

А.Р. Галембикова¹, С.В. Бойчук¹, С.С. Зыкова², Р.Р. Хуснутдинов¹, П.Д. Дунаев¹

Пивалоил-замещенные 2-пирролоны индуцируют гибель гастроинтестинальных стромальных опухолей, резистентных к иматинибу и химиопрепаратам

¹ФГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», Казань;

²ФГОУ ВПО «Пермская государственная фармацевтическая академия», Пермь

Представлены результаты исследований по оценке чувствительности клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) к некоторым химиопрепаратам (ингибиторы топоизомераз II типа, таксаны, винкаалкалоиды), а также пивалоил-замещенным пиррол-содержащим гетероциклическим соединениям (ПЗПГ). Показан цитотоксический эффект вышеуказанных химиопрепаратов в отношении клеток ГИСО, чувствительных к иматинибу (ИМ). Эффект ПЗПГ был выявлен как в отношении ИМ-чувствительных, так и резистентных к ИМ клеток ГИСО. ПЗПГ были также способны оказывать цитотоксический эффект в отношении клеток ГИСО, резистентных к вышеуказанным химиопрепаратам. Преимущественным механизмом гибели опухолевых клеток под действием ПЗПГ является апоптоз, что может быть следствием нарушений в М-фазе клеточного цикла и развитием митотической катастрофы.

Ключевые слова: гастроинтестинальные стромальные опухоли (ГИСО), химиопрепараты, пивалоил-замещенные пиррол-содержащие гетероциклические соединения (ПЗПГ), апоптоз

Открытие активирующих мутаций протоонкогена *c-KIT* в клетках гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСО) явилось ключевым событием как с точки зрения диагностики данных злокачественных новообразований, так и с точки зрения наиболее ярких примеров последующего успешного использования таргетных препаратов в лечении онкологических больных [7, 10]. Обнаружение различных активирующих мутаций в генах *c-KIT*, а также *PDGFRA* позволили в дальнейшем разработать молекулярную классификацию ГИСО, определить прогностическое значение данных мутаций и степень чувствительности ГИСО к иматинибу и другим таргетным препаратам [4, 9]. На сегодняшний день проведение таргетной терапии иматинибом (Гливеком) является общепризнанным стандартом в лечении больных с рецидивными и дис-

семинарованными формами ГИСО, позволяющим достичь почти 4-х кратного увеличения продолжительности жизни больных с данными формами заболевания. Несмотря на впечатляющие результаты от проведения таргетной терапии иматинибом (ИМ), более чем у половины пациентов с ГИСО в течение 2-х лет после начала терапии ИМ развивается резистентность к данному препарату, обусловленная развитием вторичных мутаций, в том числе, в 13, 14 и 17 экзонах гена *c-KIT* [9, 15]. Данный факт явился предпосылкой для разработки и внедрения в практическую онкологию таргетных препаратов второго и третьего поколения (сунитиниба и регорафениба, соответственно), что позволило добиться определенных успехов в лечении больных ГИСО, резистентных к ИМ [11].

В настоящее время проведение химиотерапии больным ГИСО считается малоперспективным, уровень ответа на химиотерапию, по данным разных авторов, варьирует от 0 до 27%, а медиана выживаемости пациентов, получавших системную химиотерапию, составляет от 14 до 18 месяцев. Тем не менее, данная точка зрения в настоящее время подвергается пересмотру. Например, сравнительно недавно были опубликованы результаты, свидетельствующие о чувствительности опухолевых клеток ГИСО к отдельным цитостатическим химиопрепаратам как *in vitro*, так и *in vivo* [3, 6, 13, 14].

Исходя из вышеизложенного, целью настоящего исследования явилось изучение химиочувствительности ИМ-чувствительных и резистентных клеточных линий ГИСО к химиопрепаратам различных групп. Принимая во внимание полученные нами ранее результаты, свидетельствующие о высокой цитотоксической активности некоторых пивалоил-замещенных пиррол-содержащих гетероциклических соединений (ПЗПГ) в отношении опухолевых клеточных линий, относящихся к группе сарком мягких тканей [5] был также проведен сравнительный анализ их цитотоксических свойств в отношении клеточных линий ГИСО, в том числе, резистентных к ИМ и некоторым химиопрепаратам.

Материалы и методы исследования

Исследования проводились на клеточных линиях ГИСО, чувствительных и резистентных к ИМ (Т-1 и 430, соответственно). В исследование был также включен полученный в нашей лаборатории клон опухолевых клеток линии ГИСО Т-1 (Т29-Р), обладавший резистентностью к некоторым химиопрепаратам (паклитакселу, этопозиду, доксорубину и др.). Клеточные линии ГИСО культивировали при 37°C и 5% CO₂ в культуральной среде RPMI-1640 (ПАНЭКО, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), антибиотики (пенициллин и стрептомицин) и L-глутамин (ПАНЭКО, Россия). Клетки культивировали в присутствии ИМ, либо химиопрепаратов доксорубина, паклитаксела и винбластина (Sigma, США), этопозида (Calbiochem, США), а также 2-х соединений, относящихся к ПЗПГ, ранее проявивших цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток сарком мягких тканей [5].

Уровень экспрессии белков, являющихся маркерами нарушений М-фазы клеточного цикла, двунитевых разрывов ДНК и апоптоза оценивали методом иммуноблоттинга с использованием соответствующих моноклональных антител.

Для изучения цитотоксичности исследуемых химиопрепаратов в отношении клеточных линий ГИСО опухолевые клетки засеивали в лунки плоскодонного 96-луночного культурального планшета (Corning, США). После достижения 70-80%-ной конfluenceности клеток в культуру клеток вносили ИМ или вышеуказанные химиопрепараты. Клетки культивировали с различными концентрациями химиопрепаратов в 3-х повторностях в течение 24-72 часа при 37°C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Пролиферативную способность клеток ГИСО определяли фотоколориметрически с помощью реагента CellTiter 96® AQueous MTS Reagent Powder (Promega, США) с помощью планшетного анализатора Multiscan FC (Thermo Scientific, США) при длине волны 492 нм. Статистический анализ результатов проводили с помощью t-критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel 2007.

Результаты и обсуждение

Было выявлено, что ингибиторы топоизомеразы II типа (доксорубин и этопозид), а также препараты, влияющие на динамическое состояние микротрубочек веретена деления (например, паклитаксел) оказывают дозо-зависимый цитотоксический эффект в отношении как ИМ-чувствительных, так и ИМ-резистентных опухолевых клеточных линий (Т-1 и 430, соответственно). Примечательно, что ИМ-резистентная линия ГИСО 430 была значительно менее чувствительна к воздействию всех вышеуказанных химиопрепаратов (рис. 1 А, Б). Например, значения IC₅₀ для доксорубина составили 0.19±0.08 и 1.4±0.19 мг/мл в отношении клеточных линий Т-1 и 430, соответственно.

В отличие от вышеуказанных химиопрепаратов, ПЗПГ оказывали выраженный дозо-зависимый цитотоксический эффект *in vitro* как в отношении ИМ-чувствительных, так и ИМ-резистентных опухолевых клеток ГИСО. Например, значения IC₅₀ для соединения № 1 составили 12,7 ± 0.08 и 14,1 ± 0.11 мкМ в отношении

клеточных линий Т-1 и 430, соответственно, а для соединения № 2 – 13,2 ± 0.21 и 16,5 ± 0.07 мкМ, соответственно.

Основным механизмом гибели клеток ГИСО под действием вышеуказанных химиопрепаратов, а также ПЗПГ, являлся апоптоз, о чем свидетельствовало значительное повышение уровня экспрессии расщепленных форм каспазы-3 и поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП), являющихся общепризнанными маркерами апоптоза. Данный эффект был дозо-зависимым и коррелировал с описанными выше результатами исследований по изучению цитотоксичности. Например, для индукции апоптоза ИМ-резистентных ГИСО требовались более высокие концентрации доксорубина и этопозида по сравнению с ИМ-чувствительными клетками ГИСО (рис. 2 Б и А, соответственно). Данная закономерность была также выявлена для химиопрепаратов, влияющих на динамическое состояние микротрубочек веретена деления (например, паклитаксела), а также для ПЗПГ (рис. 3).

Индукция апоптоза в клетках ГИСО под действием ингибиторов топоизомеразы II типа являлась следствием повреждений ДНК (двунитевых разрывов), о чем свидетельствовало повышение уровня экспрессии фосфорилированной по остаткам серина в положении 139 формы гистона 2А (γ-H2AX) (рис. 2). Повышение уровня экспрессии γ-H2AX под действием ПЗПГ также могло являться следствием нарушений регуляции клеточного цикла и накопления клеток ГИСО в М-фазе. В пользу данного положения свидетельствовали характерные для М-фазы морфологические изменения клеток ГИСО (накопление клеток округлой формы) спустя 24 часа их инкубации с вышеуказанными соединениями, а также изменение уровня экспрессии некоторых белков, селективно накапливающихся в М-фазе, в частности, фосфорилированной формы ролоподобной киназы-1 (PLK-1) (рис. 3).

Представленные данные коррелируют с полученными нами ранее результатами о способности ПЗПГ нарушать процессы полимеризации тубулина, повышать уровень экспрессии гистона H3, фосфорилированного по остаткам серина в положении 10, и способствовать селективному накоплению опухолевых клеток различного происхождения в М-фазе клеточного цикла [5].

Для изучения способности ПЗПГ индуцировать гибель опухолевых клеток ГИСО, устойчивых к действию химиопрепаратов, было проведено исследование цитотоксических свойств данных соединений в отношении полученного нами ранее клона клеток ГИСО (Т-29R), обладавшего генотипическими и фенотипическими признаками резистентности к доксорубину, этопозиду и паклитакселу.

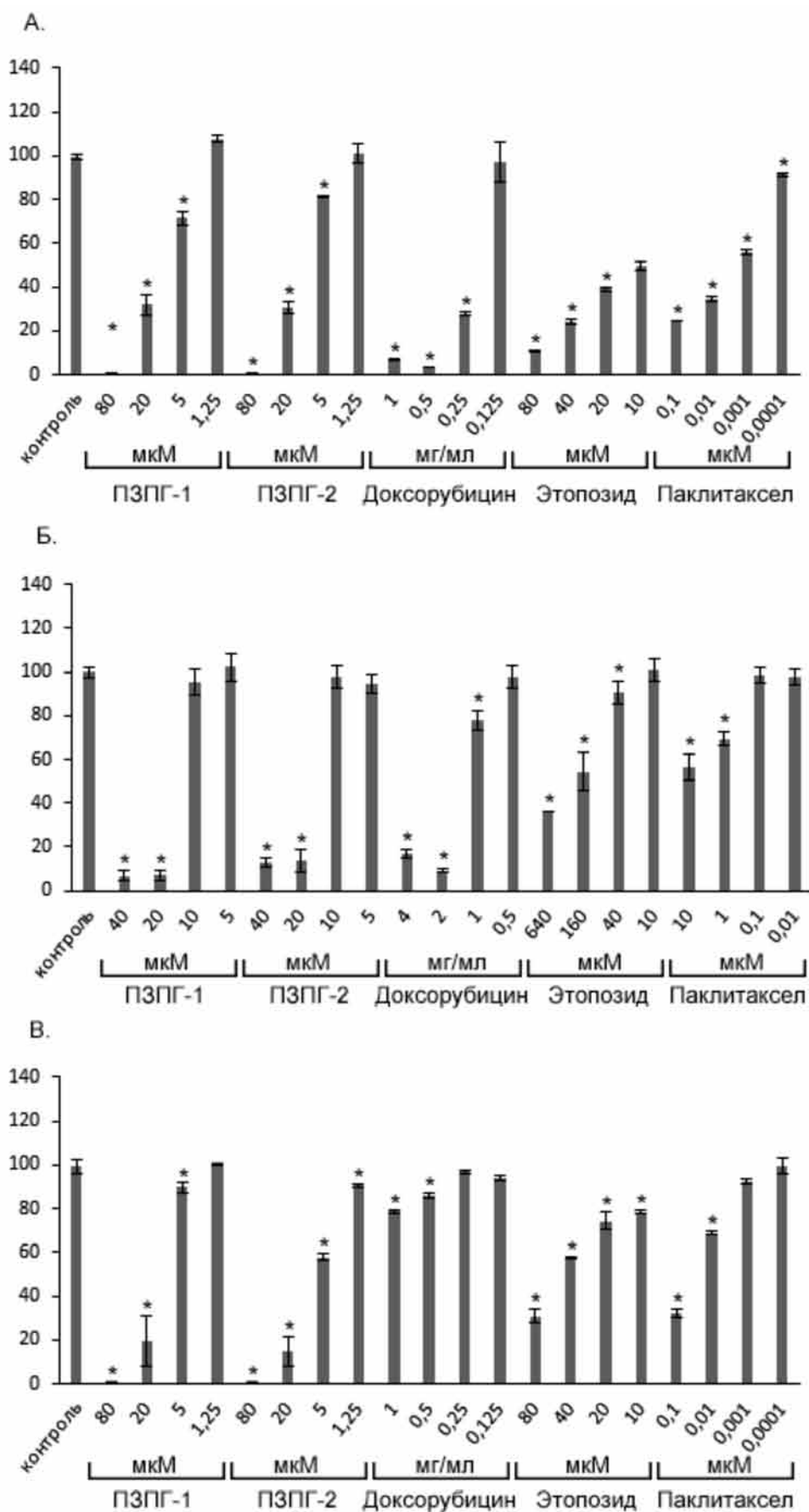


Рис. 1. Цитотоксическая активность химиопрепаратов, а также соединений ПЗПГ в отношении клеток ГИСО, чувствительных и резистентных к иматинибу (А и Б, соответственно), а также резистентных к доксорубину, этопозиду и паклитакселу (В). Цитотоксичность определяли по результатам MTS-теста. Звездочка указывает достоверность отличия от контроля при $p < 0.05$

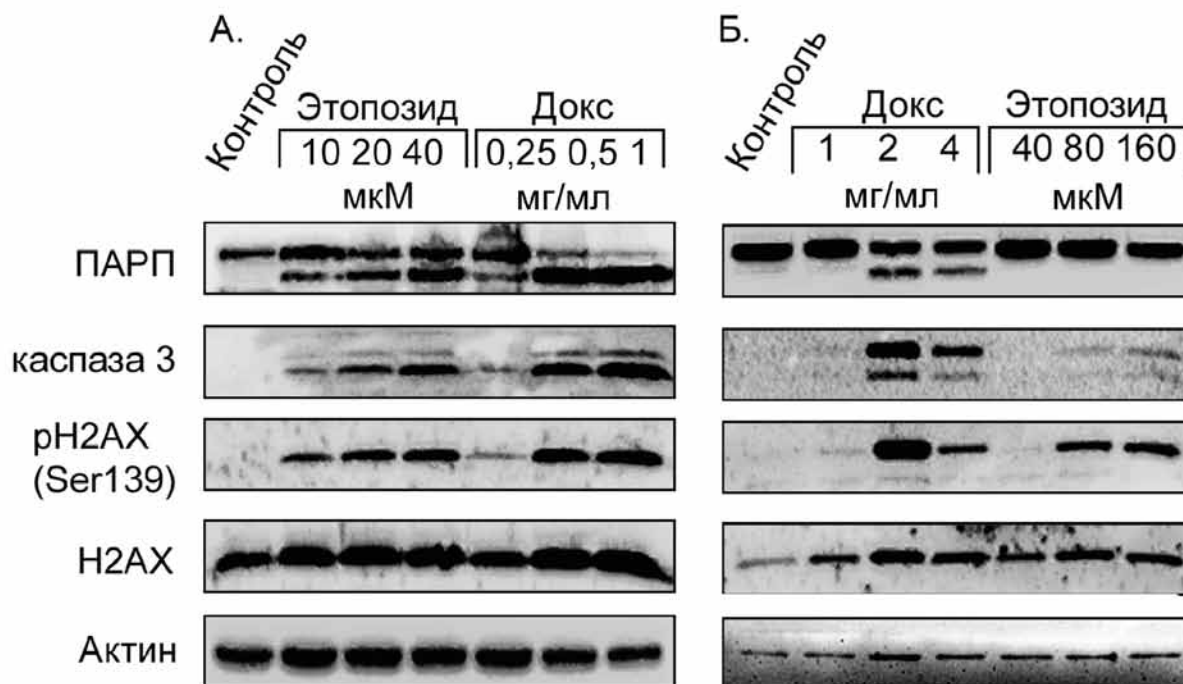


Рис. 2. Ингибиторы топоизомеразы II типа (доксорубин и этопозид) индуцируют апоптоз ИМ-чувствительных (А) и резистентных (Б) клеток ГИСО. Маркеры апоптоза – расщепленные формы PARP и каспазы-3, маркер двуниевых разрывов ДНК – повышение уровня экспрессии γ -H2AX

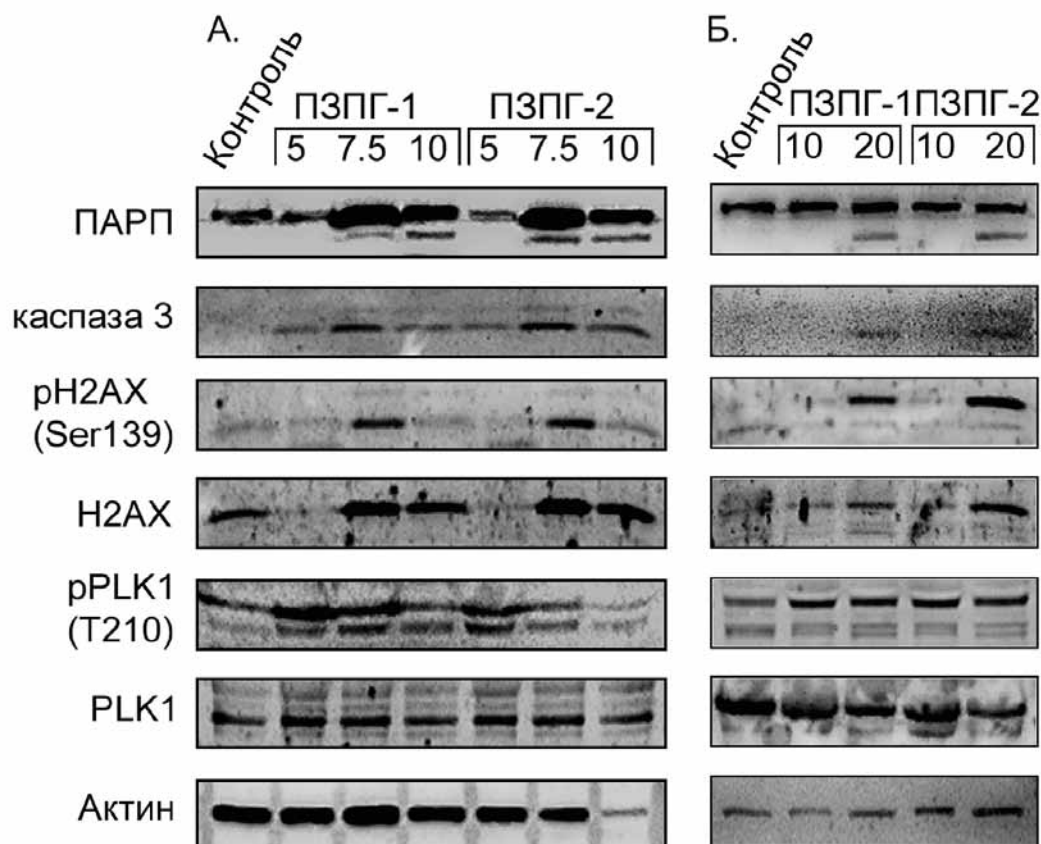


Рис. 3. ПЗПГ-1 и-2 дозо-зависимо индуцируют апоптоз ИМ-чувствительных (А) и резистентных (Б) клеток ГИСО. Маркеры апоптоза – расщепленные формы PARP и каспазы-3, маркеры М-фазы - повышение уровня экспрессии фосфорилированной формы PLK-1 и γ -H2AX. Концентрация ПЗПГ-1 и -2 указана в μ M

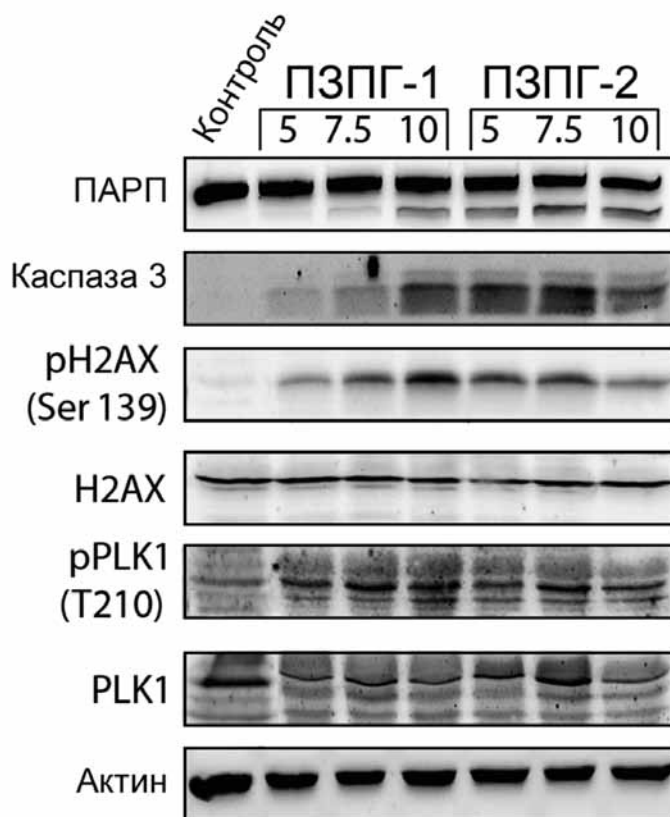


Рис. 4. ПЗПГ-1 и -2 дозо-зависимо индуцируют апоптоз клеток ГИСО T29R, резистентных к химиопрепаратам. Маркеры апоптоза – расщепленные формы ПАРП и каспазы-3, маркеры М-фазы - повышение уровня экспрессии фосфорилированной формы PLK-1 и γ -H2AX. Концентрация ПЗПГ-1 и -2 указана в мкМ.

Было обнаружено, что ПЗПГ также обладают выраженной цитотоксичностью в отношении клеток T-29R (рис. 1B), причем значения IC50 для данных соединений достоверно не отличались от значений, полученных на «родительских» опухолевых клетках ГИСО T-1. ПЗПГ индуцировали апоптоз резистентного к химиопрепаратам клона клеток ГИСО, а их про-апоптогенный эффект также сопровождался характерным повышением уровней экспрессии фосфорилированной формы PLK-1 и γ -H2AX (рис. 4).

Таким образом, результаты проведенных нами исследований свидетельствуют о чувствительности клеток ГИСО к действию ингибиторов топоизомеразы II типа – доксорубину и этопозиду, а также препаратов и соединений, влияющих на динамическое содержание микротрубочек веретена деления. К последним относятся паклитаксел и синтезированные нами соединения, относящиеся к классу пивалоил-замещенных пиррол-содержащих гетероциклов (ПЗПГ). Примечательно, что цитотоксическая активность ПЗПГ была выявлена в одинаковой степени как в отношении ИМ-чувствительных, так и ИМ-резистентных клеток ГИСО. Более того, данные соединения обладали дозо-зависимой цитотоксичностью в отношении клона

опухолевых клеток ГИСО T-29R, резистентного к вышеуказанным химиопрепаратам. Преимущественным механизмом гибели клеток ГИСО под действием ПЗПГ являлся апоптоз.

Вышеизложенное подчеркивает необходимость более углубленного изучения вопроса об эффективности химиотерапии в лечении больных с ГИСО. Особую практическую значимость имеют исследования по оценке химиочувствительности больных с ГИСО с резистентностью к таргетным препаратам, в первую очередь, ИМ. Перспективным, на наш взгляд, является изучение возможности комбинированного использования таргетных препаратов и химиопрепаратов в лечении больных с ГИСО. Например, нами было обнаружено, что ИМ способен вызывать сенситизацию клеток ГИСО к химиопрепаратам, в частности, к ингибиторам топоизомеразы II типа [2]. Одним из молекулярных механизмов данного феномена является способность таргетного препарата подавлять процессы гомологичной рекомбинации повреждений ДНК, индуцируемых данными химиопрепаратами. Способность ИМ вызывать сенситизацию опухолевых клеток к доксорубину и индуцировать в дальнейшем их апоптоз *in vitro* была также показана на опухолевых клеточных линиях саркомы Юинга

с гиперэкспрессией *c-KIT* [8]. Была также выявлена эффективность применения малых доз доксорубина у больных с неоперабельными, метастатическими, а также резистентными к ИМ формами ГИСО [12].

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-15-00342)

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойчук С.В., Галембикова А.Р., Зыкова С.С., Хуснутдинов Р.Р. Нарушения регуляции клеточного цикла и репарации повреждений ДНК в опухолевых клетках под действием замещенного этилового эфира 2-амино-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 5. – С. 116.
2. Бойчук С.В., Галембикова А.Р., Рамазанов Б.Р., Дусинг А. Иматиниб повышает чувствительность клеток гастроинтестинальных стромальных опухолей к ингибиторам топоизомераз II типа // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2015. – № 1. – С. 76-81.
3. Галембикова А.Р., Дунаев П.Д., Бойчук С.В. Оценка чувствительности гастроинтестинальных стромальных опухолей (ГИСТ) к химиопрепаратам различных групп // *Современные проблемы науки и образования*. – 2015. – № 6. – С. 255.
4. Мазуренко Н.Н., Цыганова И.В. Молекулярно-генетические особенности и маркеры гастроинтестинальных стромальных опухолей // *Успехи молекулярной онкологии*. – 2015. – № 2. – С. 29-40.
5. Boichuk S., Galembikova A., Zyкова S, Ramazanov B. et al. Ethyl-2-amino-pyrrole-3-carboxylates are novel potent anticancer agents that affect tubulin polymerization, induce G2/M cell-cycle arrest, and effectively inhibit soft tissue cancer cell growth *in vitro* // *Anti-Cancer Drugs*. – 2016. – Vol. 27(7). – P. 620-634.
6. Boichuk S., Lee D.J., Mehalek KR, Makielski KR, et al. Unbiased compound screening identifies unexpected drug sensitivities and novel treatment options for gastrointestinal stromal tumors // *Cancer Res*. – 2014. – Vol. 74. – P. 1200-1213.
7. Demetri, G. D., M. von Mehren, C. D. Blanke, A. D. Van den Abele, B., et al. Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors // *The New Engl. J. Med*. – 2002. – Vol.347. – P. 472-480.
8. Gonzalez I., Andreu E.J., Panizo A., Fontalba A. et al. 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 // *Clin. Cancer Res*. – 2004. – Vol.10. – P 751-761.
9. Gramza A.W., Corless C.L., Heinrich M.C. Resistance to tyrosine kinase inhibitors in gastrointestinal stromal tumors // *Clin Cancer Res*. – 2009. – Vol.15. – P. 7510-7518.
10. Hirota S., K. Isozaki, Moriyama Y., Hashimoto K. et al. Gain-of-function mutations of c-kit in human gastrointestinal stromal tumors // *Science (New York, N.Y.)*. – 1998. – Vol. 279. – P. 577-580.
11. Hopkins TG, Marples M, Stark D. Sunitinib in the management of gastrointestinal stromal tumours (GISTs) // *Eur J Surg Oncol*. – 2008. – Vol. 34 (8). – P. 844-850.
12. Maurel J., Martins A.S., Poveda A., López-Guerrero J.A. et al. 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 // *Cancer*. – 2010. – Vol.116. – P. 3692-3701.
13. Pessetto Z.Y, Weir S.J., Sethi G., Broward M.A. et al. Drug repurposing for gastrointestinal stromal tumor // *Mol Cancer Ther*. – 2013. – Vol. 12(7). – P. 1299-1309.
14. Pessetto, Z. Y., Ma Y., Hirst J. J., von Mehren M. et al. Drug repurposing identifies a synergistic combination therapy with imatinib mesylate for gastrointestinal stromal tumor. // *Mol. Cancer Ther*. – 2014. – Vol. 13. – P. 2276-2287.
15. Verweij J., Casali P.G., Zalcberg J., LeCesne A. et al. Progression-free survival in gastrointestinal stromal tumors with high-dose imatinib: randomized trial // *Lancet*. – 2004. – Vol. 364. – P. 1127-1132.

Поступила в редакцию 05.08.2016 г.

*A.R.Galembikova¹, S.V.Boichuk¹, S.S.Zykova²,
R.R.Khusnutdinov¹, P.D.Dunaev¹*

Pivaloyl-substituted 2-pyrrolones induce death of gastrointestinal stromal tumors resistant to imatinib and chemotherapy drugs

¹Kazan State Medical University, Kazan
²Perm State Pharmaceutical Academy, Perm

There are presented data illustrating sensitivity of gastrointestinal stromal tumors (GISTs) to certain chemotherapeutic agents (topoisomerase type II inhibitors, taxanes, vinca alkaloids) and pivaloyl-containing heterocyclic pyrroles (PCHPs). The chemotherapeutic drugs indicated above provided the cytotoxicity to IM-sensitive GIST cells. PCHPs were effective in both IM-sensitive, and resistant GISTs as well. Moreover PCHPs were also active against GISTs harboring the resistance to the chemotherapeutic agents indicated above. PCHPs-treated tumor cells underwent apoptosis due to the M-phase abnormalities and mitotic catastrophe.

Key words: gastrointestinal stromal tumors, chemotherapeutic drugs, pivaloyl-containing heterocyclic pyrroles, apoptosis