

На правах рукописи

ХАН ИРИНА ИГОРЕВНА

**ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ
АКТИВНОСТЬ АЛСЕВИРОНА – НОВОГО ИНГИБИТОРА CYP17A1**

03.01.04 – Биохимия

14.01.12 – Онкология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2022

Работа выполнена на кафедре биохимии им. акад. Т.Т. Березова Медицинского института ФГАОУ ВО "Российский университет дружбы народов".

Научный руководитель

Покровский Вадим Сергеевич

доктор медицинских наук, доцент, заведующий кафедрой биохимии им. им. акад. Т.Т. Березова Медицинского института ФГАОУ ВО "Российский университет дружбы народов".

Официальные оппоненты

Балакин Константин Валерьевич

доктор химических наук, доцент, ведущий научный сотрудник научно-образовательного центра фармацевтики; ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет"

Немцова Елена Романовна

доктор биологических наук, Лауреат премии Правительства РФ, ведущий научный сотрудник отделения экспериментальной фармакологии и токсикологии МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России

Морозкина Светлана Николаевна

кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник научно-исследовательского центра биоинженерии ФГАОУ ВО «Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики»

Зашита состоится «24» июня 2022 года в 12:00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.015 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (РУДН) по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.8., зал №1 Медицинского института.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке РУДН по адресу: 117198, ул. Миклухо-Маклая, д.6.

Электронная версия автореферата и объявление о защите диссертации размещены на официальном сайте РУДН <http://dissovet.rudn.ru> и отправлены для размещения на официальном сайте ВАК при Минобрнауки России.

Автореферат разослан «24» мая 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета ПДС 0300.015

доктор биологических наук, профессор

Лукашева Е.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Рак предстательной железы (РПЖ) является вторым по распространённости среди злокачественных новообразований, выявляемых у мужчин в развитых странах [A. Jemal, et al, 2011]. В большинстве случаев заболевание считают гормончувствительным, однако во многих случаях с течением времени развивается кастрационно-резистентная форма РПЖ (КРРПЖ), характеризующаяся низкой концентрацией андрогенов, которая при этом достаточна для активации андрогенных рецепторов (AR) и продолжения опухолевого роста [A. Buhmeida, et al, 2006]. Эффективная терапия КРРПЖ включает использование стероидных антиандрогенов, которые подавляют активность CYP17A1 — ключевого фермента синтеза андрогенов. Ингибиторы CYP17A1 изучаются в качестве потенциальных препаратов для терапии РПЖ, но в то же время обладают рядом недостатков, связанных с ингибированием синтеза не только андрогенов, но и гормонов коры надпочечников, низкой биодоступностью и ограниченной растворимостью в водных и масляных растворах. Поэтому разработка и исследование новых стероидных соединений с антиандрогенной активностью является одной из приоритетных задач медицинской химии, биохимии и экспериментальной онкологии.

Степень разработанности темы исследования. На сегодняшний день известные ингибиторы CYP17A1 по химической структуре можно разделить на стероидные и нестероидные. Наиболее известным ингибитором CYP17A1 можно считать стероидное соединение абираптерон, которое уже внедрено в клиническую практику [T. Goldberg, et al, 2013]. Абираптерон снижает активность CYP17A1 человека ($IC_{50}=73$ нМ), уровень простатспецифического антигена (ПСА) с 137,7 нг/мл до 128,8 нг/мл при применении в дозе 1 г в сутки после 28-дневного курса лечения [J.S. de Bono, et al, 2011] и концентрацию стероидных гормонов: тестостерона, эстрadiола, дегидроэпиандростерона и андростендиона в плазме крови. Другой стероидный ингибитор галетерон и его производные проявляют высокую антипролиферативную и противоопухолевую активность на культурах клеток и на моделях ксенографтов рака предстательной железы человека у иммунодефицитных мышей. Клинические исследования показывают, что применение галетерона в дозах 650–2600 мг в сутки на протяжении 12 нед способствовало снижению уровня ПСА более чем на 30%, а почти у 22,4% пациентов ПСА снижался более чем на 50% [R.B. Montgomery, et al, 2016].

Нестероидные ингибиторы, такие как ортеронел и ODM-204, по свойствам не уступают стероидным соединениям. Ингибиторы данной группы также способны снижать

уровень ПСА, стероидных гормонов [M. Hussain, et al, 2014; L. Manenschijn, et al, 2016; K.J. Peltola, et al, 2020].

В лаборатории синтеза физиологически активных соединений ИБМХ им. В.Н. Ореховича осуществлен синтез стероидных соединений, которые соответствуют требованиям фармакофора для ингибирования CYP17A1 [A.S. Latysheva, et al, 2020; V.A. Zolotsev, et al, 2018] на основе андростанового и 21-норпрегнанового скаффолдов. Соединения продемонстрировали способность к ингибированию CYP17A1 на уровне, сопоставимом с абиатероном [V.A. Zolotsev, et al, 2018]. В настоящей работе проведено исследование механизма действия и противоопухолевой активности нового ингибитора CYP17A1 алсевирона с целью создания на его основе лекарственного препарата для терапии РПЖ.

Цель исследования — изучение механизма противоопухолевого эффекта и антипролиферативной активности алсевирона ($2'-(E)-3\beta$ -гидроксиандрост-5-ен-17-илиден]метил}-4',5'-дигидро-1',3'-оксазол).

Задачи исследования:

1. Оценить способность алсевирона ингибировать CYP17A1.
2. Оценить влияние алсевирона на экспрессию CYP17A1 в культуре клеток РПЖ.
3. Оценить влияние алсевирона на экспрессию андрогенных рецепторов в культуре клеток РПЖ.
4. Изучить динамику изменения синтеза стероидных гормонов под действием алсевирона *in vivo* при многократном введении.
5. Оценить цитотоксическую активность алсевирона на культурах клеток РПЖ.
6. Изучить механизмы гибели опухолевых клеток под действием алсевирона под контролем изменения маркеров апоптоза.
7. Провести сравнительную оценку противоопухолевого эффекта алсевирона на моделях ксенографтов РПЖ человека у иммунодефицитных мышей.

Научная новизна исследования заключается в том, что:

1. Показана сопоставимая с абиатероном активность алсевирона при ингибировании CYP17A1. В концентрации 5 μ M алсевирон и абиатерон снижали активность CYP17A1 в testiculaх крыс на 85% и 83%, соответственно, а в концентрации 20 μ M — на 98% и 87%, соответственно.
2. В работе показано влияние алсевирона и абиатерона на экспрессию мРНК CYP17A1 в культурах клеток РПЖ 22Rv1 и DU145.
3. Выявленная способность алсевирона и абиатерона угнетать экспрессию гена AR позволяет предположить наличие дополнительного механизма противоопухолевой

активности, помимо ингибиования CYP17A1. Продемонстрирована возможность снижения уровня тестостерона в плазме крови мышей под действием многократного введения алсевирона и абиратерона.

4. На культурах клеток LNCaP, 22Rv1, DU145, PC3 продемонстрировано наличие цитотоксической активности алсевирона. IC50 при этом составили 35,9 μM , 23,8 μM , 22,9 μM и 82 μM для клеточных линий LNCaP, 22Rv1, DU145, PC3, соответственно.

5. Показано изменение маркеров апоптоза в культуре клеток DU-145 после инкубации с алсевироном или абиратероном при различных концентрациях (0,01–0,3 μM). Показано достоверное и дозозависимое увеличение количества клеток, связывающихся с аннексином V; клеток с активированными каспазами 3 и 7, снижение количества клеток, экспрессирующих антиапоптотический белок Bcl-2.

6. На модели ксеногraftов рака предстательной железы человека 22Rv1 показано наличие достоверного противоопухолевого эффекта алсевирона со значением ТРО_{max} = 59,5%.

Теоретическая и практическая значимость исследования заключаются в том, что описанные в работе проапоптотические, антиандрогенные, цитотоксические и противоопухолевые свойства алсевирона позволяют определить возможности и ограничения применения алсевирона как потенциального противоопухолевого агента. Результаты настоящего исследования *in vitro* и *in vivo* важны для оценки перспектив изучения и использования ингибиторов CYP17A1 в качестве препаратов для лекарственной терапии РПЖ. Результаты исследований также могут быть использованы при планировании экспериментальных исследований новых ингибиторов CYP17A1.

Методология и методы исследования. В работе были использованы методы биохимии и экспериментальной онкологии: изучение активности и экспрессии CYP17A1, определение концентрации стероидных гормонов в плазме крови мышей, изучение цитотоксической и противоопухолевой активности, оценка экспрессии маркеров апоптоза, оценка экспрессии генов андрогенных рецепторов, а также статистическая обработка полученных результатов.

Научные результаты, полученные лично автором, содержащие научную новизну, заключаются в следующих положениях, выносимых на защиту:

1. В концентрациях 5 μM и 20 μM алсевирон и абиратерон достоверно снижают активность CYP17A1. Снижение активности CYP17A1 частично обусловлено угнетением экспрессии мРНК CYP17A1 в культурах клеток РПЖ 22Rv1 и DU145.

2. Алсевирон способен снижать экспрессию *AR*, что позволяет считать его мультитаргетным агентом, механизм действия которого обусловлен не только ингибирированием CYP17A1.

3. Алсевирон и абиратерон при 10-кратном введении в дозе 300 мг/кг угнетают синтез тестостерона *in vivo*.

4. Алсевирон обладает высокой антиплиферативной и цитотоксической активностью в культурах клеток LNCaP, 22Rv1, DU145, PC3 (IC₅₀ составляют 35,9; 23,8; 22,9; и 82 μ M соответственно).

5. Клетки после воздействия алсевироном погибают по механизму апоптоза: увеличивается число клеток, связывающих аннексин V, активируются каспазы 3 и 7, снижается экспрессия Bcl-2. Апоптоз клеток, подвергшихся воздействию алсевироном, сопровождается двухцепочечными разрывами ДНК.

6. На модели ксенографтов рака предстательной железы человека 22Rv1 и DU145 алсевирон подавляет рост опухолей при ТРО=59,5% и 45,4% соответственно.

Степень достоверности. Достоверность результатов диссертационной работы подтверждается проведением достаточного количества экспериментов с использованием современных методов биохимии и экспериментальной онкологии. Полученные результаты обрабатывали статистическим анализом и интерпретировали с использованием современных методов статистической обработки информации и анализа данных. Результаты исследований проиллюстрированы диаграммами, графиками и отображены в таблицах.

Методы статистической обработки включали методы: описательной статистики нелинейной регрессии, сравнительные анализы с использованием параметрического критерия Стьюдента и непараметрического Манна-Уитни. Уровни значимости критериев Стьюдента и Манна-Уитни были установлены, равными 0,05.

Апробация результатов. Материалы диссертации доложены и обсуждены на следующих конференциях:

1. 26th Meeting of the EAU Section and Urological Research, Porto, 10-12 October 2019.
2. VIII Международный медицинский Конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2019», Санкт-Петербург, 4-6 декабря 2019 г.
3. Шестая Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии», Нижний Новгород, 27-30 сентября 2020 г.
4. Всероссийская научно-практическая конференция «Актуальные вопросы экспериментальной онкологии», Ростов-на-Дону, 29 сентября 2021 г.

5. Седьмая Междисциплинарная конференция «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии», Москва, 10-12 октября 2021 г.

6. Заседание Ученого совета НИИ ЭДИТО НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина МЗ РФ 9 ноября 2021 г.

Диссертационная работа апробирована на заседании кафедры биохимии им. акад. Т.Т. Березова Медицинского института Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования "Российский университет дружбы народов" (Протокол №2-5-2022 от 17.05.2022).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 107 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания применяемых в работе моделей и методов, 3 глав с описанием полученных результатов, главы с обсуждением полученных результатов, выводов, списка сокращений и списка литературы, включающего 195 источников, из них 12 работы российских авторов и 183 публикаций зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 16 рисунками и 14 таблицами.

Финансирование. Диссертационная работа была выполнена при финансовой поддержке грантов РНФ № 18-75-10008 (руководитель Покровский В.С.) и РФФИ «Аспиранты» № 20-315-90043 (руководитель Покровский В.С.).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Противоопухолевые агенты. Алсевирон был синтезирован в лаборатории синтеза физиологически активных соединений ИБМХ им. В.Н. Ореховича (руководитель Мишарин А.Ю.) по ранее разработанной методике. Субстанция абиратерона ацетата (Baoji Guokang Bio-Technology Co., Ltd, Китай) была использована в качестве положительного контроля. Для постановки опытов *in vitro* на культурах клеток РПЖ каждое соединение растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) для получения раствора со стоковой концентрацией 400 мкг/мл, затем полученный раствор разбавляли для достижения необходимых концентраций. Для изучения противоопухолевого эффекта *in vivo* алсевирон и абиратерон вводили мышам внутрижелудочно, предварительно препараты растворяли в оливковом масле, при этом конечная концентрация препарата составляла от 15 до 60 мг/мл. Для оценки влияния соединений на концентрацию стероидных гормонов в плазме крови мышей разбавления проводили аналогично, а концентрацию препаратов исследуемых соединений варьировали от 40 до 90 мг/мл.

Культуры клеток. В работе были использованы культуры клеток линий рака предстательной железы человека 22Rv1, LNCaP (гормончувствительные) и PC3, DU145 (гормоннечувствительные) (ATCC, Rockville, MD).

В работе были использованы следующие методики:

Ингибирование CYP17A1 изучали в гомогенате testикул крыс при концентрации исследуемых соединений 5 или 20 μM , измеряя концентрацию продуктов ферментативной реакции 17 α -гидроксипрогестерона и андростендиона. В качестве субстрата использовали прогестерон.

Экспрессию мРНК CYP17A1 и андрогеновых рецепторов ARVs (ARFL, ARv3, ARv7) изучали методом ОТ-ПЦР в реальном времени с предварительным выделением РНК из клеток линий DU145 и 22Rv1, инкубированных с алсевироном или абиатероном в концентрациях $\frac{1}{4}$ IC50. В работе были использованы наборы для выделения РНК (PureLink RNA mini kit («Thermo Fisher Scientific Inc.», США)), постановки обратной транскрипции (RevertAid RT Kit (Invitrogen, Grand Island, NY)) и ПЦР Platinum SYBR Green qPCR Supermix-UDG («Invitrogen»), а также соответствующие праймеры. Нормализацию экспрессии проводили по референсному гену 18S. Стандартные кривые эффективности были построены по разведению кДНК: 1:40, 1:80, 1:160, 1:320.

Концентрация тестостерона в плазме крови иммунокомпетентных мышей-самцов BDF1, получавших препараты 10-кратно в разовой дозе 300 мг/кг была измерена иммуноферментным анализом (ИФА) с использованием набора Тестостерон-ИФА (ООО «Хема», Россия).

Оценку цитотоксической активности проводили с помощью МТТ-теста на культурах клеток, инкубированных с исследуемыми соединениями в указанных концентрациях (0,003–0,3 mM) в течение 72 ч. Оценивали жизнеспособность клеток (% от контроля) в зависимости от концентрации соединений. Рассчитывали IC50 (концентрацию лекарственного средства, которая ингибировала рост клеток на 50%). Все эксперименты проводились в трех повторах.

Изменения экспрессии маркеров апоптоза изучали на клетках DU145 после инкубации с алсевироном или абиатероном в концентрациях (0,003–0,3 μM) с использованием клеточного анализатора Muse Cell Analyser и набора соответствующих реагентов Muse Detection Kits (Muse®, EMD Millipore Corporation, USA): Annexin V & Dead Cell Kit, Bcl-2 Activation Dual Detection Kit, Caspase-3/7 Kit, Multi-Color DNA Damage Kit. В каждом образце было проанализировано более 2000 клеток. Все эксперименты ставили в триплете.

Для оценки противоопухолевой активности проводили терапевтический опыт с использованием моделей подкожных ксеногraftов рака предстательной железы 22Rv1 и DU145 на иммунодефицитных мышах-самцах Balb/c nude. Лечение начинали при

достижении среднего объема опухолей ~ 80 мм³. Препараты вводили в течение 10 дней в разовых дозах 150 мг/кг или 300 мг/кг (суммарная доза составила 1,5 или 3,0 г/кг) в виде суспензии в оливковом масле. В контрольной группе мышам вводили оливковое масло в аналогичном режиме. Измерения опухолей проводили 2 раза в неделю, а объем опухолей считали по формуле: $V=\pi/6*(L*W*H)$, где L, W и H — три взаимно перпендикулярных измерения опухолевого узла. Эффективность терапии оценивали по показателям: торможение роста опухоли (ТРО), индекс прироста опухоли и переносимость терапии.

Методы статистической обработки включали методы нелинейной регрессии для анализа значения цитотоксичности IC50. Модель регрессии представляла собой зависимость ингибирования роста клеток рака предстательной железы от концентрации используемых агентов. Полученные значения представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение ($M\pm SD$). Для анализа использовано ПО Graphpad Prism version 4.0 for Windows. Для оценки изменений сигнальных путей апоптоза, оценки экспрессии CYP17A1, ARVs и определения концентрации тестостерона были проанализированы результаты трех независимых экспериментов для каждого показателя с использованием t-критерия Стьюдента для независимых выборок. Значения представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка ($M\pm SD$). Данные, полученные в экспериментах *in vivo*, анализировали методами описательной статистики. Сравнение с контрольной группой проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Значения представлены в виде среднего \pm стандартная ошибка ($M\pm SE$). Для анализа использована программная среда SPSS V. 22.0. Уровень значимости критериев Стьюдента и Манна-Уитни были установлены, равным 0,05.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

Ингибирование алсевироном CYP17A1

Установлено снижение ферментативной активности после инкубации с обоими агентами по изменению скорости реакции образования андростендиона из прогестерона. За 100% (контроль) принимали уровень образования андростендиона из прогестерона в микросомальной фракции testikul, не инкубированной с препаратами. Алсевирон снижал активность фермента более активно по сравнению с абиратероном в testikuлах крыс: в концентрации 5 μ M алсевирон и абиратерон показали сопоставимые результаты, но повышение концентрации способствовало повышению ингибирующей активности алсевирона, в то время как повышение концентрации абиратерона не изменило ингибирующих свойств. Таким образом, ингибирующий эффект алсевирона был выше,

чем у абиатерона при $20 \mu\text{M}$ ($98\pm0,2\%$ для алсевирона против $87\pm3\%$ для абиатерона). Данные представлены в таблице 1.

Таблица 1. Ингибиование активности CYP17A1 алсевироном или абиатероном в концентрациях 5 и $20 \mu\text{M}$.

	<i>Скорость образования андростендиона из прогестерона, %</i>	
<i>Концентрация ингибитора, μM</i>	<i>Алсевирон</i>	<i>Абиатерон</i>
5	15 \pm 3	17 \pm 5
20	2 \pm 0,2	13 \pm 5

Источник: составлено автором.

Влияние алсевирона на экспрессию CYP17A1

После инкубации с обоими агентами в концентрации $\frac{1}{4}\text{IC50}$ было замечено достоверное снижение экспрессии гена CYP17A1 только в клетках DU145 (рис. 1), при этом экспрессия составила 30,42% ($p=0,021$) и 10,00% ($p=0,034$) от контроля в группах алсевирона и абиатерона. В клетках 22Rv1 статистически значимых изменений экспрессии CYP17A1 не отмечено.

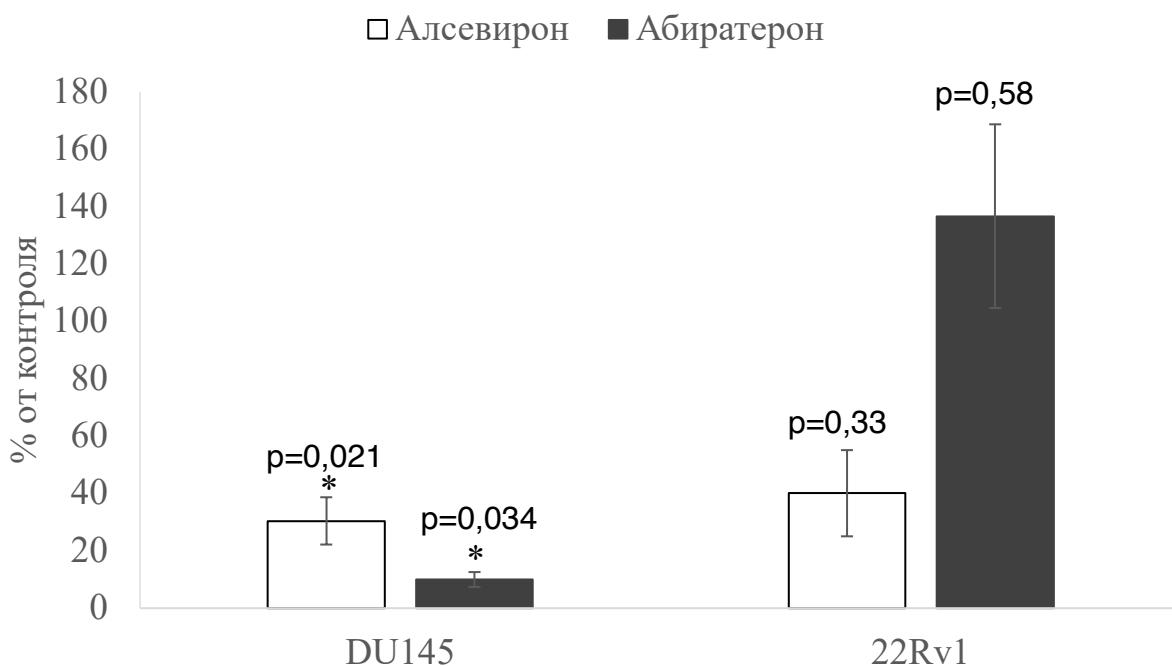


Рис. 1. Экспрессия CYP17A1 в клетках DU145 и 22Rv1 после 72-часовой инкубации с алсевироном и абиатероном в концентрациях $\frac{1}{4} \text{IC50}$. Нормализацию экспрессии проводили по гену 18S. Данные представлены в виде $M \pm SD$. * значения статистически достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

Источник: составлено автором.

Влияние алсевирона на содержание тестостерона в плазме крови мышей

Установлено снижение концентрации тестостерона, что является закономерным следствием ингибиции мРНК и ферментативной активности CYP17A1 (рис. 2). После седьмого введения алсевирона было замечено снижение уровня тестостерона, которое достигало статистической значимости при уровне значимости критерия Стьюдента равным 0,05. При этом уровень тестостерона составил $0,31 \pm 0,03$ нг/мл ($p < 0,001$) или 20,4% от первоначального уровня, по сравнению с уровнем тестостерона в контроле, который был $1,52 \pm 0,49$ нг/мл. Абиратерон также способствовал снижению концентрации тестостерона, однако минимальное значение было зафиксировано после 4 введения и составило $0,98 \pm 0,22$ нг/мл ($p = 0,192$), что составило 64,5% от начального значения. Через 10 дней после последнего введения концентрация тестостерона возвращалась к значениям, сопоставимым с исходными — $1,65 \pm 1,45$ нг/мл ($p = 0,103$) для алсевирона и $1,53 \pm 0,7$ нг/мл ($p = 0,424$) для абиратерона.

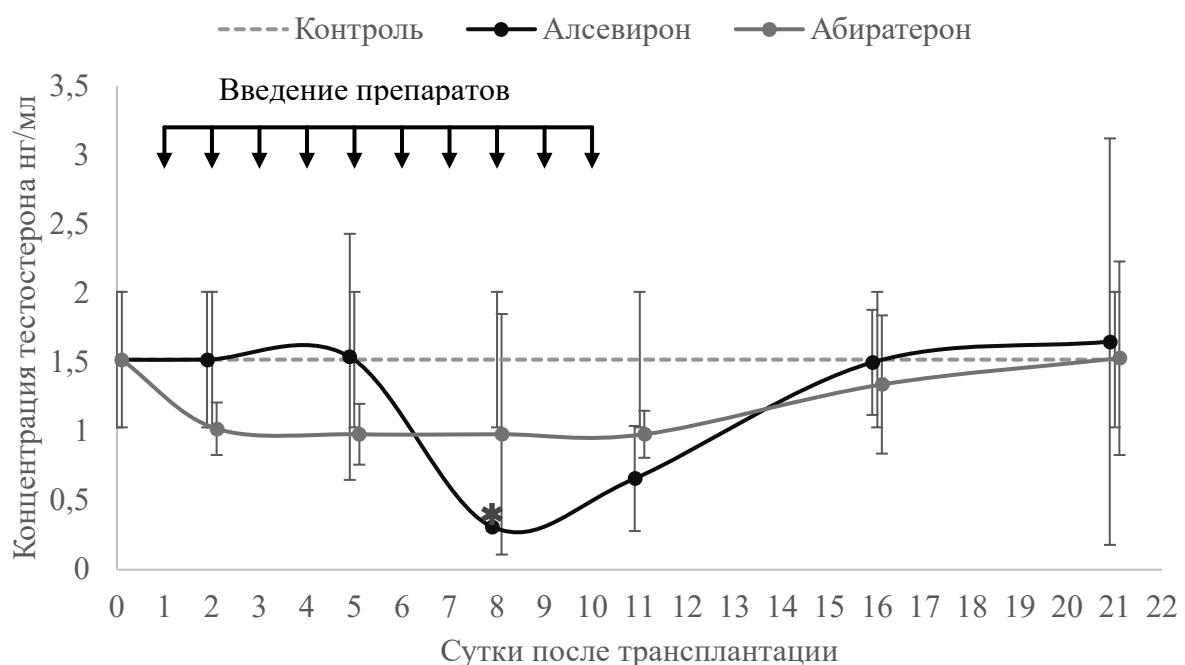


Рис. 2. Влияние алсевирона и абиратерона на выработку тестостерона у мышей BDF1. Алсевирон и абиратерон вводили в разовой дозе 300 мг/кг в течение 10 дней.
* значения статистически достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

Источник: составлено автором.

Влияние алсевирона на экспрессию андрогенных рецепторов и их сплайс-вариантов в клетках рака предстательной железы

В исследовании нами была изучена экспрессия андрогенных рецепторов трех вариантов: полноразмерного *ARFL* и сплайс-вариантов *ARv3* и *ARv7*.

Экспрессия ARFL. В клетках DU145 экспрессия ARFL (рис. 3) значительно снижалась после инкубации как с алсевироном, так и с абиатероном в концентрации $\frac{1}{4}$ IC50: 32,81% ($p=0,001$) и 13,99% ($p<0,001$) от контрольных алсевирона и абиатерона соответственно.

Абиатерон увеличивал экспрессию ARFL (рис. 3) в клетках 22Rv1 по сравнению с контролем, в то время как уровень экспрессии ARFL после инкубации с алсевироном был сопоставим с контролем. Этот эффект составил: 111,9% ($p=0,982$) и 132,8% ($p=0,011$) от контроля после инкубации с $\frac{1}{4}$ IC50 алсевирона и абиатерона, соответственно.

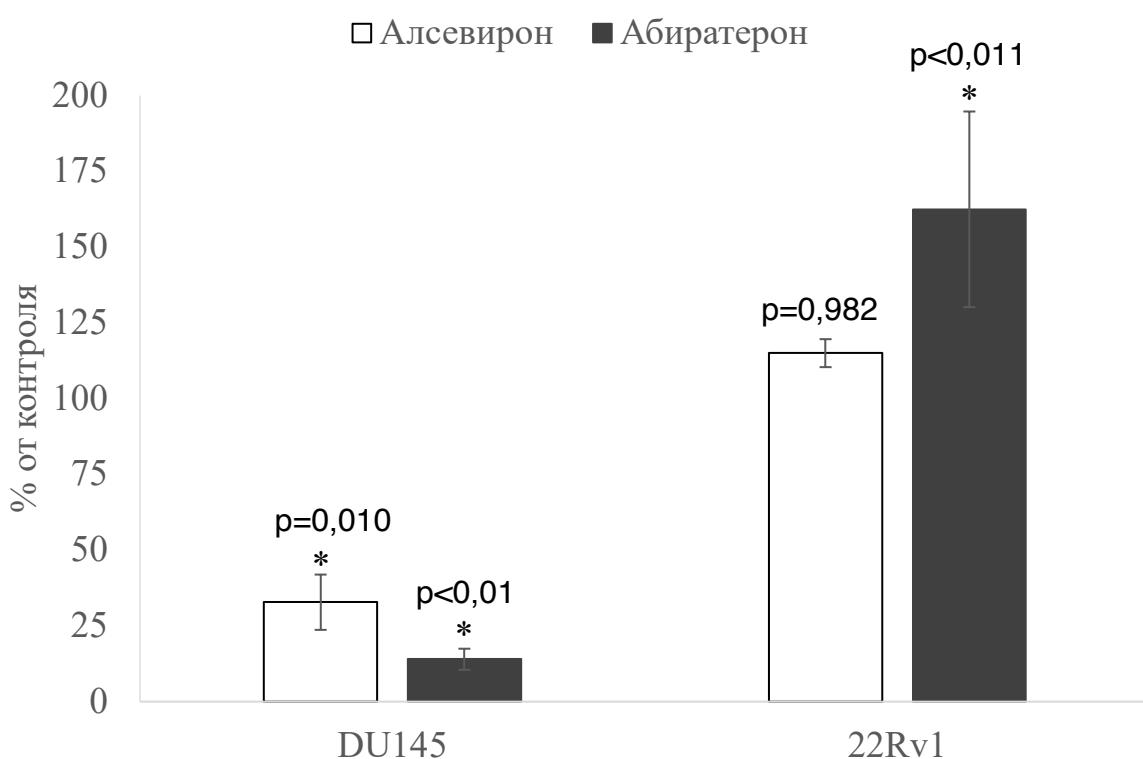


Рис. 3. Экспрессия ARFL в культурах клеток DU145 и 22Rv1 после инкубации с алсевироном и абиатероном в концентрации $\frac{1}{4}$ IC50. Нормализацию экспрессии проводили по гену 18S. Данные представлены в виде $M \pm SD$. * значения статистически достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

Источник: составлено автором.

Экспрессия ARv3 (рис. 4) снижалась под действием абиатерона и алсевирона на культуре клеток DU145, но не изменялась в клетках 22Rv1. При субтоксической концентрации экспрессия ARv3 составила 14,74% ($p=0,001$) и 9,44% ($p<0,001$) от контроля в группе алсевирона и абиатерона по сравнению с контролем на культуре DU145.

В клетках 22Rv1 концентрация $\frac{1}{4}$ IC₅₀ снижала экспрессию *ARv3*, статистически значимую для группы алсевирона, до 61,07% контроля ($p=0,018$) против 81,18% ($p=0,348$) контроля для группы абиаратерона.

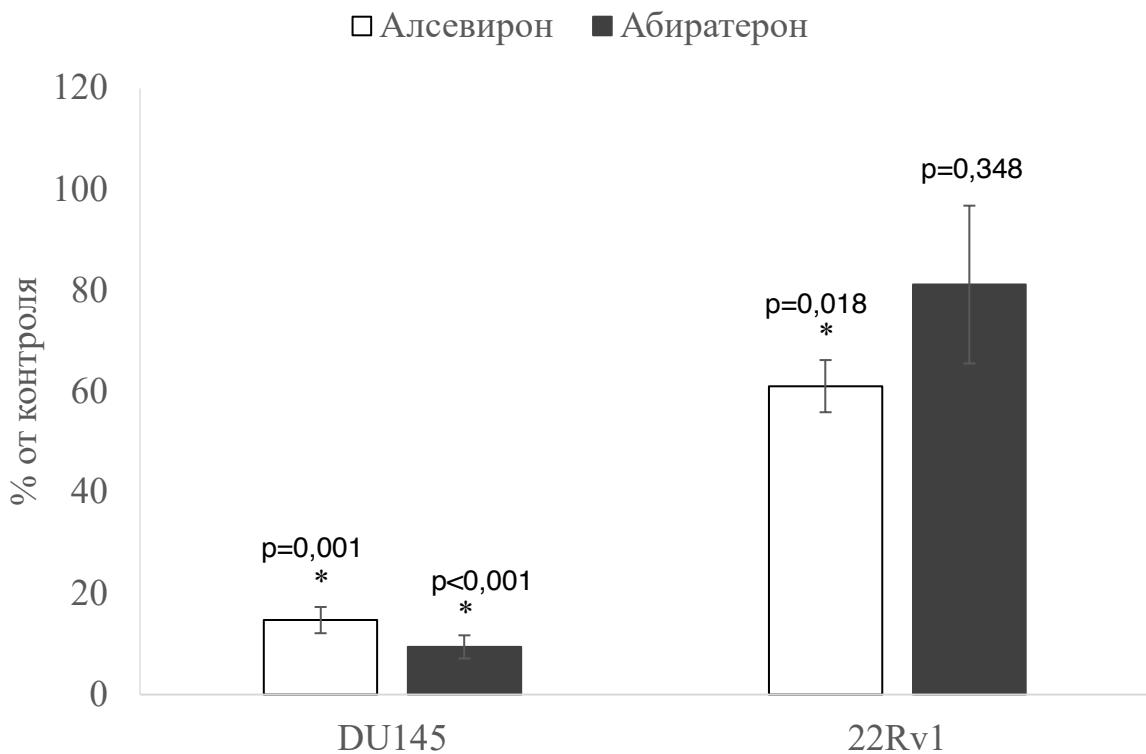


Рис. 4. Экспрессия *ARv3* в культурах клеток DU145 и 22Rv1 после инкубации с алсевироном и абиаратероном в концентрации $\frac{1}{4}$ IC₅₀. Данные представлены в виде $M \pm SD$. * значения статистически достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

Источник: составлено автором.

Экспрессия *ARv7*. После инкубации с субтоксической концентрацией ($\frac{1}{4}$ IC₅₀) алсевирона и абиаратерона снижение экспрессии *ARv7* (рис. 5) было более значительным: 67,18% ($p=0,223$) и 10,77% ($p<0,001$) контроля для алсевирона и абиаратерона соответственно при $\frac{1}{4}$ IC₅₀.

Изменения экспрессии *ARv7* наблюдались в клетках 22Rv1 (рис. 5) и были аналогичны изменениям в клетках DU145: экспрессия составила 54,65% ($p=0,27$) и 50,49% ($p=0,235$) контроля для алсевирона и абиаратерона соответственно при такой же концентрации агентов.

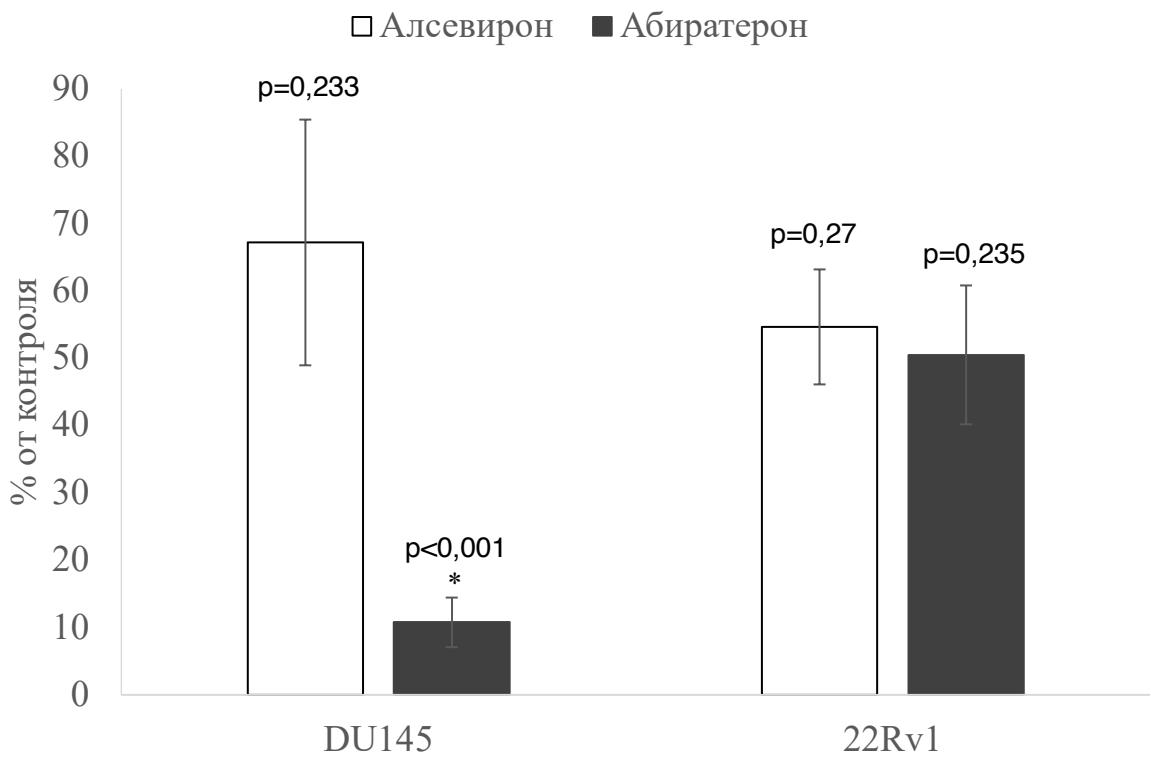


Рис. 5. Экспрессия *ARv7* в культурах клеток DU145 и 22Rv1 после инкубации с алсевироном и абирапероном в концентрации $\frac{1}{4}$ IC50. Данные представлены в виде $M \pm SD$. * значения статистически достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

Источник: составлено автором.

Цитотоксичность алсевирона

На культурах клеток РПЖ человека была оценена цитотоксичность ингибитора CYP17A1 алсевирона в сравнении с абирапероном. Результаты представлены в табл. 2.

Алсевирон продемонстрировал высокую цитотоксическую активность, превосходящую абираперон в клетках РПЖ, гормончувствительных и AR-зависимых LNCaP и 22Rv1, а также DU145, которые характеризуются низкой экспрессией AR.

Таблица 2. Значения IC50 ингибиторов CYP17A1 на культурах клеток РПЖ человека.

Линии клеток	IC50, μM	
	Алсевирон	Абираперон
DU145	22,9±0,5	28,8±1,6
22Rv1	23,8±1,2	151,4±23,7
LNCaP	35,9±5,6	109,9±35,2
PC3	82,0±4,2	59,6±5,4

Источник: собственные результаты.

Изменение маркеров апоптоза опухолевых клеток под действием алсевирона

Аннексин V используется в качестве маркера апоптоза клеток, за счет способности связываться с фосфатидилсерином мембран клеток, находящихся в апоптозе. Дозозависимое увеличение количества клеток, вступающих в апоптоз и связывающихся с аннексином V (Annexin V (+)) было обнаружено в группах как алсевирона, так и абиратерона (рис. 6). Инкубация с алсевироном ($0,3 \mu\text{M}$) увеличивала содержание клеток в ранней апоптотической фазе с $10,5 \pm 1,3\%$ в контроле до $14,2 \pm 0,6\%$ ($p=0,004$), в то время как инкубация с абиратероном ($0,3 \mu\text{M}$) снижала содержание клеток в ранней апоптотической фазе до $5,6 \pm 0,6\%$ ($p=0,268$). Также обнаружено увеличение количества клеток в поздней апоптотической фазе: от $5,8 \pm 0,7\%$ в контроле до $22,3 \pm 1,1\%$ в группе после инкубации с $0,3 \mu\text{M}$ алсевирона, и $12 \pm 1,3\%$ в группе после инкубации с $0,3 \mu\text{M}$ абиратерона.

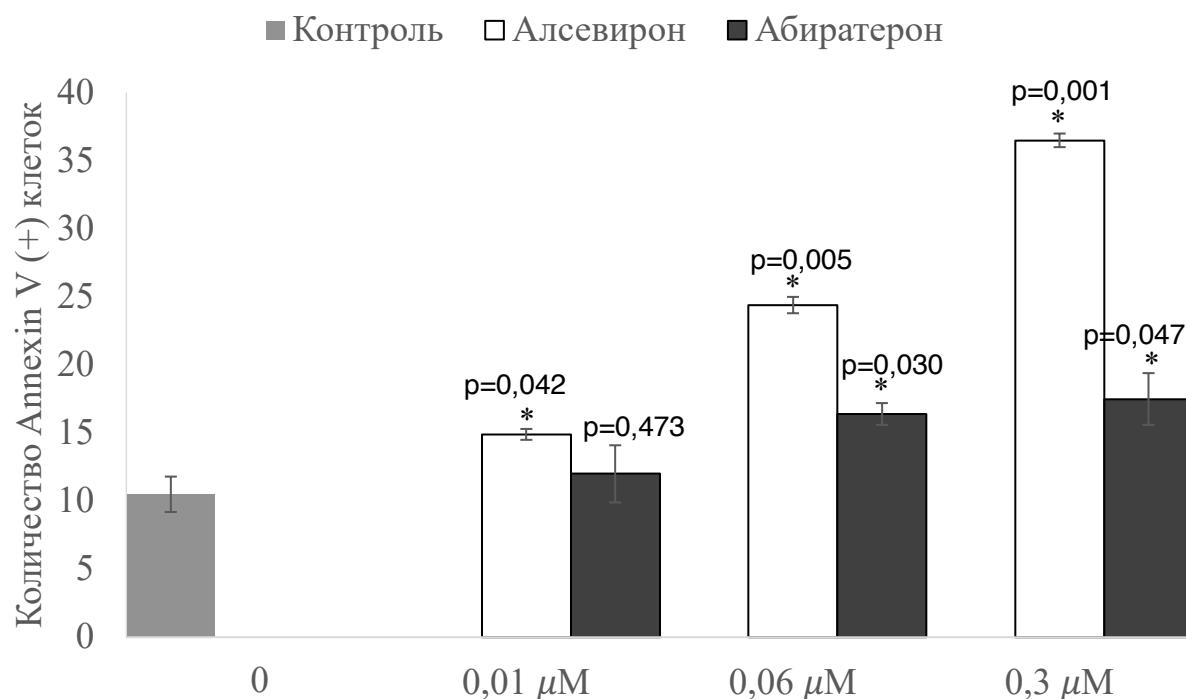


Рис. 6. Изменение количества клеток, связывающихся с аннексином V после 24 ч инкубации с алсевироном и абиратероном ($0,01$ – $0,3 \mu\text{M}$). * отличия от контрольной группы статистически значимы, $p \leq 0,05$.

Источник: составлено автором.

Каспазы 3/7. Активированные эффекторные каспазы 3 и 7 являются маркерами апоптоза. Как алсевирон, так и абиратерон вызывали достоверное повышение содержания клеток с активированными каспазами 3 и 7 (рис. 7). Статистически значимое увеличение содержания клеток с повышенным уровнем каспаз 3/7 (+) было обнаружено после

инкубации с алсевироном ($0,3 \mu\text{M}$): $37 \pm 0,4\%$, $p < 0,001$ и с абиатероном ($0,3 \mu\text{M}$): $34 \pm 0,1\%$, $p < 0,001$ в сравнении со значением $13 \pm 0,7\%$ в контрольной группе.

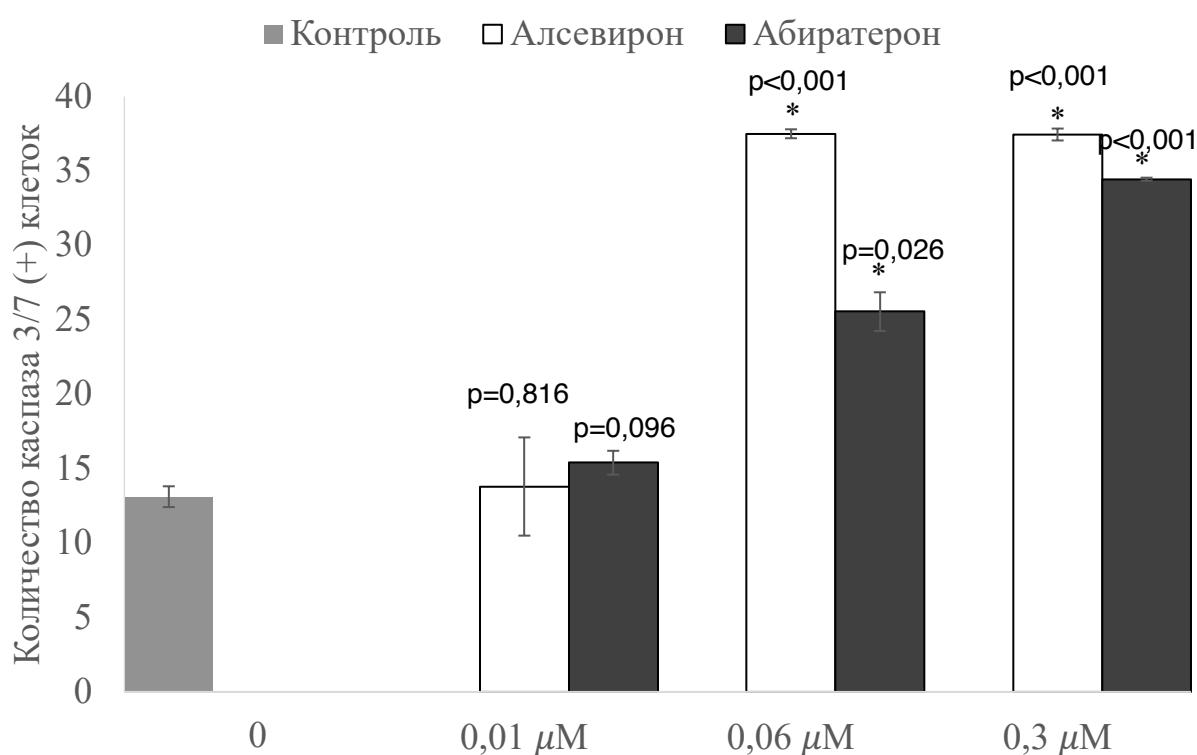


Рис. 7. Повышение количества клеток, содержащих активированные каспазы 3 и 7 после 24 ч инкубации с алсевироном и абиатероном ($0,01$ – $0,3 \mu\text{M}$). * отличия от контрольной группы статистически значимы, $p \leq 0,05$.

Источник: составлено автором.

Bcl-2 является антиапоптотическим белком, который контролирует проницаемость митохондриальных мембран и снижает активацию каспаз. Оба препарата, и алсевирон, и абиатерон способствовали подавлению уровня *Bcl-2* и повышению уровня активированного *Bcl-2*. Концентрация *Bcl-2* (+) клеток снизилась с $93 \pm 1,1\%$ в контроле до $85 \pm 0,9\%$ ($p = 0,018$) в группе алсевирона и до $80 \pm 1,0\%$ ($p = 0,007$) в группах абиатерона (рис. 8а).

В то время как содержание клеток *Bcl-2* (+) снижалось, содержание клеток, экспрессирующих активную фосфорилированную форму *Bcl-2*, было повышенным (рис. 8б). Эффект алсевирона был более выраженным по сравнению с абиатероном: $13 \pm 1,3\%$ ($p < 0,05$) и $7 \pm 0,4\%$ ($p < 0,05$) (при концентрации $0,3 \mu\text{M}$ каждого) против $3,75 \pm 1,2\%$ в контрольной группе.

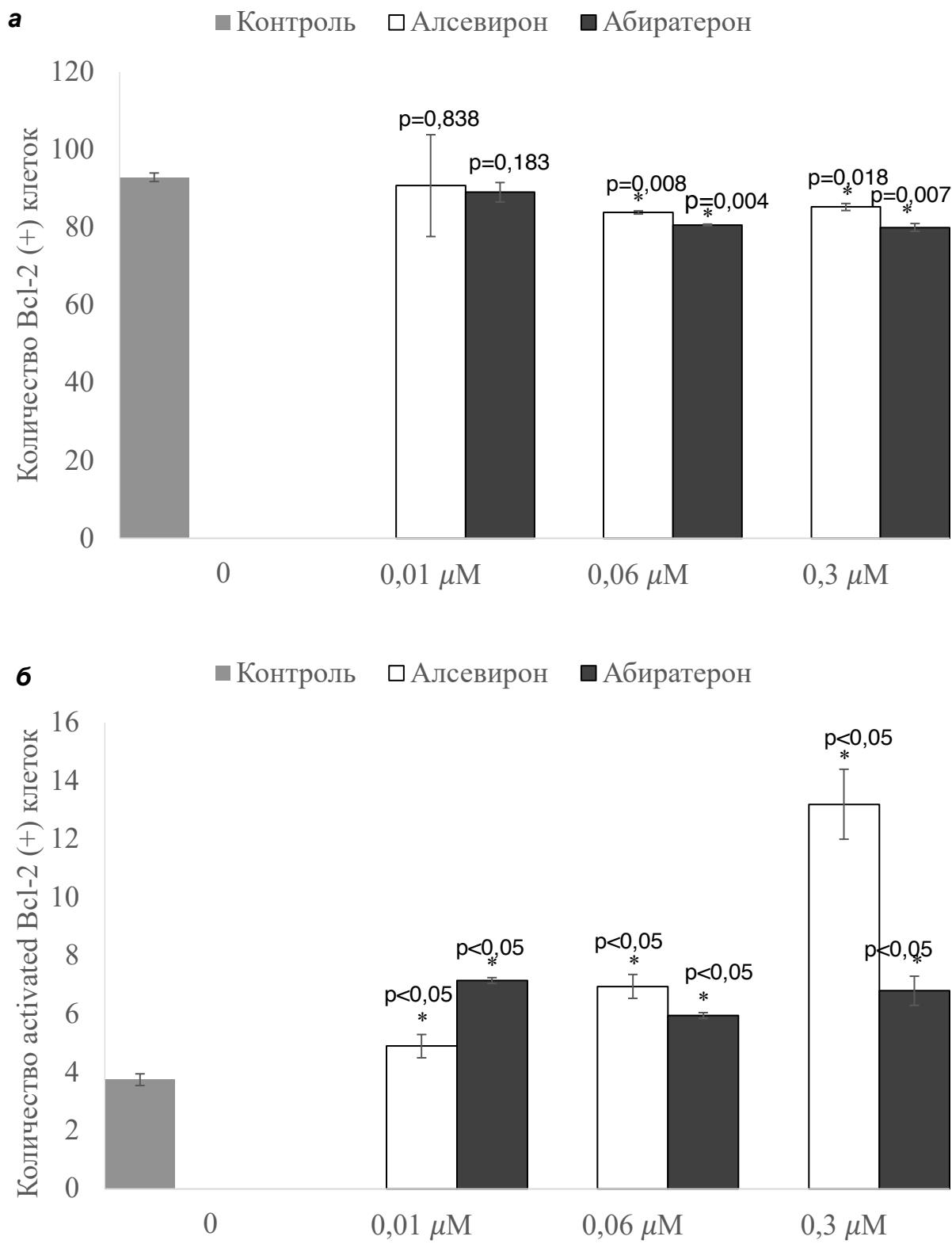


Рис. 8. Количество клеток, экспрессирующих Bcl-2 и активную форму Bcl-2 после 24 ч инкубации с алсевироном и абирапероном ($0,01$ – $0,3 \mu\text{M}$). * отличия от контрольной группы статистически значимы, $p \leq 0,05$.

Источник: составлено автором.

Повреждения ДНК. Фосфорилированный гистон H2A.X и ATM (протеинкиназа атаксии-телеангидразии) являются чувствительными маркерами, которые свидетельствуют о двухцепочечных разрывах ДНК. В работе были проанализированы суммарное количество клеток с двухцепочечными разрывами ДНК (DSBs) и клетки pATM и количество клеток, экспрессирующих фосфорилированный гистон H2A.X.

Алсевирон и абиратерон способствовали повреждению ДНК после инкубации. Были обнаружены клетки, экспрессирующие фосфорилированный гистон H2A.X (клетки H2A.X (+)), и клетки с двухцепочечным разрывом (DSBs). Изменение экспрессии фосфорилированного гистона H2A.X, который рассматривается как маркер повреждения ДНК и DSBs было идентифицированы только в клетках, ко-инкубированных с алсевироном. После инкубации с алсевироном количество клеток H2A.X (+) составило 55+2,3% ($p<0,001$), а после инкубации с абиратероном — 10+0,8% ($p=0,036$) по сравнению с 2+1,1% в контрольной группе (рис. 9).

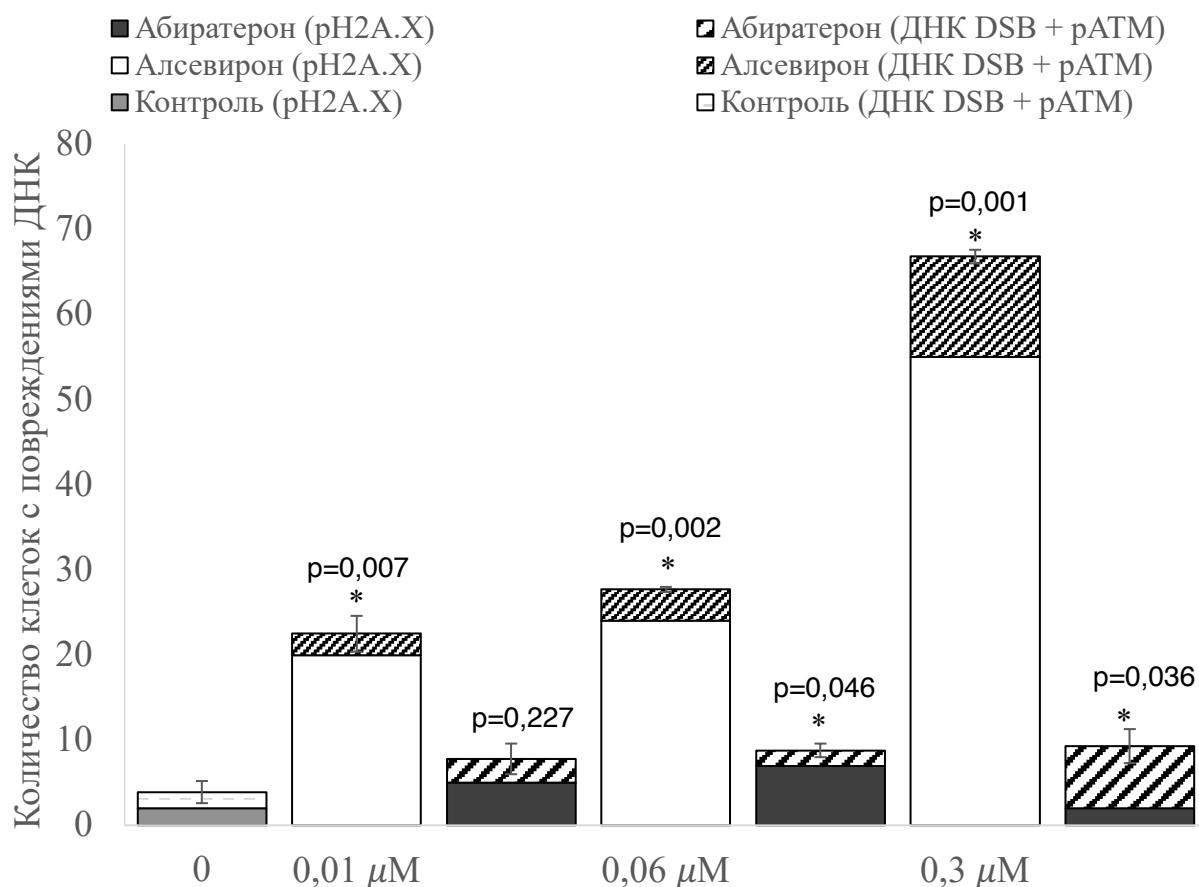


Рис. 9. Содержание клеток с повреждениями ДНК после инкубации с алсевироном и абиратероном ($0,01-0,3 \mu\text{M}$) в течение 24 ч. *отличия от контрольной группы статистически значимы, $p \leq 0,05$.

Источник: составлено автором.

Противоопухолевый эффект *in vivo*

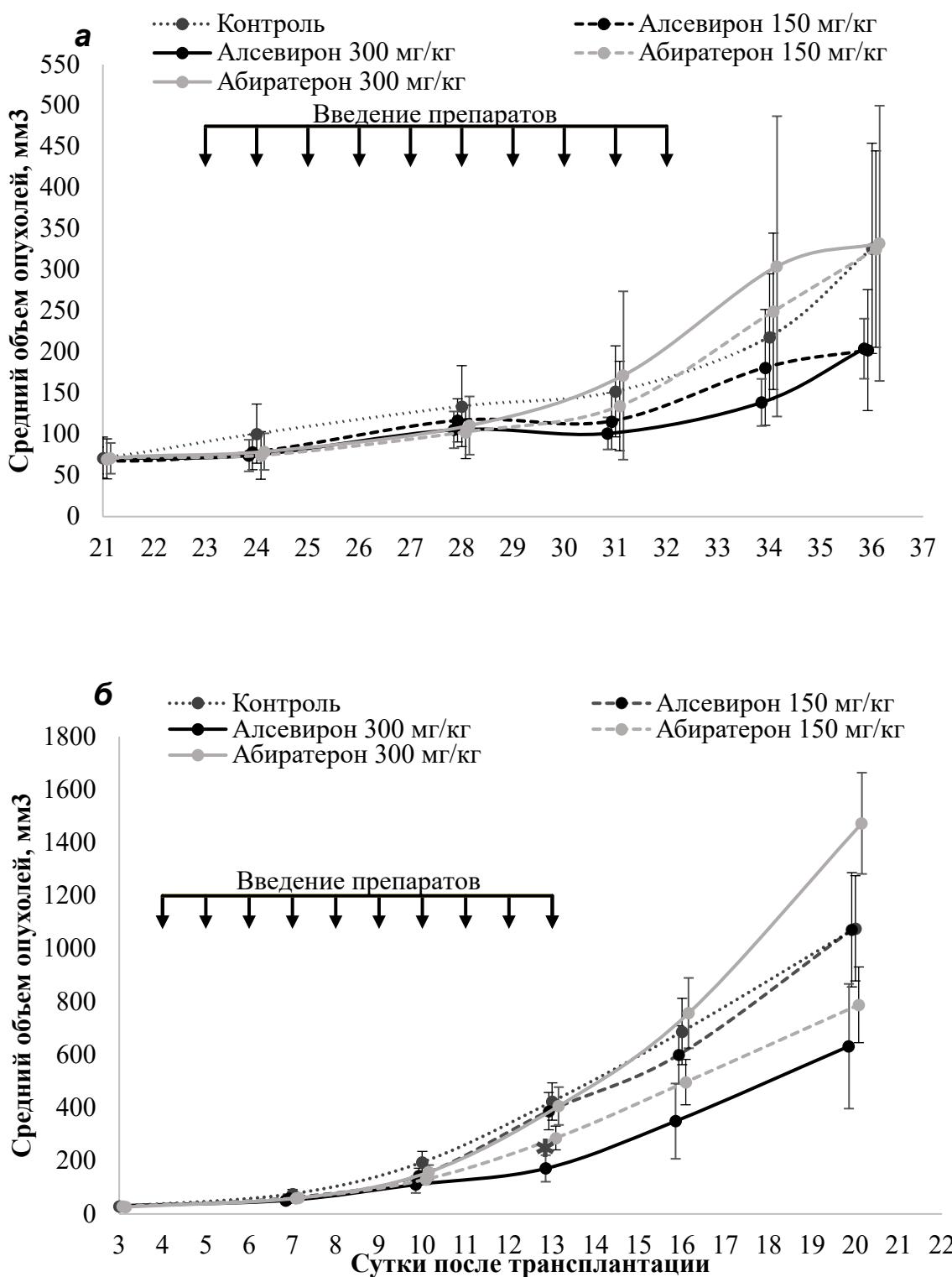


Рис. 10. Динамика роста опухоли на модели ксеногraftов DU145 (а) и 22Rv1 (б) после 10-дневного лечения алсевироном и абираптероном в дозах 150 мг/кг и 300 мг/кг по сравнению с контрольной группой. Данные представлены в виде $M \pm SE$. * значения статистически достоверны при $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

Источник: составлено автором.

На модели ксенографтов DU145 алсевирон был более активен в разовой дозе 300 мг/кг при максимальном ТРО=45,4% (рис. 10а), которое было зафиксировано на 5 день после окончания лечения. При этом средний объем опухолей составил $204,6 \pm 36,6$ мм^3 ($p=0,852$) относительно $326,4 \pm 127,9$ мм^3 в контрольной группе. Стоит отметить, что противоопухолевая активность была замечена и при дозе 150 мг/кг, при этом ТРО=37,2% при среднем объеме опухоли $202,6 \pm 73,6$ мм^3 ($p=0,491$). Абиратерон в аналогичных дозах был неактивным: при значениях $V_{cp}=408,9 \pm 168,3$ мм^3 ($p=0,662$) и $V_{cp}=332,5 \pm 167,5$ мм^3 ($p=0,852$) при введении доз 150 мг/кг и 300 мг/кг соответственно.

На модели 22Rv1 введение алсевирона в разовой дозе 300 мг/кг продемонстрировало значительный противоопухолевый эффект (рис. 10б). На 10-й день лечения максимальный показатель торможения роста опухоли (ТРО) составил 59% при среднем объеме опухоли $171,6 \pm 50,1$ мм^3 ($p=0,022$) относительно $424,2 \pm 70,3$ мм^3 в контрольной группе. При этом абиратерон не показал такого же противоопухолевого эффекта: он был более активен при разовой дозе 150 мг/кг, чем при 300 мг/кг (ТРО=32% со средним объемом опухоли $286,6 \pm 44,9$ мм^3 ($p=0,203$) и ТРО=4% со средним объемом опухоли $407,1 \pm 71,3$ мм^3 ($p=0,971$)).

Переносимость терапии на двух моделях ксенографтов можно считать удовлетворительной, гибели мышей в процессе лечения не отмечали, существенной потери массы тела ($>10\%$ не наблюдали).

ВЫВОДЫ

1. Алсевирон подавляет активность CYP17A1 на уровне, сопоставимом с абиратероном. В концентрации 5 μM алсевирон и абиратерон снижали активность CYP17A1 в testicулах крыс достоверно на 85% и 83%, а в концентрации 20 μM алсевирон ингибировал активность CYP17A1 эффективнее абиратерона: на 98% и 87%.

2. Алсевирон подавляет экспрессию гена *CYP17A1* в слабо экспрессирующей AR и гормоннечувствительной культуре клеток РПЖ DU145, однако в AR- и гормонозависимой линии 22Rv1 эффект был менее выражен. Эффект алсевирона сопоставим с эффектом абиратерона без статистически значимых различий.

3. В культуре клеток DU145 как алсевирон, так и абиратерон успешно снижают экспрессию всех изучаемых *ARVs*. В культуре клеток 22Rv1 алсевирон и абиратерон без статистических отличий ингибировали экспрессию *ARv3* и *ARv7*. Оба агента вызывали повышение экспрессии *ARFL*, но только в случае абиратерона отличия с контролем были статистически достоверными.

4. Алсевирон более активно снижает уровень тестостерона в плазме крови у мышей BDF1. Статистически значимое снижение было отмечено в группе алсевирона после 7-го

введения в дозе 300 мг/кг, при этом концентрация составила 20,4% от исходного уровня ($0,31\pm0,03$ нг/мл, $p<0,001$). Абиратерон давал меньшее снижение уровня тестостерона до 64,5% от первоначального уровня без статистических различий с контролем ($0,98\pm0,22$ нг/мл, $p=0,19$). После завершения лечения уровень тестостерона возвращался к исходному значению.

5. Алсевирон оказался более цитотоксичным по сравнению с абиратероном в культурах клеток LNCaP (IC₅₀ составили 35,86 μ M для алсевирона и 109,87 μ M для абиратерона), DU145 (22,87 и 28,80 μ M) и 22Rv1 (23,80 и 151,43 μ M), на культуре клеток PC3 цитотоксическая активность абиратерона была выше: IC₅₀ 82,03 μ M против 59,62 μ M для алсевирона и абиратерона соответственно.

6. Алсевирон вызывает апоптоз клеток DU145, который сопровождается увеличением числа клеток, связавшихся с аннексином V, активацией каспаз 3/7, увеличением содержания активной формы внутриклеточного Bcl-2. Аналогичные изменения наблюдали также и после инкубации с абиратероном. Алсевирон в отличие от абиратерона способствует более активному повреждению ДНК ($66,8\pm0,8\%$ для алсевирона по сравнению с $9,3\pm2,1\%$ для абиратерона и $2,8\pm1,8\%$ в контроле), которое сопровождается двухцепочечными разрывами ДНК в клетках DU145.

7. Противоопухолевая активность алсевирона в разовой дозе 300 мг/кг при 10-кратном введении была выше, чем таковая у абиратерона при такой же дозе и режиме введения на моделях подкожных ксеногraftов DU145 (ТРО алсевирона составило 45,43%, абиратерон эффекта не продемонстрировал) и 22Rv1 (ТРО алсевирона 59%, в то время как ТРО абиратерона составило 32%).

По теме диссертационного исследования опубликованы следующие работы:

Публикации в изданиях, индексируемых научометрическими базами данных Scopus и Web of Science:

1. Zolottsev, V.A., Latysheva, A.S., Pokrovsky, V.S., **Khan, I.I.**, Misharin, A.Y. Promising applications of steroid conjugates for cancer research and treatment. *European journal of medicinal chemistry*, 2021, 210, 113089.
2. Latysheva, A.S., Zolottsev, V.A., Pokrovsky, V.S., **Khan, I.I.**, Misharin, A.Y. Novel nitrogen containing steroid derivatives for prostate cancer treatment. *Curr Med Chem.* 2021; 28(40), pp. 8416-8432.
3. **Khan, I.I.**, Karshieva, S.S., Sokolova, D.V., Spirina, T.S., Zolottsev, V.A., Latysheva, A.S., Anisimova, N.Y., Komarova, M.V., Yakunina, M.N., Nitetskaya, T.A., Misharin, A.Y., Pokrovsky, V.S., Antiproliferative, proapoptotic, and tumor-suppressing effects of the novel anticancer agent alsevirone in prostate cancer cells and xenografts. *Arch. Pharm.* 2022; 355 (1).

Научные статьи, опубликованные в изданиях, рекомендованных Перечнем ВАК/ Перечень РУДН:

1. Золотцев, В.А., Латышева, А.С., Покровский, В.С., **Хан, И.И.**, Алманза, Р.Л.М., Мишарин А.Ю., Стероидные конъюгаты как потенциальные противоопухолевые агенты // Российский биотерапевтический журнал, 2020; 19(1): 22-52 с.

Публикации в других изданиях:

1. Pokrovsky, V.S., Anisimova, N.Yu., Sokolova, D.V., Zolottsev, V.A., Latysheva, A.S., **Khan, I.I.**, Misharin, A.Y. Cytotoxic and apoptotic effects of new CYP17A1 inhibitor in prostate cancer cell lines // 26th Meeting of the EAU Section and Urological Research, Porto, 2019, p.38
2. **Хан, И.И.**, Латышева, А.С. Оценка цитотоксической активности и противоопухолевого эффекта алсевирона — нового стероидного антиандрогена // VIII Международный медицинский Конгресс «Санкт-Петербургские научные чтения-2019», Санкт-Петербург, 2019, С. 455.
3. **Хан, И.И.**, Латышева, А.С., Золотцев, В.А., Соколова, Д.В., Каршиева, С.Ш., Мишарин, А.Ю., Покровский, В.С. Оценка цитотоксической активности и противоопухолевого эффекта алсевирона на моделях рака предстательной железы // Сборник тезисов докладов Шестой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии», Нижний Новгород, 2020, С. 245.
4. **Хан, И.И.**, Латышева, А.С., Золотцев, В.А., Соколова, Д.В., Каршиева, С.Ш., Мишарин, А.Ю., Жданов, Д.Д., Покровский, В.С. Влияние ингибитора CYP17A1 алсевирона на экспрессию андрогенных рецепторов и их сплайс-варианты в клетках рака предстательной железы // Сборник тезисов докладов Седьмой Междисциплинарной конференции «Молекулярные и Биологические аспекты Химии, Фармацевтики и Фармакологии», Москва 2021, С. 110

Список использованных сокращений и условных обозначений:

ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	иммуноферментный анализ
КРРПЖ	кастрационно-резистентный рак предстательной железы
ОТ-ПЦР	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ПО	программное обеспечение
ПСА	простатспецифический антиген
РПЖ	рак предстательной железы
ТРО	торможение роста опухоли
AR	androgen receptor (андрогенный рецептор)
ARFL	полноразмерный вариант андрогенного рецептора
ARv3	сплайс-вариант 3 андрогенного рецептора
ARv7	сплайс-вариант 7 андрогенного рецептора
ATM	протеинкиназа атаксии-телеангидазии
DSBs	double-strand breaks (двуихцепочечные разрывы ДНК)
SD	standard deviation (стандартное отклонение)
SE	standard error (стандартная ошибка)

ХАН ИРИНА ИГОРЕВНА (РФ)
**ОСОБЕННОСТИ МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ
АКТИВНОСТЬ АЛСЕВИРОНА – НОВОГО ИНГИБИТОРА CYP17A1**

Представленная работа посвящена изучению механизма действия и оценке антитрополиферативной и противоопухолевой активности нового стероидного ингибитора CYP17A1 алсевирона в сравнении с уже внедренным в клиническую практику агентом — абиратероном. Показано, что механизм действия алсевирона связан с ингибированием ферментативной активности и снижением экспрессии мРНК *CYP17A1* и *ARVs*. Обнаружено, что алсевирон был более активен по сравнению с абиратероном на 3 из 4 изучаемых культурах клеток, а также в ксеногraftах рака предстательной железы человека DU145 и 22Rv1. Цитотоксическая и противоопухолевая активности обусловлены активацией апоптоза. Апоптоз, индуцированный алсевироном, характеризуется повышением клеток, связавшихся с аннексином V, активацией каспаз 3 и 7, повышением экспрессии фосфорилированной формы Bcl-2, увеличением количества клеток с двухцепочечными разрывами ДНК. Результаты работы имеют значение в разработке и изучении новых ингибиторов CYP17A1 в качестве препаратов для лекарственной терапии рака предстательной железы.

IRINA I. KHAN (Russia)

**«Features of the action mechanism and the anticancer activity of the novel
CYP17A1 inhibitor alsevirone»**

The research was aimed at studying the action mechanism and evaluating of antiproliferative and anticancer activities of the novel CYP17A1 inhibitor in comparison with clinically used abiraterone. The action mechanism of alsevirone is noticed to be associated with inhibition of CYP17A1 enzyme activity, suppressing *CYP17A1* и *ARVs* mRNA expression and reduction of testosterone concentration. Alsevirone was more active in 3/4 cell lines in xenograft models of human prostate cancer DU145 and 22Rv1 than abiraterone. Cytotoxic and anticancer activities are caused by apoptosis. Alsevirone-induced apoptosis is characterized by the increasing amount of Annexin (+) cells, activation of caspase 3/7, increasing expression of phosphorylated Bcl-2 and increasing number of cells with double-strand breaks. The results of the research are interesting in design of new CYP17A1 inhibitors and research them as potential drugs in prostate cancer therapy.