

*Р.А. Ковалёв, Т.А. Штам, Ф.М. Ибатулин, Г.Н. Бондарев, М.В. Филатов***ВОЗМОЖНОСТИ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ТЕРАПИИ
ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ НАПРАВЛЕННОСТИ
НА МОДЕЛЯХ IN VITRO**

ФГБУ «Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова», г. Гатчина

В последнее десятилетие всё большую популярность приобретает эпигенетическая терапия, основанная на использовании ингибиторов гистоновых деацетилаз (иГДАЦ). Некоторые простые вещества естественного происхождения, например, соли масляной (BuNa) или вальпроовой (VaNa) кислот обладают свойствами эпигенетических модуляторов и потенциально могут оказывать антипролиферативное действие на клетки опухолей. На примере ряда злокачественно трансформированных клеточных линий человека продемонстрирована способность BuNa и VaNa подавлять пролиферативную активность опухолевых клеток. Комбинированное воздействие радиотерапии с BuNa на злокачественные клетки увеличивает их чувствительность к облучению γ -радиацией. Ингибирование активности ГДАЦ в комбинации с цисплатиной и гемзаром значительно активирует гибель опухолевых клеток, инициированную цитостатиками. Проведен поиск и представлена характеристика новых иГДАЦ, в ряду которых найдены низкомолекулярные ингибиторы, обладающие высоким противоопухолевым потенциалом при низкой токсичности для клеток нормальной морфологии. Совокупность полученных данных указывает на потенциальную полезность использования простых иГДАЦ в монорежиме, а также в сенситализации злокачественных опухолей к некоторым видам терапии.

Ключевые слова: эпигенетическая терапия, ингибиторы гистоновых деацетилаз, бутират натрия, вальпроат натрия, гемзар, цисплатина, γ -облучение.

Одной из причин перерождения нормальных клеток в злокачественные является отклонение от нормы эпигенетического статуса клетки [1, 10]. Коррекция возникших эпигенетических нарушений может быть перспективным направлением борьбы со злокачественными новообразо-

ваниями и преодоления резистентности опухолей к действию химиотерапевтических препаратов [19]. Один из возможных способов эпигенетической регуляции генной экспрессии заключается в модификации ядерных белков, самым распространенным типом которой является их ацетилирование [13]. Степень ацетилирования гистонов и других белков определяется активностью двух типов ферментов—гистонацетилаз и деацетилаз. В нормальной клетке активность этих ферментов находится в некотором равновесии, однако, в опухолевых клетках зачастую наблюдается дисбаланс в сторону гиперактивности деацетилаз, результатом которого могут быть как структурные перестройки хроматина, так и прямые изменения активности онко-супрессорных генов и негативных регуляторов клеточного цикла [1, 13].

Обратимость процесса ацетилирования дает основание рассматривать его коррекцию как перспективную стратегию противоопухолевой терапии. Способ, базирующийся на подавлении деацетилаз, не исключено, является наиболее простым и доступным из эпигенетических подходов к лечению злокачественных опухолей [8]. Продemonстрировано, что иГДАЦ, многие из которых были выделены из естественных источников, способны подавлять пролиферацию, индуцировать дифференцировку и вызывать апоптоз трансформированных клеток [2, 17]. Одним из привлекающих внимание свойств этих эпигенетических модуляторов является их низкая токсичность, показанная в некоторых исследованиях [8, 14]. Кроме того, иГДАЦ могут быть использованы совместно с другими антиопухолевыми агентами. Существуют многочисленные указания на то, что данные соединения не только сами способны подавлять пролиферацию опухолевых клеток, но и делают их более чувствительными к различным схемам химио/радиотерапии [4-6]. В последнее время исследуется огромное количество химических соединений, обладающих функцией иГДАЦ [8]. Не-

которые простые вещества естественного происхождения, например, соли масляной (BuNa) и вальпроовой кислот (VaNa) также являются эпигенетическими модуляторами и потенциально могут оказывать антипролиферативное действие на клетки опухолей различного происхождения [12, 15].

В настоящей работе изучено влияние иГДАЦ, бутирата и вальпроата натрия на пролиферацию и жизнеспособность различных трансформированных клеточных линий человека. Кроме того, на ряде клеточных моделей удалось продемонстрировать, что сочетание эпигенетической и радио/химиотерапии оказывает значительно больший антипролиферативный эффект. Особое внимание было уделено поиску новых низкомолекулярных веществ со свойствами иГДАЦ, обладающих значительным противоопухолевым потенциалом при низкой токсичности, с их оценкой на морфологически неизмененных клетках в условиях *in vitro*.

Материалы и методы

Клеточные культуры и условия культивирования. Работа проведена на перевиваемых культурах злокачественно трансформированных клеток человека Hela (аденокарцинома шейки матки), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), HT1080 (фибросаркома), ECV-304 (трансформированные клетки эндотелия), глиома-Т и глиома-В (первичные культуры глиомных клеток, полученные в нашей лаборатории). В качестве нормальных клеток использовали эмбриональные фибробласты легкого человека (ФЛЭЧ) ранних пассажей. Клетки культивировали во флаконах Карреля в среде DMEM/F12 (Биолот) с добавлением 10%-ной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Биолот), без антибиотиков, в 5 % CO₂ атмосфере, при 37 °С.

Химический синтез новых иГДАЦ.

Бутиргидроксамовая кислота. К теплomu раствору гидрохлорида гидроксиламина (7.6 г, 0.11 моль) в 40 мл метанола прибавили раствор гидроксида калия (7.24 г, 0.11 моль) в 20 мл метанола. После охлаждения образовавшийся осадок хлорида калия отфильтровали и промыли на фильтре 10 мл метанола. К объединенному фильтрату добавили метиловый эфир масляной кислоты (11.4 мл, 0.1 моль) и реакционную смесь оставили при комнатной температуре на 4 час., после чего упарили при пониженном давлении. Остаток растворили в воде, раствор подкислили соляной кислотой до pH 2-3 и продукт экстрагировали этилацетатом (3 × 30 мл). Органические вытяжки сушили над безводным сульфатом натрия и упарили. Остаток закристаллизовался при стоянии. Выход продукта составил 8.9 г (87 %). Найдено, %: С, 46.70; Н, 8.63; N, 13.33. C₄H₉NO₂. Вычислено, %: С, 46.59; Н, 8.80; N, 13.58.

Калиевая соль адиподигидроксамовой кислоты. К теплomu раствору гидрохлорида гидроксиламина (16.7 г, 0.24 моль) в 80 мл метанола прибавили гидроксида калия (85%) (23.8 г, 0.36 моль) в 60 мл метанола. После охлаждения образовавшийся осадок хлорида калия отфильтровали и промыли на фильтре 20 мл метанола. К объединенному фильтрату добавили диметиловый эфир адипиновой кислоты (16.4 мл, 0.1 моль) и реакционную смесь оставили на 15 час. при комнатной температуре. Осадок отфильтровали и промыли на фильтре метанолом (3 × 20 мл). Продукт сушили на воздухе. Выход калиевой соли адиподигидрок-

самовой кислоты—12.6 г (59 %). Найдено, %: С, 3.54; Н, 5.09; N, 12.93. C₆H₁₁KN₂O₄. Вычислено, %: С, 33.63; Н, 5.17; N, 13.07.

Оценка пролиферативной активности клеток на фоне применения иГДАЦ. Клетки высаживались во флаконы Карреля по 50 × 10⁴ клеток на флакон. Для изучения пролиферативной активности клеток в условиях подавления клеточных деацетилаз, через 24 час. после посева, в культуральную среду добавляли BuNa (Sigma), фармакопейный препарат Депакин (VaNa) или различные вновь синтезированные иГДАЦ до конечной концентрации 1-10 мМ, после чего клетки инкубировали в среде содержащей иГДАЦ в течение различных промежутков времени (от 24 до 72 час.). Далее клетки переводили в суспензию раствором версенатрипсина (Биолот) и десятую долю клеток переносили во флаконы Карреля, содержащие новую полную культуральную среду, и культивировали в обычных условиях. Подсчет клеток проводили в момент достижения необработанными контрольными клетками максимальной плотности клеток на единицу площади поверхности культурального флакона (монослой), при этом их количество определялось как 100 %. Пролиферативную активность всех исследованных клеточных культур при воздействии иГДАЦ определяли не менее трех раз.

Оценку пролиферативной активности клеток при комбинированном воздействии ионизирующего излучения и BuNa проводили по следующей схеме: клетки высаживались во флаконы Карреля по 50 × 10⁴ клеток на флакон; введение в культуральную среду BuNa (10 мМ) осуществляли через 24 час. после посева; инкубировали клетки исследуемых линий с иГДАЦ в течение 24 час.; далее проводили облучение γ-радиацией в дозе 10 Грэй (¹³⁷Cs). Спустя 24 час. после облучения клетки рассевали в равных долях во флаконы, содержащие полную культуральную среду без добавок, и по достижении контрольными (необработанными) клетками монослоя производили подсчет клеток. Для сравнительного анализа в каждый опыт включали контрольные клетки, инкубированные при стандартных условиях, клетки, инкубированные с одним иГДАЦ, а также клетки, подвергнутые воздействию только ионизирующего излучения. Пролиферативную активность всех исследованных клеточных культур по описанной схеме определяли не менее трех раз.

Для исследования комбинированного воздействия иГДАЦ и химиотерапии использовали фармакопейные препараты цисплатина (платинол) и гемзар в концентрации 0.7 мкг/мл и 0.1 мкг/мл соответственно. Введение этих препаратов химиотерапии производили по истечении 48 час. инкубации исследуемых клеток с BuNa (5мМ). После 24 час. комбинированного воздействия цитостатиков и иГДАЦ клетки переводили в суспензию раствором версенатрипсина и переносили в равных долях во флаконы Карреля, содержащие полную культуральную среду. Далее культивировали при стандартных условиях. По достижении контрольными клетками монослоя производили подсчет количества клеток, принимая число необработанных клеток за 100 % и используя для подсчета не менее трех флаконов на точку.

Результаты и обсуждение

Влияние BuNa на жизнеспособность опухолевых клеточных линий. Воздействие BuNa на пролиферацию клеток линий HT1080, MCF-7, глиомы-В, глиомы-Т, Hela и ECV-304 оценивали по числу жизнеспособных клеток, выявляемому после инкубации с ингибитором в концентрациях 5 мМ и 10 мМ в течение различных проме-

жутков времени. Обнаружено, что BuNa с разной эффективностью подавляет пролиферацию злокачественно трансформированных клеток человека, а при длительной инкубации приводит к их гибели.

На рис. 1 представлены данные по выживаемости клеток, инкубированных с BuNa в концентрациях 5 мМ и 10 мМ в течение 72 час. После культивирования в присутствии BuNa (5 мМ) выживаемости клеток линий HT1080, MCF-7, глиомы-В, глиомы-Т, Hela и ECV-304 составила: 8 %, 11 %, 24 %, 25 %, 32 % и 50 % соответственно. При повышении концентрации BuNa (10 мМ) наблюдали значительное снижение жизнеспособности исследуемых клеток до 0.03%, 0.04%, 3%, 5%, 7% и 11%. При этом токсичность BuNa, определяемая по выживаемости ФЛЭЧ, была незначительной (рис. 1).

При анализе особенностей роста злокачественных клеток различной этиологии в условиях культивирования в среде с иГДАЦ исследованные клеточные линии распределили на две группы в зависимости от степени влияния BuNa на характер их роста. В первую группу включили линии MCF-7 и HT1080, длительная инкубация клеток которых с BuNa приводит к необратимому подавлению способности к пролиферации. Во вторую группу вошли первичные клеточные культуры глиального происхождения, а также перевиваемые линии Hela и ECV-304, клетки которых демонстрировали угнетение роста при инкубации с BuNa, однако число жизнеспособных клеток после длительного воздействия этого ингибитора (в концентрации 5 мМ) составляло более 20 %.

Бутират натрия как радиосенсибилизатор в анализе выживаемости трансформированных клеток in vitro. Комбинация эпигенетической и лучевой терапии была изучена на клетках пяти злокачественно трансформированных линий различной этиологии. На рис. 2 представлены результаты экспериментов. Выживаемость клеток линий HT1080, MCF-7, глиомы-Т, Hela и ECV-304, как оказалось, составляет: после облучения—10 %, 13 %, 16 %, 9 % и 19 %; после инкубации в течение 48 час. в присутствии BuNa (10 мМ)—3 %, 5 %, 29 %, 45 % и 46 %; после облучения на фоне предварительного культивирования клеток в течение 24 час. в присутствии BuNa (10 мМ)—0.03 %, 0.01 %, 18 %, 1.5 % и 2 % соответственно.

Четыре из тестируемых клеточных линии (HT1080, MCF-7, Hela и ECV-304), инкубированных с BuNa до облучения, показали значительно более низкую выживаемость клеток, чем культуры без введения BuNa в культуральную среду, но облученные при идентичных условиях. Для клеток линии глиома-Т существенных

различий между двумя группами клеток (с или без BuNa) выявлено не было. Приведенные результаты свидетельствуют о том, что для большинства исследованных злокачественно трансформированных клеток эффективность радиационного воздействия значительно возрастает на фоне применения иГДАЦ. Этот факт позволяет сделать предположение, что BuNa при определенных условиях может действовать как радиосенсибилизатор опухолей.

Комплексное использование противоопухолевых препаратов химиотерапии и иГДАЦ. Оценка сочетанного воздействия иГДАЦ с химиотерапией проводилась для пяти опухолевых культур. В качестве моделей химиотерапии в данном исследовании использовали фармакопейные препараты гемзар и платинол. Полученные результаты представлены на рис. 3. Выживаемость клеток линий HT1080, MCF-7, глиомы-В, глиомы-Т и Hela в этом случае составила: при инкубации в присутствии гемзара (0.1 мкг/мл, 24 час.)—15 %, 29 %, 32 %, 34 % и 58 %; при добавлении в культуральную среду платинола (0.7 мкг/мл, 24 час.)—15 %, 29 %, 30 %, 7.5 % и 13 %; при инкубации в присутствии BuNa (5 мМ, 72 ч.)—8 %, 11 %, 24 %, 25 % и 32 %; при инкубации в присутствии гемзара (0.1 мкг/мл, 24 час.) в комбинации с BuNa (5 мМ, 72 ч.)—1 %, 4.5 %, 15 %, 16 % и 26 %; при применении платинола (0.7 мкг/мл, 24 час.) на фоне BuNa (5 мМ, 72 час.)—1 %, 6 %, 7.5 %, 3.8 % и 5 % соответственно. В целом, использование BuNa совместно с препаратами противоопухолевой химиотерапии приводит к увеличению гибели всех исследованных трансформированных клеток. Эти результаты дают основание полагать, что для достижения одинакового терапевтического эффекта при вышеуказанных концентрациях иГДАЦ, требуемая доза цитостатиков может быть уменьшена в несколько раз.

Влияние ингибитора деацетилаз VaNa на жизнеспособность опухолевых клеточных линий.

Депакин (VaNa)—лекарственное средство из группы противоэпилептических препаратов, как и описанный выше BuNa, является иГДАЦ. Выраженная противоопухолевая активность VaNa отмечалась ранее в некоторых исследованиях [11, 15]. В настоящей работе представлены сравнительные данные по злокачественно трансформированным клеточным линиям. Для эксперимента были взяты самые чувствительные к BuNa клеточные линии—HT1080 и MCF-7 и одна из слабо чувствительных культур—Hela. Внесение VaNa в культуральную среду приводило к значительному подавлению пролиферации всех исследованных злокачественных клеток. Рис. 4 характеризует выживаемость трансформированных

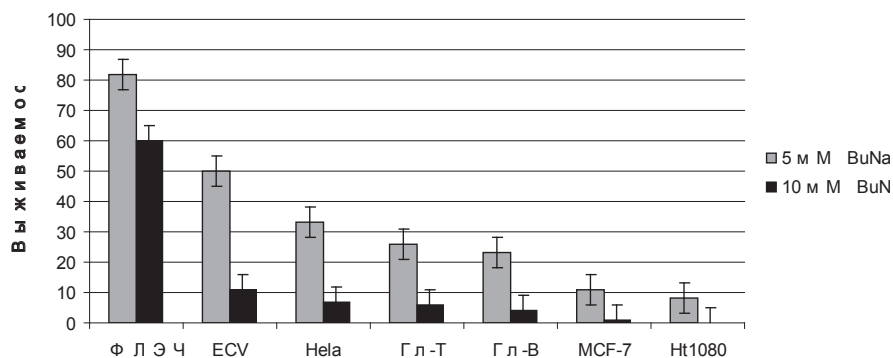


Рис. 1. Выживаемость нормальных эмбриональных фибробластов легкого человека (ФЛЭЧ), а также злокачественно трансформированных клеточных линий Ht1080, MCF-7, глиомы-В, глиомы-Т, Hela и ECV304 при инкубации в присутствии BuNa в концентрациях 5 мМ и 10 мМ в течение 72 ч

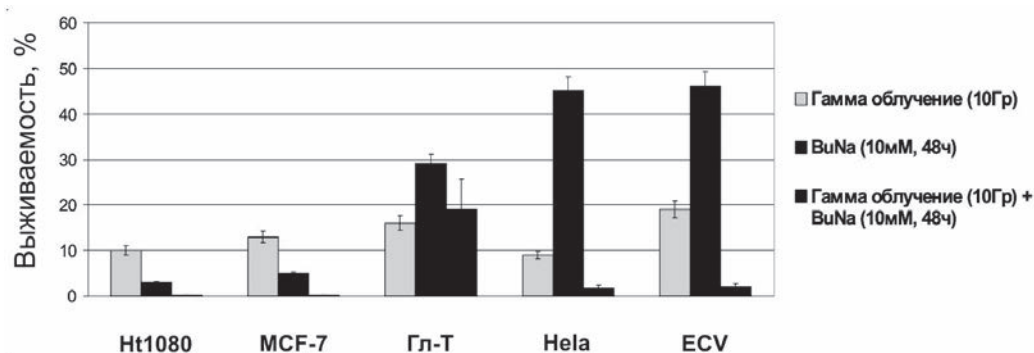


Рис. 2. Сравнение выживаемости злокачественно трансформированных клеток линий Ht1080, MCF-7, глиомы-Т, Hela и ECV-304 после применения бутирата натрия (10 мМ, 48 ч), -облучения (10 Гр) и их комбинации

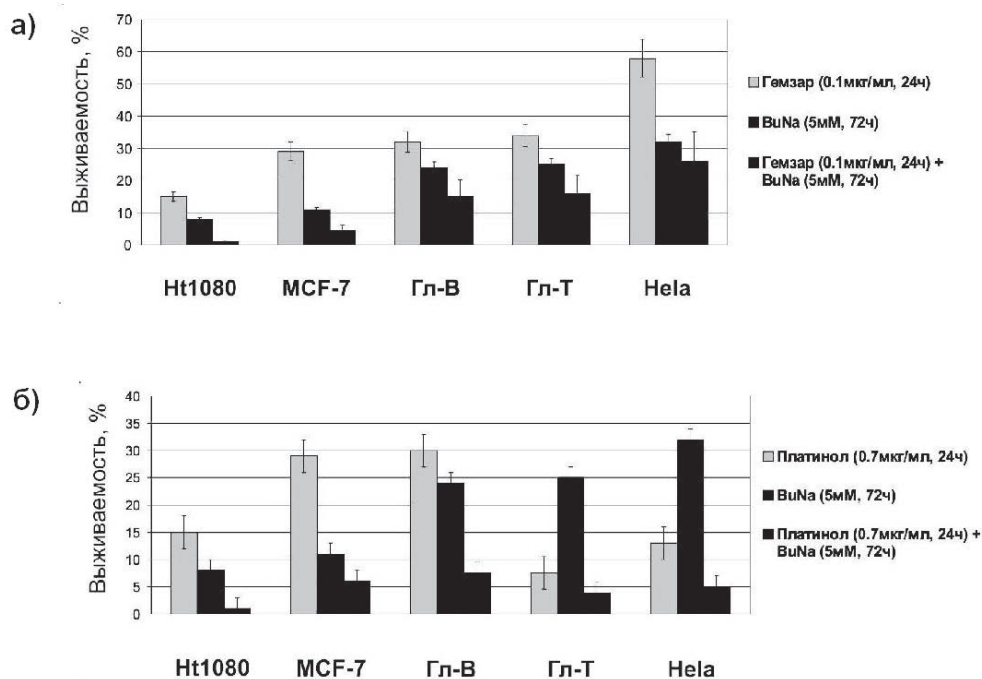


Рис. 3. Комбинированное воздействие химиотерапевтических препаратов «Гемзар» (а) или «Платинол» (б) и бутирата натрия на клетки опухолевых линий Ht1080, MCF-7, глиома-В, глиома-Т и Hela

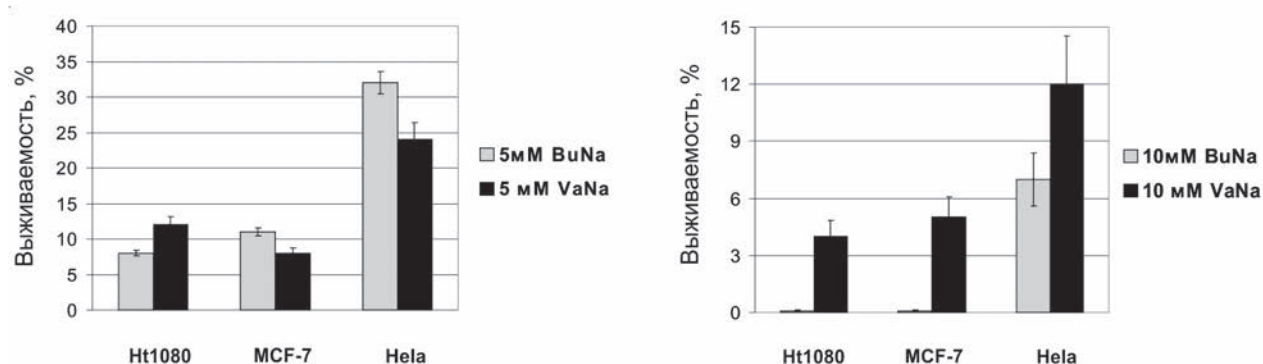


Рис. 4. Сравнение выживаемости злокачественно трансформированных клеток линий HT1080, MCF-7 и Hela после применения бутирата и вальпроата натрия (фармокопейный препарат «Депакин») в концентрациях 5 мМ и 10 мМ в течение 72 ч

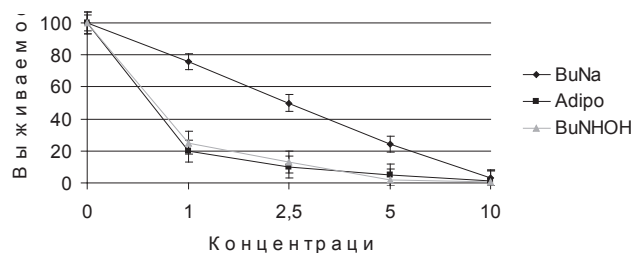
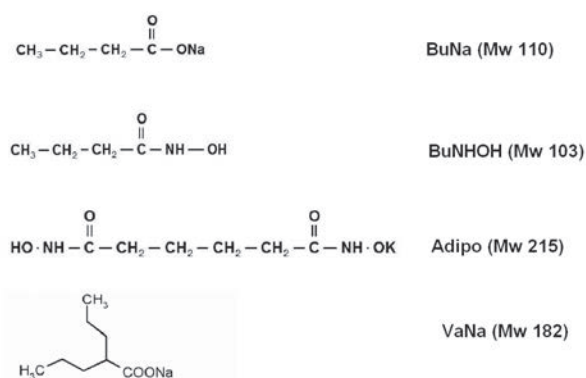


Рис. 5. Химические формулы бутирата (BuNa) и вальпроата (VaNa) натрия, а также синтезированных ингибиторов гистоновых деацетилаз (BuNHON и Adipo), полученных на основе масляной и адипиновой кислот

Рис. 7. Дозовые кривые выживаемости клеток линии глиома-В при инкубации их в течение 72 ч в присутствии BuNa или вновь синтезированных ингибиторов гистоновых деацетилаз Adipo и BuNHON

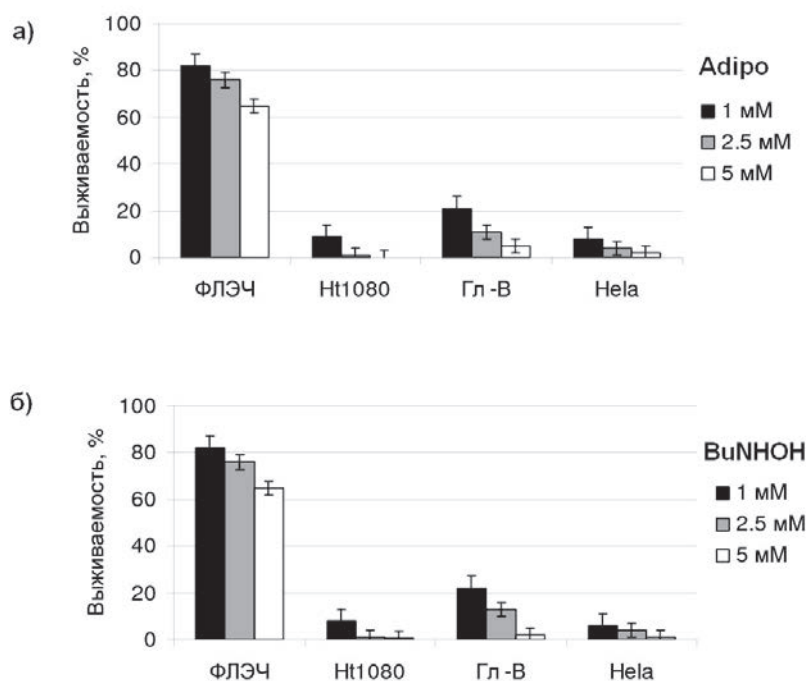


Рис. 6. Выживаемость нормальных эмбриональных фибробластов легкого человека и злокачественно трансформированных клеток HT1080, глиома-В и Hela после инкубации в течение 72 ч в присутствии синтезированных ингибиторов гистоновых ацетилаз Adipo (а) и BuNHON (б) в концентрациях 1 мМ, 2,5 мМ и 5 мМ

клеток в зависимости от концентрации VaNa, внесенного в культуральную среду. Так, через 72 час. после добавления VaNa (5 мМ) выживаемость клеток линий HT1080, MCF-7 и Hela составила 12 %, 8 % и 24 % соответственно. При повышении концентрации VaNa до 10 мМ этот показатель снижался и составил для клеток линии HT1080—4%, MCF-7—5% и Hela—12%. При этом не наблюдали значительной потери жизнеспособности ФЛЭЧ, использованных в качестве нормальных клеток (данные не представлены).

Результаты сравнительной оценки эффективности применения BuNa и VaNa позволили заключить. Что уровень антипролиферативного эффекта иГДАЦ в монорежиме (в концентрации 5мМ) при инкубации клеток линий 1-ой группы составляет 5-12%, а второй группы—24-32%; существенной разницы между этими двумя препаратами не наблюдалось (рис. 4). Однако, при использовании более высокой концентрации ингибиторов (10 мМ) клетки наиболее чувствительных линий (HT1080 и MCF-7) необратимо теряют способность к пролиферации при длительной инкубации с BuNa, тогда как аналогичное воздействие на них VaNa приводит к менее выраженной клеточной гибели. При этом выживаемость и жизнеспособность клеток линии Hela в присутствии BuNa или VaNa отличается незначительно. Следует заметить, что обладая выраженной противоопухолевой активностью при использовании в монорежиме, и BuNa, и VaNa оказывают значительно меньшее повреждающее действие на нормальные клетки.

Оценка эффективности новых ингибиторов гистоновых деацетилаз. В задачи данной работы входили поиск и разработка новых более действенных соединений из семейства иГДАЦ, обладающих умеренным негативным воздействием на нормальные клетки. Анализируя структуру описанных ранее веществ данного класса, а также учитывая структуру каталитического центра гистоновых деацетилаз, нами была предпринята попытка создания новых соединений, обладающих высоким сродством к ГДАЦ. В результате синтеза более 30 различных органических водорастворимых веществ, удалось выделить два вещества, не проявляющих токсичности к нормальным клеткам, но обладающих выраженным антипролиферативным действием на трансформированные клетки. Химические формулы синтезированных иГДАЦ—бутиргидроксамовой кислоты (BuNHOH) и калиевой соли адиподи-гидроксамовой кислоты (Adipo), полученных на основе масляной и адипиновой кислот представлены на рис. 5.

Оба новых соединения оказались значительно эффективнее BuNa даже при их введении в куль-

туральную среду в более низких концентрациях. Так, после культивирования в присутствии BuNHOH (1 мМ) в течение 72 час. выживаемость злокачественных клеток линий HT1080, глиомы-В и Hela составляла 8 %, 22 % и 6 % соответственно. При повышении концентрации BuNHOH до 5 мМ наблюдалось значительное снижение выживаемости исследуемых клеток, которая для всех трех культур составляла менее 5 % (рис. 6).

При этом токсичность BuNHOH, определяемая по жизнеспособности ФЛЭЧ, была незначительной. Выживаемость клеток линий HT1080, глиома-В и Hela после инкубации в течение 72 час. в присутствии Adipo (1мМ) составляет 9 %, 20 % и 8 % соответственно (рис. 6). При повышении концентрации Adipo до 5 мМ выживаемость исследованных злокачественных клеток падает и составляет для клеток линии HT1080—0.1 %, глиома-В—5 % и Hela—2 %. В то же время, культивирование в присутствии Adipo (5 мМ) нормальных фибробластов в течение 72-96 час. не приводило к заметной токсичности, при том, что данная концентрация препарата оказывалась критичной для всех исследованных трансформированных клеток.

Сравнение эффективности синтезированных ингибиторов и BuNa на примере клеток линии глиома-В представлено в виде дозовых кривых на рис. 7. Экспериментальные данные показали, что и BuNHOH и Adipo имеют выраженную антипролиферативную активность уже в концентрации 1 мМ, в то время как аналогичное снижение выживаемости злокачественных клеток наблюдается в присутствии BuNa в концентрации 5 мМ. Таким образом, поскольку эффективного торможения процесса пролиферации опухолевых клеток удалось достичь даже при более низких дозах BuNHOH и Adipo, можно говорить о том, что вновь синтезированные ингибиторы ГДАЦ эффективнее BuNa по концентрации в 5 и более раз.

Обсуждая полученные результаты и проблему в целом, следует отметить, что в большинстве злокачественных опухолей человека нарушен процесс ацетилирования из-за высокой активности деацетилаз [10, 19]. Наиболее простым и доступным из эпигенетических подходов лечения злокачественных опухолей представляется способ, базирующийся на подавлении этих ферментов. В последние годы большое число лабораторий занимается изучением роли деацетилаз в канцерогенезе и разработкой их ингибиторов, которые эффективны для остановки роста клеток и селективно вызывают апоптоз или гибель опухолевых клеток [17]. Первое поколение таких лекарственных препаратов проходит клинические испытания [3].

Интересно, что вещества, подавляющие активность деацетилаз и могущие обладать противоопухолевым эффектом, — не обязательно принципиально новые химические соединения. Так, существуют доступные лекарственные препараты, обладающие описываемым действием, которые до настоящего времени применялись с другой целью, например, депакин (VaNa)—противоэпилептический препарат широкого спектра действия. Более того, некоторые простые вещества естественного происхождения, например BuNa, которые, по существу не являются лекарствами, а, скорее, пищевыми добавками, тоже входят в группу иГДАЦ и могут представлять собой некий инструмент, позволяющий воздействовать на жизненно важные для опухолевой клетки процессы [3, 11].

Данные, полученные нашей лабораторией, полностью укладываются в рамки современных представлений об эпигенетических подходах к лечению опухолевых заболеваний различной локализации [5, 8, 19]. Так, в этом исследовании на примере ряда клеточных моделей опухолей разного происхождения удалось продемонстрировать антипролиферативный эффект BuNa и VaNa. Однако, даже среди относительно небольшого набора клеточных культур мы выявили линии, демонстрирующие высокую чувствительность к монотерапии эпигенетической направленности, в то время как для большинства исследованных опухолевых клеток воздействие иГДАЦ вызывало лишь некоторое снижение темпа роста. Тем не менее, проведенное нами исследование набора различных опухолевых линий, даёт возможность оценки эффективности применения иГДАЦ в отношении воздействия на злокачественные опухоли.

В течение многих лет стандарты терапии в онкологии основаны на хирургии, радиотерапии и химиотерапии, применяемых отдельно или в комбинациях. Радиотерапия позволяет уничтожать как клетки первичного опухолевого очага, так и метастазов, но для эрадикации всех опухолевых клеток безопасной дозы может оказаться недостаточно; в то же время, увеличение доз может вызывать поражение не только опухолевых, но и чувствительных к этим методам здоровых клеток. Главными факторами, ограничивающими применение химиотерапии, являются её токсичность и существование множественной лекарственной устойчивости. Особенности мишеней иГДАЦ, механизм их действия, а также продемонстрированная в ряде исследований, в том числе и в данном, низкая токсичность эпигенетических модуляторов предполагают возможность эффективного сочетания эпигенетического подхода со стандартной терапией, что, потенциально, должно улучшить результаты

лечения злокачественных опухолей [4-7, 14, 18]. В настоящей работе нам удалось продемонстрировать, что чувствительность большинства исследованных трансформированных клеток к некоторым препаратам химиотерапии и ионизирующему излучению возрастает на фоне применения BuNa. Эти результаты дают основание полагать, что сочетание эпигенетической и химиотерапии/радиотерапии может в перспективе улучшить результаты лечения злокачественных новообразований.

На протяжении последних 15 лет эпигенетические подходы интенсивно разрабатываются в эксперименте с целью поиска новых потенциальных противоопухолевых агентов и внедрения их в клиническую практику [16, 18]. Результатом этого поиска явился синтез таких препаратов, как Vorinostat (SAHA), активно изучаемого в рамках II и III фаз клинических исследований или уже рекомендованного в качестве лечебного средства при некоторых видах онкологических заболеваний в ряде стран. Однако, несмотря на высокую эффективность SAHA, данный вид терапии часто демонстрирует некоторую токсичность и ряд побочных эффектов *in vivo* [9]. В связи с этим разработка новых иГДАЦ на основе естественных источников, обладающих умеренным негативным влиянием на нормальные клетки, остается по-прежнему актуальной. В данной работе были разработаны и синтезированы водорастворимые низкомолекулярные соединения, обладающие функциями иГДАЦ. Два из них, полученные на основе масляной и адипиновой кислот, продемонстрировали высокую антипролиферативную активность по отношению к трансформированным клеткам при низкой токсичности по отношению к морфологически неизменным клеткам. При этом дозовая эффективность подавления пролиферации опухолевых клеток новыми ингибиторами отличалась от BuNa и VaNa, как минимум, в несколько раз. В целом, представленные данные приводят к заключению, что эпигенетическая терапия, пока не позволяет заменить стандартные режимы химиотерапии, но может дать возможность существенно повысить эффективность лечения при использовании комбинированных подходов. Кроме того, разработка новых эпигенетических модуляторов открывает широкие возможности в поиске иГДАЦ, обладающих более сильным противоопухолевым потенциалом.

Работа выполнена при поддержке персонального гранта правительства Санкт-Петербурга Р.А. Ковалеву.

ЛИТЕРАТУРА

1. Чехун В.Ф. Эпигенетика рака // Онкология. -2008. - т.10. -№ 3.- С. 301-302.

2. Штам Т.А., Виноградская Г.Р., Волницкий А.В. и др. Эпигенетическая регуляция функционирования некоторых онкогенов и возможности ее практического использования // Клинико-лабораторный консилиум -2012. -Т. 1(41). -С.53-58.
3. Ai T, Cui H, Chen L. Multi-targeted histone deacetylase inhibitors in cancer therapy // *Curr Med Chem.* -2012. -Vol. 19(4). -P.475-487.
4. Bangert A., Hcker S., Cristofanon S. et al. Chemosensitization of glioblastoma cells by the histone deacetylase inhibitor MS275 // *Anticancer Drugs* -2011. -Vol. 22(6). -P.494-499.
5. Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy // *Cancer Lett.* -2008. -Vol. 269(1). -P.7-17.
6. Entin-Meer M, Yang X, VandenBerg SR et al. In vivo efficacy of a novel histone deacetylase inhibitor in combination with radiation for the treatment of gliomas // *Neuro Oncol.* -2007. -Vol. 9(2). -P.82-88.
7. Entin-Meer M., Rephaeli A., Yang X. et al. Butyric acid prodrugs are histone deacetylase inhibitors that show antineoplastic activity and radiosensitizing capacity in the treatment of malignant gliomas // *Mol Cancer Ther.* -2005. -Vol. 4(12). -P.1952-1961.
8. Gryder BE, Sodji QH, Oyeler AK. Targeted cancer therapy: giving histone deacetylase inhibitors all they need to succeed // *Future Med Chem.* -2012. -Vol. 4(4). -P.505-524.
9. Hrzenjak A, Moinfar F, Kremser ML et al. Histone deacetylase inhibitor vorinostat suppresses the growth of uterine sarcomas in vitro and in vivo // *Molecular Cancer* -2010. -Vol. 9.- P.49.
10. Kanwal R, Gupta S. Epigenetic modifications in cancer // *Clin Genet.* -2012. -Vol. 81(4). -P.303-311.
11. Kawano T, Akiyama M, Agawa-Ohta M. et al. Histone deacetylase inhibitors valproic acid and depsipeptide sensitize retinoblastoma cells to radiotherapy by increasing H2AX phosphorylation and p53 acetylation-phosphorylation // *Int J Oncol.* -2010. -Vol. 37(4). -P.787-795.
12. Kim E. H., Kim H. S., Kim S. U. et al. Sodium butyrate sensitizes human glioma cells to TRAIL-mediated apoptosis through inhibition of Cdc2 and the subsequent downregulation of survivin and XIAP // *Oncogene* -2005. -Vol. 24(46). -P.6877-6889.
13. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell.* -2007. -Vol. 128(4). -P.693-705.
14. Lee J. H., Choy M L., Ngo L. et al. Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair // *Proc Natl Acad Sci U S A.* -2010. -Vol. 107(33). -P.14639-14644.
15. Masoudi A, Eloppe M, Amini E et al. Influence of valproic acid on outcome of high-grade gliomas in children // *Anticancer Res.* -2008. -Vol. 28(4C). -P.2437-2442.
16. Pan H, Cao J, Xu W. Selective histone deacetylase inhibitors // *Anticancer Agents Med Chem.* -2012. -Vol. 12(3). -P.247-257.
17. Shankar S, Srivastava RK. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis // *Adv Exp Med Biol.* -2008. -Vol. 615. -P.261-298.
18. Xu Y, Jiang Z, Yin P et al. Role for Class I histone deacetylases in multidrug resistance. // *Exp Cell Res.* -2012. -Vol. 318(3). -P.177-186.
19. Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future // *Nat Rev Drug Discov.* -2006. Vol. 5(1).- P. 37-50.

*R.A. Kovalev, T.A. Shtam, F.M. Ibatullin,
G.N. Bondarev, M.V. Filatov*

In vitro potential of histone deacetylase inhibitors for anticancer therapy

Nuclear Physics Institute, Saint-Petersburg

Research during the past decade has shown that epigenetic events have a key role in carcinogenesis and tumour progression. Histone deacetylase inhibitors (HDACi) comprise structurally diverse compounds that are a group of targeted epigenetic anticancer agents. Here we explored the in vitro efficacy of HDACi such as sodium butyrate (BuNa), valproic acid (VaNa) and several novel HDAC inhibitors for the treatment of cancer. Both BuNa and VaNa inhibited cancer cell proliferation in a time—and dose-dependent fashion. In the present study we demonstrated the significant effect of two novel HDACi, Adipo or BuNHOH, able to induce apoptosis of cancer cells, but not of normal line. Since HDAC inhibitors have been proposed as radio—or chemosensitizers in cancer therapy, we have studied the radiosensitizing effect of sodium butyrate on cancer cells. The combination of BuNa and radiation significantly inhibited tumor cell growth. Besides, combining Cisplatin or Gemzar with HDAC inhibitors results in synergistic antiproliferative activity that could be therapeutically exploited. These results suggest that HDACi acts as an antitumor agent and that combining HDAC inhibitors with radio or—chemotherapeutic treatment of cancers insensitive to traditional antitumor agents.