

НАРУШЕНИЯ РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ЗАМЕЩЕННОГО ЭТИЛОВОГО ЭФИРА 2-АМИНО-1Н-ПИРРОЛ-3-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ

¹Бойчук С.В., ¹Галембикова А.Р., ²Зыкова С.С., ¹Хуснутдинов Р.Р.

¹ФГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань, Россия (420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49), e-mail: boichuksergei@mail.ru

²ФКОУ ВПО «Пермский институт ФСИН России», (614012, г. Пермь, ул. Карпинского, 125), e-mail: zykova.sv@rambler.ru

Настоящая статья посвящена изучению механизмов цитотоксического действия этилового эфира 2-амино-1-бензоиламино-5-(2-(4-хлорфенил)-2-оксоэтилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-АПК) в отношении некоторых опухолевых клеточных линий *in vitro*. Была обнаружена способность данного соединения, относящегося к классу 2-амино-пиррол-карбоксилатов, вызывать нарушения регуляции клеточного цикла и индуцировать селективное накопление опухолевых клеток в М-фазе клеточного цикла. Эффект действия 2-АПК был сопоставим с эффектом препаратов, влияющих на процессы полимеризации/деполимеризации тубулина – паклитакселом, винбластинном и нокадозолом. Кроме того, была выявлена способность 2-АПК индуцировать двухнитевые разрывы ДНК и вызывать последующую активацию АТМ- и DNA-РК-опосредованных механизмов репарации повреждений ДНК. Следствием описанных выше нарушений являлась гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза, о чем свидетельствовало накопление расщепленных форм поли-АДФ(рибоза)-полимеразы (ПАРП) и каспазы-3.

Ключевые слова: 2-амино-пиррол-карбоксилаты, повреждения ДНК, репарация, апоптоз, митоз, опухолевые клеточные линии, гастроинтестинальные стромальные опухоли, саркомы мягких тканей.

2-AMINO-1H-PYRROLE-3-CARBOXYLATE INDUCES THE CELL CYCLE ABNORMALITIES AND DNA DAMAGE RESPONSE IN TUMOR CELLS IN VITRO

¹Boichuk S.V., ¹Galembikova A.R., ²Zykova S.S., ¹Khusnutdinov R.R.

¹Kazan State medical University, Russia (420012, Kazan, 49 Butlerov str.), e-mail: boichuksergei@mail.ru

²Perm Penal Service Institute, Russia (614012, Perm, 125 Karpinskii st.), e-mail: zykova.sv@rambler.ru

The study was aimed to examine the molecular mechanisms of cytotoxic activity of 2-amino-1-benzamido-4-oxo-5-(2-oxo-2-(p-tolyl)ethylidene)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxylate (2-APC) against the various tumor cell lines *in vitro*. The compound examined in present study belonged to the 2-amino-pirrole-carboxilates and induced a cell cycle abnormalities and robust accumulation of the tumor cells in M-phase. This effect was similar to the effect observed in paclitaxel-, vinblastine- and nocadazole-treated tumor cells. Moreover, 2-APC induced DNA double-strand breaks and activated ATM- and DNA-PK-mediated DNA damage responses (DDR). The outcome of these events was apoptotic cell death of tumor cells that was evidenced by accumulation of the cleaved forms of poly(ADP)-ribose-polymerase (PARP) and caspase-3.

Keywords: 2-amino-pirrole-carboxilate, DNA damage, DNA damage response (DDR), apoptosis, mitosis, tumor cell lines, gastrointestinal stromal tumors, soft tissue sarcomas.

Химиорезистентность у злокачественных новообразований, относящихся к группе сарком мягких тканей, является одним из ключевых факторов, оказывающих негативное влияние на характер течения и прогноз заболевания у больных с метастатическими и нерезектабельными формами заболевания [4; 12; 13]. Гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСТ) долгое время относились к вышеуказанной нозологической группе злокачественных новообразований и также считались нечувствительными к большинству

имеющихся в настоящее время химиопрепаратов. Ключевым моментом в появлении ГИСТ, как самостоятельной нозологической единицы, стало открытие активирующей мутации в гене *c-kit* в некоторых мезенхимальных и нейрогенных опухолях, экспрессирующих маркер CD-117. Результатом данной мутации является стимуляция митотической активности и пролиферация опухолевых клеток. Последующие (в том числе, проведенные нами) исследования показали, что наряду с таргетными препаратами первой и второй линии (иматиниб, сунитиниб) некоторые химиопрепараты также могут быть эффективными в отношении клеток ГИСТ как в отдельности, так и на фоне их преинкубации с иматинибом [2; 6; 9]. Данная концепция о возможности сенситизации иматинибом клеток ГИСТ к химиопрепаратам согласуется с данными единичных клинических наблюдений, свидетельствующих о том, что иматиниб может повышать чувствительность ГИСТ к малым дозам химиопрепаратов, в частности ингибитору топоизомеразы II типа – доксорубицину [11]. Данные факты явились предпосылками как для пересмотра существовавшего в течение долгого времени ошибочного мнения о химиорезистентности ГИСТ, так и для поиска новых химиопрепаратов, не обладающих селективностью действия в отношении рецепторов тирозинкиназ. Поиск новых лекарственных препаратов для терапии больных с метастатическими и неоперабельными формами ГИСТ также является актуальным по причине быстро развивающейся резистентности опухоли к таргетным препаратам. Показано, что более чем у половины пациентов с ГИСТ вторичная резистентность к иматинибу развивается в течение 2 лет с момента начала проведения им таргетной терапии [7; 14].

Проведенные нами ранее исследования выявили цитотоксическую активность некоторых соединений, относящихся к классу 4-пивоил-2-пирролонов, по отношению к различным опухолевым клеточным линиям *in vitro*, в том числе к различным линиям ГИСТ и саркомам мягких тканей [3].

Исходя из вышеизложенного, **целью настоящего исследования** явилось изучение молекулярных механизмов действия одного из вновь синтезированных нами соединений, относящихся к классу 2-амино-пирролов по отношению к клеткам ГИСТ, а также лейо- и рабдомиосарком.

Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования были выбраны опухолевые клеточные линии гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСТ-T1), а также сарком мягких тканей (лейомиосаркома SK-LMS-1, рабдомиосаркома RD). Клетки культивировали в стандартных условиях (37°C, 5%CO₂ - LamSystems, Россия) в культуральной среде RPMI-1640 (ПАНЭКО, Россия) с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки (15%) (HyClone, США), антибиотиков пенициллина-стрептомицина и L-глутамина (все реагенты ПАНЭКО, Россия).

В опухолевые клеточные культуры вносили химиопрепараты доксорубин (ДОКС)(0.25 мкг/мл), паклитаксел (ПТ)(1 мкМ), винбластин (ВБ)(10 мкМ), нокадозол (НЗ)(10 мкМ) (все реагенты Sigma), а также этиловый эфир 2-амино-1-бензоиламино-5-(2-(4-хлорфенил)-2-оксоэтилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты (2-АПК) в концентрации 5-10 мкМ. Опухолевые клетки инкубировали с вышеуказанными препаратами в течение 24-48 часов. Экспрессию белков, отражающих повреждение ДНК, а также активацию спасательных путей репарации повреждений ДНК и развитие апоптоза оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих моноклональных антител (мАТ). Подсчет клеток в М-фазе клеточного цикла проводили общепринятым способом с использованием иммунофлуоресцентной микроскопии (Olympus BX63) и оценкой уровня экспрессии гистона 3, фосфорилированного по остаткам серина в положении 10. Статистический анализ результатов проводили методом t-критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel 2007.

Результаты исследования и их обсуждение

На ранних сроках культивирования клеток ГИСТ-Т1 (24 ч) с 2-АПК наблюдалось значительное увеличение клеток округлой формы, что свидетельствовало о возможном накоплении клеток в М-фазе клеточного цикла под действием данного соединения (рис. 1). Эффект данного соединения был дозозависимым (5-10 мкМ) и сопоставимым с действием паклитаксела, также индуцирующего «арест» клеток в М-фазе клеточного цикла за счет его способности влиять на процессы деполимеризации тубулина (рис. 1).

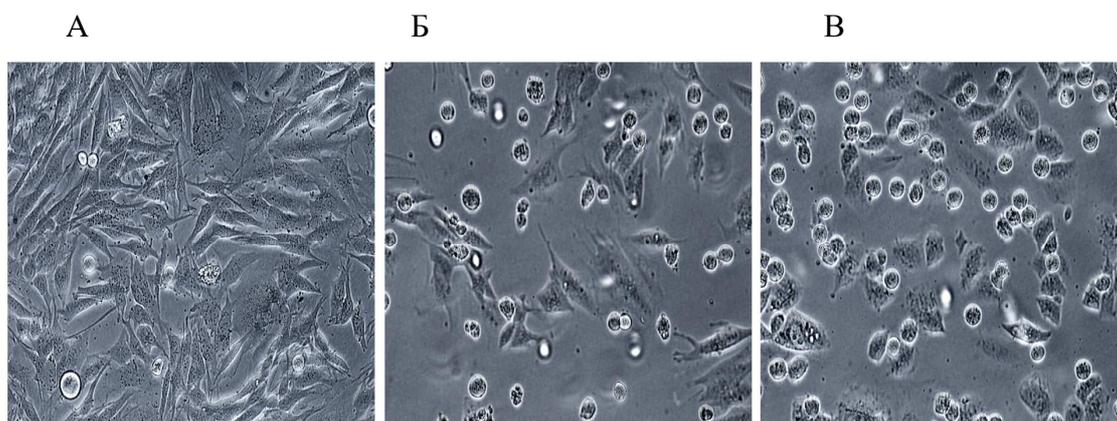


Рис. 1. Увеличение клеток округлой формы при культивировании опухолевых клеток линии ГИСТ-Т1 с 2-АПК- 5мкМ (Б) и паклитаксел - 1мкМ (В) в течение 24 часов. А - контроль.

Увеличение количества клеток, находившихся в стадии митоза, было подтверждено методом иммунофлуоресцентной микроскопии, показавшим значительное увеличение количеств клеток, экспрессировавших фосфорилированную (по остаткам серина в положении 10) форму гистона Н3 ($p < 0.001$). Данная форма гистона традиционно используется для выявления и подсчета количеств митотических клеток. Максимальное

количество pH3-позитивных клеток наблюдалось спустя 24 ч после культивирования опухолевых клеток с вышеуказанными соединениями, а также паклитакселом и другими препаратами, влияющими на процессы полимеризации/деполимеризации тубулина и, таким образом, индуцирующими арест клеток в М-фазе клеточного цикла (положительный контроль).

Кроме того, инкубация клеток ГИСТ Т-1 с 2-АПК приводила к образованию двунитевых разрывов ДНК, о чем свидетельствовало накопление в опухолевых клетках гистона 2А, фосфорилированного по остаткам серина в положении 139 (γ -H2AX) (рис. 2). Как и предполагалось, образование двунитевых разрывов ДНК активировало в опухолевых клетках АТМ-опосредованные механизмы репарации повреждений ДНК, о чем свидетельствовал повышенный уровень экспрессии АТМ-киназы, фосфорилированной по остаткам серина 1981. Активация сигнальных путей репарации повреждений ДНК в клетках ГИСТ приводила к активации «точек рестрикции», регулирующих клеточный цикл (повышение экспрессии белка p53, фосфорилированного по остаткам серина в положении 15). Важно подчеркнуть, что, несмотря на наличие признаков двунитевых разрывов ДНК и активацию начальных этапов репарации повреждений ДНК, уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 в опухолевых клетках ГИСТ Т1 после воздействия 2-АПК существенно снижался, что могло указывать на несостоятельность процессов гомологичной рекомбинации в данных экспериментальных условиях (рис. 2). Все описанные выше изменения также наблюдались в клетках лейо- и рабдомиосаркомы, инкубированных с данным соединением.

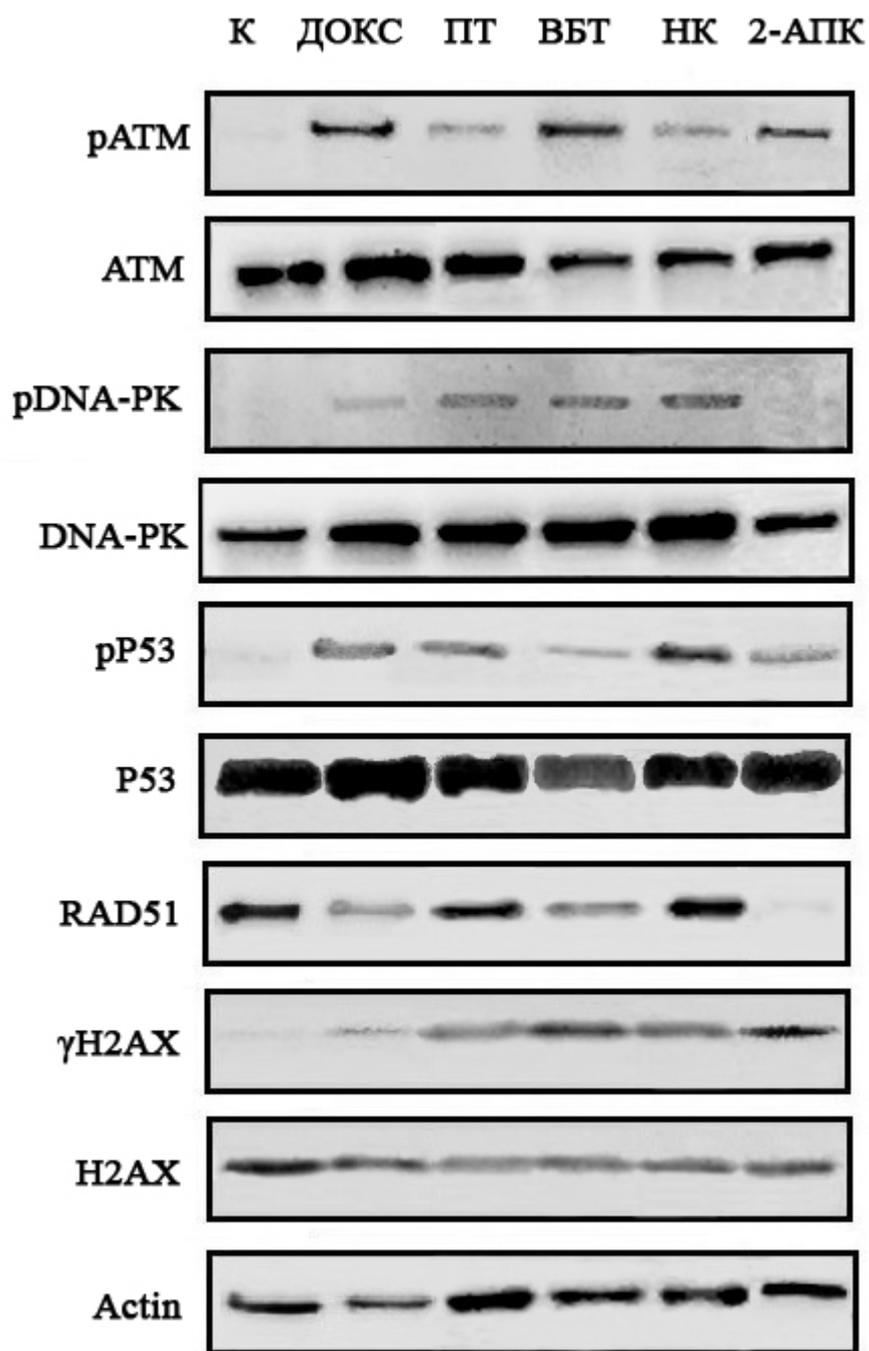


Рис. 2. Анализ способности доксорубицина (ДОКС), паклитаксела (ПТ), винбластина (ВБТ), нокадазола (НК) и соединения 2-АПК индуцировать в клетках ГИСТ Т-1 образование двунитевых разрывов ДНК (γ-H2AX), активировать спасательные пути репарации вышеперечисленных повреждений (фосфорилированные формы АТМ-киназы и белка р53, изменение уровня экспрессии рекомбиназы Rad51).

Результаты проведенных исследований показали, что ингибитор топоизомеразы II типа доксорубицин, а также ингибиторы процессов полимеризации и деполимеризации тубулина (паклитаксел и др.) вызывали в опухолевых клетках ГИСТ и сарком мягких тканей аналогичные изменения – образование двунитевых разрывов ДНК и активацию АТМ-

зависимого спасательного пути их репарации. Примечательно, что повреждения ДНК, вызываемые доксорубицином и препаратами, влияющими на динамическое состояние микротрубочек, также активировали DNA-РК-зависимые пути репарации повреждений ДНК, о чем свидетельствовал повышенный уровень экспрессии DNA-РК-киназы, фосфорилированной по остаткам серина 2056 (рис. 2).

Описанные выше различия в механизмах активации сигнальных путей репарации повреждений ДНК в опухолевых клетках под действием 2-АПК и препаратами контроля (ингибитор топоизомеразы II типа и пр.) могут свидетельствовать о специфическом характере повреждений ДНК, вызываемых 2-АПК. Для подтверждения правомочности данной гипотезы требуются дальнейшие исследования, в частности проведение анализа видов повреждений ДНК под действием синтезированного нами соединения (например, щелочная и нейтральная версии метода ДНК-комет).

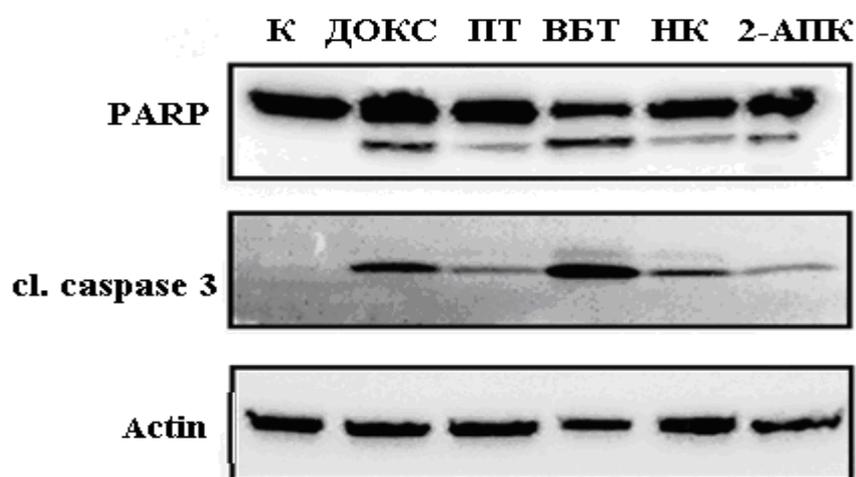


Рис. 3. Сравнительный анализ способности доксорубицина (ДОКС), паклитаксела (ПТ), винбластина (ВБТ), нокодазола (НК) и соединения 2-АПК индуцировать апоптоз клеток ГИСТ Т-1. Маркеры апоптоза - экспрессия расщепленных форм ПАРП и каспазы-3.

Тем не менее, несмотря на запуск спасательных путей активации в опухолевых клетках ГИСТ-Т1, а также лейо- и фибромиосарком, последующая их инкубация в течение 48 часов с 2-АПК приводила к их гибели по механизму апоптоза, о чем свидетельствовало накопление расщепленных форм поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП), а также каспазы-3 (рис. 3). Одним из возможных механизмов, ответственных за гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза, могла являться несостоятельность процессов гомологичной рекомбинации, о чем свидетельствовало значительное снижение уровня рекомбиназы Rad51 в данных экспериментальных условиях [5]. Для изучения возможных механизмов селективного снижения уровня экспрессии Rad51 требуется проведение дальнейших исследований, в частности с использованием ингибиторов протеасом для изучения возможных механизмов деградации данного белка. Полученные нами данные согласуются с

общепринятой концепцией гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза в условиях генотоксического стресса вследствие несостоятельности процессов репарации повреждений ДНК, вызванных химиопрепаратами, радиотерапией или другим генотоксическим воздействием [1; 8; 10; 15]. Про-апоптогенный эффект 2-АПК в отношении опухолевых клеток ГИСТ и сарком мягких тканей был сопоставим с эффектом ингибитора топоизомеразы II типа – доксорубицина и превышал эффект препаратов, влияющих на динамическое состояние микротрубочек (паклитаксела и винбластина).

Заключение

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о способности 2-АПК вызывать в опухолевых клетках ГИСТ и сарком мягких тканей нарушения регуляции клеточного цикла и индуцировать селективное накопление опухолевых клеток в М-фазе клеточного цикла. Следствием нарушений сегрегации генетического материала в фазе митоза («митотическая катастрофа») явилась активация АТМ-опосредованного пути репарации повреждений ДНК в опухолевых клетках и последующий запуск программы апоптоза вследствие несостоятельности репаративных механизмов.

Исследования поддержаны грантом Российского научного Фонда (РНФ) - № 14-15-00342 (2014-2016).

Список литературы

1. Бойчук С.В. Нарушения в системе репарации ДНК – роль в онкогенезе и терапии злокачественных новообразований / Бойчук С.В., Рамазанов Б.Р. // Казанский медицинский журнал. – 2014. – № 3. – С. 304-314.
2. Бойчук С.В. Иматиниб повышает чувствительность клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам топоизомераз II типа / Бойчук С.В., Галембикова А.Р., Рамазанов Б.Р., Дусинг А. // Успехи молекулярной онкологии. – 2015. - № 1. - С. 76-81.
3. Зыкова С.С., Бойчук С.В., Галембикова А.Р., Рамазанов Б.Р., Мустафин И.Г., Игидов Н.М., Одегова Т.Ф. 3-гидрокси-1,5-диарил-4-пиваоил-2,5-дигидро-2-пирролоны нарушают процессы митоза и индуцируют гибель опухолевых клеток *in vitro* // Цитология. - 2014. – Т. 56, № 6. – С. 439-442.
4. Буланов А.А. Адьювантная терапия сарком скелета, сарком мягких тканей и меланомы / Буланов А.А., Носов Д.А., Тюляндин С.А // Практическая онкология. – 2007. – Т. 8, № 3. – С. 155-163.
5. Boichuk S. Functional connection between Rad51 and PML in homology-directed repair /. Boichuk S., Hu L., Makielski K., Pandolfi P.P., Gjoerup O.V. // PLoS One. – 2011. – 6 (10):e25814.

6. Boichuk S. Unbiased Compound Screening Identifies Unexpected Drug Sensitivities and Novel Treatment Options for Gastrointestinal Stromal Tumors / Boichuk S., Parry J.A., Makielski K.R., Litovchick L. et al. // *Cancer Res.* – 2014. - Vol 74 (4). – P. 1200-1213.
7. Gramza A.W. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors / Gramza A.W., Corless C.L., Heinrich M.C. // *Clin Cancer Res.* - 2009. – Vol. 15. – P. 7510–7518.
8. Golding S. Dynamic inhibition of ATM kinase provides a strategy for glioblastoma multiform radiosensitization and growth control / Golding S., Rosenberg E., Adams B.R., Wignarajah S., Beckta J.M., O'Connor M.J. et al. // *Cell Cycle.* - 2012. – Vol. 11. – P. 1167–1173.
9. Gonzalez I. Imatinib inhibits proliferation of Ewing tumor cells mediated by the stem cell factor/KIT receptor pathway, and sensitizes cells to vincristine and doxorubicin-induced apoptosis / Gonzalez I., Andreu E.J., Panizo A. et al. // *Clin Cancer Res.* - 2004. – Vol. 10. – P. 751-761.
10. Huntoon C.J. ATR inhibition broadly sensitizes ovarian cancer cells to chemotherapy independent of BRCA status / Huntoon C.J., Flatten K.S., Wahner Hendrickson A.E., Huehls A.M., Sutor S.L., Kaufmann S.H. et al. // *Cancer Res.* – 2013. – Vol. 73. – P. 3683–3691.
11. Maurel J. Imatinib plus low-dose doxorubicin in patients with advanced gastrointestinal stromal tumors refractory to high-dose imatinib: a phase I-II study by the Spanish Group for Research on Sarcomas / Maurel J., Martins A.S., Poveda A., López-Guerrero J.A., Cubedo R. et al. // *Cancer.* – 2010. – Vol. 116 (15). – P. 3692-3701.
12. O'Byrne K. The role of chemotherapy in the treatment of adult soft tissue sarcomas / O'Byrne K., Stewart W.P. // *Oncology.* – 1999. – Vol. 56. – P. 13-23.
13. Tierney J.F. Adjuvant chemotherapy for soft_tissue sarcoma: Review and meta-analysis of the published results of randomized clinical trials / Tierney J.F., Mosseri V., Stewart L.A. et al. // *Brit. J. Cancer.* – 1995. – Vol. 72. – P. 469-457.
14. Verweij J. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumors with high-dose imatinib: randomized trial. / Verweij J., Casali P.G., Zalcborg J. et al. // *Lancet.* - 2004. – Vol. 364. - P. 1127–1132.
15. Woods D. Chemotherapy induced DNA damage response: Convergence of drugs and pathways. / Woods D., Turchi J.J. // *Cancer Biol Ther.* – 2013. - Vol. 14. – P. 379–389.

Рецензенты:

Семина И.И., д.м.н., профессор, заведующий ЦНИЛ ГБОУ ВПО «Казанский ГМУ» Минздрава России, г. Казань;

Мухутдинова Ф.И., д.м.н., профессор ГБОУ ВПО «Казанский ГМУ» Минздрава России, г. Казань.