

УДК 577.29

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ТИРОЗИЛ-ДНК-ФОСФОДИЭСТЕРАЗЫ 1 НА ПРОАПОПТОТИЧЕСКОЕ И ГЕНОТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ АНТИРАКОВОГО ПРЕПАРАТА ТОПОТЕКАНА

© 2023 г. А. А. Чепанова¹, А. Л. Захаренко¹, Н. С. Дырхеева^{1,*}, И. А. Чернышова¹, О. Д. Захарова¹, Е. С. Ильина¹, О. А. Лузина², член-корреспондент РАН Н. Ф. Салахутдинов², академик РАН О. И. Лаврик^{1,**}

Поступило 28.11.2022 г.

После доработки 14.12.2022 г.

Принято к публикации 14.12.2022 г.

На сегодняшний день предлагаются различные стратегии повышения эффективности терапии онкологических заболеваний. Известно, что активность системы репарации ДНК может обуславливать устойчивость раковых клеток к ДНК-повреждающей химио- и радиотерапии, и одним из путей повышения эффективности терапии является поиск ингибиторов ферментов систем репарации ДНК. Ингибирование фермента репарации ДНК тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (Tdp1) приводит к повышению эффективности ингибитора топоизомеразы 1 (Top1) – противоопухолевого препарата топотекана. Ковалентные комплексы Top1-ДНК, которые в норме являются короткоживущими и не представляют угрозы для клетки, под воздействием топотекана стабилизируются и приводят к гибели клетки. Такие стабилизированные комплексы устраняет Tdp1 и, таким образом, ослабляет эффект терапии топотеканом. Ранее мы показали, что применение гидразонотиазольного производного усниновой кислоты **OL9-119** в комбинации с топотеканом повышало противоопухолевую и антиметастатическую эффективность последнего на модели карциномы легких Льюис мышей. В данной работе показано, что совместное использование топотекана и ингибитора Tdp1 – гидразонотиазольного производного усниновой кислоты **OL9-119** приводит к усилению ДНК-повреждающего действия топотекана, применяемого в клинике для лечения онкозаболеваний. Исследование проапоптотического эффекта соединения **OL9-119** показало, что само по себе соединение не индуцирует апоптоз, но повышает проапоптотический эффект топотекана. Результаты исследования могут быть использованы для повышения эффективности противоопухолевой терапии и/или для снижения терапевтической дозы топотекана и, следовательно, тяжести побочных эффектов.

Ключевые слова: тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1, ингибитор Tdp1, топотекан, репарация ДНК

DOI: 10.31857/S2686738922601011, **EDN:** QFLIZI

Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (Tdp1) – фермент репарации ДНК, который отвечает за удаление с 3'-конца ДНК различных аддуктов эндогенного и экзогенного происхождения [1]. Наиболее значимый 3'-аддукт – ковалентный аддукт другого фермента, топоизомеразы 1 (Top1) с

ДНК, который образуется в ходе катализа между остатком тирозина 721 Top1 (у человека) и 3'-концом ДНК в одноцепочечном разрыве [2]. Top1 регулирует спирализацию ДНК во время репликации, рекомбинации и других процессов, и такой разрыв одной из цепей ДНК необходим для изменения топологии двойной спирали. Ковалентный комплекс Top1-ДНК в норме является короткоживущим, но может быть стабилизирован различными агентами, в число которых входят противоопухолевые препараты на основе камптотецина – топотекан и иринотекан [3]. Такие производные камптотецина связываются с комплексом Top1-ДНК, препятствуя восстановлению целостности ДНК и высвобождению Top1 из комплекса, что приводит к сохранению одноце-

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

*e-mail: dyrkheeva.n.s@gmail.com

**e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Таблица 1. Среднее количество повреждений ДНК, вызванное применением **OL9-119** индивидуально и в комбинации с топотеканом

Группа	Среднее количество ДНК в хвосте комет, %
Контроль без обработки	3.8 ± 3.2
ДМСО 1%	3.9 ± 3.3
OL9-119 5 мкМ	8.7 ± 4.4
OL9-119 20 мкМ	9.8 ± 4.6
Трс 5 мкМ	14.2 ± 8.2
Трс + OL9-119 5 мкМ	28 ± 12
Трс + OL9-119 20 мкМ	26 ± 15

почечного разрыва и может привести к гибели клетки из-за блокировки процессов репликации, транскрипции и других [4]. В устранении таких “застывших” на ДНК комплексов принимает участие Tdp1, тем самым снижая терапевтическую эффективность топотекана и иринотекана. Существует большое количество экспериментальных доказательств того, что дефицит активности Tdp1 в клетках или у организмов приводит к повышенной чувствительности к ингибиторам Top1 [5–8]. И наоборот, гиперэкспрессия Tdp1 в опухолевых клетках приводит к снижению чувствительности к ингибиторам Top1 [9, 10]. На основании изложенного, Tdp1 считается одним из факторов резистентности опухолей к терапии ингибиторами Top1 и подходящей мишенью для сопровождающей терапии, призванной повысить эффективность основной терапии с помощью ингибиторов Top1, в том числе топотекана [11]. Топотекан и иринотекан являются селективными ингибиторами Top1, и последние 20 лет используются в клинике, в том числе для лечения метастазирующего колоректального рака и рака яичников, мелкоклеточного рака легких, карциномы шейки матки и аденокарциномы поджелудочной железы [12]. Ингибиторы Top1 вызывают гибель клеток по механизму апоптоза [12].

Ранее нашим коллективом был обнаружен ингибитор Tdp1 – производное усниновой кислоты **OL9-119** (лабораторный шифр), способный sensibilizировать цитотоксическое действие топотекана *in vitro* и его противоопухолевое и антиметастатическое действие *in vivo* (соединение **20d** в [13]). Также нами было показано, что комбинированное введение топотекана и **OL9-119** приводило к развитию деструктивных процессов в опухоли, которые выражались в появлении клеток, в которых липидные капли занимали почти всю цитоплазму, а также в повышенном накоплении

клеточного детрита, отсутствовавшего в образцах после введения каждого из препаратов по отдельности [14]. В настоящей работе мы изучили уровень накопления повреждений ДНК в присутствии **OL9-119** в монорежиме и в комбинации с топотеканом, а также влияние этого соединения на проапоптотический эффект топотекана.

Для изучения влияния **OL9-119** на накопление повреждений ДНК под действием топотекана использовали культуру клеток HeLa (рак шейки матки). Количество повреждений оценивали с помощью метода ДНК-комет в щелочных условиях [15]. Метод широко используется для оценки генотоксической и канцерогенной активности различных агентов. Время инкубации клеток с препаратами составляло 1 ч, и было выбрано на основании проведенных предварительных экспериментов (данные не приведены).

Для изучения влияния соединения **OL9-119** на накопление повреждений ДНК под действием топотекана были выбраны две концентрации **OL9-119**: 5 мкМ и 20 мкМ на основании величины CC_{50} (концентрация вещества, приводящая к гибели половины клеток). Величина CC_{50} для соединения **OL9-119** на клеточной линии HeLa 9.7 мкМ, т.е. первая концентрация примерно в 2 раза ниже CC_{50} , вторая примерно в 2 раза выше. Полученные результаты приведены на рис. 1. Контрольные образцы клеток HeLa, инкубированные с 1% ДМСО в течение 1 ч, содержали незначительное количество поврежденной ДНК: 3.8%. При инкубации клеток с соединением **OL9-119** в концентрациях 5 и 20 мкМ количество поврежденной ДНК выросло до 8.6 и 9.7% соответственно (табл. 1, рис. 1), что значимо отличалось (p -value < 0.05) от клеток, инкубированных с 1% ДМСО. Инкубация клеток с топотеканом в 5 мкМ концентрации (в присутствии 1% ДМСО) приводила к увеличению количества поврежденной ДНК до 14.2%.

В случае совместного применения топотекана и **OL9-119** количество поврежденной ДНК значимо росло по сравнению с применением одного топотекана с 14.2 до 28%, но не зависело от концентрации ингибитора Tdp1. Количество повреждений ДНК, вызванное совместным применением топотекана с **OL9-119**, было выше при использовании **OL9-119** в концентрации 5 мкМ (27.9%), чем при использовании **OL9-119** в концентрации 20 мкМ (25.5%).

Таким образом, было показано, что совместное использование топотекана с ингибитором Tdp1 **OL9-119** усиливает ДНК-повреждающее действие топотекана. Это может быть использовано для повышения эффективности противопухолевой терапии и/или для снижения дозы топотекана и, следовательно, тяжести побочных эффектов от действия препарата.

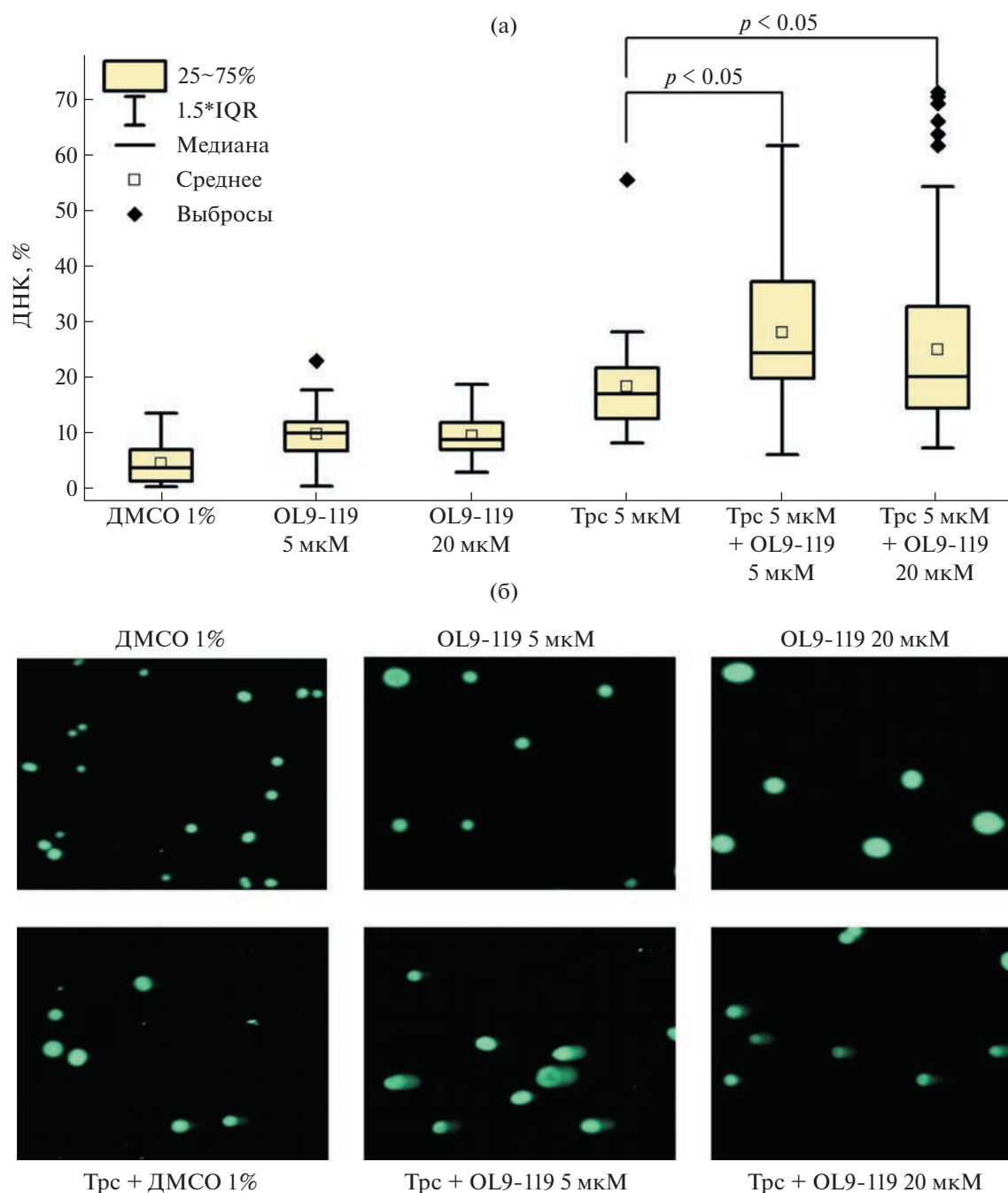


Рис. 1. Соединение **OL9-119** увеличивает число повреждений ДНК, вызванных топотеканом. (а) Данные статистической обработки экспериментов по изучению влияния соединения **OL9-119** в различных концентрациях на действие топотекана. (б) Примеры изображений ДНК-комет, полученных с использованием флуоресцентной микроскопии.

Одной из проблем при лечении онкологических заболеваний является неспецифическая высокая токсичность антираковых препаратов, обусловленная, в том числе, некротическим механизмом гибели клеток. Побочным эффектом механизма действия таких препаратов является развитие воспалительных реакций и интоксикации. К предпочтительным механизмам воздей-

ствия на опухолевые клетки, в отличие от некроза, относится индукция апоптоза — естественного пути гибели клеток [16]. Многие из используемых в клинике противораковых препаратов приводят к клеточной гибели путем апоптоза, в том числе камптотектин и его производные иринотекан и топотекан [12].

Таблица 2. Процент клеток, находящихся на различной стадии клеточной гибели, вызванной применением **OL9-119** как отдельно, так и в комбинации с топотеканом

Группа	Q1 (некроз)	Q2 (поздний апоптоз)	Q3 (живые клетки)	Q4 (ранний апоптоз)
Контроль	5.8 ± 0.4	13.4 ± 1.07	76.4 ± 5.3	4.3 ± 0.7
OL9-119 5 мкМ	4.6 ± 0.6	18.7 ± 1.1	67.3 ± 8.8	9.4 ± 0.6
OL9-119 20 мкМ	4.2 ± 0.2	17.4 ± 2	69.2 ± 7.6	9.3 ± 1.2
Трс 2 мкМ	4.9 ± 0.3	26.4 ± 3.2	64.5 ± 6.4	4.2 ± 0.6
Трс 5 мкМ	13.1 ± 0.8	37.3 ± 5.2	44.3 ± 5.3	5.2 ± 0.3
Трс 2 мкМ + OL9-119 5 мкМ	14.4 ± 1.4	53.1 ± 4.4	28.9 ± 4.0	3.5 ± 0.5
Трс 2 мкМ + OL9-119 20 мкМ	12.3 ± 1.1	50.1 ± 6.0	32.8 ± 4.6	4.8 ± 0.5
Трс 5 мкМ + OL9-119 5 мкМ	15.9 ± 1.3	50.0 ± 4	29.5 ± 1.5	4.6 ± 0.8
Трс 5 мкМ + OL9-119 20 мкМ	10.2 ± 1.1	54.3 ± 5.4	30.8 ± 4.6	4.7 ± 0.6

Тип клеточной гибели при совместном применении **OL9-119** и топотекана исследовали методом проточной цитометрии с окрашиванием клеток Аннексином V-FITC и пропидий йодидом (PI). Совместное использование Аннексина V и PI позволяет разделить клетки на живые клетки (AnV-/PI-), ранние апоптотические клетки (AnV+/PI-), поздние апоптотические клетки (AnV+/PI+) и некротические клетки (AnV-/PI+) [17].

Для анализа проапоптотического действия **OL9-119** были выбраны две концентрации этого соединения 5 и 20 мкМ. Величина CC_{50} соединения **OL9-119** на клеточной линии MCF-7 была определена равной 9.3 мкМ, первая концентрация примерно в 2 раза ниже CC_{50} , вторая – примерно в 2 раза выше. Также были выбраны две концентрации топотекана – 2 и 5 мкМ. Величина CC_{50} топотекана для клеточной линии MCF-7 около 5 мкМ, первая концентрация в 2.5 раза ниже CC_{50} , вторая равна CC_{50} . Время инкубации клеток с соединениями было выбрано на основании развития морфологических изменений в клетках, через 4 и 8 ч при данных концентрациях **OL9-119** и топотекана морфологических изменений не наблюдалось. Через 24 ч наблюдалось множество клеток с деформированными контурами, открепленных от подложки (данные не приведены). На основании этого время инкубации было выбрано равным 14 ч.

Контрольные клетки, инкубированные с 1% ДМСО в течение 14 ч, содержали 75% живых клеток, 4% клеток в стадии раннего апоптоза, 13.4% клеток в стадии позднего апоптоза и 5.8% клеток

в стадии некроза (рис. 2, табл. 2). При инкубации клеток с топотеканом в концентрациях 2 и 5 мкМ популяция клеток в стадии раннего апоптоза практически не изменялась по сравнению с контрольной группой клеток. При инкубации клеток с топотеканом в концентрации 2 мкМ популяция клеток в стадии позднего апоптоза увеличилась до 26%, что в два раза выше по сравнению с контрольной группой клеток. При инкубации клеток с топотеканом в концентрации 5 мкМ популяция поздних апоптотических клеток увеличилась до 37.3%, что втрое выше по сравнению с контрольной группой клеток. Также до 13% (p -value < 0.05) увеличивалась популяция некротических клеток при инкубации клеток с 5 мкМ топотеканом, что в два раза больше по сравнению с контрольной группой.

Инкубация клеток с **OL9-119** в концентрациях 5 и 20 мкМ приводила к увеличению популяции клеток с признаками раннего апоптоза до 9%, что на 5% больше, чем в контрольной группе. Популяция клеток с признаками позднего апоптоза также увеличилась на 5%, по сравнению с контрольной группой и составила 18.7% для **OL9-119** в концентрации 5 мкМ и 17.4% для **OL9-119** в концентрации 20 мкМ. Популяция некротических клеток сравнима с контрольной группой при инкубации клеток с **OL9-119** в концентрации 5 и 20 мкМ. Следовательно, повышение концентрации ингибитора Tdp1 не приводило к значительному увеличению гибели клеток.

В результате совместного применения 2 мкМ топотекана и производного УК **OL9-119** в концентрациях 5 и 20 мкМ, популяция клеток в ста-

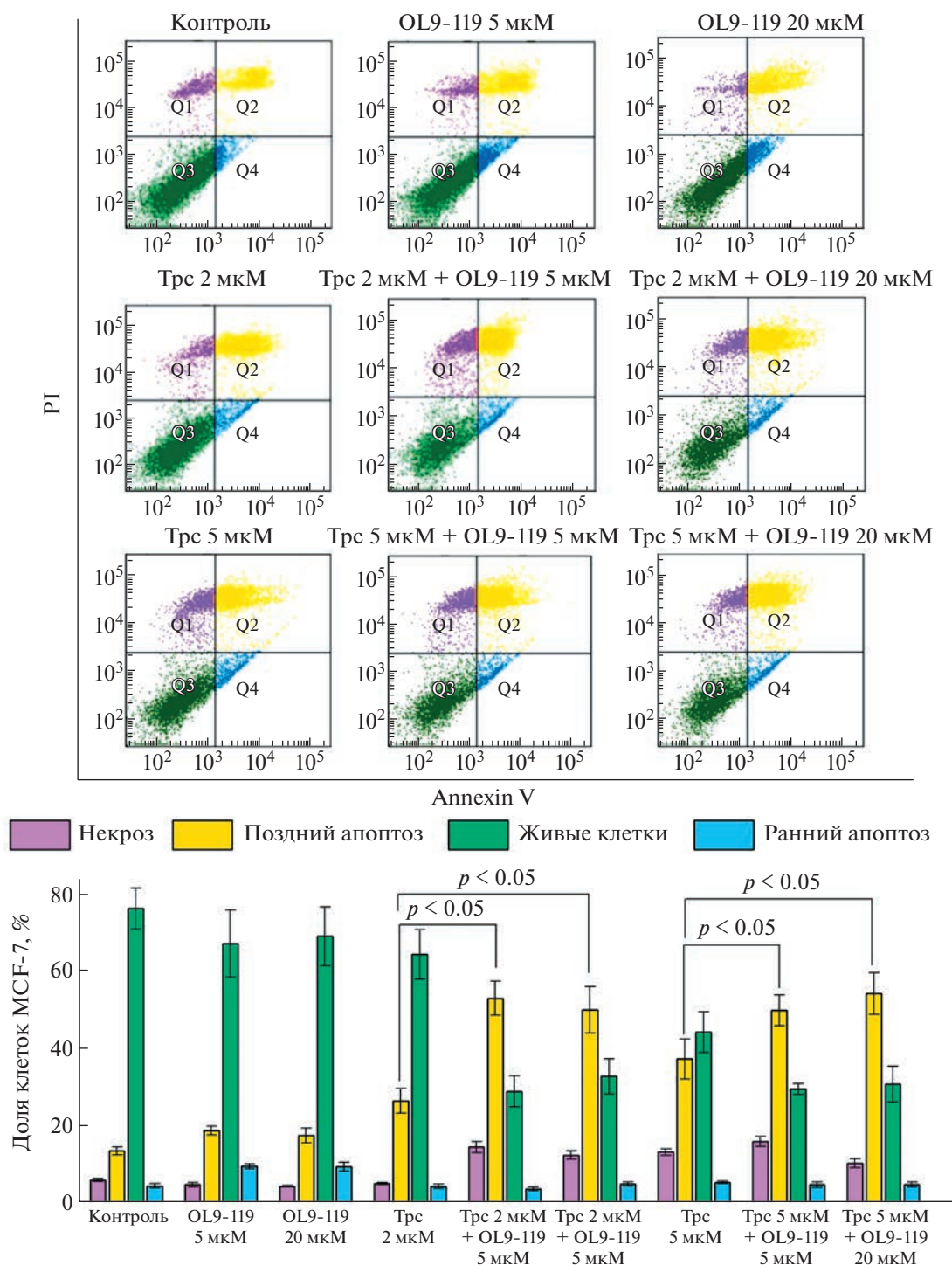


Рис. 2. Соединение **OL9-119** повышает уровень апоптоза в клетках MCF-7, вызванного топотеканом. Клетки инкубировали в течение 14 ч с топотеканом в концентрациях 2 и 5 мкМ, ингибитором Tdp1 в концентрациях 5 и 20 мкМ и их комбинацией, окрашивали FITC-аннексином V/PI и анализировали уровень апоптоза в клеточных популяциях с помощью проточной цитометрии. (а) Распределение популяций клеток по окраске FITC-аннексином V/PI. Q1 – (фиолетовый цвет) некротическая популяция, Q2 – (желтый цвет) популяция позднего апоптоза, Q3 (зеленый цвет) – живые клетки, Q4 (голубой цвет) – ранняя апоптотическая популяция. (б) Количественный анализ уровня апоптоза в клетках, обработанных ТРТ, **OL9-119** и их комбинацией.

дии позднего апоптоза увеличивалась до 53 и 50% соответственно. Это значимо выше по сравнению с использованием только 2 мкМ топотекана. Рост клеточной популяции в стадии позднего апоптоза составил 26% при совместной инкубации 2 мкМ топотекана и **OL9-119** в концентрации 5 мкМ, и 23% при совместной инкубации 2 мкМ топотекана и **OL9-119** в концентрации 20 мкМ. При повышении концентрации топотекана до 5 мкМ в присутствии ингибитора **OL9-119** в концентрациях 5 и 20 мкМ, популяция клеток в стадии позднего апоптоза увеличивалась до 50 и 54.3% соответственно. Рост популяции по сравнению с использованием только 5 мкМ топотекана составил 13% при совместной инкубации 5 мкМ топотекана и **OL9-119** в концентрации 5 мкМ и 17% при совместной инкубации 5 мкМ топотекана и **OL9-119** в концентрации 20 мкМ. Стоит отметить, что поздняя стадия апоптоза наступает, когда клеточная мембрана становится проницаемой, характеризуется фрагментацией ДНК и является необратимой фазой программируемой клеточной гибели.

Таким образом, повышение доли позднеапоптотических клеток под действием **OL9-119** позволяет сделать вывод, что совместное использование топотекана с ингибитором Tdp1 увеличивает эффективность топотекана в индукции апоптоза опухолевых клеток и позволяет использовать его в более низких концентрациях.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2020-773).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Comeaux E.Q., van Waardenburg R.C. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I resolves both naturally and chemically induced DNA adducts and its potential as a therapeutic target. // *Drug Metab. Rev.* 2014. V. 46. № 4. P. 494–507.
2. Yang S.W., Burgin A.B., Jr, HuiZenga, B.N., et al. A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996. V. 93. № 21. P. 11534–11539.
3. Staker B.L., Hjerrild K., Feese M.D., et al. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2002. V. 99. № 24. P. 15387–15392.
4. Pommier Y., Huang S.Y., Gao R., et al. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2) // *DNA Repair (Amst).* Elsevier B.V. 2014. V. 19. P. 114–129.
5. El-Khamisy S.F., Katyal S., Patel P., et al. Synergistic decrease of DNA single-strand break repair rates in mouse neural cells lacking both Tdp1 and aprataxin // *DNA Repair (Amst).* Elsevier. 2009. V. 8. № 6. P. 760–766.
6. Das B.B., Antony S., Gupta S., et al. Optimal function of the DNA repair enzyme TDP1 requires its phosphorylation by ATM and/or DNA-PK // *The EMBO Journal.* European Molecular Biology Organization. 2009. V. 28. № 23. P. 3667–3680.
7. Hirano R., Interthal H., Huang C., et al. Spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy: consequence of a Tdp1 recessive neomorphic mutation? // *The EMBO Journal.* John Wiley Sons, Ltd. 2007. V. 26. № 22. P. 4732–4743.
8. Katyal S., El-Khamisy S.F., Russell H.R., et al. TDP1 facilitates chromosomal single-strand break repair in neurons and is neuroprotective in vivo // *The EMBO Journal.* EMBO J. 2007. V. 26. № 22. P. 4720–4731.
9. Barthelmes H.U., Habermeyer M., Christensen M.O., et al. TDP1 overexpression in human cells counteracts DNA damage mediated by topoisomerases I and II // *J. Biol. Chem.* J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 53. P. 55618–55625.
10. Meisenberg C., Gilbert D.C., Chalmers A., et al. Clinical and cellular roles for TDP1 and TOP1 in modulating colorectal cancer response to irinotecan // *Mol. Cancer Ther.* 2015. V. 14. № 2. P. 575–585.
11. Brettrager E.J., van Waardenburg R.C. Targeting Tyrosyl-DNA phosphodiesterase I to enhance toxicity of phosphodiester linked DNA-adducts // *Cancer drug Resist.* Alhambra, Calif. 2019. V. 2. № 4. P. 1153–1163.
12. Thomas A., Pommier Y. Targeting Topoisomerase I in the Era of Precision Medicine // *Clin. Cancer Res.* 2019. V. 25. № 22. P. 6581–6589.
13. Zakharenko A.L., Luzina O.A., Sokolov D.N., et al. Novel tyrosyl-DNA phosphodiesterase I inhibitors enhance the therapeutic impact of topotecan on in vivo tumor models // *Eur. J. Med. Chem.* Elsevier Masson SAS. 2019. V. 161. P. 581–593.
14. Дырхеева Н.С., Захаренко А.Л., Новоселова Е.С., и др. Противоопухолевая активность комбинации топотекана и ингибитора Тирозил-ДНК-Фосфодиэстеразы 1 на модели асцитной карциномы Кребс-2 мыши // *Молекулярная биология.* 2021. Т. 55. № 2. С. 273–277.
15. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells // *Exp. Cell Res.* Exp. Cell Res. 1988. V. 175. № 1. P. 184–191.
16. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death // *Toxicologic Pathology.* Toxicol. Pathol. 2007. V. 35. № 4. P. 495–516.
17. Galluzzi L., Vitale I., Vacchelli E., et al. Cell death signaling and anticancer therapy // *Frontiers in Oncology.* Frontiers. 2011. V. 1. № 5. P. 1–18.
18. Crowley L.C., Marfell B.J., Scott A.P., et al. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry // *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016. 2016. V. 11.

INFLUENCE OF TYROSYL-DNA PHOSPHODIESTERASE 1 INHIBITOR ON THE PROAPOPTOTIC AND GENOTOXIC EFFECTS OF ANTICANCER AGENT TOPOTECAN

A. A. Chepanova^a, A. L. Zakharenko^a, N. S. Dyrkheeva^a, I. A. Chernyshova^a,
O. D. Zakharova^a, E. S. Ilina^a, O. A. Luzina^b, Corresponding Member of the RAS N. F. Salakhutdinov^b,
and Academician O. I. Lavrik^{a, #}

^a Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russian Federation

^b N.N. Vorozhtsov Novosibirsk Institute of Organic Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russian Federation

[#]e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

To date, various strategies have been proposed to increase the efficiency of cancer therapy. It is known that the action of DNA repair system can determine the resistance of cancer cells to DNA-damaging chemotherapy and radiotherapy, and one of these ways to increase therapeutic efficiency is the search for inhibitors of enzymes of the DNA repair system. Inhibition of the DNA repair enzyme tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (Tdp1) leads to an increase in the effectiveness of the topoisomerase 1 (Top1) inhibitor, the anticancer drug topotecan. Covalent complexes Top1-DNA, which are normally short-lived and are not a threat to the cell, are stabilized under the influence of topotecan and lead to cell death. Tdp1 eliminates such stabilized complexes and thus weaken the effect of topotecan therapy. We have previously shown that the use of the usnic acid hydrazonothiazole derivative **OL9-119** in combination with topotecan increased the antitumor and antimetastatic efficacy of the latter in a mouse model of Lewis lung carcinoma. In this work, it was shown that the combined use of topotecan and Tdp1 inhibitor, the hydrazonothiazole derivative of usnic acid **OL9-119**, leads to an increase in the DNA-damaging effect of topotecan which is used in the clinic for the treatment of cancer. The study of the proapoptotic effect of the compound **OL9-119** showed that the compound itself does not induce apoptosis, but increases the proapoptotic effect of topotecan. The results of the study could be used to improve the effectiveness of anticancer therapy and/or to reduce the therapeutic dose of topotecan and, therefore, the severity of side effects.

Keywords: tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1, Tdp1 inhibitor, topotecan, DNA repair