

**ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ КСЕНОБИОТИКИ С ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ
КАНЦЕРОГЕННОЙ АКТИВНОСТЬЮ – СОВРЕМЕННАЯ КОНЦЕПЦИЯ
ИДЕНТИФИКАЦИИ**

М.Г. Якубовская, В.П. Максимова, К.И. Кирсанов
ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России,
mgyakubovskaya@mail.ru

Злокачественные новообразования (ЗНО) относятся к числу социально значимых заболеваний, список которых утвержден Постановлением Правительства Российской Федерации от 1 декабря 2004 N715. Онкологическая смертность населения занимает второе место после смертности от сердечно-сосудистых заболеваний (13,8% умерших) [1]. В Указе Президента «О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года» (№ 204 от 7.05.2018 г.) определены значения целевых индикаторов по ЗНО для их достижения в рамках нового федерального проекта [2]. Однако динамика онкологической заболеваемости в России демонстрирует противоположную тенденцию, если в 2009 г. было выявлено 504 975 случаев, то в 2019 г. этот показатель вырос на 27% и составил 640 391 случай [1]. Такая динамика соответствует глобальным показателям, фиксируемым Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) и в других странах. По прогнозам ВОЗ заболеваемость ЗНО за последующие 20 лет увеличится на 52% и, если число заболевших в 2020 г. составляло 19,2 млн человек, то к 2040 г. оно превысит 30,2 млн человек [3]. В то же время, понимание молекулярных механизмов патогенеза ЗНО, накопленная информация об этиологических факторах канцерогенеза, а также эпидемиологические данные, учитывающие экспозицию отдельных групп людей к известным канцерогенным агентам, позволили лидирующим ученым-онкологам провести мета-анализ влияния факторов окружающей среды на заболеваемость ЗНО и заключить, что реализация мер первичной и вторичной профилактики

рака должна привести к снижению смертности от ЗНО на 70% даже без развития новых подходов к лечению данного заболевания [4]. При этом ученые, проводившие исследования по возможному вкладу мероприятий по профилактике рака, отмечают следующее:

1) Общество не осознает важность проведения дорогостоящих исследований в области профилактики рака и их реализации, которые в большинстве случаев являются «убыточными» для частных компаний.

2) Совершенствование лечения онкопациентов приводит к очевидному эффекту, а результат проведения профилактических мероприятий невозможно оценить на коротком интервале времени, он становится очевидным лишь по истечении продолжительного интервала времени (более 20-30 лет).

3) Исследования в области профилактики рака более сложны и объемны, они требуют проведения анализа на выборках десятков тысяч людей, в то время как совершенствование методов лечения может быть продемонстрировано на выборке в 100 онкопациентов.

4) Поток добровольных пожертвований онкопациентов направлен на совершенствование лечения, а не на развитие профилактических мероприятий.

5) Фармацевтические фирмы заинтересованы в развитии и внедрении новых методов лечения, которые более прибыльны по сравнению с внедрением новых методов профилактики.

Авторы упомянутой научной публикации подчеркивают низкое финансирование исследований, направленных на поиск путей профилактики рака, в разных странах оно составляет от 2 до 9% от финансирования всех исследований в области онкологии [4]. Ведущую роль в организации профилактических мероприятий должны брать на себя государственные органы, существующие во многих странах национальные комитеты и комиссии по канцерогенным факторам.

В СССР исследования по химическому канцерогенезу и развитие первичной профилактики рака возглавлял академик Л.М.Шабал, инициатор создания Комиссии по канцерогенным веществам и мерам профилактики. За последние 25 лет Комиссией по канцерогенным факторам России были разработаны и введены в действие 7 нормативных документов федерального уровня, определяющих канцерогенную опасность химических, физических, биологических факторов и производственных процессов для человека, была организована паспортизация канцерогенно опасных производств, разработана классификация пестицидов по степени канцерогенной опасности (СанПиН 1.2.2584-10), к 2014 г. членами Комиссии была завершена работа по ратификации Россией Конвенции МОТ № 139 «О борьбе с опасностью, вызываемой канцерогенными веществами и агентами в производственных условиях, и мерах профилактики».

В настоящее время в России, как и во всем мире, тестирование канцерогенной опасности химических соединений основано на использовании тестов на генотоксическую активность. Однако согласно современной концепции молекулярного патогенеза ЗНО, основы которой были заложены экспериментальными работами И.Беренблума и ряда других исследователей в 40-ые годы прошлого столетия, канцерогенные агенты подразделяются на генотоксические канцерогены, оказывающие иницирующее воздействие в патогенезе ЗНО, и эпигенетические (или негенотоксические), оказывающие промотирующее действие на развитие клона трансформированных клеток и формирование опухоли [5]. Накопленная за последние 30 лет информация по биологии опухолевой клетки, эпигенетической регуляции экспрессии генов, а также по механизмам действия негенотоксичных канцерогенов позволяет подойти к решению проблемы по организации скрининга негенотоксичных канцерогенов, с распространением которых связывают неуклонное повышение заболеваемости ЗНО [6-8].

Для решения этой проблемы Международное агентство по изучению рака (МАИР) разработало новый подход к определению канцерогенной опасности на основе оценки ключевых характеристик канцерогенных соединений, среди которых рассмотрены не только генотоксическое действие, но и эффекты, непосредственно несвязанные с повреждением ДНК. Такие эффекты можно оценить по механистическим данным *in vitro*, в частности, по митогенной активности, по способности индуцировать воспаление и вызывать генетическую нестабильность, по влиянию на клеточный сигналинг и активацию апоптоза, по иммуномодулирующему действию и т.д. На совместном заседании более 100 специалистов-экспертов в области химического канцерогенеза в 2018 г. были официально приняты изменения процедуры установления канцерогенной опасности различных агентов на основании механистических данных [9]. Страны Организации экономического сотрудничества и развития в 2020 г. сформировали международный научный комитет по разработке рабочего плана создания унифицированных методических подходов для скрининга опасных для человека негенотоксичных канцерогенов [10]. На основе анализа более 700 научных публикаций

по механизмам действия негенотоксичных соединений и детального обсуждения более 200 опубликованных методических подходов, были сформированы группы тестов на выявление негенотоксичных канцерогенов: (1) индукторов воспаления; (2) иммуномодуляторов; (3) агентов, повреждающих клеточные структуры; (4) митогенных соединений; (5) индукторов гиперплазии; (6) индукторов дисплазии. При этом было отмечено, что все используемые тесты должны быть сопровождаемы анализом влияния изучаемых соединений на систему эпигенетической регуляции экспрессии генов, как систему, определяющую функционирование генома как в нормальной, так и в опухолевой клетке.

Число исследований канцерогенных факторов окружающей среды, обладающих доказанным или вероятным эпигенетическим действием, продолжает постоянно увеличиваться. Становится очевидной необходимость включения в анализ канцерогенного риска данных об эпигенетической активности соединений окружающей среды [11]. Эту насущную необходимость иллюстрирует классический пример трагических последствий применения в медицинской практике диэтилстильбестрола в качестве средства для сохранения беременности. Его канцерогенные свойства проявились спустя годы у детей, чьи матери во время их вынашивания применяли этот препарат с указанной целью [12]. К числу негенотоксических веществ с выраженной эпигенетической активностью относится большой набор соединений разных классов, в том числе промоторы канцерогенеза (пентахлорфенол, фенобарбитал, полихлорированные бифенилы, кротоновое масло), большая группа эндокринных модификаторов и гормональных дизрапторов (финастеридин, винклозин, амитрол, сульфаметазин, фенобарбитал, эстрогены, гормональные модификаторы атразина, ингибиторы дофамина и др.), многочисленные цитотоксины (арохлор, бутахлор, четыреххлористый углерод фталаты и др.), мелкодисперсные частицы, металлы (кадмий, никель, свинец, ртуть и пр.), и другие соединения [13].

Исследования механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов начались в середине 1990-х годов и к настоящему времени стало очевидным, что эпигенетическое замалчивание генов является важным механизмом регуляции функционирования генома и включает метилирование ДНК, модификации гистонов, интерференцию нкРНК и ремоделирование хроматина [14]. Эпигенетическая регуляция транскрипции участвует в процессах экспрессии и транспозиции мобильных элементов, геномном импринтинге, контроле экспрессии генов в разные периоды клеточного деления и тканевой дифференцировки. Эпигенетическая регуляция транскрипции также обеспечивает адаптацию организма к изменениям окружающей среды. Экзогенные факторы, влияющие на эпигенетическую регуляцию, могут вызывать адаптивные изменения, так и нарушать ключевые клеточные процессы, приводя к ЗНО и другим заболеваниям [15].

В настоящее время человечеством используется более 90 000 химических веществ, а эпигенетическая активность была оценена только для небольшой их части (<2%) [16]. Ситуация также осложняется непрерывным появлением новых соединений и ростом годового оборота уже используемых в быту и на производствах химических соединений, который за последние десять лет удвоился. Отсюда следует необходимость скрининга ксенобиотиков на эпигенетическую активность до начала их широкого применения. В связи с этим разработка новых методов скрининга, обладающих высокой производительностью, дающих четкие критерии активности и низкий уровень ложноположительных и ложноотрицательных результатов, а также позволяющим проведение широких скрининговых мероприятий по своей себестоимости, является актуальной задачей современной науки.

Одной из первых работ, в которой была высказана необходимость создания тест-систем для скрининга ксенобиотиков на эпигенетическую активность, была публикация по негенотоксическим эффектам химических соединений сотрудников МАИР в 2013 г. [11]. К настоящему времени для изучения эпигенетических эффектов ксенобиотиков были разработаны различные модельные системы *in vivo*. Наибольший вклад в изучение эпигенетических эффектов загрязнений окружающей среды были сделаны с использованием *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Daphnia* и *Xenopus laevis*. Тест-системы *in vivo* включают и мышинные модели, в которых эпигенетические состояния отражаются изменениями окраски шерсти и морфологии хвоста. Однако использование этих организмов ограничено видовыми особенностями системы эпигенетической регуляции, и такие исследования трудозатратны и дорогостоящи. Наиболее удобные методы скрининга эпигенетически активных соединений основаны на модельных системах *in vitro* с использованием культивируемых иммортализованных клеток человека [17]. Преимущества таких клеточных технологий заключаются в низкой себестоимости и краткосрочности тестирования. Одним из перспективных подходов к созданию скринингового теста стала разработка флуоресцентного репортерного анализа на

реактивацию эпигенетически подавленных генов: клетки аденокарциномы молочной железы мыши C127 трансфицировали вектором, содержащим репортерный флуоресцентный белок GFP под промотором CMV и аминокликозид-фосфотрансферазу, обеспечивающую резистентность к неомицину [38]. Клетки, устойчивые к неомицину с эпигенетически подавленной экспрессией GFP было предложено использовать в качестве тест-системы на эпигенетическую активность. Однако механизмы подавления экспрессии репортерного гена в полученной тест-системе проанализированы не были.

В 2010 г. группа исследователей, лидером которой была известная американская вирусолог Анна М. Скалка, опубликовала результаты своего исследования, посвященного моделированию в единой системе 15 различных механизмов эпигенетического подавления экспрессии вирусного генома, интегрированного в геном инфицированной клетки [19]. Разработанная модельная система была основана на использовании репортерного анализа, что обеспечивало высокую пропускную способность при ее применении в скрининговых целях, относительную дешевизну анализа и простоту в интерпретации результатов. При получении данной модельной системы использованы клетки HeLa, которые были инфицированы лентивирусным вектором, содержащим репортерный ген флуоресцентного белка GFP, а затем был проведен трехкратный клеточный сортинг на варианты клеток, содержащие эпигенетически репрессированный ген *GFP*, экспрессия которого восстанавливалась при обработке клеток ингибитором гистоновых деацетилаз трихостатином А [41]. Эта популяция клеток получила название HeLa TI. Мы предположили, что при воздействии на клетки HeLa TI ксенобиотиков, способных влиять на систему эпигенетической регуляции экспрессии генов, должна происходить активация экспрессии эпигенетически подавленного GFP, и, соответственно, будет наблюдаться появление флуоресцентного сигнала. Таким образом, использование клеток HeLa TI потенциально открыло возможность создания тест-системы, позволяющей проводить скрининг ксенобиотиков, обладающих различными механизмами влияния на систему эпигенетической регуляции.

Мы показали, что эпигенетически репрессированный ген GFP в клетках HeLa TI реактивируется 15 агенты, реализующими свои эффекты воздействием на различные ферменты системы эпигенетической регуляции транскрипции, в том числе ингибиторы HDAC – вориносат, бутират натрия, вальпроевая кислота, депсипептид, помиферин и энтиносат; ингибиторы метилирования ДНК – децитабин, 5-азациитидин, RG108; ингибиторы гистоновых метилтрансфераз – UNC0638, VIX01294, ДЗНеп; ремодератор хроматина – кураксин CBL0137; а также ингибиторы бромодоменов – JQ-1 и JQ-35. Согласно полученным данным, использование комбинаций эпигенетических модуляторов с разным механизмом действия приводит к существенному увеличению числа клеток с реактивированным GFP по сравнению с их индивидуальными эффектами. Мы также продемонстрировали, что клетки HeLa TI способны метаболизировать ксенобиотики и обладают конститутивно экспрессируемыми и индуцируемыми монооксигеназами цитохрома P450, участвующими в биотрансформации ксенобиотиков. Таким образом, клетки HeLa TI могут быть использованы в качестве адекватной тест-системы для скрининга химических веществ, которые должны быть метаболически активированы. Оказалось, что фракция S9 печени крысы, которая широко используется для активации ксенобиотиков при тестировании генотоксичности, способна реактивировать эпигенетически репрессированные гены. Применяя систему HeLa TI, мы установили, что N-нитрозодифениламин и N-нитрозодиметиламин реактивируют эпигенетически репрессированные гены, вероятно, влияя на метилирование ДНК.

Таким образом, тест-система HeLa TI может быть использована для широкого скрининга эпигенетически активных ксенобиотиков. Далее выявленные эпигенетически активные ксенобиотики предполагается тестировать с помощью количественной ПЦР на способность вызывать изменения уровня экспрессии генов, вовлеченных в процесс канцерогенеза. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского Научного Фонда (грант № 21-75-10163).

Список использованных источников

1 Злокачественные новообразования в России в 2019 году (заболеваемость и смертность). Под ред. Каприна А.Д., Старинского В.В., Шахзадовой А.О. М: МНИОИ им. П.А. Герцена - филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России. - 2020. - 252 с.

2 Указ Президента РФ от 7 мая 2018 г. № 204 "О национальных целях и стратегических задачах развития Российской Федерации на период до 2024 года".

3 International Agency for Research Cancer: CANCER TOMORROW - URL: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en> (дата обращения 7.10.2023).

- 4 Song M., Vogelstein B., Giovannucci E.L., Willett W.C., Tomasetti C. Cancer prevention: Molecular and epidemiologic consensus // *Science* – 2018. – Vol. 361, No. 6409. P. 1317 – 1318.
- 5 Kobets T., Iatropoulos M.J., Williams G.M. Mechanisms of DNA-reactive and epigenetic chemical carcinogens: applications to carcinogenicity testing and risk assessment // *Toxicology Research (Camb)* – 2019. – Vol. 8, No. 2. P. 123 – 145.
- 6 Белицкий Г.А., Кирсанов К.И., Лесовая Е.А., Максимова В.П., Соленова Л.Г., Якубовская М.Г. Химический канцерогенез и первичная профилактика рака. – М: АБВ-пресс, 2020. – 482 с.
- 7 Desaulniers D., Vasseur P., Jacobs A., Aguila M.C, Ertych N., Jacobs M.N. Integration of Epigenetic Mechanisms into Non-Genotoxic Carcinogenicity Hazard Assessment: Focus on DNA Methylation and Histone Modifications. *International Journal of Molecular Sciences* – 2021. – Vol. 22, No. 20. P. 10969.
- 8 Goodman S., Chappell G., Guyton K.Z., Pogribny I.P., Rusyn I. Epigenetic alterations induced by genotoxic occupational and environmental human chemical carcinogens: An update of a systematic literature review. *Mutation Research* – 2022. – Vol. 789, P.108408.
- 9 Samet J.M., Chiu W.A., Cogliano V., Jinot J., Kriebel D., Lunn R.M., Beland F.A., Wild C.P. The IARC Monographs: Updated Procedures for Modern and Transparent Evidence Synthesis in Cancer Hazard Identification. *Journal of the National Cancer Institute* – 2020. – Vol. 112, No. 1. P. 30-37.
- 10 Jacobs M.N., Colacci A, Corvi R, Vaccari M, Aguila MC, Corvaro M, Vasseur P. Chemical carcinogen safety testing: OECD expert group international consensus on the development of an integrated approach for the testing and assessment of chemical non-genotoxic carcinogens. *Archives of Toxicology* – 2020. – Vol. 94, No. 8. P. 2899-2923.
- 11 Herceg Z., Lambert M.P., van Veldhoven K., Demetriou C., Vineis P., Smith M.T. Towards incorporating epigenetic mechanisms into carcinogen identification and evaluation. *Carcinogenesis* – 2013. – Vol. 34, No. 9. P. 1955–1967.
- 12 Prins G.S. Estrogen imprinting: when your epigenetic memories come back to haunt you // *Endocrinology* – 2008. – Vol. 149, No. 12. P. 5919 – 5921.
- 13 Kobets T., Iatropoulos M.J., Williams G.M. Mechanisms of DNA-reactive and epigenetic chemical carcinogens: applications to carcinogenicity testing and risk assessment // *Toxicology Research (Camb)* – 2019. – Vol. 8, No. 2. P. 123 – 145.
- 14 Allis C.D., Jenuwein T. The molecular hallmarks of epigenetic control // *Nature Reviews Genetics* – 2016. – Vol. 17, No. 8. P. 487 – 500.
- 24 Chung F.F., Herceg Z. The Promises and Challenges of Toxicology-Epigenomics: Environmental Chemicals and Their Impacts on the Epigenome // *Environ Health Perspect* – 2020. – Vol. 128, No. 1. P. 15001.
- 16 Angrish M.M., Allard P., McCullough S.D., Druwe I.L., Chadwick L., Hines E., Chorley B.N. Epigenetic Applications in Adverse Outcome Pathways and Environmental Risk Evaluation // *Environ Health Perspect* – 2018. – Vol. 126, No. 4. P. 045001.
- 17 Максимова В.П., Бугаева П.Е., Жидкова Е.М., Усалка О.Г. Современные подходы к выявлению и изучению эпигенетически активных ксенобиотиков // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2019 – N 6 (3). – С. 8 -27.
- 18 Martinez E.D., Dull A.B., Beutler J.A., Hager G.L. High-Content Fluorescence-Based Screening for Epigenetic Modulators // *Methods in Enzymology* – 2006. – Vol. 414, P. 21 – 36.
- 19 Poleshko A., Einarson M.B., Shalginskikh N., Zhang R. Identification of a functional network of human epigenetic silencing factors // *The Journal of Biological Chemistry* – 2010. – Vol. 285, No. 1. P. 422 – 433.
- 20 Maksimova V., Shalginskikh N., Vlasova O., Usalka O., Beizer A., Bugaeva P., Fedorov D., Lizogub O., Lesovaya E., Katz R., Belitsky G., Kirsanov K., Yakubovskaya M. HeLa TI cell-based assay as a new approach to screen for chemicals able to reactivate the expression of epigenetically silenced genes // *PloS One* – 2021. – Vol. 16, No. 6. P. e0252504.