичности Dox, «↓» - снижение токсичности Dox; Hoe/PI – двойное окрашивание клеток ядерными красителями Hoechst 33258 (Hoe) и иодидом пропидия (PI) для выявления апоптотических клеток.

Как было указано выше, первичные культуры кардиомиоцитов являются гетерогенными по своему составу, поскольку содержат «примеси» фибробластов, нейронов, эндотелиальных и некоторых других типов клеток. Поэтому получаемые результаты (в особенности, касающиеся определения выживаемости) достаточно неоднозначны, а порой и сложно интерпретируемы, в частности вследствие того, что мы имеем дело с интегральным ответом клеток разного типа на оказываемые

фармакологические воздействия. Мы предполагаем, что наблюдаемые различия во влиянии одного и того же вещества (NAC и эмоксипин) на кардиотоксичность Dox в отношении клеток H9c2 и изолированных кардиомиоцитов, по крайней мере частично, объясняются гетерогенностью используемых первичных культур кардиомиоцитов.

4.6. Повреждение и фрагментация ДНК при кардиотоксическом действии доксорубицина

Кардиопротекторное действие ингибиторов PARP и наблюдаемое временное увеличение внутриклеточного уровня PAR указывают на вовлеченность системы поли(АДФ-рибозил)ирования в механизмы кардиотоксичности Dox.

Поскольку известно, что повреждения ДНК являются триггером активации PARP, было интересно определить их уровень через 6 и 24 ч инкубации клеток Н9с2 с Dox. В этих временных точках мы наблюдали повышение уровня РАК в клетке, существенное насыщение клеток Dox и появление в цитоплазме гранул с высоким уровнем флуоресценции Dox (6 ч), а также гибель наиболее чувствительных к Dox клеток (24 ч). Для определения степени повреждения ДНК использовали щелочной вариант метода ДНК-комет, который неизбирательно оценивает количество одно- и двунитевых разрывов ДНК (как было отмечено в разделе 2.1.1 однонитевые повреждения ДНК могут образовываться в результате повышения в клетке уровня АФК и пероксинитрита при превращении Dox в радикалы семихинона, а двунитевые разрывы ДНК - в результате ингибирования топоизомеразы II комплексом ДНК с Dox). Уровень повреждений ДНК при анализе ДНК-комет отражает показатель ТМ (см. раздел 3.3.5). Чем выше значение ТМ, тем больше повреждений ДНК в клетке. Для исследования влияния ингибиторов PARP и антиоксидантов на повреждение ДНК, были приготовлены культуры, которые помимо Dox инкубировали с PJ34 (2 мкМ) или эмоксипином (0.5 мМ). Положительным контролем в данной серии экспериментов были клетки, инкубировавшиеся в течение 20 мин в среде с 50 мкМ H_2O_2 при комнатной температуре.

Как видно на рисунке 4.20 через 6 ч инкубации во всех образцах клеток Н9с2, обработанных 1 мкМ Dox, степень повреждения ДНК была выше, чем в контроле (ничем не обработанные клетки). Инкубация клеток Н9с2 в присутствии антиоксиданта или ингибитора PARP по-разному влияла на степень повреждения ДНК при действии Dox. Инкубация клеток с эмоксипином существенно не повлияла на показатель ТМ, тогда как с PJ34 - достоверно снижала степень повреждения ДНК, хотя и не до контрольного уровня.

Аналогичные результаты были получены на культурах делящихся (не переведенных в дифференцированное состояние) клеток H9c2 после 6-часовой инкубации с Dox.

Отсутствие защитного эффекта у эмоксипина после 6-часовой инкубации с Dox свидетельствует в пользу того, что образование повреждений ДНК не связано с генерацией АФК или пероксинитрита. Эти данные также хорошо объясняют то, что эмоксипин в аналогичных условиях не влиял на стимулируемое Dox увеличение уровня PAR (рис. 4.8). Следует заметить, что образование первичных повреждений ДНК, обусловленное присутствием в клетке Dox, должно предшествовать активации PARP, поэтому ингибитор PJ34 не может снижать их уровень. Скорее наоборот, ингибирование PARP затрудняет репарацию ДНК, и в присутствии ингибитора количество повреждений должно было увеличиться. Выявленные эффекты PJ34 позволили сделать предположение, что уже через 6 ч инкубации с Dox в определенной клеточной популяции реализуется программа гибели, которая запускается в результате активации PARP; терминальной стадией ее является фрагментация ДНК. В этом случае PJ34 уменьшает показатель ТМ за счет подавления PARP-опосредованной гибели клеток, и, следовательно, предотвращает фрагментацию ДНК нуклеазами.

После 24-часовой инкубации клеток H9c2 с 1 мкМ Dox степень повреждения ДНК намного выше, чем после 6-часовой инкубации (рисунки 4.20 A, 4.21 A и 4.21 B), а показатель ТМ клеток, инкубированных с Dox, даже превышает данный показатель у обработанных H₂O₂ клеток (рис. 4.21 Б). При этом ингибиторы PARP многократно снижали степень повреждения ДНК, вызванную Dox (рис. 4.21). На основании полученных результатов можно предположить, что наблюдаемое увеличение показателя ТМ (по сравнению с контролем и 6-часовой инкубацией с Dox) является в значительной степени результатом фрагментации ДНК нуклеазами на заключительных этапах реализации PARP-опосредованной гибели, видимо, каспаза-независимого апоптоза, протекающего по механизму партанатоза.

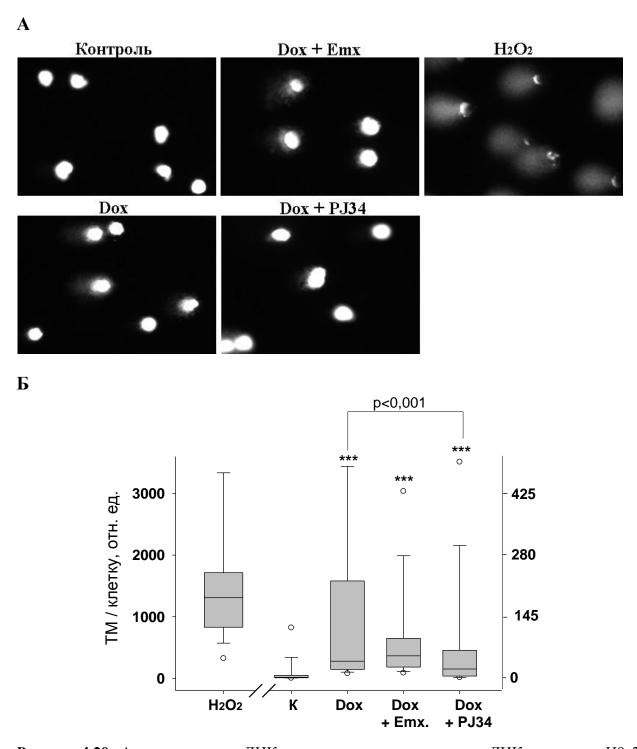


Рисунок 4.20. Анализ методом ДНК-комет степени повреждения ДНК в клетках Н9с2 после 6-часовой обработки их доксорубицином (Dox).

 ${\bf A}$ — характерные микрофотографии «комет» в контроле, после обработки Dox, ${\bf H}_2{\bf O}_2$ (50 мкМ, 20 мин; положительный контроль), а также Dox в сочетании с Emx (Dox+Emx) или PJ34 (Dox+PJ34). ${\bf F}$ - количественный анализ степени повреждения ДНК.

Концентрации реагентов: Dox -1 мкM, PJ34 -2 мкM, эмоксипин (Emx) -0.5 мМ. ДНК окрашена флуоресцентным красителем DAPI, объектив $\times 20$. Количественные данные представлены в виде нижний квартиль—медиана—верхний квартиль. *** p<0.001 - по сравнению с контролем (клетки не обрабатывали никакими реагентами). Для анализа ТМ («момента хвоста комет») использовали изображения, полученные методом флуоресцентной микроскопии с использованием объектива $\times 20$.

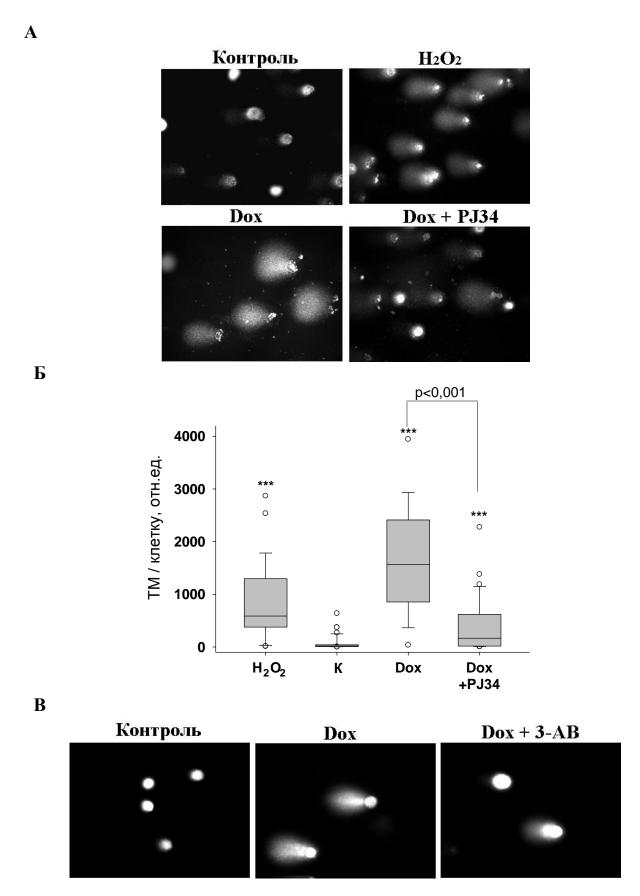


Рисунок 4.21. Анализ методом ДНК-комет степени повреждения ДНК в клетках Н9с2 после 24-часовой обработки их доксорубицином (Dox).

 ${\bf A}$ – характерные микрофотографии «комет» в контроле, после обработки Dox, ${\bf H_2O_2}$ (50 мкМ, 20 мин; положительный контроль), а также Dox в сочетании с PJ34 (Dox+PJ34).

 ${f G}$ - количественный анализ степени повреждения ДНК. ${f B}$ - характерные микрофотографии «комет», полученные в повторном аналогичном эксперименте, но с использованием 3-AB.

Концентрации реагентов: Dox -1 мкM, PJ34 -2 мкM, 3-AB -1 мM. ДНК окрашена флуоресцентным красителем DAPI, объектив $\times 20$. Количественные данные представлены в виде - нижний квартиль—медиана—верхний квартиль. *** p<0.001 - по сравнению с контролем (клетки не обрабатывали никакими реагентами). Для анализа ТМ («момента хвоста комет») использовали изображения, полученные методом флуоресцентной микроскопии с использованием объектива $\times 20$.

Известно, что при каспаза-зависимом апоптозе происходит межнуклеосомное расщепление ДНК на короткие фрагменты, длиной около 200 п.о. Характерным признаком каспаза-независимого апоптоза является гидролиз ДНК на очень крупные фрагменты, длиной около 50 000 п.о. Такая фрагментация вызывается транслокацией AIF из митохондрий в ядро. Поскольку ДНК-кометы не дают представления о размере образующихся ДНК-фрагментов, мы дополнительно провели анализ образцов ДНК методом электрофореза в агарозном геле. Положительным контролем служили образцы ДНК, полученные из клеток Н9с2, обработанных неселективным ингибитором киназ стауроспорином (STS; 1 мкМ; 24 ч). STS является классическим индуктором каспазазависимого апоптоза, характеризующегося межнуклеосомной фрагментацией ДНК. Как видно на рисунке 4.22 A при воздействии STS на клетки H9c2 действительно образуются фрагменты, кратные 200 п.о. При обработке клеток 1 мкМ Dox такие фрагменты не обнаруживаются, но видно накопление более крупных фрагментов ДНК. При этом РЈ34 существенно подавлял фрагментацию ДНК, вызванную Dox (рис. 4.22 Б). Следует отметить, что после 24- и 48-часовой инкубации клеток Н9с2 с Dox наблюдали схожие профили фрагментации ДНК.

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что гибель клеток Н9с2 не связана с каспаза-зависимым апоптозом. Ранее в работе Йоун [274] было обнаружено, что при обработке клеток Н9с2 Dox происходит активация каспазы-3, однако общий ингибитор каспаз z-VAD.FMK не оказывал ожидаемого защитного действия, и не увеличивал процент жизнеспособных клеток. Мы предположили, что одним из основных путей гибели кардиомиоцитов в результате цитотоксического действия Dox является партанатоз – разновидность каспаза-независимого апоптоза.

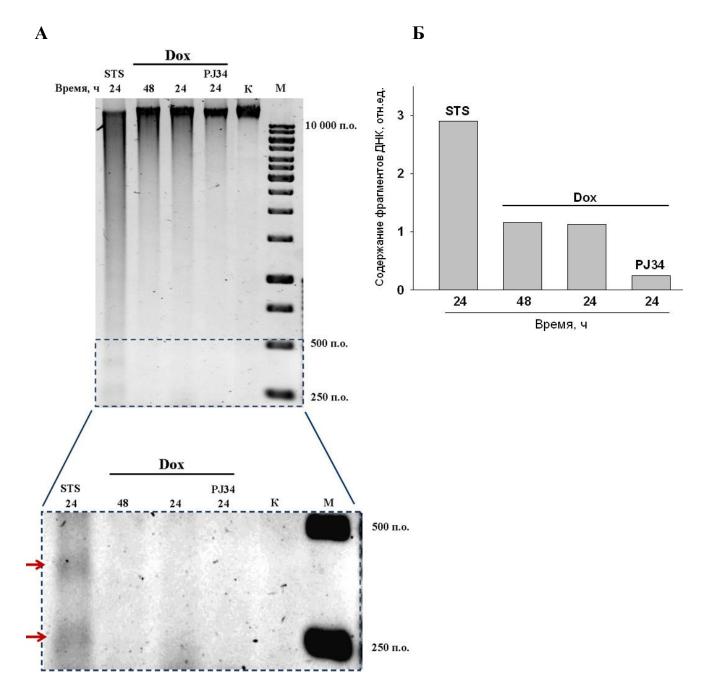


Рисунок 4.22. Анализ фрагментов ДНК, образующихся при обработке клеток H9c2 доксорубицином (Dox), методом гель-электрофореза.

А – электрофореграмма, демонстрирующая состав фрагментов ДНК, образующихся при обработке клеток STS, Dox, а также Dox в сочетании с PJ34. На вставке – увеличенное и контрастированное изображение части электрофореграммы. Красными стрелками указаны фрагменты ДНК, образующиеся при каспаза-зависимом апоптозе (приблизительно 200 и 400 п.о.), индуцированном STS. **Б** – количественный анализ содержания фрагментов ДНК в образцах; содержание фрагментов ДНК в контроле принимали равным «0».

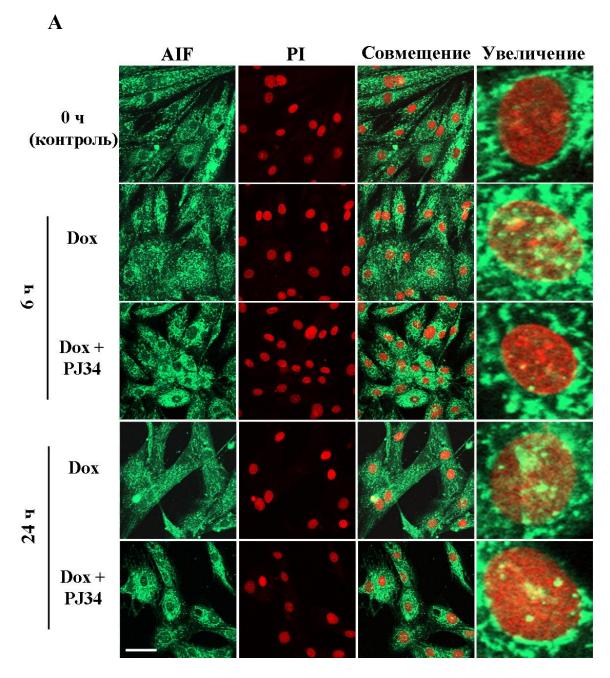
Концентрации реагентов: Dox - 1 мкМ; PJ34 - 2 мкМ; стауроспорин (STS) - 1 мкМ.

Электрофорез проводили в 1.5 % агарозном геле. В каждом образце содержалось по 0.5 мкг ДНК. Для окрашивания ДНК использовали бромистый этидий.

Обозначения: K — отрицательный контроль (интактные, ничем не обработанные клетки); M — набор маркеров ДНК (250 — 10 000 п.о.).

4.7. Внутриядерное накопление **AIF** в кардиомиоцитах при воздействии доксорубицина

Транслокация AIF из митохондрий в ядро является ключевой стадией партанатоза (см. раздел 2.2.4). С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания AIF было исследовано внутриклеточное распределение этого белка в интактных (контрольных) культурах H9c2, а также в культурах, подвергшихся 6- и 24-часовой обработке 1 мкМ Dox. Из представленных на рисунке 4.23 А микрофотографий видно, что в контрольных клетках флуоресцентный сигнал AIF локализован преимущественно в цитоплазме. Обработка культур Dox приводила к накоплению AIF в области ядер на обоих сроках инкубации, а внесение ингибитора PARP заметно снижало стимулированное Dox внутриядерное накопление AIF.



Б

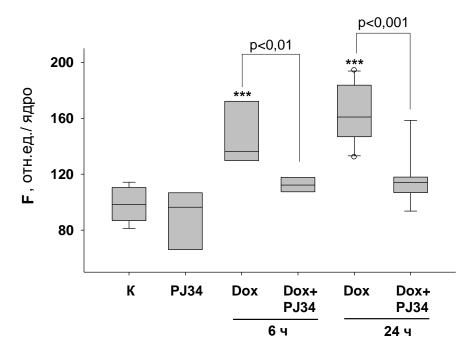


Рисунок 4.23. Инкубация клеток H9c2 с доксорубицином (Dox) приводит к транслокации AIF в ядро.

А - характерные изображения клеток H9c2, полученные после иммунофлуоресцентного анализа AIF. **Б** - количественный анализ содержания AIF в ядрах клеток H9c2.

Концентрация Dox - 1 мкМ, PJ34 - 2 мкМ; PJ34 вносили в среду культивирования за 2 ч до Dox. Ядра окрашивали иодидом пропидия (PI), объектив $- \times 40$, режим масляной иммерсии. Масштабная планка соответствует расстоянию 50 мкм. Обозначения: 0 ч или \mathbf{K} - контрольный уровень AIF (культуры не обрабатывали Dox). Количественные данные представлены в виде - нижний квартиль—медиана—верхний квартиль. ** p<0.01; *** p<0.001 - по сравнению с контролем.

Количественный анализ показал, что при 6- и 24-часовой инкубации кардиомиоцитов H9c2 с Dox медианные значения интенсивности флуоресценции сигнала AIF в области ядер увеличивались в 1.39 и 1.64 раза по сравнению с контролем; а PJ34 снижал медианные значения показателей внутриядерной интенсивности флуоресценции AIF на обоих сроках инкубации практически до контрольного уровня (рис. 4.23 Б).

Суммируя полученные результаты, можно констатировать, что уже через 6 ч инкубации с Dox происходит активация PARP и накопление PAR, что приводит к запуску механизма партанатоза: транслокации AIF в ядро и активации специфических нуклеаз, вызывающих образование длинных фрагментов ДНК. Ингибиторы PARP увеличивают выживаемость клеток, препятствуя развитию партанатоза и фрагментации ДНК. При этом соединения с антиоксидантным действием не влияют на активацию PARP, фрагментацию ДНК и не увеличивают выживаемость клеток. Полученные данные опровергают сделанное нами ранее предположение о вовлеченности активных форм кислорода и азота в активацию PARP и механизмы гибели кардиомиоцитов, вызываемые Dox.

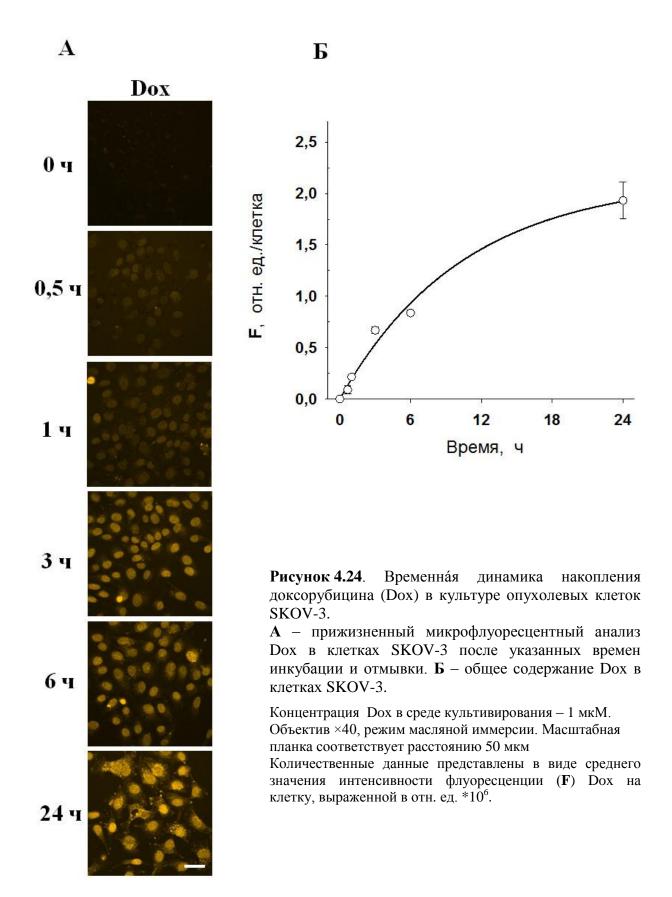
4.8. Влияние ингибиторов PARP на стимулируемую доксорубицином гибель клеток опухоли яичника человека SKOV-3

Стратегия применения ингибиторов PARP для снижения кардиотоксического действия Dox представляется весьма перспективной, поэтому важно было исследовать их влияние на противоопухолевое действие Dox. Следует заметить, что литературные данные по этому вопросу весьма противоречивы (см. раздел 2.4.3).

Исследования проводили на культуре клеток опухоли яичника человека SKOV-3. Для начала, также как и для кардиомиоцитов, была исследована динамика накопления Dox в клетках SKOV-3 и подобрана схема обработки культур Dox.

Было показано, что накопление Dox (содержание в среде культивирования 1 мкМ) в клетках SKOV-3 характеризуется схожей с клетками H9c2 динамикой (рисунки 4.4 В и 4.24 Б). Расчетные значения максимальной степени накопления и времени полунасыщения Dox всей клетки составили 2.14 ± 0.11 отн. ед. и 7.24 ± 0.76 ч, соответственно. В отличие от культур кардиомиоцитов, в клетках SKOV-3 гранулярное цитоплазматическое распределение Dox обнаруживается только при длительных временах инкубации - через 24 ч, тогда как в культурах кардиомиоцитов такие гранулы можно выявить уже через 6 ч после внесения Dox (рисунки 4.4 Б, 4.5 Б и 4.24 А).

Затем мы исследовали чувствительность опухолевых клеток SKOV-3 к Dox. Считается, что активно делящиеся клетки, в том числе и опухолевые, обладают более высокой чувствительностью к действию генотоксических агентов по сравнению с терминально дифференцированными неделящимися клетками, поэтому обрабатывали клетки SKOV-3 более низкими концентрациями Dox, чем в случае кардиомиоцитов. Было показано, что 72-часовая инкубация в присутствии 0.02 – 0.5 мкМ Dox приводит к сильному подавлению роста клеток в культуре. При концентрации 0.05 мкМ Dox вызывает примерно 70% снижение жизнеспособности клеток, а дальнейшее увеличение концентрации Dox, вплоть до 0.5 мкМ, лишь незначительно увеличивало его цитотоксичность (рис. 4.25). В дальнейшем в экспериментах на клетках SKOV-3 мы использовали Dox в концентрациях 0.02 – 0.2 мкМ.



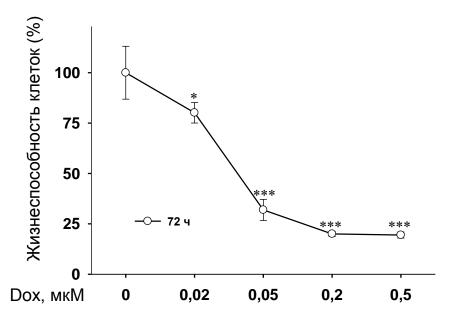
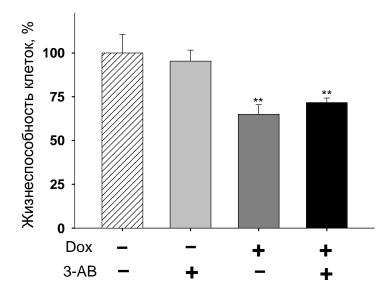


Рисунок 4.25. Чувствительность опухолевых клеток SKOV-3 к токсическому действию Dox.

Клетки культивировали с Dox 72 ч; жизнеспособность оценивали методом MTT (морфометрия); за 100% принимали выживаемость клеток в контроле. * p<0.05; *** p<0.001 по сравнению с контролем.

После подбора условий обработки клеток Dox, было исследовано влияние ингибиторов PARP (3-AB и 5-AIQ) на противоопухолевую активность Dox (см. раздел 3.3.2). Положительным контролем служили сестринские культуры клеток SKOV-3, которые вместо Dox обрабатывались темозоломидом (ТZ) - противоопухолевым препаратом алкилирующего действия. Известно, что ингибиторы PARP усиливают противоопухолевое действие TZ [54, 252]. Как следует из полученных данных, ни 3-AB, ни 5-AIQ не влияли на гибель клеток SKOV-3, вызванную цитотоксическим действием Dox в концентрации 0.02 мкМ (рис. 4.26). Такой же результат наблюдали при применении Dox в концентрации 0.05 мкМ (не показано). Подобные результаты были получены Али с коллегами в экспериментах на культурах опухолевых клеток MDA-MB-231, SW620, LoVo при совместном применении Dox и ингибитора PARP AG014699 [17]. Следует также отметить, что после 72-часовой инкубации клеток SKOV-3 с 5-AIQ, без обработки Dox, мы наблюдали существенное увеличение числа клеток SKOV-3 по сравнению с контролем (рис. 4.26 Б).

A



Б

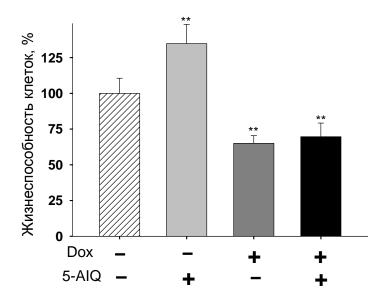


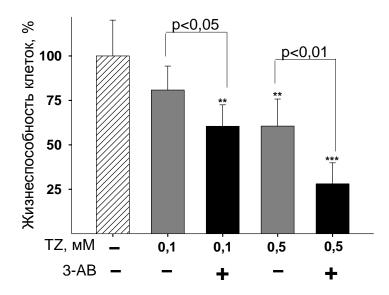
Рисунок 4.26. Влияние ингибиторов PARP - 3-AB (**A**) и 5-AIQ (**Б**) - на цитотоксическое действие Dox на опухолевые клетки SKOV-3.

Концентрация Dox в среде культивирования -0.02 мкM, 3-AB - 1 мМ и 5-AIQ -10 мкM. Ингибиторы PARP добавляли за 2 ч до внесения Dox. В контрольные образцы и образцы с Dox (график **Б**) добавляли ДМСО до конечной концентрации 0.1%, что соответствует содержанию ДМСО в образцах с 5-AIQ. Жизнеспособность оценивали после 72 ч инкубации методом МТТ (морфометрия). За 100% принимали жизнеспособность клеток в контроле. ** p<0,01 по сравнению с контролем

В серии параллельных экспериментов, в которых опухолевые клетки обрабатывали TZ (0.1 или 0.5 мМ), как и ожидалось, наблюдали усиление токсичности алкилирующего агента при внесении в культуру ингибиторов PARP. Так было показано, что 3-AB и 5-AIQ

более чем в два раза увеличивали гибель клеток SKOV-3, вызванную инкубацией в присутствии 0.5 мМ TZ (рис. 4.27).

A



Б

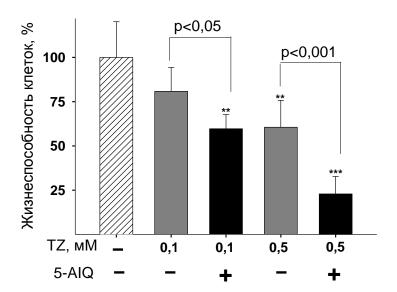


Рисунок 4.27. Влияние ингибиторов PARP - 3-AB (**A**) и 5-AIQ (**Б**) - на цитотоксическое действие темозоломида (TZ) на опухолевые клетки SKOV-3.

Концентрации 3-AB-1 мМ и 5-AIQ-10 мкМ. Ингибиторы PARP добавляли за 2 ч до внесения TZ. Жизнеспособность оценивали после 72 ч инкубации методом МТТ (морфометрия). За 100% принимали жизнеспособность клеток в контроле. ** p<0,01; *** p<0.001 по сравнению с контролем.

Таким образом, в данной серии экспериментов было показано, что ингибиторы PARP не снижают противоопухолевые эффекты Dox.

4.9. Дисахаридные и диальдегидные производные пиримидиновых нуклеозидов – потенциальные ингибиторы PARP

В рамках данной работы мы исследовали PARP-ингибирующую и кардиопротекторную активности ряда новых соединений - дисахаридных и диальдегидных аналогов нуклеозидов.

Аналоги нуклеозидов представляют собой большую группу органических соединений, обладающих разнообразными биологическими свойствами. Известно, что некоторые метаболиты аналогов нуклеозидов способны подавлять активность ряда ферментов обмена нуклеотидов, ДНК-полимераз и ферментов, связанных с процессами репарации и рекомбинации ДНК [145, 176]. В этой связи особый интерес предоставляет возможность регуляции активности PARP-1 аналогами нуклеозидов. Следует отметить, что ранее другими исследователями уже была определена PARP-ингибирующая активность некоторых природных нуклеозидов и их производных (см. раздел 2.3.5).

4.9.1. Ингибирование рекомбинантной PARP-1 человека аналогами нуклеозидов

В Лаборатории дизайна и синтеза биологически активных соединений Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (заведующий - д.х.н. Михайлов С.Н.) были синтезированы нуклеозиды с измененной структурой углеводной части молекулы - дисахаридные и диальдегидные производные [2, 168]. Поскольку дисахаридный нуклеозид является структурным элементом РАК [3], синтезированные соединения рассматривались в качестве потенциальных конкурентных ингибиторов РАКР. Особенность всех использованных в нашей работе дисахаридных производных нуклеозидов — это наличие дополнительного остатка рибозы, присоединенного к нуклеозиду через 1"- полуацетальный гидроксил (рис. 4.28).

В совместной работе с коллегами из Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Лаборатория биоорганической химии, заведующая - д.х.н. Лаврик О.И.) было исследовано влияние около 30 синтетических аналогов нуклеозидов (главным образом, дисахаридных) на активность изолированной рекомбинантной PARP-1 (hrPARP-1) человека. Было показано, что производные аденина, гуанина и цитозина не проявляют hrPARP-1 ингибирующей активности вне зависимости структуры дисахаридной части, за исключением 3'-О-β-D-рибофуранозил-2'дезоксицитидина, который оказывал слабое ингибиторное действие на hrPARP-1. Стоит отметить, что 2'-O-α-D-рибофуранозиладенозин, являющийся мономерным звеном PAR, не оказывал hrPARP-1-ингибирующего действия. Ряд дисахаридных аналогов Thd, так же как и сам Thd, проявляли значительную ингибиторную активность в отношении hrPARP-1: значения IC_{50} для них варьировали в пределах 25 - 54 мкМ (таблица 4.3).

3'-О-β-D-рибофуранозил-5-йод-2'дезоксиуридин (**2**)

Диальдегидное производное 3'-О-β-D-рибофуранозил-2'- дезокситимидина (4)

Диальдегидное производное 1-β-D-эритрофуранозилурацила (**6**)

Рисунок 4.28. Структуры синтетических производных нуклеозидов

Таблица 4.3. Ингибирование hrPARP-1 человека новыми синтетическими производными нуклеозидов.

Соединение	Ингибирование активности hrPARP-1 (IC ₅₀ , μM)	Ингибирование активности PARP в клетках SKOV-3 ^a
Уридин	> 2000	HA^6
Тимидин	54 ± 2	+++
1	> 2000	НА
2	45 ± 3	++
3	38 ± 4	+
4	25 ± 3	++
5	139 ± 22	-
6	> 2000	НА
3-Аминобензамид	57 ± 8	+++

^а Ингибиторную активность PARP в культуре оценивали по четырехуровневой шкале: отсутствие активности (-); низкая активность (+); умеренная активность (++); высокая активность (+++).

Ингибирование hrPARP-1 дисахаридными производными дезоксиуридина с заместителем галогеном в 5-положении зависело от размера галогена: 3'-О- β -D-рибофуранозил-5-фтор-2'-дезоксиуридин не ингибировал hrPARP-1, а 3'-О- β -D-рибофуранозил-5-йод-2'-дезоксиуридин (2) оказался эффективным ингибитором hrPARP-1 (IC₅₀ = 45 мкМ), как и производные Thd. Похожие результаты с галоген-замещенными по 5-положению производными дезоксиуридина были получены ранее в работах Прейс [208] и Пивазяна [204].

В отличие от Thd, уридин (Urd) и его 3'-дисахаридный аналог не ингибировали hrPARP-1. Также были исследованы hrPARP-1 ингибирующие свойства аналогов Urd с окисленным (диальдегидным) остатком рибозы (5) или эритрозы (6). Несмотря на то, что эти соединения похожи, только 5 проявило ингибирующую активность ($IC_{50} = 139 \text{ мкM}$). Это может объясняться только структурными особенностями углеводного остатка, поскольку сам Urd не ингибирует hrPARP-1.

4.9.2. Ингибирование PARP человека аналогами нуклеозидов в культуре клеток

На основании полученных данных по ингибированию рекомбинантной PARP-1 человека новыми синтетическими нуклеозидами были отобраны несколько наиболее

⁶ НА – ингибиторную активность соединения не анализировали.

перспективных аналогов нуклеозидов (соединения **2-5**) и оценено их влияние на стимулированный H_2O_2 синтез PAR в культуре клеток опухоли яичника человека SKOV-3. В качестве соединений сравнения были взяты Thd и 3-AB.

В контрольных опытах было показано, что сами исследуемые соединения не влияли на базальный уровень PAR, в качестве примера приведены данные для соединения $\bf 4$ (рис. 4.29). После 5-минутной инкубации с 1 мМ $\bf H_2O_2$ содержание PAR в ядрах клеток увеличивалось в 20-25 раз по сравнению с контролем (рисунки 4.29 и 4.30). Предынкубация клеток с соединениями $\bf 2$ (рис. 4.30 A), $\bf 3$ (рис. 4.30 Б) или $\bf 4$ (рисунки 4.29 и 4.30 В) в течение 1 или 24 ч вызывала концентрационно-зависимое снижение стимулированного $\bf H_2O_2$ накопления PAR. Однако, ингибиторный эффект этих соединений был заметно слабее того, которое оказывал Thd (рис. 4.30 Д). Например, после часовой предынкубации клеток с нуклеозидами, взятыми в концентрации 0.1 мМ, Thd снижал стимулированный $\bf H_2O_2$ синтез PAR на 72% (рис. 4.30 Д), соединение $\bf 2$ — на 63% (рис. 4.30 А), соединение $\bf 4$ — на 50% (рис. 4.30 В), а соединение $\bf 3$ — на 25% (рис. 4.30 Б) по сравнению с клетками, обработанными только $\bf H_2O_2$.

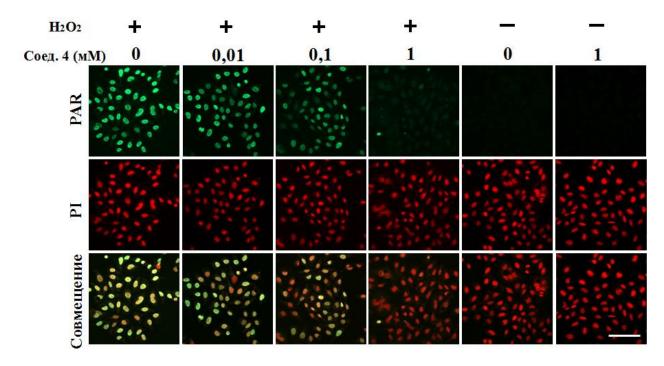
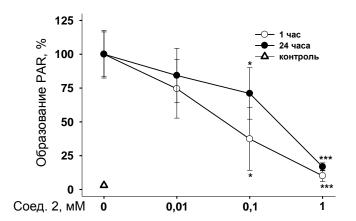


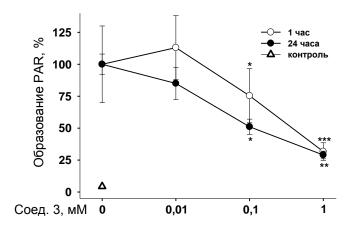
Рисунок 4.29. Концентрационно-зависимое ингибирование стимулированного H_2O_2 синтеза PAR в клетках SKOV-3 диальдегидным производным 3′-O- β -D-рибофуранозил-2′-дезокситимидина (соединение 4).

Характерные изображения препаратов культур SKOV-3, полученные после иммунофлуоресцентного окрашивания PAR. Культуры клеток предынкубировали с указанными концентрациями $\bf 4$ в течение 1 ч, после чего подвергали 5-минутной обработке 1 мМ $\bf H_2O_2$. Ядра контрастировали иодидом пропидия (PI). Микроскопию проводили в режиме масляной иммерсии с использованием объектива $\bf \times 40$. Масштабная планка соответствует расстоянию $\bf 100$ мкм.

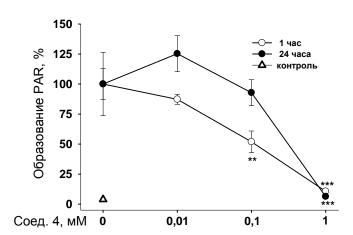
A



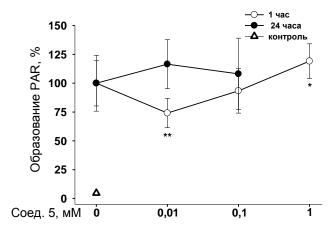
Б



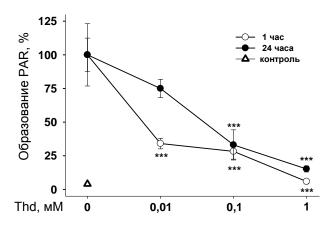
B



Γ



Д



 \mathbf{E}

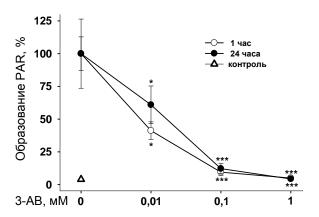


Рисунок 4.30. Влияние аналогов нуклеозидов, обладающих ингибиторной активностью hrPARP-1, на стимулируемый H_2O_2 синтез PAR в клетках SKOV-3.

Количественный анализ содержания PAR в ядрах клеток SKOV-3 после 1- и 24-часовой предынкубации с соединениями **2** (A), **3** (Б), **4** (В), **5** (Γ), **Thd** (Д) и **3-AB** (Е) и стимулированных H_2O_2 (1 мМ, 5 мин) повреждений ДНК. Контрольные культуры ничем не обрабатывали. Уровень PAR в ядрах клеток обработанных только H_2O_2 принимали за 100%. Данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение. * p<0.05; ** p<0.01; *** p<0.001 - по сравнению с образцами, обработанными только H_2O_2 .

Видно, что наличие дополнительного остатка рибозы в 3'-положении приводит к снижению PARP-ингибирующего потенциала производных Thd. При этом соединение со вторым окисленным остатком рибозы (4) лучше, чем его восстановленный аналог (3) подавляет активацию PARP (рисунки 4.30 Б и В). Интересно, что все исследуемые соединения, за исключением 3, оказывали более сильное ингибирующее действие на синтез PAR при 1-часовой предынкубации с клетками, по сравнению с 24-часовой, что может быть обусловлено их лабильностью или активным метаболизмом.

После часовой предынкубации клеток SKOV-3 с $0.01\,\mathrm{mM}$ диальдегидного производного Urd (5) наблюдалось незначительное ингибирование образования PAR (рис. $4.30\,\Gamma$), но при более высоких концентрациях этот нуклеозид либо не влиял на $\mathrm{H_2O_2}$ –индуцированное образование PAR, либо его усиливал. Следует заметить, что после 24-часовой инкубации 5 не ингибировал PARP в клетках SKOV-3, при этом оказывал выраженное цитотоксическое действие: бо́льшая часть клеток погибала, однако в оставшихся жизнеспособных клетках наблюдался интенсивный синтез PAR после воздействия $\mathrm{H_2O_2}$.

Таким образом, исследуемые нами производные нуклеозидов проявляли свойственную им PARP-ингибиторную активность и в культуре клеток человека. Необходимо отметить, что эффективность их ингибиторного действия в культуре клеток была несколько ниже, чем в экспериментах с hrPARP-1, в то время как эффективность 3-AB (рис. 4.30 E) не отличалась, а Thd даже оказалась выше (табл.4.3).

4.9.3. Влияние синтетических производных нуклеозидов - ингибиторов PARP на цитотоксичность доксорубицина в отношении кардиомиоцитов и опухолевых клеток

Также чрезвычайно интересно было сравнить влияние выявленных нами новых ингибиторов PARP на цитотоксические эффекты доксорубицина на кардиомиоциты и опухолевые клетки. Эксперименты проводили на культурах клеток Н9с2 и клеток опухоли яичника человека SKOV-3. Были исследованы эффекты соединений 3 и 4, так как они проявляли сравнительно высокую PARP-ингибиторную активность и оказались вплоть концентрации 1 **MM** $0.1 \, \text{MM}$ малотоксичными до соответственно (см. Приложение А). Анализировали выживаемость клеток при инкубации нуклеозидами, Dox, а также при их совместном применении.

Показано, что при 72-часовой инкубации клеток SKOV-3 с Dox (0.02 мкМ) соединения **3** и **4** (оба в концентрации 0.1 мкМ) не влияли на его противоопухолевое действие (рис. 4.31), что хорошо согласуется с ранее полученными данными для известных ингибиторов PARP (рис. 4.26).

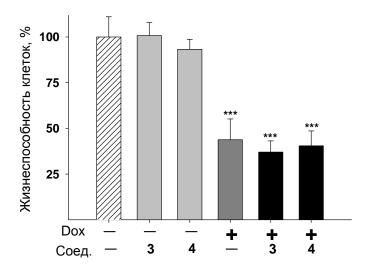


Рисунок 4.31. Влияние 3'-О-β-D-рибофуранозил-2'-дезокситимидина (3) и его диальдегидного производного (4) на гибель опухолевых клеток SKOV-3, вызванную Dox.

Концентрации реагентов: Dox -0.02 мкМ; соединение 3-0.1 мМ, соединение 4-0.1 мМ. Время инкубации в присутствии Dox -72 ч. Нуклеозиды вносили в культуры за 2 ч до добавления Dox. Контрольные культуры (заштрихованный столбик) ничем не обрабатывали. За 100% принимали жизнеспособность клеток в контроле. Жизнеспособность клеток определяли методом МТТ (морфометрия). Данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение.***p<0.001 по сравнению с контролем.

В экспериментах на клетках Н9с2 было обнаружено, что соединение **3** (1 мМ) демонстрировало незначительную цитотоксичность, но при этом оказывало существенное защитное действие при инкубации с Dox. После 48 ч совместной инкубации соединение **3** увеличивало число живых клеток приблизительно на 15 % (рис. 4.32).

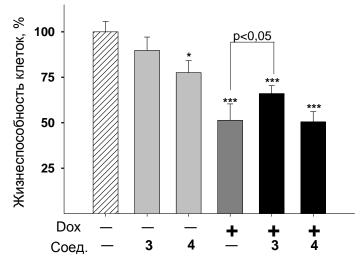


Рисунок 4.32. Влияние 3'-О-β-D-рибофуранозил-2'-дезокситимидина (3) и его диальдегидного производного (4) на гибель клеток H9c2, вызванную Dox.

Концентрации реагентов: Dox - 0.5 мкМ; соединение 3 - 1 мМ, соединение 4 - 0.1 мМ. Время инкубации в присутствии Dox - 48 ч. Нуклеозиды вносили в культуры за 2 ч до добавления Dox.

Контрольные культуры (заштрихованные столбики) ничем не обрабатывали. За 100% принимали жизнеспособность клеток в контроле. Жизнеспособность оценивали по плотности клеточных культур. Данные представлены в виде среднее \pm стандартное отклонение. *p<0.05; ***p<0.001 по сравнению с контролем.

Соединение **4**, хотя использовалось в меньшей концентрации (0.1 мМ) чем соединение **3**, оказалось более токсичным для клеток H9c2: после 48-часового воздействия соединение **4** снижало жизнеспособность клеток примерно на 20% по сравнению с контролем, но при этом не влияло на кардиотоксические эффекты Dox (рис. 4.32). Отсутствие аддитивности в токсических эффектах Dox и соединения **4** может быть следствием того, что собственная токсичность нуклеозида нивелируется его защитным PARP-ингибирующим действием.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе исследовалось возможное участие системы поли(АДФрибозил) ирования белков в механизмах кардиотоксического действия Dox в модельных экспериментальных системах. С этой целью использовались две разновидности культур кардиомиоцитов – первичные культуры из сердца новорожденных крыс и культура клеток Н9с2 (кардиомиобласты эмбриона крысы). Особенностью использованных нами культур было то, что они предварительно культивировались в условиях, способствующих их дифференцировке в кардиомиоциты. Поскольку большинство функций PARP связано с ее активацией (или с образованием продукта реакции - PAR), то интересно было исследовать с одной стороны влияние Dox на уровень PAR, а с другой - влияние ингибиторов PARP на различные проявления кардиотоксического действия Dox. Из литературы известно, что кардиотоксическое действие Dox сопровождается активацией синтеза NO и образования активных форм кислорода и азота, способных вызывать повреждения ДНК, которые могут приводить к активации PARP. В этой связи логично было на используемой нами модели сравнить кардиопротекторные эффекты ингибиторов PARP, ингибиторов NO-синтазы и антиоксидантов. Кроме того, в работе были исследованы некоторые свойства новой группы потенциальных ингибиторов PARP, являющихся производными пиримидиновых нуклеозидов. С применением методики, позволяющей проводить анализ активности PARP в живых клетках, был оценен PARP-ингибиторный потенциал исследуемых соединений. Также была определена цитотоксичность ряда производных нуклеозидов в отношении нормальных и опухолевых клеток человека (см. Приложение А).

Исследование накопления Dox в изолированных кардиомиоцитах и клетках H9c2 показало, что в промежутке времени от 0.5 до 6 ч наблюдается сходная динамика внутриядерного накопления Dox в обоих типах клеток. Характер распределения Dox в этих клетках также схож: Dox в первые часы инкубации локализуется преимущественно в ядрах, а после 6-часовой инкубации начинает накапливаться в цитоплазме, где со временем появляются Dox-содержащие гранулы. При этом показатели максимальной степени накопления и времени полунасыщения ядер Dox в клетках H9c2 более чем в два раза превышают показатели, полученные для изолированных кардиомиоцитов.

Динамика накопления Dox в клетках SKOV-3 похожа на ту, которую наблюдали для клеток H9c2, а величины максимальной степени накопления Dox оказались почти одинаковыми для этих клеток. Это указывает на то, что в обоих типах клеток может накапливаться примерно одинаковое количество Dox. Тем не менее, кардиомиоциты и опухолевые клетки сильно отличаются по чувствительности к цитотоксическому

действию Dox. Определение выживаемости клеточных культур при обработке их Dox показало, что 70% гибель изолированных кардиомиоцитов, клеток H9c2 и SKOV-3 достигается при концентрациях Dox в среде равной примерно 1, 0.5 и 0.05 мкМ, соответственно. Эти различия, по-видимому, связаны с разной способностью клеток к накоплению Dox и разным пролиферативным статусом клеток в момент их обработки Dox. Было показано, что изолированные кардиомиоциты накапливают в два раза меньше Dox, чем клетки H9c2 и SKOV-3, при этом проявляя наибольшую устойчивость. Кроме того Dox, как химиотерапевтический агент, обладает большей токсичностью в отношении опухолевых клеток (в данном случае – это опухолевые клетки SKOV-3) по сравнению с нормальными клетками, характеризующимися, как правило, низкой пролиферативной активностью.

В работе нами впервые было показано, что Dox вызывает почти двукратное, по сравнению с базальным уровнем, увеличение содержания PAR в клетках Н9с2. Этот эффект обнаруживается после 6-часового воздействия Dox и является временным, т.к. на меньших сроках (1 и 3 ч) и после 24 ч инкубации с Dox уровень PAR в клетках не превышает базальный. Наблюдаемое увеличение уровня PAR, видимо, связано с активацией клеточных PARP. Однако такое умеренное повышение уровня PAR не может быть следствием гиперактивации PARP, явления, наблюдаемого при развитии некоторых патологических ситуаций, например в области инфаркта при фокальной ишемии мозга, а также при действии различных генотоксических стимулов. Так, например, при обработке клеток Н9с2 1 мМ Н₂О₂ уровень PAR повышается примерно в 10-15 раз по сравнению с базальным и примерно в 5-7.5 раз - по сравнению с Dox-стимулированным. Следует также отметить, что после 6 ч инкубации клеток Н9с2 с Dox, когда происходит увеличение уровня PAR, содержание Dox в клетке достигает примерно половины от максимального, при этом отмечено повышение его количества в цитоплазме и появление в цитоплазме Dox-содержащих гранул.

Ингибитор PARP PJ34, как и ожидалось, подавлял Dox-стимулированное образование PAR, тогда как антиоксидант эмоксипин не оказывал влияния на уровень PAR. Кроме того, мы не выявили каких-либо различий в уровне активных форм кислорода между культурами H9c2, обработанными в течение 6 ч Dox, и контрольными культурами. Это позволило предположить, что активация PARP в клетках H9c2, вызываемая обработкой Dox, не связана с развитием окислительного стресса, сопровождаемого, как правило, увеличением уровня повреждений ДНК. В качестве возможных механизмов активации PARP можно выделить накопление двухцепочечных разрывов ДНК за счет

ингибирования топоизомеразы II, образование крестообразных структур ДНК, которые могут распознаваться PARP, а также посттрансляционные модификации PARP (фосфорилирование, ацетилирование, моно(АДФ-рибозил)ирование и др.), способные вызвать их активацию [99].

Для выяснения вовлеченности PARP, а также активных форм кислорода и азота в механизмы кардиотоксичности Dox мы оценили влияние антиоксидантов, ингибиторов PARP и iNOS на выживаемость клеток H9c2 и изолированных кардиомиоцитов крысы при инкубации с Dox. Было обнаружено, что антиоксиданты (эмоксипин, *N*-ацетилцистеин - NAC) и ингибитор iNOS (аминогуанидин - AG) либо не оказывали защитного действия, либо оно оказывалось незначительным, в то время как ингибиторы PARP (3-AB, PJ34, 5-AIQ, BYK204165) существенно снижали гибель кардиомиоцитов, в особенности клеток H9c2, вызываемую цитотоксическим действием Dox. Среди всех протестированных ингибиторов PARP 5-AIQ оказывал максимальное протекторное действие: он способствовал увеличению выживаемости клеток H9c2 в 2.6 раза по сравнению с образцами, обработанными только Dox, при этом доля живых клеток возрастала с 23% до 58%. Полученные результаты позволяют заключить, что гибель кардиомиоцитов при действии Dox связана с активацией PARP, а не с развитием окислительного стресса.

С помощью щелочного варианта метода ДНК-комет было показано, что уже через 6 ч инкубации клеток Н9с2 с Dox обнаруживаются заметные повреждения ДНК. Поскольку эмоксипин в этих условиях не уменьшает степень повреждения ДНК, то, следовательно, их образование не вызвано накоплением в клетке активных форм кислорода и азота. После 24-часовой обработки клеток Dox степень повреждения ДНК сильно возрастает по сравнению с 6-часовой инкубацией. В отличие от эмоксипина, РЈ34 оказывает защитное действие, снижая уровень повреждения ДНК; этот эффект наиболее выражен после 24-часового воздействия Dox. Полученные результаты позволили сделать заключение, что выявляемые методом ДНК-комет повреждения ДНК после 6- и 24часовой инкубации клеток с Dox в значительной степени являются результатом реализации программы PARP-опосредованной гибели клетки, терминальной стадией которой является фрагментация ДНК нуклеазами. РJ34 подавляет PARP-опосредованную гибель клеток, и, следовательно, предотвращает фрагментацию ДНК, что выражается в уменьшении размеров ДНК-комет. Предположительно, в кардиомиоцитах воздействии Dox запускается гибель клеток по пути партанатоза. Эта программа клеточной гибели характеризуется двумя «маркерными» признаками: транслокацией AIF

из митохондрий в ядро и образованием высокомолекулярных (около 50 000 п.о.) фрагментов ДНК.

Мы оценили клеточное распределение AIF в контрольных культурах H9c2 и обработанных 6 или 24 ч Dox. Было обнаружено, что внутриядерное содержание AIF в клетках, инкубированных с Dox, выше, чем в контроле; т.е. при воздействии Dox происходит транслокация AIF в ядра клеток. PJ34, как и ожидалось, значительно снижает Dox-стимулированное внутриядерное накопление AIF.

Анализ целостности ДНК методом электрофореза в агарозном геле показал фрагментацию ДНК после 24 и 48 ч воздействия Dox, при этом характерные для каспаза-зависимого апоптоза «маркерные» фрагменты ДНК, кратные 200 п.о. (образуются при межнуклеосомной фрагментации ДНК), не выявляются.

Таким образом, данные по анализу фрагментов ДНК и клеточного распределения АІF доказывают, что гибель части клеток Н9с2 при воздействии Dox, протекает по механизму партанатоза - по каспаза-независимому пути, реализуемому через активацию PARP. Следует также отметить, что если бы гибель кардиомиоцитов осуществлялась по пути каспаза-зависимого апоптоза, происходило бы расщепление PARP-1 (характерный признак и маркер каспаза-зависимого апоптоза), и в этом случае ингибиторы PARP не оказывали бы никакого влияния на выживаемость клеток.

На основании всех полученных результатов мы предлагаем новый механизм кардиотоксичности Dox. Временное повышение уровня PAR (6 ч), уменьшение степени повреждения ДНК и предотвращение внутриядерного накопления AIF при ингибировании PARP (6 и 24 ч), а также кардиопротекторное действие ингибиторов PARP (48 ч), наблюдаемые в культурах клеток H9c2 при инкубации с Dox, являются взаимосвязанными событиями. Dox стимулирует активацию PARP, образование PAR, транслокацию AIF из митохондрий в ядро и запуск каспаза-независимой гибели клеток по пути партанатоза, а ингибирование синтеза PAR частично предотвращает ее развитие (рис. 5.1). При этом гибель кардиомиоцитов при действии Dox, не обусловлена развитием окислительного стресса, т.к. антиоксиданты не оказывают защитного действия.

Однако PARP-опосредованная гибель кардиомиоцитов при действии Dox не является единственным реализуемым в данной модели механизмом гибели клеток, т.к. ингибиторы PARP не способны сохранить жизнеспособность всех клеток; ингибиторы увеличивают выживаемость в среднем в 1.5 раза. Согласно литературным данным защитное действие на кардиомиоциты при токсическом действии Dox оказывают ловушки пероксинитрита, ингибиторы р53 и др. [141, 148, 177, 217, 274], хотя следует отметить,

что эти эффекты были выявлены преимущественно в экспериментах на культурах недифференцированных клеток H9c2. Возможно, лучшая протекция может быть достигнута при комбинированном использовании ингибиторов PARP и соединений, подавляющих другие пути гибели кардиомиоцитов.

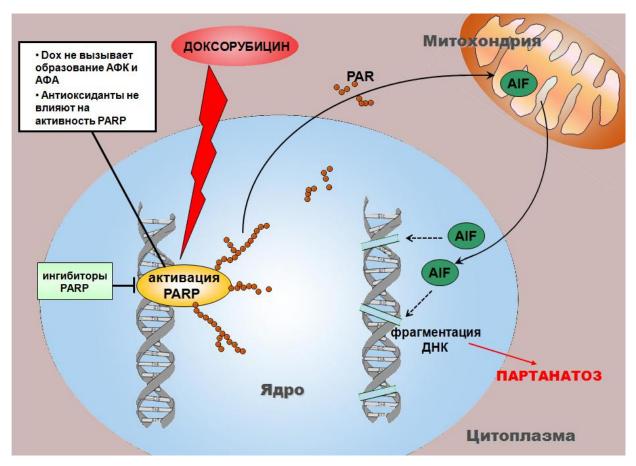


Рисунок 5.1. Предполагаемый механизм PARP-опосредованной гибели кардиомиоцитов при действии доксорубицина (Dox).

Очевидно, что использование ингибиторов PARP для снижения кардиотоксичности Dox может быть оправдано только в том случае, если эти ингибиторы не снижают противоопухолевое действие Dox. Для моделирования этого процесса мы исследовали подавление Dox роста культивируемых клеток опухоли яичника SKOV-3. Было показано, что внесение в среду культивирования ингибитора PARP (3-AB или 5-AIQ) никак не влияет на цитотоксические эффекты Dox в отношении опухолевых клеток данной линии.

Полученные нами результаты, наряду с некоторыми литературными данными [192, 193], позволяют предположить, что применение ингибиторов PARP в качестве кардиопротекторов при проведении химиотерапии Dox может быть весьма перспективным подходом в онкологии. К тому же в настоящее время некоторые новые ингибиторы PARP находятся на I и II стадиях клинических испытаний, как средства для

монотерапии или адъювантной терапии (в сочетании с алкилирующими агентами) злокачественных новообразований различного генеза (см. раздел 2.4).

С использованием клеточной тест-системы нами были исследованы PARPингибирующие свойства ряда новых синтетических дисахаридных и диальдегидных производных нуклеозидов. Было показано, что дисахаридные производные тимидина - 3'-О-β-D-рибофуранозил-2'-дезокситимидин (соединение 3) и его диальдегидный аналог (соединение 4), а также 3'-О-β-D-рибофуранозил-5-йод-2'-дезоксиуридин (соединение 2) концентрационно-зависимо ингибируют стимулированный H₂O₂ синтез PAR в клетках SKOV-3, хотя ингибиторный эффект этих соединений слабее того, которое оказывает Thd, использованный нами в качестве положительного контроля. Наиболее эффективными оказались соединения 2 и 4. Показано, что наличие дополнительного остатка рибозы в 3'положении приводит к снижению PARP-ингибирующего потенциала производных Thd, при этом соединение со вторым диальдегидным остатком рибозы (4) лучше, чем его восстановленный аналог (3) подавляет активацию PARP. Ингибирующая активность окисленного производного Urd (соединение 5) незначительна. Видимо. ингибирующая активность аналогов нуклеозидов определяется, главным образом, наличием заместителя в 5-положении. Все исследуемые соединения, за исключением 3, оказывают более сильное ингибирующее действие на синтез PAR после 1-часовой предынкубации с клетками, по сравнению с 24-часовой, что может быть обусловлено различной скоростью их транспорта в ядро или метаболизмом.

Было показано, что дисахаридные нуклеозиды с РАRР-ингибирующей активностью, соединения **3** и **4**, не влияют на противоопухолевое действие Dox и поразному влияют на его кардиотоксичность в экспериментах на клетках H9c2. Так, соединение **3** оказывает защитное действие при инкубации с Dox, увеличивая жизнеспособность клеток примерно на 15% по сравнению с образцами, инкубированными только с Dox, а его диальдегидное производное (соединение **4**) оказывает токсическое действие в отношении клеток H9c2, не влияя при этом на кардиотоксические эффекты Dox.

Исходя из полученных результатов, мы считаем возможным использование некоторых из исследованных нами синтетических аналогов нуклеозидов, обладающих PARP-ингибирующей активностью, в качестве основы для создания новых фармакологических веществ.

6. ВЫВОДЫ

- 1. Вызываемая токсическими дозами доксорубицина гибель культивируемых кардиомиоцитов крысы (дифференцированных в кардиомиоциты клеток Н9с2 и кардиомиоцитов, выделенных из новорожденных крыс) в значительной степени обусловлена активацией процесса поли(АДФ-рибозил)ирования белков. Ингибиторы поли(АДФ-рибоза)-полимераз увеличивают в 1.2 2.6 раза выживаемость кардиомиоцитов после цитотоксического воздействия доксорубицина, и при этом они не влияют на чувствительность культивируемых опухолевых клеток (показано на примере клеток опухоли яичника SKOV-3) к доксорубицину.
- 2. Обнаружено, что цитотоксическое действие доксорубицина на клетки Н9с2 сопровождается временным увеличением содержания поли(АДФ-рибозы), преимущественно в ядрах клеток. Через 6 ч инкубации клеток Н9с2 с доксорубицином происходит двукратное увеличение уровня поли(АДФ-рибозы) в ядрах. Наблюдаемое временное увеличение уровня поли(АДФ-рибозы) не обусловлено повышением концентрации активных форм кислорода в клетке (окислительным стрессом) и не предотвращается антиоксидантами.
- 3. Установлено, что цитотоксическое действие доксорубицина на клетки Н9с2 и изолированные кардиомиоциты крысы не обусловлено развитием окислительного или нитрозативного стрессов. Антиоксиданты и ингибитор индуцибельной NO-синтазы не предотвращают вызываемую токсическими дозами доксорубицина гибель клеток Н9с2 и изолированных кардиомиоцитов крысы. Антиоксиданты также не предотвращают доксорубицин-индуцированную фрагментацию ДНК в клетках Н9с2.
- 4. Вызываемая токсическими дозами доксорубицина гибель клеток Н9с2 протекает по механизму партанатоза и сопровождается транслокацией апоптоз-индуцирующего фактора из митохондрий в ядро, а также деградацией ДНК. Эти процессы частично предотвращаются ингибиторами поли(АДФ-рибоза)-полимераз.
- 5. Дисахаридные производные 2'-дезокситимидина и 5-йод-2'-дезоксиуридина оказывают ингибиторное действие на активность поли(АДФ-рибоза)-полимераз человека. Они способны проникать в интактные клетки, подавлять стимулированный ДНК-повреждающими агентами синтез поли(АДФ-рибозы) и оказывать цитопротекторное действие на клеточной модели кардиотоксичности доксорубицина.

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Богуш Т. А., Равчеева А. Б., Богуш Е. А., Игнатова Е. О., Дудко Е. А., Лактионов К. К., Полоцкий Б. Е., Давыдов М. И. Новый механизм регуляции внутриклеточного распределения противоопухолевых препаратов в клетках с фенотипом множественной лекарственной резистентности, ассоциированной с функцией ABC-транспортеров// Вестник РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН. 2008. 19(2). С. 4-14.
- 2. Ермолинский Б.С., Михайлов С.Н. Реакция периодатного окисления в химии нуклеотидных кислот. Диальдегидные производные нкулеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов// Биоорганическая химия. 2000. 26 (7). С. 483-504.
- 3. Ефимцева Е.В., Куликова И.В., Михайлов С.Н. Дисахаридные нуклеозиды важная группа природных соединений// Молекулярная биология. 2009. 43(2). С. 327-338.
- 4. Кутузов М.М. Взаимодействие поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 с ДНК-интермедиатами эксцизионной репарации оснований: Автореф.дис. канд. биол. наук. Новосибирск, 2013. 21 с.
- 5. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 480 с.
- 6. Матяш М.Г., Кравчук Т. Л., Высоцкая В.В., Чернов В.И., Гольдберг В.Е. Индуцированная антрациклинами кардиотоксичность: механизмы развития и клинические проявления// Сибирский онкологический журнал. 2008. 6. С. 66-75.
- 7. Резникова Е.А., Косенок В.К., Нечаева Г.И., Меркулов В.Н., Резников А.С. Влияние препарата реамберин на кардиотоксическое действие антрациклинов в лечении местнораспространенного рака молочной железы// Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии им. И.И.Мечникова. 2004. 4. С. 123-126.
- 8. Самура Б.Б. Повреждения миокарда, индуцированные антрациклинами. Диагностика и лечение// Украинский медицинский вестник. 2008. 12. С. 46-52.
- 9. Семенова А.И. Кардио- и нейротоксичность противоопухолевых препаратов (патогенез, клиника, профилактика, лечение)// Практическая онкология. 2009. 10(3). —C. 168-176
- 10. Сипров А.В. Оптимизация химиотерапии злокачественных новообразований некоторыми антиоксидантами производными 3-оксипиридина: Автореф. дис. доктора. мед. наук. Саранск, 2009. 38 с.
- 11. Собакарь М.С., Ших Е.В. Антиоксидантная терапия и метаболические подходы к лечению заболеваний сердечно сосудистой системы// Биомедицина. 2010. 3. C. 10-21
- 12. Суханова М.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. Поли(АДФ-рибозо)полимераза-1 регулятор белково-нуклеиновых взаимодействий в процессах, возникающих при генотоксическом воздействии// Молекулярная биология. 2004. т. 38. №5. С. 834-847.
- 13. Топорова Я.Г., Антонова Л.В., Мухамадияров Р.А., Богданов М.В., Головкин А.С. Сравнительное исследование кардиопротективного дозозависимого влияния эмоксипина в липосомальной и свободной формах на ишемизированный и

- реперфузируемый миокард на модели изолированного сердца крысы// Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. 2012. 1. С. 30-34.
- 14. Шиловский Г.А., Хохлов А.Н., Шрам С.И. Система поли(ADP-рибозил)ирования белков: роль в поддержании стабильности генома и детерминации продолжительности жизни// Биохимия. -2013.-78(5). С. 473-487.
- 15. Aihara Y., Kurabayashi M., Tanaka T., Takeda S.I., Tomaru K., Sekiguchi K.I., Ohyama Y., Nagai R. Doxorubicin represses CARP gene transcription through the generation of oxidative stress in neonatal rat cardiac myocytes: possible role of serine/threonine kinase- dependent pathways// J. Mol. Cell. Cardiol. 2000. 32. P. 1401–1414.
- 16. Alano C.C., Garnier P., Ying W., Higashi Y., Kauppinen T.M., Swanson R.A. NAD+depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death// J. Neurosci. 2010. 30(8). P. 2967-2978.
- 17. Ali M., Kamjoo M., Thomas H.D., Kyle S., Pavlovska I., Babur M., Telfer B.A, Curtin N.J., Williams K.J. The clinically active PARP inhibitor AG014699 ameliorates cardiotoxicity but does not enhance the efficacy of doxorubicin, despite improving tumor perfusion and radiation response in mice// Mol. Cancer Ther. 2011. 10(12). P. 2320-2329.
- 18. Allen D.D., Caviedes R., Cárdenas A.M., Shimahara T., Segura-Aguilar J., Caviedes P.A. Cell lines as in vitro models for drug screening and toxicity studies// Drug Dev. Ind. Pharm. 2005. 31(8). P. 757-768
- 19. Allinson S.L., Dianova I.I., Dianov G.L. Poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair: always engaged, but not essential for DNA damage processing// Acta Biochim. Pol. 2003. 50(1). P. 169-179.
- 20. Altmeyer M., Messner S., Hassa P.O., Fey M., Hottiger M.O. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites// Nucleic Acids Res. − 2009. Vol. 37. №11. -P. 3723–3738.
- 21. Ame J.-C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Höger T., Ménissier de Murcia J., de Murcia G. PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase// J. Biol. Chem. 1999. -274(25). P. 17860-17868.
- 22. Ame J.-C., Spenlehauer C., de Murcia G. The PARP superfamily// BioEssays.- 2004. 26. P. 882–893.
- 23. An J., Li P., Li J., Dietz R., Donath S. ARC is a critical cardiomyocyte survival switch in doxorubicin cardiotoxicity// J. Mol. Med. 2009. 87. P. 401–410.
- 24. Andrabi S.A., Kim N.S., Yu S.W., Wang H., Koh D.W., Sasaki M., Klaus J.A., Otsuka T., Zhang Z., Koehler R.C., Hurn P.D., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. Poly(ADPribose) (PAR) polymer is a death signal// Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. 103. P. 18308–18313.
- 25. Aredia F, Scovassi A.I. Poly(ADP-ribose): a signaling molecule in different paradigms of cell death// Biochem. Pharmacol. 2014. 92(1). P 157-163.
- 26. Aries A., Paradis P., Lefebvre C., Schwartz R.J., Nemer M. Essential role of GATA-4 in cell survival and drug-induced cardiotoxicity// Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2004. 101. P. 6975–6980.

- 27. Ariumi Y., Masutani M., Copeland T.D., Mimori T., Sugimura T., Shimotohno K., Ueda K., Hatanaka M., Noda M. Suppression of the poly (ADP-ribose) polymerase activity by DNA-dependent protein kinase in vitro// Oncogene. 1999. 18. 4616–4625.
- 28. Armstrong S.C. Anti-oxidants and apoptosis: attenuation of doxorubicin induced cardiomyopathy by carvedilol// J. Mol. Cell. Cardiol. 2004. 37. .- P. 817–821.
- 29. Ashworth A. A synthetic lethal therapeutic approach: poly(ADP) ribose polymerase inhibitors for the treatment of cancers deficient in DNA double-strand break repair// J. Clin. Oncol. 2008. 26(22). 3785-3790.
- 30. Banasik M., Komura H., Shimoyama M., Ueda K. Specific inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase and mono(ADP-ribosyl)transferase// J. Biol. Chem. 1992. 267. P. 1569-1575.
- 31. Banerjee S., Kaye S. PARP inhibitors in BRCA gene-mutated ovarian cancer and beyond// Curr. Oncol. Rep. 2011. 13. P. 442–449.
- 32. Baumann P., West S.C. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair// Trends Biochem. Sci. 1998. -23. P. 247–251.
- 33. Beckert S., Farrahi F., Perveen Ghani Q., Aslam R., Scheuenstuhl H., Coerper S., Konigsrainer A., Hunt T.K., Hussain M.Z. IGF-I-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase// Biochem. Biophys. Res. Commun. 2006. 341. P. 67–72.
- 34. Bedikian A.Y., Papadopoulos N.E., Kim K.B., Hwu W.J., Homsi J., Glass M.R., Cain S., Rudewicz P., Vernillet L., Hwu P. A phase IB trial of intravenous INO-1001 plus oral temozolomide in subjects with unresectable stage-III or IV melanoma// Cancer Invest. 2009. 27(7). P. 756-763.
- 35. Bernhard D., Laufer G. The aging cardiomyocyte: a mini-review// Gerontology. 2008. 54. P. 24–31.
- 36. Bhatnagar A. Contribution of ATP to oxidative stress-induced changes in action potential of isolated cardiac myocytes// Am. J. Physiol. 1997. 272. P. 598-608.
- 37. Bohr V.A. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells// Free Radic. Biol. Med. 2002. 32. P. 804–812.
- 38. Boorstein R.J., Pardee A.B. 3-Aminobenzamide is lethal to MMS-damaged human fibroblasts primarily during S phase// J. Cell. Physiol. 1984. 120(3). P. 345-353.
- 39. Bouchard V.J., Rouleau M., Poirier G.G. PARP-1, a determinant of cell survival in response to DNA damage// Exp. Hematol. 2003. 31. P. 446–454.
- 40. Bowes J., McDonald M.C., Piper J., Thiemermann C. Inhibitors of poly (ADP-ribose) synthetase protect rat cardiomyocytes against oxidant stress// Cardiovasc. Res. 1999. 41(1). P. 126-134.
- 41. Bowes J., Ruetten H., Martorana P.A., Stockhausen H., Thiemermann C. Reduction of myocardial reperfusion injury by an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase in the pig// Eur. J. Pharmacol. 1998. 359(2-3). P. 143-150.

- 42. Bowes J., Thiemermann C. Effects of inhibitors of the activity of poly (ADP-ribose) synthetase on the liver injury caused by ischaemia-reperfusion: a comparison with radical scavengers// Br. J. Pharmacol. 1998. 124(6). P. 1254-1260.
- 43. Bowman K.J., Newell D.R., Calvert A.H., Curtin N.J. Differential effects of the poly (ADPribose) polymerase (PARP) inhibitor NU1025 on topoisomerase I and II inhibitor cytotoxicity in L1210 cells in vitro// Brit. J. Cancer. 2001. 84(1). P. 106-112.
- 44. Branco A.F., Sampaio S.F., Moreira A.C., Holy J., Wallace K.B., Baldeiras I., Oliveira P.J., Sardao V.A. Differentiation-dependent doxorubicin toxicity on H9c2 cardiomyoblasts// Cardiovasc. Toxicol. 2012. 12(4). P. 326-340.
- 45. Bryant H.E., Schultz N., Thomas H.D., Parker K.M., Flower D., Lopez E., Kyle S., Meuth M., Curtin N.J., Helleday T. Specific killing of BRCA2- deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase// Nature. 2005. 434. P. 913–917.
- 46. Buki K.G., Bauer P.I., Mendeleyev J., Hakam A., Kun E. Destabilization of Zn²⁺ coordination in ADP-ribose transferase (polymerizing) by 6-nitroso-1,2-benzopyrone coincidental with inactivation of the polymerase but not the DNA binding function// FEBS Lett. 1991. 290(1-2). P. 181-185.
- 47. Burgman P., Konings A.W. Effect of inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase on the radiation response of HeLa S3 cells// Radiat. Res. 1989. 119(2). P. 380-386.
- 48. Burkle A. PARP-1: A regulator of genomic stability linked with mammalian longevity// Chembiochem. 2001. 2. P. 725–728.
- 49. Burkle A. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD+//FEBS Journal. 2005. 272. P. 4576–4589.
- 50. Caestecker K.W., Van de Walle G.R. The role of BRCA1 in DNA double-strand repair: past and present// Exp. Cell. Res. 2013. 319(5). P. 575-587.
- Barton S., Calvert A.H., 51. Calabrese C.R., Almassy R., Batey M.A., Canan-Koch S., Durkacz B.W., Hostomsky Z., Kumpf R.A., Kyle S., Li J., Maegley K., Newell D.R., Skalitzky D., Stratford I.J., Thomas H.D., Notarianni E., Wang L.Z., Webber S.E., Williams K.J., Curtin N.J. Anticancer chemosensitization and radiosensitization by the novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor AG14361// J. Natl. Cancer Inst. -2004. - 96(1). -P. 56-67.
- 52. Calabrese C.R., Batey M.A., Thomas H.D., Durkacz B.W., Wang L.Z., Kyle S., Skalitzky D., Li J., Zhang C., Boritzki T., Maegley K., Calvert A.H., Hostomsky Z., Newell D.R., Curtin N.J. Identification of potent nontoxic poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitors: chemopotentiation and pharmacological studies// Clin. Cancer Res. 2003. 9(7). P. 2711-2718.
- 53. Cepeda V., Fuertes M.A., Castilla J., Alonso C., Quevedo C., Soto M., Pérez J.M. Poly(ADPribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors in cancer chemotherapy// Recent Pat. Anticancer Drug Discov. 2006. 1(1). P. 39-53.
- 54. Chalmers A.J. The potential role and application of PARP inhibitors in cancer treatment// Br. Med. Bull. 2009. 89. P. 23-40.

- 55. Chambon P., Weil J. D., Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme// Biochem. Biophys. Res. Commun. 1963. 11.- P. 39-43.
- 56. Cheng H., Zhang Z., Borczuk A., Powell C.A., Balajee A.S., Lieberman H.B., Halmos B. PARP inhibition selectively increases sensitivity to cisplatin in ERCC1-low non-small cell lung cancer cells// Carcinogenesis. 2013. 34(4). P. 739-749.
- 57. Cheung E.C., Joza N., Steenaart N.A., McClellan K.A., Neuspiel M., McNamara S., MacLaurin J.G., Rippstein P., Park D.S., Shore G.C., McBride H.M., Penninger J.M., Slack R.S. Dissociating the dual roles of apoptosis-inducing factor in maintaining mitochondrial structure and apoptosis// EMBO J. 2006. 25. P. 4061–4073.
- 58. Chiang S.K., Lam T.T. Post-treatment at 12 or 18 hours with 3-aminobenzamide ameliorates retinal ischemia-reperfusion damage// Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2000. 41(10). 3210-3214.
- 59. Childs A.C., Phaneuf S.L., Dirks A.J., Phillips T., Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo causes cytochrome c release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2:Bax ratio// Cancer Res. 2002. 62. P. 4592–4598.
- 60. Clark J.B., Ferris J.M., Pinder S. Inhibition of nuclear NAD nucleosidase and poly ADP-ribose polymerase activity from rat liver by nicotinamide and 5'-methyl nicotinamide//Biochem. Biophys. Acta. 1971. 238(1). P. 82-85.
- 61. Cole M.P., Chaiswing L., Oberley T.D., Edelmann S.E., Piascik M.T., Lin S.M., Kiningham K.K., St. Clair D.K. The protective roles of nitric oxide and superoxide dismutase in adriamycin-induced cardiotoxicity// Cardiovasc. Res. 2006. 69. P. 186–197.
- 62. Conklin K.A. Cancer chemotherapy and antioxidants// J. Nutr. 2004. 134. P. 3201S–3204S.
- 63. Curtin N.J. PARP inhibitors for cancer therapy// Expert Rev. Mol. Med. 2005. 7(4). P. 1-20.
- 64. Curtin N.J., Szabo C. Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond// Mol. Aspects Med. 2013. 34(6). P. 1217-1256.
- 65. Cuzzocrea S., Zingarelli B., Costantino G., Szabo A., Salzman A.L., Caputi A.P., Szabo C. Beneficial effects of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase in a rat model of splanchnic artery occlusion and reperfusion// Br. J. Pharmacol. 1997. 121(6). 1065-1074.
- 66. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions// Biochem. J. 1999. 342. P. 249-268.
- 67. Dantzer F, Giraud-Panis MJ, Jaco I, Amé JC, Schultz I, Blasco M, Koering CE, Gilson E, Ménissier-de Murcia J, de Murcia G, Schreiber V. Functional interaction between poly(ADP-Ribose) polymerase 2 (PARP-2) and TRF2: PARP activity negatively regulates TRF2// Mol Cell Biol. 2004 Feb;24(4):1595-607.
- 68. Daugas E., Nochy D., Ravagnan L., Loeffler M., Susin S.A., Zamzami N., Kroemer G. Apoptosis inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis// FEBS Lett. 2000. 476. P. 118-123.

- 69. Daugherty J.P., Simpson T.A.Jr., Mullins D.W.Jr. Effect of hyperthermia and doxorubicin on nucleoid sedimentation and poly (ADP-ribose) polymerase activity in L1210 cells// Cancer Chemother. Pharmacol. 1988. 21(3). P. 229-232.
- 70. Davidovic L., Vodenicharov M., Affar E.B., Poirier G.G. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism// Exp. Cell Res.- 2001. 268. P. 7–13.
- 71. De Murcia J.M., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Amé J.C., Dierich A., LeMeur M., Sabatier L., Chambon P., de Murcia G. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse// EMBO J. 2003. 22. P. 2255–2263.
- 72. Decker P., Muller S. Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress// Curr. Pharm. Biotechnol. 2002. 3. P. 275–283.
- 73. Dedes K.J., Wilkerson P.M., Wetterskog D., Weigelt B., Ashworth A., Reis-Filho J.S. Synthetic lethality of PARP inhibition in cancers lacking BRCA1 and BRCA2 mutations// Cell Cycle. 2011. 10. P. 1192–1199.
- 74. Delaney C.A., Wang L-Z., Kyle S., White A.W., Calvert A.H., Curtin N.J., Durkacz B.W., Hostomsky Z., Newell D.R. Potentiation of temozolomide and topotecan growth inhibition and cytotoxicity by novel poly(adenosine diphosphoribose) polymerase inhibitors in a panel of human tumor cell lines// Clin. Cancer Res. 2000. 6. P. 2860–2867.
- 75. Demple B., Herman T., Chem D.S. Cloning and expression of APE1, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. 88. P. 11450–11454.
- 76. Diefenbach J., Burkle A. Introduction to poly(ADP-ribose) metabolism// Cell. Mol. Life Sci. 2005. -62. -P. 721–730.
- 77. Dolle C., Niere M., Lohndal E., Ziegler M. Visualization of subcellular NAD+ pools and intra-organellar protein localization by poly-ADP-ribose formation// Cell Mol. Life Sci. 2010. 67. P. 433-443.
- 78. Donawho C.K., Luo Y., Penning T.D., Bauch J.L., Bouska J.J., Bontcheva-Diaz V.D., Cox B.F., DeWeese T.L., Dillehay L.E., Ferguson D.C., Ghoreishi-Haack N.S., Grimm D.R., Guan R., Han E.K., Holley-Shanks R.R., Hristov B., Idler K.B., Jarvis K., Johnson E.F., Kleinberg L.R., Klinghofer V., Lasko L.M., Liu X., Marsh K.C., McGonigal T.P., Meulbroek J.A., Olson A.M., Palma J.P., Rodriguez L.E., Shi Y., Stavropoulos J.A., Tsurutani A.C., Zhu G.D., Rosenberg S.H., Giranda V.L., Frost D.J. ABT-888, an orally active poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor that potentiates DNA-damaging agents in preclinical tumor models// Clin. Cancer Res. 2007. 13. P. 2728–2737.
- 79. Doroshow J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart// Cancer Res. 1983. 43(2). P. 460-472.
- 80. Downs J.A., Jackson S.P. A means to a DNA end: the many roles of Ku// Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2004. 5. P. 367-378
- 81. Dragojevic-Simic V., Dobric S., Jacevic V., Bokonjic D., Milosavljevic I., Kovacevic A., Mikic D. Efficacy of amifostine in protection against doxorubicin-induced acute cardiotoxic effects in rats// Vojnosanit Pregl. 2013. 70 (1). P. 38-45.

- 82. Dungey F.A., Loser D.A., Chalmers A.J. Replication dependent radiosensitization of human glioma cells by inhibition of poly(ADP-Ribose) polymerase: mechanisms and therapeutic potential// Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2008. 72. P. 1188–1197.
- 83. Durkacz B.W., Irwin J., Shall S. Inhibition of (ADP-ribose)n biosynthesis retards DNA repair but does not inhibit DNA repair synthesis// Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981. 101. P. 1433–1441.
- 84. Edinger A.L., Thompson C.B. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy// Curr. Opin. Cell Biol. 2004. 16. P. 663–669.
- 85. El-Khamisy S.F., Masutani M., Suzuki H., Caldecott K.W. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage// Nucl. Acids Res. 2003.- 31. P. 5526–5533.
- 86. Eltze T., Boer R., Wagner T., Weinbrenner S., McDonald M.C., Thiemermann C., Bürkle A., Klein T. Imidazoquinolinone, imidazopyridine, and isoquinolindione derivatives as novel and potent inhibitors of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP): a comparison with standard PARP inhibitors// Mol. Pharmacol. 2008. 74(6). P. 1587-1598.
- 87. Faderl S., Gandhi V., Kantarjian H.M. Potential role of novel nucleoside analogs in the treatment of acute myeloid leukemia// Curr. Opin. Hematol. 2008. 15(2). P. 101-107.
- 88. Farmer H., McCabe N., Lord C.J., Tutt A.N., Johnson D.A., Richardson T.B., Santarosa M., Dillon K.J., Hickson I., Knights C., Martin N.M., Jackson S.P., Smith G.C., Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy// Nature. 2005. 434(7035). P. 917-921.
- 89. Fatokun A.A., Dawson V.L., Dawson T.M. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities// Br. J. Pharmacol. 2014. 171. P. 2000-2016.
- 90. Fiorillo C., Ponziani V., Giannini L., Cecchi C., Celli A., Nassi N., Lanzilao L., Caporale R., Nassi P. Protective effects of the PARP-1 inhibitor PJ34 in hypoxic-reoxygenated cardiomyoblasts// Cell. Mol. Life Sci. 2006. 63. P. 3061–3071.
- 91. Fong P.C., Boss D.S., Carden C.P., Roelvink M., De Greve J., Gourley C. M., Carmichael J., De Bono J. S., Schellens J. H., Kaye S. B. AZD2281 (KU-0059436), a PARP (poly ADPribose polymerase) inhibitor with single agent anticancer activity in patients with BRCA deficient ovarian cancer: results from a phase I study// J. Clin. Oncol. 2008. 26. 5510.
- 92. Galmarini C.M., Mackey J.R., Dumontet C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment// Lancet Oncol. 2002. 3. P. 415-424.
- 93. Gewirtz D.A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin// Biochem. Pharmacol. 1999. 57. P. 727–741.
- 94. Ghodgaonkar M.M., Zacal N., Kassam S., Rainbow A.J., Shah G.M. Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase-1 reduces host cell reactivation of a UV-damaged adenovirus-encoded reporter gene in human dermal fibroblasts// DNA Repair (Amst). 2008. 7(4). P. 617-632.
- 95. Godon C., Cordelieres F.P., Biard D., Giocanti N., Megnin-Chanet F., Hall J., Favaudon V. PARP inhibition versus PARP-1 silencing: different outcomes in terms of single-strand break repair and radiation susceptibility// Nucleic Acids Res. 2008. 36. P. 4454–4464.

- 96. Greene R.F., Collins J.M., Jenkins J.F., Speyer J.L., Myers C.E. Plasma pharmacokinetics of adriamycin and adriamycinol: implications for the design of in vitro experiments and treatment protocols// Cancer Res. 1983. 43(7). P. 3417-3421.
- 97. Hassa P.O., Haenni S.S., Buerki C., Meier N.I., Lane W.S., Owen H., Gersbach M., Imhof R., Hottiger M.O. Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kB-dependent transcription// J. Biol. Chem. 2005. 280. P. 40450–40464.
- 98. Hassa P.O., Haenni S.S., Elser M., Hottiger M.O. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?// Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2006 70 (3). P. 789-829.
- 99. Hegedus C., Virag L. Inputs and outputs of poly(ADP-ribosyl)ation: relevance to oxidative stress// Redox Biol. 2014. 21(2C). P. 978-982.
- 100. Helleday T., Bryant H.E., Schultz N. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) in homologous recombination and as a target for cancer therapy// Cell Cycle. 2005. 4(9). P. 1176-1178.
- 101. Hescheler J., Meyer R., Plant S., Krautwurst D., Rosenthal W., Schultz G. Morphological, biochemical, and electrophysiological characterization of a clonal cell (H9c2) line from rat heart// Circ. Res. 1991. 69(6). P. 1476-1486.
- 102. Hochegger H., Dejsuphong D., Fukushima T., Morrison C., Sonoda E., Schreiber V., Zhao G.Y., Saberi A., Masutani M., Adachi N., Koyama H., de Murcia G., Takeda S. Parp-1 protects homologous recombination from interference by Ku and Ligase IV in vertebrate cells// EMBO J. 2006. 25(6). P. 1305-1314.
- 103. Hoeijmakers J.H. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer// Nature 2001. 411. P. 366–374.
- 104. Hottiger M.O., Hassa P.O., Lüscher B., Schüler H., Koch-Nolte F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases// Trends Biochem. Sci. 2010 35(4) P. 208-219.
- 105. Huehls A.M., Wagner J.M., Huntoon C.J., Geng L., Erlichman C., Patel A.G., Kaufmann S.H., Karnitz L.M. Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition synergizes with 5-fluorodeoxyuridine but not 5-fluorouracil in ovarian cancer cells// Cancer Res. 2011. 71. P. 4944-4954.
- 106. Ignatius A., Hund M., Tempel K. Poly(ADP-ribose)polymerase-activity of chicken embryo cells exposed to nucleotoxic agents// Toxicology. 1992. 76(2). P. 187-196.
- 107. Ikegami E., Fukazawa R., Kanbe M., Watanabe M., Abe M., Watanabe M., Kamisago M., Hajikano M., Katsube Y., Ogawa S. Edaravone, a potent free radical scavenger, prevents anthracycline-induced myocardial cell death// Circ. J. 2007. 71. P. 1815 1820.
- 108. Isabelle M., Moreel X., Gagné J.P., Rouleau M., Ethier C., Gagné P., Hendzel M.J., Poirier G.G. Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry// Proteome Sci. 2010. 8. P. 22.
- 109. Isakoff S.J., Overmoyer B., Tung N.M., Gelman R.S., Giranda V.L., Bernhard K.M., Habin K.R., Ellisen L.W., Winer E. P. Goss P.E. A phase II trial of the PARP inhibitor veliparib (ABT888) and temozolomide for metastatic breast cancer// J. Clin. Oncol. 2010. 28 (15). 1019.

- 110. Iwashita A., Tojo N., Matsuura S., Yamazaki S., Kamijo K., Ishida J., Yamamoto H., Hattori K., Matsuoka N., Mutoh S. A novel and potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor, FR247304 (5-chloro-2-[3-(4-phenyl-3,6-dihydro-1(2H)-pyridinyl)propyl]-4(3H)-quinazolinone), attenuates neuronal damage in in vitro and in vivo models of cerebral ischemia// J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004. 310(2). P. 425-436.
- 111. Jacobson S.L., Piper H.M. Cell cultures of adult cardiomyocytes as models of the myocardium// J. Mol. Cell. Cardiol. 1986. 18(7). P. 661-678.
- 112. Jang Y.M., Kendaiah S., Drew B., Phillips T., Selman C., Julian D., Leeuwenburgh C. Doxorubicin treatment in vivo activates caspase-12 mediated cardiac apoptosis in both male and female rats// FEBS Lett. 2004. 577. P. 483–490.
- 113. Jouan-Lanhouet S., Arshad M.I., Piquet-Pellorce C., Martin-Chouly C., Le Moigne-Muller G., Van Herreweghe F., Takahashi N., Sergent O., Lagadic-Gossmann D., Vandenabeele P., Samson M., Dimanche-Boitrel M.T. TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation// Cell Death Differ. 2012. 19. P. 2003-2014.
- 114. Kalivendi S.V., Konorev E.A., Cunningham S., Vanamala S.K., Kaji E.H., Joseph J., Kalyanaraman B. Doxorubicin activates nuclear factor of activated T- lymphocytes and Fas ligand transcription: role of mitochondrial reactive oxygen species and calcium// Biochem. J. 2005. 389. P. 527–539.
- 115. Kanai M., Tong W.M., Sugihara E., Wang Z.Q., Fukasawa K., Miwa M. Involvement of poly(ADP-Ribose)polymerase 1 and poly(ADP-Ribosyl)ation in regulation of centrosome function// Mol. Cell. Biol. 2003. 23. 2451–2462.
- 116. Kaplan J., O'Connor M., Hake P.W., Zingarelli B. Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase ameliorate myocardial reperfusion injury by modulation of activator protein-1 and neutrophil infiltration// Shock. 2005. 23. P. 233–238.
- 117. Khan O.A., Gore M., Lorigan P., Stone J., Greystoke A., Burke W., Carmichael J., Watson A.J., McGown G., Thorncroft M., Margison G.P., Califano R., Larkin J., Wellman S., Middleton M.R. A phase I study of the safety and tolerability of olaparib (AZD2281, KU0059436) and dacarbazine in patients with advanced solid tumours// Br. J. Cancer. 2011. 104. P. 750–755.
- 118. Khan T.A., Ruel M., Bianchi C., Voisine P., Komjati K., Szabo C., Sellke F.W. Poly(ADPribose) polymerase inhibition improves postischemic myocardial function after cardioplegia-cardiopulmonary bypass// J. Am. Coll. Surg. 2003. 197. P. 270–277.
- 119. Khanna K.K., Jackson S.P. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection// Nature Genet. 2001. 27. P. 247-254.
- 120. Kik K, Studzian K., Wasowska-Łukawska M., Oszczapowicz I., Szmigiero L. Cytotoxicity and inhibitory properties against topoisomerase II of doxorubicin and its formamidine derivatives// Acta Biochim Pol. 2009.- 56(1). P. 135-142.
- 121. Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD+ into a nuclear signal// Genes Dev. 2005. 19(17). P. 1951-1967.
- 122. Kim S.Y., Kim S.J., Kim B.J., Rah S.Y., Chung S.M., Im M.J., Kim U.H. Doxorubicin-induced reactive oxygen species generation and intracellular Ca2+ increase are reciprocally modulated in rat cardiomyocytes// Exp. Mol. Med. 2006. 38. P. 535–545.

- 123. Kim Y., Ma A.G., Kitta K., Fitch S.N., Ikeda T., Ihara Y., Simon A.R., Evans T., Suzuki Y.J. Anthracycline-induced suppression of GATA-4 transcription factor: implication in the regulation of cardiac myocyte apoptosis// Mol. Pharmacol. 2003. 63. P. 368–377.
- 124. Kimes B.W., Brandt B.L. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart// Exp. Cell. Res. 1976. 98(2). P. 367-381.
- 125. King B.S., Cooper K.L., Liu K.J., Hudson L.G. Poly(ADP-ribose) contributes to an association between poly(ADP-ribose) polymerase-1 and xerodermapigmentosum complementation group A in nucleotide excision repair// J. Biol. Chem. 2012. 287(47). P. 39824-36833.
- 126. Kiyomiya K., Matsuo S., Kurebe M. Mechanism of specific nuclear transport of adriamycin: the mode of nuclear translocation of adriamycin-proteasome complex// Cancer Res. 2001. 61. P. 2467–2471.
- 127. Koczor C.A., Torres R.A., Lewis W. The role of transporters in the toxicity of nucleoside and nucleotide analogs// Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. 2012. 8(6). P. 665-676.
- 128. Konorev E.A., Vanamala S., Kalyanaraman B. Differences in doxorubicin-induced apoptotic signaling in adult and immature cardiomyocytes// Free Radic. Biol. Med. 2008. 45. P. 1723–1728.
- 129. Kotova E., Lodhi N., Jarnik M., Pinnola A., Ji Y., Tulin A.V. Drosophila histone H2A variant (H2Av) controls poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) activation in chromatin// PNAS 2011. 108. P. 6205–6210.
- 130. Kratz F., Ehling G., Kauffmann H.M., Unger C. Acute and repeat-dose toxicity studies of the (6- maleimidocaproyl)hydrazone derivative of doxorubicin (DOXO-EMCH), an albumin-binding prodrug of the anticancer agent doxorubicin// Hum. Exp. Toxicol. 2007. 26. P. 19–35.
- 131. Krietsch J., Rouleau M., Pic É., Ethier C., Dawson T.M., Dawson V.L., Masson J.Y., Poirier G.G., Gagné J.P. Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins// Mol. Aspects Med. 2013. 34(6). P. 1066-1087.
- 132. Ku P.M., Chen L.J., Liang J.R., Cheng K.C., Li Y.X., Cheng J.T. Molecular role of GATA binding protein 4 (GATA-4) in hyperglycemia-induced reduction of cardiac contractility// Cardiovasc. Diabetol. 2011. 10(57). P. 15
- 133. Kummar S., Chen A., Ji J., Zhang Y., Reid J.M., Ames M., Jia L., Weil M., Speranza G., Murgo A.J., Kinders R., Wang L., Parchment R.E., Carter J., Stotler H., Rubinstein L., Hollingshead M., Melillo G., Pommier Y., Bonner W., Tomaszewski J.E., Doroshow J.H. Phase I study of PARP inhibitor ABT-888 in combination with topotecan in adults with refractory solid tumors and lymphomas// Cancer Res. 2011. 71(17). P. 5626-5634.
- 134. Kutuzov M.M., Ame J.-C., Khodyreva S.N., Schreiber V., Lavrik O.I. Interaction of PARP2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates// Biopolymers and cells. 2011. 27. P. 383-386.
- 135. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Amé J.-C., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Schreiber V., Lavrik O.I. Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins// Biochimie. 2013. 95(6) P. 1208-1215.

- 136. Kuznetsov A.V., Javadov S., Sickinger S, Frotschnig S., Grimm M. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation// Biochim. Biophys. Acta.- 2015. 1853(2). P. 276-284.
- 137. Lastra C.A., Villegas I., Sánchez-Fidalgo S. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors: new pharmacological functions and potential clinical implications// Curr. Pharm. Des. 2007. 13. P. 933-962.
- 138. Lautier D., Lagueux J., Thibodeau J., Ménard L., Poirier G.G. Molecular and biochemical features of poly (ADP-ribose) metabolism// Mol. Cell Biochem. -1993. 122. P. 171-193.
- 139. Lebrecht D., Geist A., Ketelsen U.P., Haberstroh J., Setzer B., Walker U.A. Dexrazoxane prevents doxorubicin-induced long-term cardiotoxicity and protects myocardial mitochondria from genetic and functional lesions in rats// Br. J. Pharmacol. 2007. 151. –P. 771–778.
- 140. Lebrecht D., Walker U.A. Role of mtDNA lesions in anthracycline cardiotoxicity// Cardiovasc. Toxicol. 2007. 7. –P. 108–113.
- 141. L'Ecuyer T., Sanjeev S., Thomas R., Novak R., Das L., Campbell W., Heide R.V. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death// Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2006. 291. P. H1273-H1280.
- 142. Levine B., Sinha S., Kroemer G. Bcl-2 family members: dual regulators of apoptosis and autophagy// Autophagy. 2008. 4. –P. 600–606.
- 143. Li K., Sung R.Y., Huang W.Z., Yang M., Pong N.H., Lee S.M., Chan W.Y., Zhao H., To M.Y., Fok T.F., Li C.K., Wong Y.O., Ng P.C. . Thrombopoietin protects against in vitro and in vivo cardiotoxicity induced by doxorubicin// Circulation. 2006. 113. P. 2211–2220.
- 144. Liaudet L., Szabo E., Timashpolsky L., Virag L., Cziraki A., Szabo C. Suppression of poly (ADP-ribose) polymerase activation by 3-aminobenzamide in a rat model of myocardial infarction: long-term morphological and functional consequences// Br. J. Pharmacol. 2001. 133(8). P. 1424-1430.
- 145. Liekens S., Bronckaers A., Balzarini J. Improvement of purine and pyrimidine antimetabolite-based anticancer treatment by selective suppression of mycoplasma-encoded catabolic enzymes// Lancet Oncol. 2009. 10. P. 628–635.
- 146. Lim C.C., Zuppinger C., Guo X., Kuster G.M., Helmes M., Eppenberger H.M., Suter T.M., Liao R., Sawyer D.B. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes// J. Biol. Chem. 2004. 279. P. 8290–8299.
- 147. Lipshultz S.E., T.R., Franco V.I., Miller T.L. Treatment-related cardiotoxicity in survivors of childhood cancer// Nat. Rev. Clin. Oncol. 2013. 10(12). P. 697-710.
- 148. Liu X., Chua C.C., Gao J., Chen Z., Landy C.L., Hamdy R., Chua B.H. Pifithrin-α protects against doxorubicin-induced apoptosis and acute cardiotoxicity in mice// Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2004. 286. P. H933–H939.
- 149. Luo X., Kraus W.L. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1// Genes Dev. 2012. 26(5). P. 417-432.
- 150. Lupo B., Trusolino L. Inhibition of poly(ADP-ribosyl)ation in cancer: old and new paradigms revisited// Biochim. Biophys. Acta. 2014. 1846 (1). P. 201-215.

- 151. Machado V., Cabral A., Monteiro P., Gonçalves L., Providencia L.A. Carvedilol as a protector against the cardiotoxicity induced by anthracyclines (doxorubicin)// Rev. Port. Cardiol. 2008. 27. P. 1277–1296.
- 152. Madden S.D., Donovan M., Cotter T.G. Key apoptosis regulating proteins are down-regulated during postnatal tissue development// Int. J. Dev. Biol. 2007. 51. P. 415–423.
- 153. Maejima Y., Adachi S., Ito H., Hirao K., Isobe M. Induction of premature senescence in cardiomyocytes by doxorubicin as a novel mechanism of myocardial damage// Aging Cell. 2008. 7. P. 125–136.
- 154. Magan N., Isaacs R.J., Stowell K.M. Treatment with the PARP-inhibitor PJ34 causes enhanced doxorubicin-mediated cell death in HeLa cells// AntiCancer Drugs. 2012.- 23.- P. 627–637.
- 155. Maiuri M.C., Zalckvar E., Kimchi A., Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis// Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2007. 8. P. 741–752.
- 156. Malanga M., Pleschke J.M., Kleczkowska H.E., Althaus F.R. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions// J. Biol. Chem. 1998. 273. P. 11839–11843.
- 157. Mao Z., Hine C., Tian X., Van Meter M., Au M., Vaidya A., Seluanov A., Gorbunova V. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1// Science. 2011. 332(6036). P. 1443-1446.
- 158. Martin D.R., Lewington A.J., Hammerman M.R. Padanilam B.J. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase attenuates ischemic renal injury in rats// Am. J. Physiol. 2000. 279(5). P. 1834-1840.
- 159. Masiello P., Cubeddu T.L., Frosina G., Bergamini E. Protective effect of 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase, against streptozotocin-induced diabetes// Diabetologia. 1985. 28(9). 683-686.
- 160. Mason K.A., Valdecanas D., Hunter N.R., Milas L. INO-1001, a novel inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase, enhances tumor response to doxorubicin// Invest. New Drugs. 2008. 26(1). P. 1-5.
- 161. Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia G., de Murcia G. XRCC1 is specifically associated with poly-(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage// Mol. Cell. Biol. 1998. 18. P. 3563–3571.
- 162. Masutani M., Nakagama H., Sugimura T. Poly-(ADP-ribose) and carcinogenesis// Genes Chromosomes Cancer 2003. 38. –P. 339–348.
- 163. Masutani M., Suzuki H., Kamada N., Watanabe M., Ueda O., Nozaki T., Jishage K., Watanabe T., Sugimoto T., Nakagama H., Ochiya T., Sugimura T. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1999. 96. P. 2301–2304.
- 164. McCabe N., Turner N.C., Lord C.J., Kluzek K., Bialkowska A., Swift S., Giavara S., O'Connor M.J., Tutt A.N., Zdzienicka M.Z., Smith G.C., Ashworth A. Deficiency in the repair of DNA damage by homologous recombination and sensitivity to poly(ADP-ribose) polymerase inhibition// Cancer Res. 2006. 66(16). P. 8109-8115.

- 165. Megnin-Chanet F., Bollet M.A., Hall J. Targeting poly(ADP-ribose) polymerase activity for cancer therapy// Cell. Mol. Life Sci. 2010. 67(21). P. 3649-3662.
- 166. Mehta M.P., Curran W.J., Wang D., Wang F., Kleinberg L., Brade A.M. Phase I safety and pharmacokinetic (PK) study of veliparib in combination with whole brain radiation therapy (WBRT) in patients (pts) with brain metastases// J. Clin. Oncol. 2012. 30. s2013.
- 167. Messner S., Altmeyer M., Zhao H., Pozivil A., Roschitzki B., Gehrig P., Rutishauser D., Huang D., Caflisch A., Hottiger M.O. PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails// Nucleic Acids Res. 2010. 38(19). P. 6350-62.
- 168. Mikhailov S.N., DeBruyn A., Herdewijn P. Synthesis and properties of some 2'-O-β–D-ribofuranosylnucleosides// Nucleosides Nucleotides. 1995. 14. P. 481–484.
- 169. Miknyoczki S.J., Jones-Bolin S., Pritchard S., Hunter K., Zhao H., Wan W., Ator M., Bihovsky R., Hudkins R., Chatterjee S., Klein-Szanto A., Dionne C., Ruggeri B. Chemopotentiation of temozolomide, irinotecan, and cisplatin activity by CEP-6800, a poly(ADP-Ribose) polymerase inhibitor// Mol. Cancer Ther. 2003. 2. –P. 371–382.
- 170. Min A., Im S.A., Yoon Y.K., Song S.H., Nam H.J, Hur H.S., Kim H.P., Lee K.H., Han S.W., Oh D.Y., Kim T.Y., O'Connor M.J., Kim W.H., Bang Y.J. RAD51C-deficient cancer cells are highly sensitive to the PARP inhibitor olaparib// Mol. Cancer Ther. 2013. 12. P. 865–877.
- 171. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity// Pharmacol. Rev. 2004. 56. –P. 185–229.
- 172. Miwa M., Masutani M. PolyADP-ribosylation and cancer// Cancer Sci.- 2007. 98(10). P. 1528-1535.
- 173. Mizutani H., Oikawa S., Hiraku Y., Murata M., Kojima M., Kawanishi S. Distinct mechanisms of site-specific oxidative DNA damage by doxorubicin in the presence of copper(II) and NADPH-cytochrome P450 reductase// Cancer Sci. 2003. 94(8). 686-691.
- 174. Morrow D.A., Brickman C.M., Murphy S.A., Baran K., Krakover R., Dauerman H., Kumar S., Slomowitz N., Grip L., McCabe C.H., Salzman A.L. A randomized, placebo-controlled trial to evaluate the tolerability, safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a potent inhibitor of poly(ADPribose) polymerase (INO-1001) in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: results of the TIMI 37 trial// J. Thromb. Thrombolysis. 2009. 27. P. 359–364.
- 175. Moynahan M.E., Chiu J.W., Koller B.H., Jasin M. Brca1 controls homology-directed DNA repair// Mol. Cell. 1999. 4. P. 511–518.
- 176. Muggia F., Diaz I., Peters G.J. Nucleoside and nucleobase analogs in cancer treatment: not only sapacitabine, but also gemcitabine// Expert Opin. Investig. Drugs. 2012. 21(4). P. 403-408.
- 177. Mukhopadhyay P., Rajesh M., Bátkai S., Kashiwaya Y., Haskó G., Liaudet L., Szabó C., Pacher P. Role of superoxide, nitric oxide, and peroxynitrite in doxorubicin-induced cell death in vivo and in vitro// Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2009. 296. –P. H1466-H1483.

- 178. Munoz-Gamez J.A., Martín-Oliva D., Aguilar-Quesada R., Canuelo A., Nunez M.I., Valenzuela M.T., Ruiz de Almodóvar J.M., De Murcia G., Oliver F.J. PARP inhibition sensitizes p53-deficient breast cancer cells to doxorubicin-induced apoptosis// Biochem. J. 2005. 386. P. 119-125.
- 179. Munoz-Gamez J.A., Quiles-Pérez R., Ruiz-Extremera A., Martín-Álvarez A.B., Sanjuan-Nuñez L., Carazo A., León J., Oliver F.J., Salmerón J. Inhibition of poly (ADP-ribose) polymerase-1 enhances doxorubicin activity against liver cancer cells// Cancer Lett. 2011. 301(1). P. 47–56.
- 180. Munoz-Gamez J.A., Rodríguez-Vargas J.M., Quiles-Pérez R., Aguilar-Quesada R., Martín-Oliva D, de Murcia G., Almendros A., Ruiz de Almodóvar M., Oliver F.J. PARP-1 is involved in autophagy induced by DNA damage// Autophagy. 2009. 5. P. 61-74.
- 181. Neilan T.G., Blake S.L., Ichinose F., Raher M.J., Buys E.S., Jassal D.S., Furutani E., Perez-Sanz T.M., Graveline A., Janssens S.P., Picard M.H., Scherrer-Crosbie M., Bloch K.D. Disruption of nitric oxide synthase 3 protects against the cardiac injury, dysfunction, and mortality induced by doxorubicin// Circulation. 2007. 116(5). P. 506-514
- 182. Nicotera P., Leist M., Ferrando-May E. Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis// Toxicol. Lett. 1998. 102-103. P. 139-142.
- 183. Niu J., Azfer A., Wang K., Wang X., Kolattukudy P.E. Cardiac-targeted expression of soluble fas attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice// J. Pharmacol. Exp. Ther. 2009. 328. –P. 740–748.
- 184. Nobuhara M., Saotome M., Watanabe T., Urushida T., Katoh H., Satoh H., Funaki M., Hayashi H. Mitochondrial dysfunction caused by saturated fatty acid loading induces myocardial insulin-resistance indifferentiated H9c2 myocytes: a novel ex vivo myocardial insulin-resistance model// Exp. Cell. Res. 2013. 319(7). P. 955-966.
- 185. Noel G., Giocanti N., Fernet M., Megnin-Chanet F., Favaudon V. Poly(ADP-ribose) polymerase (PARP-1) is not involved in DNA double-strand break recovery// BMC Cell Biol. 2003. 4. P. 7.
- 186. Noel G., Godon C., Fernet M., Giocanti N., Mégnin-Chanet F., Favaudon V. Radiosensitization by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor 4-amino-1,8-naphthalimide is specific of the S phase of the cell cycle and involves arrest of DNA synthesis// Mol. Cancer Ther. 2006. 5. –P. 564–574.
- 187. Octavia Y., Tocchetti C.G., Gabrielson K.L., Janssens S., Crijns H.J., Moens A.L. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies// J. Mol. Cell. Cardiol. 2012. 52(6). P. 1213-1225.
- 188. Ohanna M., Giuliano S., Bonet C., Imbert V., Hofman V., Zangari J., Bille K., Robert C., Bressac-de Paillerets B., Hofman P., Rocchi S., Peyron J.F., Lacour J.P., Ballotti R., Bertolotto C. Senescent cells develop a PARP-1 and nuclear factor-{kappa}B-associated secretome (PNAS)// Genes Dev. 2011. 25(12). P. 1245-1261.
- 189. Oliver F.J., Menissier-de Murcia J., Nacci C., Decker P. Andriantsitohaina R., Muller S., de la Rubia G., Stoclet J.C., de Murcia G. Resistance to endotoxic shock as a consequence of defective NF-kappaB activation in poly (ADP-ribose) polymerase-1 deficient mice// EMBO J. 1999. 18. P. 4446-4454.

- 190. O'Shaughnessy J., Osborne C., Pippen J.E., Yoffe M., Patt D., Rocha C., Koo I.C., Sherman B.M., Bradley C. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer// N. Engl. J. Med. 2011. 364(3). P. 205-214.
- 191. Pacher P., Liaudet L., Bai P., Mabley J.G., Kaminski P.M., Virag L., Deb A., Szabo E., Ungvari Z., Wolin M.S., Groves J.T., Szabo C. Potent metalloporphyrin peroxynitrite decomposition catalyst protects against the development of doxorubicin-induced cardiac dysfunction// Circulation. 2003. 107(6). P. 896-904.
- 192. Pacher P., Liaudet L., Bai P., Virag L., Mabley J.G., Hasko G., Szabo C. Activation of poly(ADP-Ribose) polymerase contributes to development of doxorubicin-induced heart failure// J. Pharmacol. Exp. Ther. 2002. 300(3). P. 862-867.
- 193. Pacher P., Liaudet L., Mabley J.G., Hasko G., Szabo C. Beneficial effects of a novel ultrapotent poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in murine models of heart failure// Int. J. Mol. Med. 2006. 17(2). P. 369–375.
- 194. Pacher P., Szabo C. Role of poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors// Cardiovasc. Drug Rev. 2007. 25(3). P. 235-260.
- 195. Pacher P., Szabo C. Role of the peroxynitrite-poly(ADP-ribose) polymerase pathway in human disease// Am. J. Pathol. 2008. 173(1). P. 2-13.
- 196. Parra V., Eisner V., Chiong M., Criollo A., Moraga F., Garcia A., Härtel S., Jaimovich E., Zorzano A., Hidalgo C., Lavandero S. Changes in mitochondrial dynamics during ceramide-induced cardiomyocyte early apoptosis// Cardiovasc. Res. 2008. 77. P. 387–397.
- 197. Parsons J.L., Dianova I.I., Allinson S.L., Dianov G.L. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts// FEBS J. 2005 272(8). P. 2012-2021.
- 198. Patel A.G., Flatten K.S., Schneider P.A., Dai N.T., McDonald J.S., Poirier G.G., Kaufmann S.H. Enhanced killing of cancer cells by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and topoisomerase I inhibitors reflects poisoning of both enzymes// J. Biol. Chem. 2012. 287(6). P. 4198-4210.
- 199. Patel A.G., Sarkaria J.N., Kaufmann S.H. Nonhomologous end joining drives poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor lethality in homologous recombination-deficient cells// Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 2011. 108(8). P. 3406-3411.
- 200. Pellicciari R., Camaioni E., Costantino G., Formentini L., Sabbatini P., Venturoni F, Eren G., Bellocchi D., Chiarugi A., Moroni F. On the way to selective PARP-2 inhibitors. Design, synthesis, and preliminary evaluation of a series of isoquinolinone derivatives// Chem. Med. Chem. 2008. 3. –P. 914–923.
- 201. Peralta-Leal A., Rodríguez M.I., Oliver F.J. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1) in carcinogenesis: potential role of PARP inhibitors in cancer treatment// Clin. Transl. Oncol. 2008. 10(6). P. 318-323.
- 202. Pieper A.A., Verma A., Zhang J., Snyder S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase, nitric oxide and cell death// Trends Pharmacol. Sci. 1999. 20. P. 171–181.

- 203. Pinnola A., Naumova N., Shah M., Tulin A.V. Nucleosomal core histones mediate dynamic regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 protein binding to chromatin and induction of its enzymatic activity// J. Biol. Chem. 2007. 282. –P. 32511–32519.
- 204. Pivazyan A.D., Birks E.M., Wood T.G., Lin T.-S., Prusoff W.H. Inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase activity by nucleoside analogs of thymidine// Biochem. Pharmacol. 1992. 44. –P. 947-953.
- 205. Plummer R., Jones C., Middleton M., Wilson R., Evans J., Olsen A., Curtin N., Boddy A., McHugh P., Newell D., Harris A., Johnson P., Steinfeldt H., Dewji R., Wang D., Robson L., Calvert H. Phase I study of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide in patients with advanced solid tumors// Clin. Cancer Res. 2008. 14(23). P. 7917-7923.
- 206. Plummer R., Lorigan P., Evans J., Steven N., Middleton M., Wilson R., Snow K., Dewji R., Calvert H. First and final report of a phase II study of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, AG014699, in combination with temozolomide (TMZ) in patients with metastatic malignant melanoma (MM)// J. Clin. Oncol. 2006. 24. 8013.
- 207. Poizat C., Puri P.L., Bai Y., Kedes L. Phosphorylation-dependent degradation of p300 by doxorubicin-activated p38 mitogen-activated protein kinase in cardiac cells// Mol. Cell. Biol. 2005. 25. –P. 2673–2687.
- 208. Preiss J., Schlaeger R., Hilz H. Specific inhibition of poly ADPribose polymerase by thymidine and nicotinamide in HeLa cells// FEBS Lett. 1971. 19(3). P. 244-246.
- 209. Quiles J.L., Huertas J.R., Battino M., Mataix J., Ramírez-Tortosa M.C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity// Toxicology. 2002. 180. –P. 79-95.
- 210. Radons J., Heller B., Burkle A., Hartmann B., Rodriguez M.L., Kroncke K.D., Burkart V., Kolb H. Nitric oxide toxicity in islet cells involves poly(ADP-ribose) polymerase activation and concomitant NAD+ depletion// Biochem. Biophys. Res. Commun. 1994. 199. 1270-1277.
- 211. Rajan A., Carter C.A., Kelly R.J., Gutierrez M., Kummar S., Szabo E., Yancey M.A., Ji J., Mannargudi B., Woo S., Spencer S., Figg W.D., Giaccone G. A phase I combination study of olaparib with cisplatin and gemcitabine in adults with solid tumors// Clin. Cancer Res. 2012. 18. P. 2344–2351.
- 212. Rankin P.W., Jacobson E.L., Benjamin R.C., Moss J., Jacobson M.K. Quantitative studies of inhibitors of ADP-ribosylation in vitro and in vivo// J. Biol. Chem. 1989. 264(8). P. 4312-4317.
- 213. Robu M., Shah R.G., Petitclerc N., Brind'Amour J., Kandan-Kulangara F., Shah G.M. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair// Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013 110(5). P. 1658-1663.
- 214. Russo A.L., Kwon H.C., Burgan W.E., Carter D., Beam K., Weizheng X., Zhang J., Slusher B.S., Chakravarti A., Tofilon P.J., Camphausen K. In vitro and in vivo radiosensitization of glioblastoma cells by the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor E7016// Clin. Cancer Res. 15. P. 607–612.
- 215. Samol J., Ranson M., Scott E., Macpherson E., Carmichael J., Thomas A., Cassidy J. Safety and tolerability of the poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, olaparib (AZD2281)

- in combination with topotecan for the treatment of patients with advanced solid tumors: a phase I study// Invest. New Drugs. 2012. 30. P. 1493–1500.
- 216. Sandhu S.K., Yap T.A., de Bono J.S. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors in cancer treatment: a clinical perspective// Eur. J. Cancer. 2010. 46. P. 9–20.
- 217. Sardao V.A., Oliveira P.J., Holy J., Oliveira C.R., Wallace K.B. Doxorubicin-induced mitochondrial dysfunction is secondary to nuclear p53 activation in H9c2 cardiomyoblasts// Cancer Chemother. Pharmacol. 2009. 64. P811–827.
- 218. Satoh M.S., Lindahl T. Role of poly(ADP-ribose) formation in DNA repair// Nature. 1992. 356. P. 356–358.
- 219. Scharer O.D. Chemistry and biology of DNA repair// Angew. Chem. Int. Ed. 2003. 42(26). P. 2946-2974.
- 220. Schinazi R.F., Hernandez-Santiago B.I., Hurwitz S.J. Pharmacology of current and promising nucleosides for the treatment of human immunodeficiency viruses// Antiviral Res. 2006. 71. P. 322-334.
- 221. Schonheit K., Nohl H. Oxidation of cytosolic NADH via complex I of heart mitochondria// Arch. Biochem. Biophys. 1996. 327(2). P. 319-323.
- 222. Schreiber V., Ame J.-C., Dolle P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., Menissier de Murcia J., de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1// J. Biol. Chem. 2002. 277. P. 23028–23036.
- 223. Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule// Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2006. 7(7). P. 517-528.
- 224. Schultz N., Lopez E., Saleh-Gohari N., Helleday T. Poly(ADPribose) polymerase (PARP-1) has a controlling role in homologous recombination// Nucleic Acids Res. 2003. 31. P. 4959–4964.
- 225. Scovassi A.I., Diederich M. Modulation of poly(ADP-ribosylation) in apoptotic cells//Biochem. Pharmacol. 2004. 68. P. 1041-1047.
- 226. Sevrioukova I.F. Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation// Antioxid. Redox Signal. 2011. 14(12). P. 2545-2579.
- 227. Shall S. Proceedings: experimental manipulation of the specific activity of poly(ADP-ribose) polymerase// J. Biochem. 1975. 77. –P. 2.
- 228. Shall S., de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1: What have we learned from the deficient mouse model?// Mutat. Res. 2000. 460. P. 1-15.
- 229. Shevchuk O.O., Posokhova E.A., Sakhno L.A., Nikolaev V.G. Theoretical ground for adsorptive therapy of antracyclines cardiotoxicity// Exp. Oncol. 2012. 34(4). P. 314–322
- 230. Shi R., Huang C., Aronstam R., Ercal N., Martin A., Huang Y.-W. N-acetylcystein amide decreases oxidative stress but not cell death induced by doxorubicin in H9c2 cardiomyocytes//BMC Pharmacology. 2009. -9:7.
- 231. Shiobara M., Miyazaki M., Ito H., Togawa A., Nakajima N., Nomura F., Morinaga N., Noda M. Enhanced polyadenosine diphosphate-ribosylation in cirrhotic liver and carcinoma

- tissues in patients with hepatocellular carcinoma// J. Gastroenterol. Hepatol. -2001. 16(3). P. 338-344.
- 232. Shizukuda Y., Matoba S., Mian O.Y., Nguyen T., Hwang P.M. Targeted disruption of p53 attenuates doxorubicin-induced cardiac toxicity in mice// Mol. Cell. Biochem. 2005. 273. 25–32.
- 233. Simonin F., Poch O., Delarue M., de Murcia G. Identification of potential active-site residues in the human poly(ADP-ribose) polymerase// J. Biol. Chem. 1993. 268. P. 8529-8535.
- 234. Sims J.L., Sikorski G.W., Catino D.M., Berger S.J., Berger N.A. Poly(adenosine-diphosphoribose) polymerase inhibitors stimulate unscheduled deoxyribonucleic acid synthesis in normal human lymphocytes// Biochemistry. 1982. 21(8). P. 1813-1821.
- 235. Sipido K.R., Marban E. L-type calcium channels, potassium channels, and novel nonspecific cation channels in a clonal muscle cell line derived from embryonic rat ventricle// Circ. Res. 1991. 69(6). P. 1487-1499
- 236. Sodhi R.K., Singh N., Jaggi A.S. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications// Vascul. Pharmacol. 2010. 53(3-4). P. 77-87.
- 237. Soldani C., Scovassi A.I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update// Apoptosis. 2002. 7. P. 321-328.
- 238. Solem L.E., Heller L.J., Wallace K.B. Dose-dependent increase in sensitivity to calcium-induced mitochondrial dysfunction and cardiomyocyte cell injury by doxorubicin// J. Mol. Cell. Cardiol. 1996. 28. P. 1023–1032.
- 239. Southan G.J., Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors// Curr. Med. Chem. 2003. 10, 321-340.
- 240. Spallarossa P., Garibaldi S., Altieri P., Fabbi P., Manca V., Nasti S., Rossettin P., Ghigliotti G., Ballestrero A., Patrone F., Barsotti A., Brunelli C. Carvedilol prevents doxorubicin-induced free radical release and apoptosis in cardiomyocytes in vitro// J. Mol. Cell. Cardiol. 2004. 37. P. 837–846.
- 241. Steffen J.D., Brody J.R., Armen R.S., Pascal J.M. Structural implications for selective targeting of PARPs// Front. Oncol. 2013. 3. P. 14.
- 242. Steinhagen H., Gerisch M., Mittendorf J., Schlemmer K.-H., Albrecht B. Substituted uracil derivatives as potent inhibitors of poly(ADP-ribose)polymerase-1 (PARP-1)// Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002. 12. –P. 3187–3190.
- 243. Stone P.R., Shall S. Poly(adenosine diphosphoribose) polymerase in mammalian nuclei. Characterization of the activity in mouse fibroblasts (LS cells)// Eur. J. Biochem. 1973. 38(1). P. 146-152.
- 244. Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N, Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M. Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor// Nature. 1999. 397. P. 441-446.
- 245. Suto M.J., Turner W.R., Arundel-Suto C.M., Werbel L.M., Sebolt-Leopold J.S. Dihydroisoquinolinones: the design and synthesis of a new series of potent inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase// Anticancer Drug Des. 1991. 6(2). P. 107-117.

- 246. Szabo C. Cardioprotective effects of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition// Pharmacol. Res. 2005.- 52(1).-P. 34-43
- 247. Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase activation by reactive nitrogen species relevance for the pathogenesis of inflammation// Nitric Oxide. 2006. 14. P. 169-179.
- 248. Szabo C., Dawson V.L. Role of poly(ADP-ribose) synthetase in inflammation and ischaemia—reperfusion// Trends Pharmacol. Sci. 1998. 19. P. 287–298.
- 249. Szabo C., Virag L., Cuzzocrea S., Scott G.S., Hake P., O'Connor M.P., Zingarelli B., Salzman A., Kun E. Protection against peroxynitrite-induced fibroblast injury and arthritis development by inhibition of poly(ADP-ribose) synthase// Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1998. 95(7). P. 3867-3872.
- 250. Szenczi O., Kemecsei P., Holthuijsen M.F., van Riel N.A., van der Vusse G.J., Pacher P., Szabó C., Kollai M., Ligeti L., Ivanics T. Poly(ADP-ribose) polymerase regulates myocardial calcium handling in doxorubicin-induced heart failure// Biochem. Pharmacol.- 2005. 69(5). -P. 725-32.
- 251. Tan X., Wang D.B., Lu X., Wei H., Zhu R., Zhu S.S., Jiang H., Yang Z.J. Doxorubicin induces apoptosis in H9c2 cardiomyocytes: role of overexpressed eukaryotic translation initiation factor 5A// Biol. Pharm. Bull. 2010. 33(10). P. 1666—1672.
- 252. Tentori L., Graziani G. Chemopotentiation by PARP inhibitors in cancer therapy// Pharmacol. Res. 2005. 52. P. 25–33.
- 253. Terman A., Brunk U.T. Autophagy in cardiac myocyte homeostasis, aging, and pathology// Cardiovasc. Res. 2005. 68. P. 355–365.
- 254. Thomas C., Tulin A.V. Poly-ADP-ribose polymerase: machinery for nuclear processes// Mol. Aspects Med. 2013. 34 (6). P. 1124-1137.
- 255. Vahsen N., Cande C., Briere J.J., Benit P., Joza N., Larochette N., Mastroberardino P.G., Pequignot M.O., Casares N., Lazar V., Feraud O., Debili N., Wissing S., Engelhardt S., Madeo F., Piacentini M., Penninger J.M., Schagger H., Rustin P., Kroemer G. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation// EMBO J. 2004. 23. 4679–4689.
- 256. Venkitaraman A.R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2// Cell. 2002. 108. P. 171–182.
- 257. Veuger S.J., Curtin N.J., Richardson C.J., Smith G.C., Durkacz B.W. Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1// Cancer Res. 2003. 63. –P. 6008–6015.
- 258. Vigar L. 50 years of poly(ADP-ribosyl)ation// Mol. Aspects Med. 2013. -34(6). P. 1043-1045.
- 259. Virag L., Szabo C. The therapeutic potential of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors// Pharmacol. Rev. 2002. 54(3). P. 375-429.
- 260. Wahlberg E., Karlberg T., Kouznetsova E., Markova N., Macchiarulo A., Thorsell A.G., Pol E., Frostell A., Ekblad T., Oncu D., Kull B., Robertson G.M., Pellicciari R., Schüler H., Weigelt J. Family-wide chemical profiling and structural analysis of PARP and tankyrase inhibitors// Nat. Biotechnol. 2012. 30. P. 283–288.
- 261. Wallace K.B. Doxorubicin-induced cardiac mitochondrionopathy.// Pharmacol. Toxicol. –

- 2003. 93. P. 105–115.
- 262. Wang G.W., Klein J.B., Kang Y.J. Metallothionein inhibits doxorubicin-induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes// J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001. 298. P. 461–468.
- 263. Wang H., Rosidi B., Perrault R., Wang M., Zhang L., Windhofer F., Iliakis G. DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining// Cancer Res. 2005. 65. P. 4020-4030.
- 264. Wang M., Wu W., Wu W., Rosidi B., Zhang L., Wang H., Iliakis G. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways// Nucl. Acids Res. 2006. 34. P. 6170–6182.
- 265. Wang S.H., Liao X.M., Liu D., Hu J., Yin Y.Y., Wang J.Z., Zhu L.Q. NGF promotes long-term memory formation by activating poly(ADP-ribose)polymerase-1// Neuropharmacology. 2012. 63 (6). P. 1085-1092.
- 266. Wang Y, Dawson V.L., Dawson T.M. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos// Exp. Neurol. 2009. 218(2). P. 193-202.
- 267. Wang Y., Kim N.S., Haince J.F., Kang H.C., David K.K., Andrabi S.A., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos)// Sci. Signal. 2011. 4. ra20.
- 268. Weil M.K., Chen A.P. PARP inhibitor treatment in ovarian and breast cancer// Curr. Probl. Cancer. 2011. 35(1). P. 7-50.
- 269. Weston V.J., Oldreive C.E., Skowronska A., Oscier D.G., Pratt G., Dyer M.J., Smith G., Powell J.E., Rudzki Z., Kearns P., Moss P.A., Taylor A.M., Stankovic T. The PARP inhibitor olaparib induces significant killing of ATM-deficient lymphoid tumor cells in vitro and in vivo// Blood. 2010. 116. P. 4578–4587.
- 270. Wooster R., Weber B.L. Breast and ovarian cancer// N. Engl. J. Med. 2003. 348. P. 2339–2347.
- 271. Wyllie A.H., Kerr J.F., Currie A.R. Cell death: the significance of apoptosis// Int. Rev. Cytol. 1980. 68. P. 251-306.
- 272. Yang Y.-G., Cortes U., Patnaik S., Jasin M., Wang Z.-Q. Ablation of PARP-1 does not interfere with the repair of DNA double-strand breaks, but compromises the reactivation of stalled replication forks// Oncogene. 2004. 23. P. 3872–3882.
- 273. Yildirim Y., Gultekin E., Avci M.E., Inal M.M., Yunus S., Tinar S. Cardiac safety profile of pegylated liposomal doxorubicin reaching or exceeding lifetime cumulative doses of 550 mg/m² in patients with recurrent ovarian and peritoneal cancer// Int. J. Gynecol. Cancer 2008. 18. P. 223–227.
- 274. Youn H.J., Kim H.S., Jeon M.H., Lee J.H., Seo Y.J., Lee Y.J., Lee J.H. Induction of caspase-independent apoptosis in H9c2 cardiomyocytes by adriamycin treatment// Mol. Cell. Biochem. 2005. 270. –P. 13–19.
- 275. Yu S.W., Andrabi S.A., Wang H., Kim N.S., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer induced cell death// Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2006. 103. 18314–18319.

- 276. Yu S.W., Wang H., Poitras M.F., Coombs C., Bowers W.J., Federoff H.J., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson V.L. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor// Science/ 2002. 297. P. 259–263.
- 277. Zaremba T., Thomas H., Cole M., Plummer E.R., Curtin N.J. Doxorubicin-induced suppression of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) activity and expression and its implication for PARP inhibitors in clinical trials// Cancer Chemother. Pharmacol. 2010. 66. P. 807–812.
- 278. Zhang L.Q., Qi G.X., Jiang D.M., Tian W., Zou J.L. Increased poly(ADP-ribosyl)ation in peripheral leukocytes and the reperfused myocardium tissue of rats with ischemia/reperfusion injury: prevention by 3-aminobenzamide treatment// Shock. 2012. 37. P. 492–500.
- 279. Zhang S., Lin Y., Kim Y.S., Hande M.P., Liu Z.G., Shen HM. C-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation // Cell Death Differ. 2007. 14. –P. 1001–1010.
- 280. Zhang Y.-W., Shi J., Li Y.-J., Wei L. Cardiomyocyte death in doxorubicin-induced cardiotoxicity// Arch. Immunol. Ther. Exp. 2009. 57(6). P. 435–445.
- 281. Zingarelli B., Cuzzocrea S., Zsengellér Z., Salzman A.L., Szabó C. Protection against myocardial ischemia and reperfusion injury by 3-aminobenzamide, an inhibitor of poly (ADP-ribose) synthetase// Cardiovasc. Res. 1997. 36(2). P. 205-215.
- 282. Zingarelli B., Hake P.W., O'Connor M., Denenberg A., Kong S., Aronow B.J. Absence of poly(ADPribose)polymerase-1 alters nuclear factor-kappa B activation and gene expression of apoptosis regulators after reperfusion injury// Mol. Med. 2003. 9. P. 143-153.
- 283. Zong W.X., Ditsworth D., Bauer D.E., Wang Z.Q., Thompson C.B. Alkylating DNA damage stimulates a regulated form of necrotic cell death// Genes Dev. 2004. 18(11). P. 1272-1282.
- 284. Zordoky B.N., El-Kadi A.O. H9c2 cell line is a valuable in vitro model to study the drug metabolizing enzymes in the heart// J. Pharmacol. Toxicol. Methods. 2007. 56(3). P. 317-322.
- 285. Михайлович Ф.А. Влияние эмоксипина на динамику морфологических характеристик острого экспериментального панкреатита// Медицинский журнал. 2006. 1. С. 5. [электронный ресурс]. http://www.bsmu.by/medicaljournal/category15/
- 286. Neonatal rat cardiomyocyte harvest protocol [электронный ресурс]. http://www.abcam.com/ps/pdf/protocols/neonatal_rat_cardiomyocyte_harvest.pdf

Исследование цитотоксических свойств новых аналогов нуклеозидов

Синтетические аналоги и производные природных нуклеозидов широко используются в медицинской практике в качестве лекарств с противоопухолевым и противовирусным действием [Galmarini, 2002; Liekens, 2009; Muggia, 2012]. В одних случаях фармакологическая активность таких соединений обусловлена подавлением процессов репликации, транскрипции и трансляции после их встраивания в ДНК и РНК, в других — прямым ингибированием ферментов, вовлеченных в метаболизм нуклеиновых кислот. В данной работе помимо исследования PARP-ингибирующей активности новых синтетических дисахаридных и диальдегидных производных природных нуклеозидов (соединения 1 - 6; см. рис. 4.28), мы также исследовали их токсическое действие на опухолевые и нормальные клетки человека.

Эксперименты проводили на клетках опухоли яичника человека (линия SKOV-3). Было отобрано несколько дисахаридных и диальдегидных производных нуклеозидов с различной структурой гетероциклического основания и сахарного остатка, включая соединения, которые оказались достаточно эффективными ингибиторами PARP в экспериментах на клетках SKOV-3 (2, 3 и 4), а также соединения, лишенные такой активности (1, 5 и 6). В качестве соединений сравнения использовали 2'-дезоксиаденозин (dAdo), Thd и 3-AB. В данной серии экспериментов выживаемость клеток оценивали с помощью морфометрического варианта МТТ-теста (см. раздел 3.3.3).

Было показано, что 72-часовая инкубация клеток SKOV-3 с dAdo или Thd в концентрации 1 мМ вызывала снижение их жизнеспособности почти в два раза (рис. I). При этом их дисахаридные производные, с дополнительным остатком рибозы в 3'-положении (соединения 1 и 3), не проявляли цитотоксическое действие вплоть до концентрации 1 мМ (рис. I). Более того, соединение 2 (3'-О-β-D-рибофуранозил-5-йод-2'-дезоксиуридин) со сходной структурой также оказалось нетоксичным. На основании этих данных нами был сделан вывод, что дисахаридные производные нуклеозидов с дополнительным неокисленным остатком рибозы в 3' положении не являются токсичными для опухолевых клеток в отличие от своих прототипов – моносахаридных нуклеозидов.

В отличие от соединения **3**, его диальдегидный аналог (соединение **4**) проявлял выраженное цитотоксическое действие. Было показано, что 72-часовая инкубация клеток SKOV-3 с соединением **4** в концентрации 1 мМ вызывала гибель 75% клеток, при этом в концентрации 0.1 мМ оно оказалось нетоксичным (рис. I). Следует отметить, что окисленные (диальдегидные) производные Urd демонстрировали еще большую

цитотоксичность по сравнению с соединением 4. При инкубации культур клеток SKOV-3 с соединениями 5 и 6 в концентрации 0.1 мМ наблюдали снижение жизнеспособности клеток на 50%, а в концентрации 1 мМ - почти полную гибель клеток (рис. I). Цитотоксичность исследуемых соединений не связана с ингибированием PARP (как в случае применения ингибиторов PARP в противоопухолевой терапии, см. раздел 2.4), т.к. PARP 3-AB (1 MM)полное подавление активности никак не повлияло жизнеспособность клеток SKOV-3. Таким образом, токсичность производных нуклеозидов 4, 5 и 6 определяется главным образом наличием в их структуре диальдегидной группы.

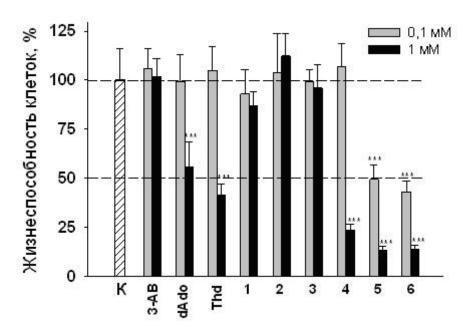


Рисунок I. Влияние ряда исследуемых синтетических нуклеозидов на выживаемость клеток опухоли яичника человека SKOV-3.

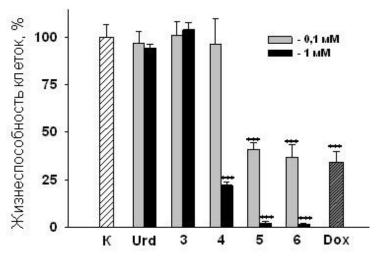
Клетки SKOV-3 в течение 72 ч инкубировали в среде, содержащей 0.1 или 1 мМ 3-AB, dAdo, Thd или нуклеозиды **1 - 6**. Контрольные культуры (**K**) ничем не обрабатывали. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью морфометрического варианта МТТ-теста. За 100% принята плотность живых клеток в контрольных (интактных) культурах. Данные представлены в виде среднее ± стандартное отклонение. *** p<0.001 - по сравнению с контролем.

В работах [Plagemann, 1977; Lee, 1982; Sheid, 1991] показано, что противоопухолевая активность диальдегидных нуклеозидов реализуется ингибирование ферментов синтеза нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот. Взаимодействие таких соединений с различными белками осуществляется благодаря наличию двух реакционноспособных альдегидных групп, которые образуют сшивки с белками и другими биомолекулами, имеющими свободные аминогруппы [Cory, 1975; Ермолинский, 2000].

Для выяснения избирательности противоопухолевого действия диальдегидных производных нуклеозидов было проведено сравнение их влияния на рост и жизнеспособность нормальных (изолированные фибробласты из легких человека) и опухолевых (SKOV-3) клеток (рис. II). Поскольку растущие в культурах фибробласты имеют сложную морфологию (рис. III), и применение морфометрического варианта МТТтеста затруднительно, мы использовали для этих целей колориметрический вариант анализа МТТ.

В данном сравнительном исследовании изучались цитотоксические свойства трех диальдегидных производных нуклеозидов – соединений **4**, **5** и **6**. В качестве соединений сравнения использовали Urd, неокисленный дисахаридный нуклеозид (соединение **3**) и Dox. Результаты анализа выживаемости клеток SKOV-3 в присутствии исследуемых веществ (рис. II A) были аналогичны результатам, полученным ранее с использованием морфометрического варианта МТТ-теста (рис. I).

A



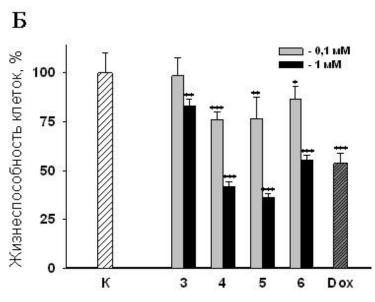


Рисунок II. Сравнительная оценка влияния ряда исследуемых синтетических нуклеозидов на выживаемость опухолевых клеток SKOV-3 (A) и нормальных фибробластов (Б) человека.

Клетки SKOV-3 И фибробласты человека культивировали в течение 72 ч в среде, содержащей 0.1 или 1 мМ Urd, нуклеозиды 3 - 6 или Dox концентрации 0.2 мкМ). Контрольные культуры (К) ничем не обрабатывали. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста (денситометрия). 100% принята жизнеспособность 3a контроле. Данные клеток В представлены В виде среднее отклонение. * p<0.05; стандартное ** p<0.01; *** p<0.001 – по сравнению с контролем.

Интересно, что Urd, вплоть до концентрации 1 мМ, практически не влиял на жизнеспособность клеток SKOV-3 (рис. II A).

Исследуемые производные нуклеозидов в целом оказывали более слабое токсическое действие на культивируемые нормальные фибробласты человека, чем на опухолевые клетки SKOV-3 (рисунки II Б и III). Диальдегидные нуклеозиды **4**, **5** и **6** в концентрации 0.1 мМ снижали жизнеспособность фибробластов по сравнению с контролем на 25, 23 и 13%, а в концентрации 1 мМ - на 58, 63 и 45%, соответственно. Соединение **6** оказалось менее токсичным для культивируемых фибробластов, чем два другие диальдегидные производные нуклеозидов. Следует отметить, что соединение **3** в концентрации 1 мМ проявляло незначительную цитотоксичность в отношении фибробластов (рис. II Б).

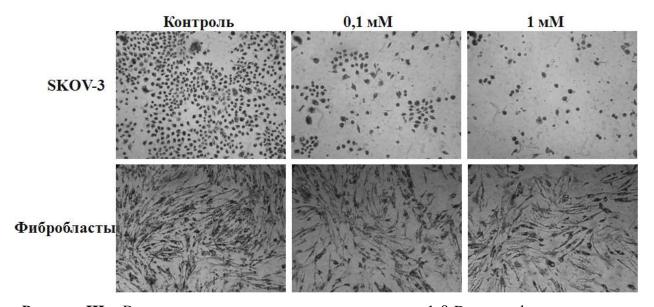


Рисунок III. Влияние диальдегидного производного 1-β-D-эритрофуранозилурацила (соединения **6**) на выживаемость опухолевых клеток SKOV-3 и фибробластов человека. Приведены типичные изображения культур клеток, после окрашивания их МТТ. Концентрации соединения **6** указаны сверху рисунка. Время инкубации – 72 ч. Световая микроскопия, объектив ×10.

На основе анализа концентрационных зависимостей (доза-эффект), были рассчитаны значения IC_{50} (табл. I). Как видно, значения IC_{50} для диальдегидных производных нуклеозидов в случае фибробластов были существенно выше, чем в случае культуры клеток SKOV-3. При этом наибольшее различие в значениях IC_{50} для опухолевых и нормальных клеток было выявлено для соединения **6**. Показательным в этом плане является соотношение значений IC_{50} для культур опухолевых и нормальных клеток, указывающее на избирательность противоопухолевого действия анализируемых

соединений. Отчетливо видно, что диальдегидные производные нуклеозидов, в отличие от Dox, обнаруживают высокую избирательность действия в отношении опухолевых клеток; для соединения $\bf 6$, например, соотношение $IC_{50 \text{ (фибр.)}}/IC_{50 \text{ (SKOV-3)}}$ составило 16,6 (табл. II).

Таблица I. Характеристики цитотоксического действия синтетических производных нуклеозидов и доксорубицина (Dox) на культивируемые клетки опухоли яичника (SKOV-3) и фибробласты человека.

Соединение	SKOV-3		Фибробласты	
	IC ₅₀ (MKM)	$n_{ m H}$	IC ₅₀ (MKM)	n_{H}
3	>5000	-	>5000	-
4	520	1.94	600	0.66
5	85	2.21	480	0.76
6	81	2.48	1350	0.72
Dox	0.14	0.52	0.27	0.56

Таблица II. Специфичность противоопухолевого действия синтетических производных нуклеозидов и доксорубицина (Dox).

Соединение	IC _{50 (фибр.)} / IC _{50 (SKOV-3)}	IС _{90 (фибр.)} / IС _{90 (SKOV-3)}
4	1.2	10.5
5	5.6	37.3
6	16.6	142
Dox	2.0	1.5

При анализе концентрационных зависимостей были рассчитаны также значения коэффициента Хилла (n_H; табл. I). Видно, что значения n_H для разных диальдегидных нуклеозидов оказались достаточно близкими: 2.0–2.5 для клеток SKOV-3 и около 0.7 для фибробластов человека. Это указывает на то, что 1)- несмотря на различия в цитотоксической активности, исследуемые соединения действуют (как цитотоксические агенты) на определенный тип клеток по единому механизму; 2)- механизмы цитотоксического действия исследуемых нуклеозидов на опухолевые и на нормальные клетки, по-видимому, существенно различаются. В действии диальдегидных нуклеозидов на клетки SKOV-3 наблюдается более высокая степень амплификации сигнала, запускающего механизмы повреждения клетки, чем в случае фибробластов человека. Такие различия выражаются в том, что при повышении концентрации нуклеозида избирательность его действия на опухолевые клетки возрастает, что отчетливо видно при сравнении значений IC₉₀ для соединений 4, 5 и 6 (табл. II). Интересно, что в случае

применения Dox рассчитанные значения n_H для обоих типов клеток были примерно одинаковыми и составляли 0.5–0.6 (табл. I).

Таким образом, нами было показано, что культивируемые опухолевые клетки человека SKOV-3 оказались более чувствительными к токсическому действию исследуемых диальдегидных производных нуклеозидов по сравнению с культивируемыми нормальными фибробластами человека. При этом наиболее сильное и одновременно избирательное цитостатическое действие на культивируемые опухолевые клетки яичника оказывало соединение **6**, представляющее собой диальдегидное производное, полученное перйодатным окислением 1-β-D-эритрофуранозилурацила.

Обобщая полученные результаты можно констатировать, что охарактеризованные нами синтетические дисахаридные и диальдегидные нуклеозиды можно рассматривать в качестве перспективных прототипов уникальных по своим характеристикам фармакологических веществ, сочетающих свойства ингибиторов PARP и селективных противоопухолевых цитостатиков.

Список литературы

- Ермолинский Б.С., Михайлов С.Н. Реакция периодатного окисления в химии нуклеотидных кислот. Диальдегидные производные нуклеозидов, нуклеотидов и олигонуклеотидов// Биоорганическая химия. 2000. 26 (7). С. 483-504.
- Cory J.G., Mansell M.M. Studies on mammalian ribonucleotide reductase inhibition by pyridoxal phosphate and the dialdehyde derivatives of adenosine, adenosine 5'monophosphate and adenosine 5'-triphosphate// Cancer Res. – 1975. - 35(2). – P. 390-396.
- Galmarini C.M., Mackey J.R., Dumontet C. Nucleoside analogues and nucleobases in cancer treatment// Lancet Oncol. 2002. 3. P. 415-424.
- Lee M.H., Lazo J.S., Li C.D., Hadfield A.F., Maniglia C.A., Sartorelli A.C. Solubilization of murine melanoma xylosyltransferase and galactosyltransferase activities and their inactivation by dialdehyde nucleosides// Chem. Biol. Interact. 1982 41(2). P. 141-53.
- Liekens S., Bronckaers A., Balzarini J. Improvement of purine and pyrimidine antimetabolite-based anticancer treatment by selective suppression of mycoplasmaencoded catabolic enzymes// Lancet Oncol. 2009. 10. P. 628–635.
- Muggia F., Diaz I., Peters,G.J. Nucleoside and nucleobase analogs in cancer treatment: not only sapacitabine, but also gemcitabine// Expert Opin. Investig. Drugs. 2012. 21(4). P. 403-408.
- Plagemann P.G., Graff J.C., Behrens M. Mechanism of action of inosine dialdehyde (NSC 118994) in the inhibition of proliferation of tumor cells in culture// Cancer Res. 1977. 37(7, 1). P. 2188-2195.
- Sheid B., Saggar M., Gaetjens E., Lerner L.M. Antiproliferative activity of purine nucleoside dialdehydes against leukemia L1210 in vitro// Cancer Chemother. Pharmacol. 1991. 28. P. 339 343.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность:

научному руководителю – заведующему Сектором нейрофармакологии Отдела химии физиологически активных веществ ИМГ РАН к.х.н. **Шраму Станиславу Ивановичу** за идеи, участие в планировании каждого эксперимента и анализе полученных данных, а также за помощь на всех этапах диссертационной работы;

заведующему Отделом химии физиологически активных веществ ИМГ РАН, академику РАН, проф., д.х.н. **Мясоедову Николаю Федоровичу** за постоянную поддержку и помощь в работе;

заведующему Сектором развития методов молекулярной генетики ИМГ РАН, к.б.н. **Генингу Леониду Владимировичу** и м.н.с. Лаборатории репликации и репарации генома ИМГ РАН, к.б.н. **Лахину Андрею Васильевичу** за помощь в изучении методов ДНК-электрофореза и ДНК-комет;

заведующему Лабораторией молекулярной генетики наследственных заболеваний, проф., д.б.н. **Сломинскому Петру Андреевичу** за тщательное изучение рукописи диссертационной работы, ценные советы и рекомендации;

сотруднице Сектора нейрофармакологии ИМГ РАН, асп. **Недорубовой Ирине Алексеевне** за важную помощь в проведении экспериментов;

сотруднику Центра клеточных и генных технологий ИМГ РАН **Антонову Станиславу Анатольевичу** за помощь при обучении работе на конфокальном микроскопе и товарищеское участие;

сотруднице Сектора нейрофармакологии ИМГ РАН **Мокроусовой Виктории Олеговне** за техническое обеспечение работы с культурами клеток.