

УДК 577.12

2-АМИНО-ПИРРОЛ-КАРБОКСИЛАТ ОСЛАБЛЯЕТ ПРОЦЕССЫ ГОМОЛОГИЧНОЙ РЕКОМБИНАЦИИ ДНК И ВЫЗЫВАЕТ СЕНСИТИЗАЦИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К ДОКСОРУБИЦИНУ

© 2022 С.В. Бойчук^{1,2*}, Ф.Ф. Бикиниева¹, И.Г. Мустафин¹,
С.С. Зыкова³, С.А. Рыжкин², А.Р. Галембикова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, 420012 Казань, Россия; электронная почта: boichuksergei@mail.ru

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993 Москва, Россия

³ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России, 614990 Пермь, Россия

Поступила в редакцию 22.03.2022

После доработки 25.03.2022

Принята к публикации 25.03.2022

Несмотря на высокую эффективность химиотерапии в современной онкологии, быстрое развитие резистентности опухолей к большинству химиопрепаратов и высокая частота системных побочных эффектов от проводимой химиотерапии являются основными факторами неблагоприятного прогноза для большинства пациентов с неоперабельными, метастатическими и рецидивирующими формами злокачественных новообразований. Следовательно, поиск новых молекулярных мишеней в опухолях и разработка подходов к усилению действия уже имеющихся химиопрепаратов являются чрезвычайно актуальными для практической онкологии. Целью исследования явилось изучение способности синтезированного нами пиррол-содержащего гетероциклического соединения, именуемого в дальнейшем как 2-АПК, вызывать сенситизацию опухолевых клеток к действию химиопрепарата доксорубинина, являющегося ингибитором ДНК-топоизомеразы типа II. Исследования проводились на опухолевых клеточных линиях, культивируемых в присутствии 2-АПК, паклитаксела и доксорубинина. Уровень экспрессии белков репарации повреждений ДНК, а также апоптоза оценивали методом иммуноблоттинга, а белковые взаимодействия – методом коиммунопреципитации. Синергизм действия химиопрепаратов оценивался с помощью компьютерной программы Synergy Finder. Было установлено, что доксорубинин оказывал умеренное цитотоксическое действие в отношении опухолевых клеток (например, остеосарком), в то время как его использование в комбинации с 2-АПК (в нетоксичных концентрациях) приводило к значимому усилению цитотоксического эффекта доксорубинина и вызывало гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза. Молекулярным механизмом 2-АПК-индуцированной сенситизации к доксорубинину явилось ослабление процессов репарации повреждений ДНК по механизму гомологичной рекомбинации, что подтверждалось снижением уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 за счёт усиления скорости её протеасом-зависимой деградации. Помимо 2-АПК данная способность была также отмечена в отношении паклитаксела, также влияющего на процессы полимеризации тубулина. Таким образом, лекарственные химиопрепараты и химические соединения, влияющие на динамическое состояние микротрубочек веретена деления, способны усиливать цитотоксическое действие ДНК-повреждающих химиопрепаратов за счёт ослабления процессов репарации повреждений ДНК в опухолевых клетках.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пиррол-содержащие гетероциклические соединения, полимеризация тубулина, паклитаксел, доксорубинин, сенситизация, апоптоз.

DOI: 10.31857/S0320972522040066, **EDN:** AQSSMH

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на успехи химиотерапии в лечении пациентов с онкологическими заболеваниями,

неуклонное развитие резистентности злокачественных новообразований к большинству современных химиопрепаратов, а также большое количество системных побочных эффектов про-

Принятые сокращения: 2-АПК – 2-амино-пиррол-карбоксилат; ДМСО – диметилсульфоксид; клетки линии HeLa – клетки аденокарциномы шейки матки человека; клетки линии U-2 OS и U-2 OS DR GFP – клетки остеосаркомы человека; ПАРП – поли-(АДФ-рибоза)-полимераза; GFP – зелёный флуоресцентный белок; MG-132 – ингибитор протеасом.

* Адресат для корреспонденции.

должают оставаться одними из главных вызовов в современной онкологии [1–3]. Эти факторы диктуют необходимость поиска новых терапевтических мишеней, направленных на увеличение терапевтического индекса химиопрепаратов и снижение токсичности от проводимой химиотерапии [4–8]. Одним из таких подходов является снижение способности опухолевых клеток репарировать повреждения ДНК, возникающие вследствие воздействия ДНК-повреждающих факторов (химиопрепараты и лучевая терапия).

Результаты настоящего исследования иллюстрируют способность синтезированного нами пиррол-содержащего гетероциклического соединения, 2-амино-пиррол-карбоксилата (2-АПК), повышать чувствительность опухолевых клеток (например, остеосарком) к ингибитору ДНК-топоизомеразы II типа, доксорубину. Данный эффект был обусловлен способностью 2-АПК снижать уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 в опухолевых клетках путём усиления процессов её протеасом-зависимой деградации, что приводило к снижению эффективности репарации повреждений ДНК по механизму гомологичной рекомбинации. Полученные данные свидетельствуют о перспективности комбинированного использования ингибиторов ДНК топоизомеразы типа II в комбинации с лекарственными препаратами, влияющими на процессы репарации повреждений ДНК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические соединения. Синтез и цитостатическая активность (Е)-этил-2-амино-5-(3,3-диметил-4-оксобутилен)-4-оксо-1-(2-фениламинобензамидо)-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксилата были описаны ранее [9, 10]. Условное обозначение данного соединения – 2-АПК (2-амино-пиррол-карбоксилат). Для исследований были также использованы химиопрепараты доксорубин («Selleck Chem», США), паклитаксел («Sigma», США), а также ингибиторы белкового синтеза циклогексимид и ингибитор протеасом MG-132 («Sigma»). Все исследуемые соединения и препараты растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) в соответствии с рекомендациями производителя.

Клеточные линии и условия культивирования. Исследования были проведены на опухолевых клеточных линиях аденокарциномы шейки матки HeLa и остеосаркомы U-2 OS, которые были получены из Американской коллекции типовых культур («ATCC», США). Клеточная линия U-2 OS DR GFP, содержащая зелёный флуоресцентный белок (GFP), была любезно предостав-

лена доктором Maria Jasin из Ракового Центра Memorial Sloan-Kettering, Нью-Йорк, США. Клеточные линии культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 15% эмбриональной бычьей сыворотки, 1% L-глутамин, 50 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и в стандартных условиях инкубатора (5% CO₂, 37 °С, «ЛамСистемс», Россия).

Антитела. Первичные антитела (АТ), используемые для вестерн-блоттинга, были следующими: актин («Gene Script», США), Rad51 («Cell Signaling», США), γ -H2AX (Ser139) («Cell Signaling»), убиквитин («Santa Cruz Biotechnology», США), расщеплённые формы каспазы-3 («Cell Signaling») и поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП) («Life Technologies», США). В качестве вторичных антител использовали АТ, конъюгированные с пероксидазой (HRP) («Santa Cruz Biotechnology»).

Вестерн-блоттинг. Для вестерн-блоттинга клетки подвергали лизису с помощью буфера RIPA (1% NP-40, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз). Полученную суспензию инкубировали в течение 1 ч при 4 °С, а затем центрифугировали («Eppendorf», Германия) в течение 30 мин при 13 000 об./мин при 4 °С. Концентрацию белка в суспензии измеряли с помощью BCA Protein Assay Kit («Thermo Fisher», США). В лунки 4–12%-ного градиентного Tris-ацетатного геля NuPAGE («Invitrogen», США) добавляли по 30 мкг белковой суспензии, затем осуществляли перенос разделённых электрофорезом белков на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США). Далее мембрану последовательно инкубировали с первичными, затем вторичными АТ в растворе 5%-ного обезжиренного молока. Детекцию проводили с помощью усиленной хемилюминесценции (реагент Western Lightning Plus-ECL, «Perkin Elmer», США) в геле-документирующей системе FUSION Solo («Vilber», Франция). Программное обеспечение NIH ImageJ («Bethesda», США) использовали для денситометрического анализа полученных изображений.

Для коиммунопреципитации клетки подвергали лизису в ТЕВ-буфере (50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 10% глицерина) в присутствии коктейля ингибиторов протеаз и фосфатаз («Sigma»). Лизаты были инкубированы со специфическими АТ в течение 12 ч при 4 °С на орбитальном шейкере («BioSan», Латвия). Далее к исследуемым образцам добавляли сефарозу А/Г («Santa Cruz Biotechnology») и инкубировали в течение 1 ч при 4 °С на орбитальном шейкере. После 5-кратного отмыва образцов ТЕВ-буфером осуществляли детекцию сигнала методом вестерн-блоттинга, как указано выше.

Анализ клеточной выживаемости. Опухолевые клетки засеивали в 96-луночные плоскодонные планшеты («Corning Inc.», США) и культивировали в присутствии исследуемых соединений или ДМСО (контроль) в течение 72 ч. Для оценки жизнеспособности клеточных культур вносили реагент (MTS) 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий («Promega», США). Спустя 1 ч проводили анализ жизнеспособности клеточных культур на планшетном спектрофотометре MultiScan FC («Thermo Fisher Scientific», США) при длине волны 492 нм.

Анализ эффективности гомологичной рекомбинации ДНК. Оценку способности 2-АПК влиять на процессы гомологичной рекомбинации оценивали методом проточной цитофлуориметрии с использованием репортёрной клеточной линии остеосаркомы U-2 OS DR GFP. Трансфекцию pCba SceI-содержащей плазмиды в «индикаторную» клеточную линию U-2 OS DR GFP осуществляли с использованием набора для трансфекции Lipofectamine RNAiMAX Reagent («Invitrogen») в соответствии с протоколом производителя. Плазида pCba SceI была любезно предоставлена Maria Jasin. Трансфекция в клетки pCba SceI-содержащей плазмиды приводит к образованию двунитевых разрывов ДНК, репарация которых приводит к восстановлению функциональной активности гена *GFP* (green fluorescent protein). Соответственно, количество GFP-положительных клеток после трансфекции отражает эффективность процессов гомологичной рекомбинации ДНК. Количество GFP-положительных клеток подсчитывали на проточном цитофлуориметре («FACS Canto», США). Для каждой выборки было зарегистрировано не менее 10 000 событий.

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Результаты представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение ($M \pm SD$) для каждой группы. Показатель синергизма оценивали количественно с помощью R-пакета программы Synergy Finder. Модель HSA (highest single agent) была использована для расчёта синергизма [11]. Значения HSA > 10 свидетельствуют о синергизме действия исследуемых препаратов, значения HSA в диапазоне от -10 до 10 иллюстрируют их аддитивный эффект, а значения HSA < -10 указывают на антагонизм исследуемых соединений.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На начальном этапе исследований нами было показано, что химиопрепарат доксорубин в

субтоксичных концентрациях ингибирует скорость пролиферации опухолевых клеток линии остеосаркомы U-2 OS. Аналогичная способность была обнаружена у синтезированного нами пиррол-содержащего гетероциклического соединения 2-АПК. Использование данных соединений в комбинации друг с другом приводило к выраженному цитотоксическому эффекту и значительному снижению степени конfluэнтности опухолевой культуры (рис. 1). Аналогичные данные были получены с использованием других опухолевых клеточных линий, например HeLa. Дальнейшие исследования показали, что основным механизмом гибели опухолевых клеток при сочетанном влиянии доксорубина и 2-АПК являлся апоптоз. В пользу этого свидетельствовало значительное повышение уровней экспрессии расщеплённых форм ПАРП и каспазы-3 (рис. 2).

На основании вышеизложенного было выдвинуто предположение о синергизме действия вышеуказанных соединений, для подтверждения которого были проведены расчёты показателей синергизма в опухолевых клетках линии U-2 OS, культивированных с различными концентрациями доксорубина (0,125; 0,25; 0,5 мкМ) и 2-АПК (0,625; 1,25; 2,5; 5 мкМ). Результаты исследования, представленные на рис. 3, показывают наличие синергизма между данными веществами (показатель синергии составлял 12,523 (>10)).

Одним из механизмов, обуславливающих способность 2-АПК усиливать цитотоксическую активность доксорубина, могло явиться ослабление в опухолевых клетках процессов репарации повреждений ДНК, индуцируемых данным химиопрепаратом. Анализ уровня экспрессии белков, участвующих в процессах репарации двунитевых разрывов ДНК, выявил значительное повышение уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 в опухолевых клетках, подвергнутых воздействию доксорубина (рис. 2). Этот факт свидетельствовал об активации спасательных путей репарации повреждений ДНК, что могло обуславливать низкую эффективность данного химиопрепарата. В то же время культивирование опухолевых клеток с доксорубином в комбинации с 2-АПК приводило к значительному снижению уровня экспрессии Rad51. Данный факт коррелировал с повышением уровней экспрессии маркёров апоптоза (рис. 2), что свидетельствовало о запуске процессов программированной клеточной гибели в опухолевых клетках вследствие несостоятельности процессов репарации повреждений ДНК, индуцированных доксорубином.

Данный факт мог быть обусловлен способностью 2-АПК влиять на уровень экспрес-

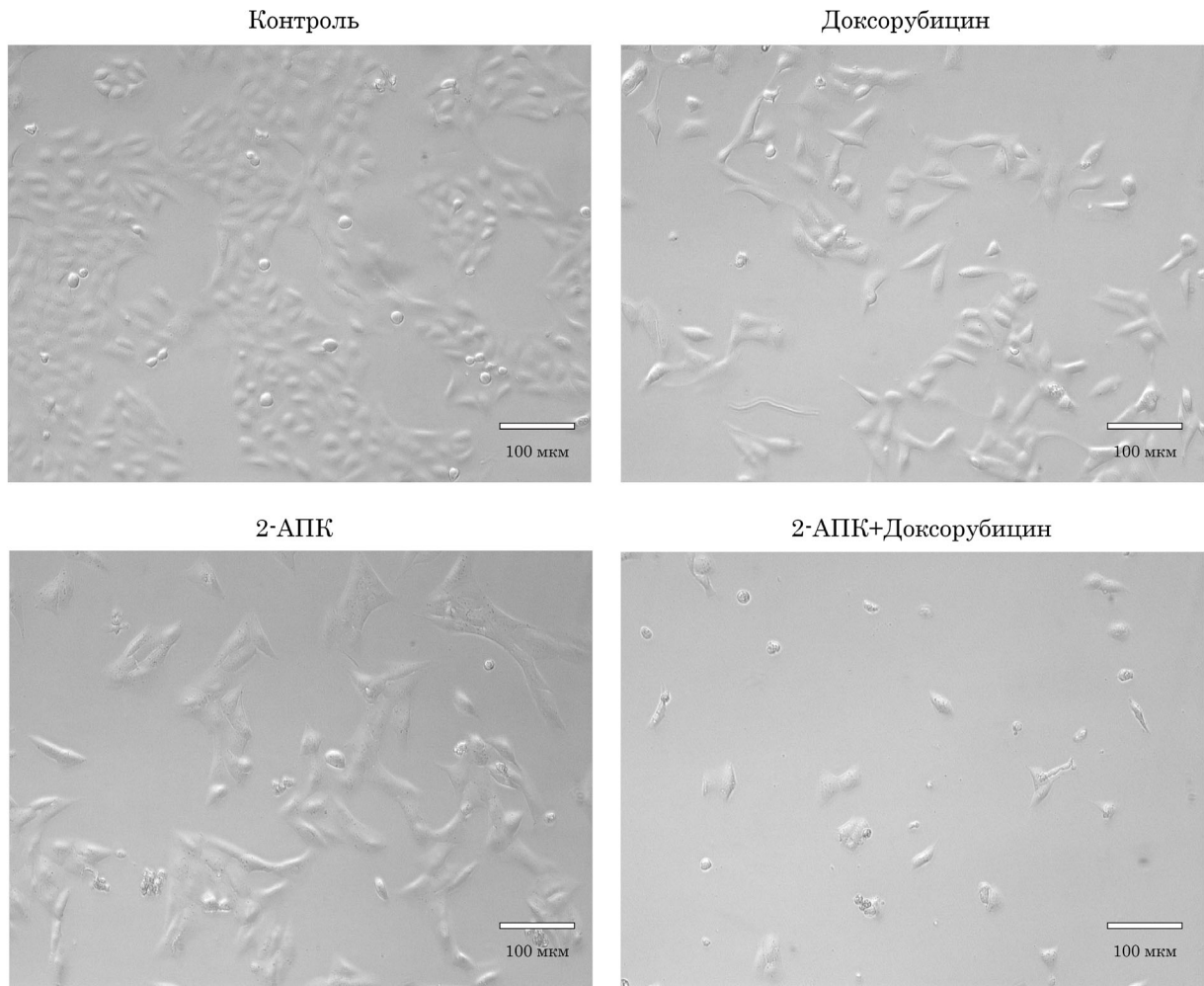


Рис. 1. Микроскопия (10×) клеток U-2 OS под влиянием доксорубина (0,5 мкМ), 2-АПК (10 мкМ), а также их комбинации в течение 48 ч

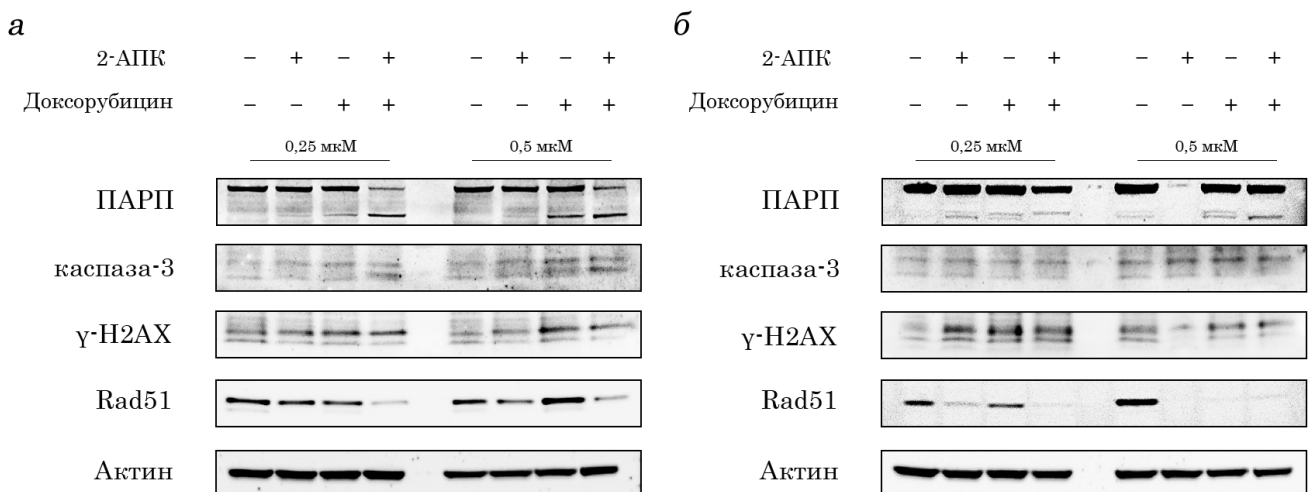


Рис. 2. Уровень экспрессии расщеплённых форм ПАРП, каспазы-3, а также γ -H2AX (Ser139) и рекомбиназы Rad51 в клетках HeLa (а) и U-2 OS (б). Актин использовали в качестве контроля белковой нагрузки в образцах

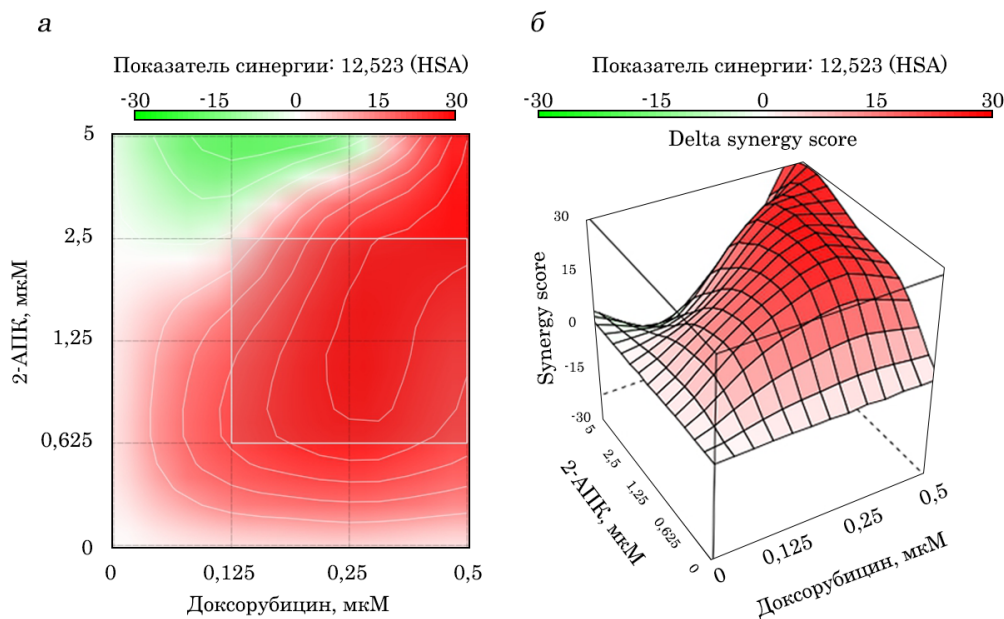


Рис. 3. Двухмерный (а) и трёхмерный (б) графики (surface-plots), отражающие оптимальные дозы доксорубицина и 2-АПК, которые обуславливают наибольший синергизм у клеток U-2 OS. Синергия доксорубицина и 2-АПК получена с помощью программы Synergy Finder. Показатель синергии доксорубицина и 2-АПК составил 12,523

сии Rad51 как на транскрипционном, так и на посттрансляционном уровнях. Поэтому на первом этапе исследований был проведён анализ уровня экспрессии Rad51 в опухолевых клетках, культивируемых с 2-АПК в присутствии циклогексимида, блокирующего синтез белка. Результаты, представленные на рис. 4, а, не выявили различий в уровне экспрессии Rad51 в опухолевых клетках U-2 OS в присутствии циклогексимида и без него. Аналогичные результаты были получены и на другой опухолевой клеточной линии HeLa (рис. 4, б). Эти данные свидетельствовали об отсутствии способности 2-АПК влиять на уровень экспрессии Rad51 на транскрипционном уровне.

На следующем этапе исследований была изучена способность данного соединения влиять на процессы протеасом-зависимой деградации рекомбиназы Rad51. С этой целью был использован препарат MG-132, являющийся ингибитором протеасом. Результаты, представленные на рис. 4, в, убедительно показывают повышение уровня экспрессии Rad51 в опухолевых клетках U-2 OS на фоне действия данного ингибитора. Аналогичные данные были получены с использованием клеточной линии HeLa (рис. 4, г). Результаты денситометрического анализа полученных данных показывают способность MG-132 статистически значимо повышать уровень экспрессии Rad51 в данных опухолевых клеточных линиях практически на всех сроках культивирования с 2-АПК (рис. 4, д и е).

Способность 2-АПК усиливать процессы протеасом-зависимой деградации в обеих опухолевых клеточных линиях была подтверждена результатами коиммунопреципитации рекомбиназы Rad51 с убиквитином (рис. 5). Важно отметить, что химиопрепарат паклитаксел также повышал уровень экспрессии убиквитинированной формы Rad51, что свидетельствовало о способности препаратов, влияющих на динамическое состояние микротрубочек веретена деления, влиять на уровень экспрессии Rad51 на посттрансляционном уровне, усиливая процессы их протеасом-зависимой деградации.

На заключительном этапе исследований была изучена способность 2-АПК непосредственно влиять на процессы гомологичной рекомбинации ДНК в клетках остеосаркомы U-2 OS (рис. 6). С этой целью нами была использована репортёрная клеточная линия, содержащая интегрированную в геном единичную копию гена *GFP*. Важно отметить, что GFP приобретает свою функциональную активность только в результате успешной репарации двунитевых разрывов ДНК, индуцированных в результате трансфекции в клетки рCba SceI-содержащей плазмиды. Следовательно, уменьшение или увеличение количеств GFP-положительных клеток после образования в них SceI-индуцированных двунитевых разрывов ДНК являлось свидетельством ослабления или усиления процессов гомологичной рекомбинации ДНК. Трансфекция в опухолевые клетки SceI-содержащей плазми-

ды приводила к появлению GFP-положительных клеток, что свидетельствовало о восстановлении последовательности *GFP* в результате активации процессов гомологичной рекомбинации (рис. 6, б). Было обнаружено значительное (почти 6-кратное) снижение количества GFP-позитивных клеток, культивируемых с 2-АПК в течение 24 ч после индукции двунитевых разрывов ДНК в результате трансфекции в данные клетки *SceI*-содержащей плазмиды (рис. 6, з).

Таким образом, основной механизм 2-АПК-индуцированной сенситизации опухолевых клеток к химиопрепарату доксорубину был обусловлен способностью данного соединения вли-

ять на уровень экспрессии рекомбиназы Rad51, снижая тем самым эффективность процессов гомологичной рекомбинации ДНК и запуская процессы апоптоза вследствие несостоятельности вышеуказанных репаративных процессов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Химиотерапия является одним из общепризнанных методов лечения пациентов со многими злокачественными новообразованиями, в том числе, остеосарком [12–14] и некоторых опухолей эпителиального происхождения [15, 16]. Несмотря на эффективность большинства со-

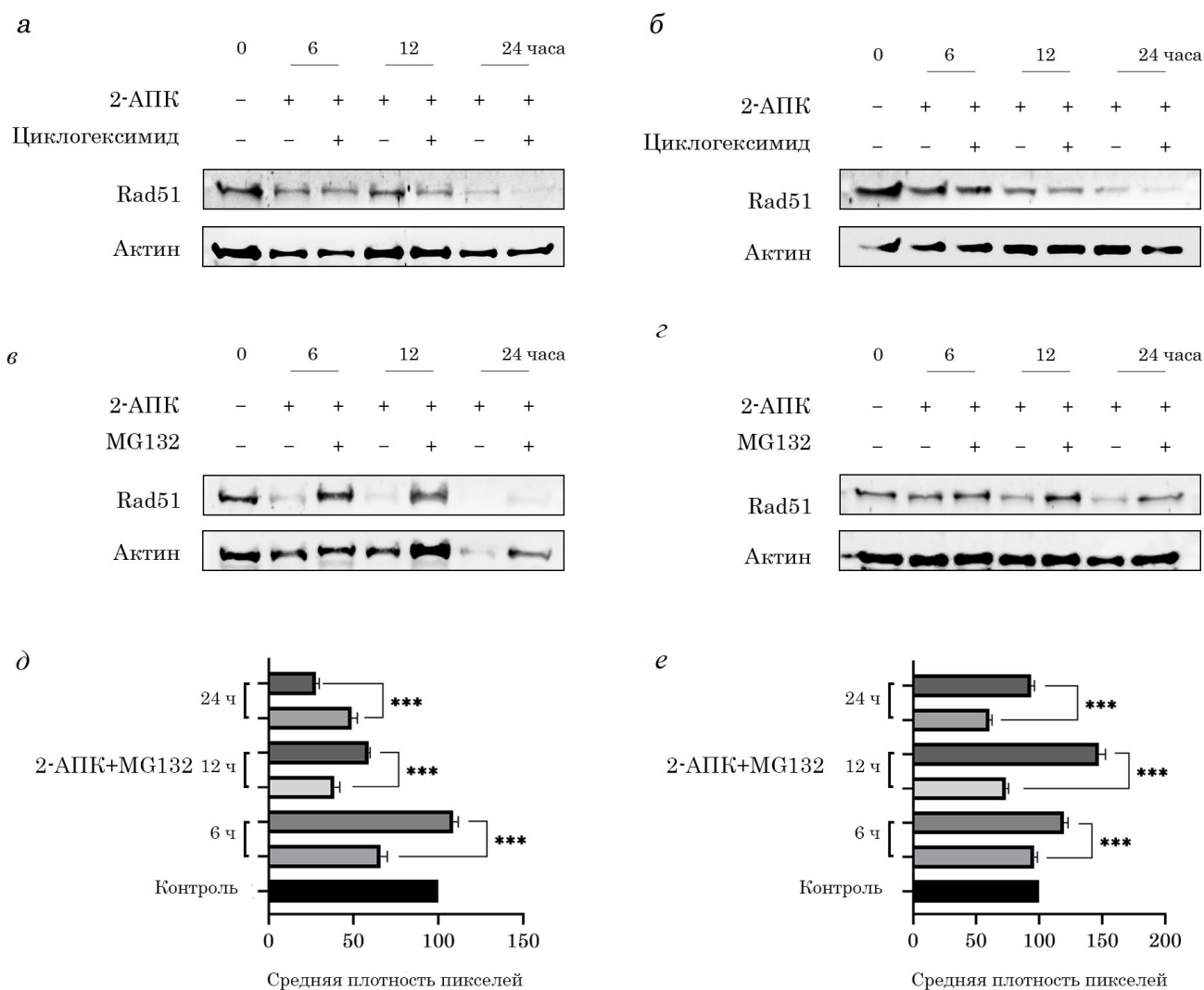


Рис. 4. Уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках HeLa (а) и U-2 OS (б) под влиянием 2-АПК в сочетании с ингибитором белкового синтеза циклогексимидом и без него в динамике (0, 6, 12 и 24 ч). Уровень экспрессии рекомбиназы Rad51 в клетках HeLa (в) и U-2 OS (г) под влиянием 2-АПК в сочетании с MG-132 и без него в динамике (0, 6, 12 и 24 ч). Актин использовали в качестве контроля белковой нагрузки в образцах. Денситометрический анализ уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 под влиянием 2-АПК в сочетании с MG-132 и без него в динамике (0, 6, 12 и 24 ч) в клеточных линиях HeLa (д) и U-2 OS (е). М ± SD, *** $p < 0,001$

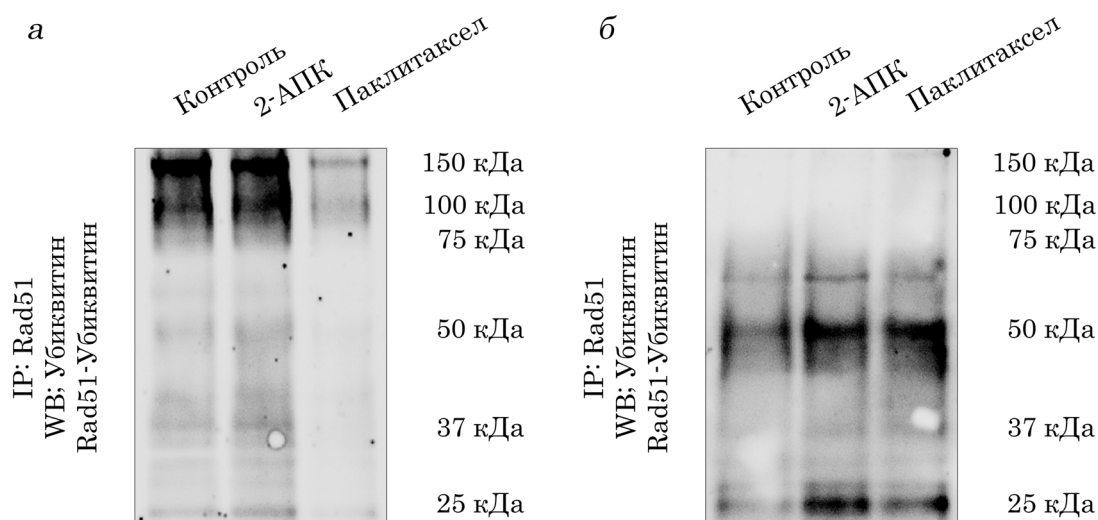


Рис. 5. Лизаты клеток HeLa (а) и U-2 OS (б) иммунопреципитировали с помощью антител к Rad51 и детектировали убиквитин с помощью иммуноблоттинга, чтобы продемонстрировать образование эндогенного комплекса. Для экспериментов по коиммунопреципитации клетки обрабатывали 2-АПК (10 мкМ) и паклитакселом (1 мкМ)

временных химиопрепаратов, наличие большого количества системных побочных эффектов от проводимой химиотерапии и быстрое развитие химиорезистентности опухоли являются основными факторами, оказывающими негативное влияние на прогноз заболевания у пациентов с неоперабельными, рецидивирующими и метастатическими формами заболевания [17–19]. Разработка и внедрение в практическую онкологию протоколов комбинированной химиотерапии, безусловно, повышает эффективность используемых химиопрепаратов, влияющих на большее количество опухолевых клеток, различающихся друг от друга по своей способности репарировать повреждения ДНК, индуцируемые химиопрепаратами. Очевидно, что эффективность комбинированной химиотерапии может быть обусловлена как синергическими, так и аддитивными эффектами противоопухолевых препаратов [20, 21]. Используемые в настоящее время схемы полихимиотерапии довольно часто включают в себя химиопрепараты антрациклинового ряда, алкилирующие агенты, препараты платины, а также митотические препараты [20–24]. Несмотря на очевидные клинические преимущества современных схем комбинированной химиотерапии по сравнению со схемами терапии, основанными на использовании этих же химиопрепаратов в монорежиме, молекулярные механизмы их комбинированного взаимодействия являются не изученными.

Предыдущие исследования нашей научной группы были посвящены синтезу и изучению механизма противоопухолевого действия пир-

рол-содержащих гетероциклических соединений [9, 10, 25–35]. Был установлен молекулярный механизм их действия, который обусловлен способностью этих соединений влиять на процессы полимеризации тубулина, что, в свою очередь, приводило к их гибели по механизму апоптоза.

Исходя из вышеизложенного, было предпринято настоящее исследование, посвящённое изучению способности ранее синтезированного нами пиррол-содержащего гетероциклического соединения 2-АПК [9, 10] влиять на чувствительность опухолевых клеток к ДНК-повреждающим агентам, например доксорубину.

Было показано, что использование 2-АПК в комбинации с доксорубином приводило к выраженному цитотоксическому эффекту и значительному снижению степени конfluэнтности опухолевой культуры (рис. 1). Уровень экспрессии маркёров апоптоза (расщеплённых форм ПАРП и каспазы-3) в опухолевых клетках был значительно выше при сочетанном применении доксорубина и 2-АПК по сравнению с использованием этих соединений по отдельности (рис. 2). На следующем этапе было обнаружено, что данный эффект обусловлен синергическим влиянием 2-АПК и доксорубина (рис. 3).

Способность пиррол-содержащего гетероциклического соединения усиливать цитотоксичность ДНК-повреждающего агента могла быть обусловлена влиянием 2-АПК на репарацию двунитевых повреждений ДНК, вызванных доксорубином. Это предположение основны-

валось на результатах иммуноблоттинга, иллюстрировавших значительные колебания уровня экспрессии рекомбиназы Rad51 в опухолевых клетках (рис. 2). Действительно, доксорубин индуцировал повреждения ДНК в опухолевых клетках, о чём свидетельствовало повышение уровня экспрессии маркера двунитевых разрывов – γ -H2AX (Ser139). Это, в свою очередь, сопровождалось активацией процессов репарации

данных повреждений ДНК, проявлявшейся в усилении уровня экспрессии рекомбиназы Rad51. Тем не менее мы наблюдали значительное снижение экспрессии данного фактора репарации поврежденных ДНК в опухолевых клетках, культивированных с доксорубицином в присутствии 2-АПК (рис. 2).

Способность 2-АПК ингибировать экспрессию Rad51 могла быть реализована как на тран-

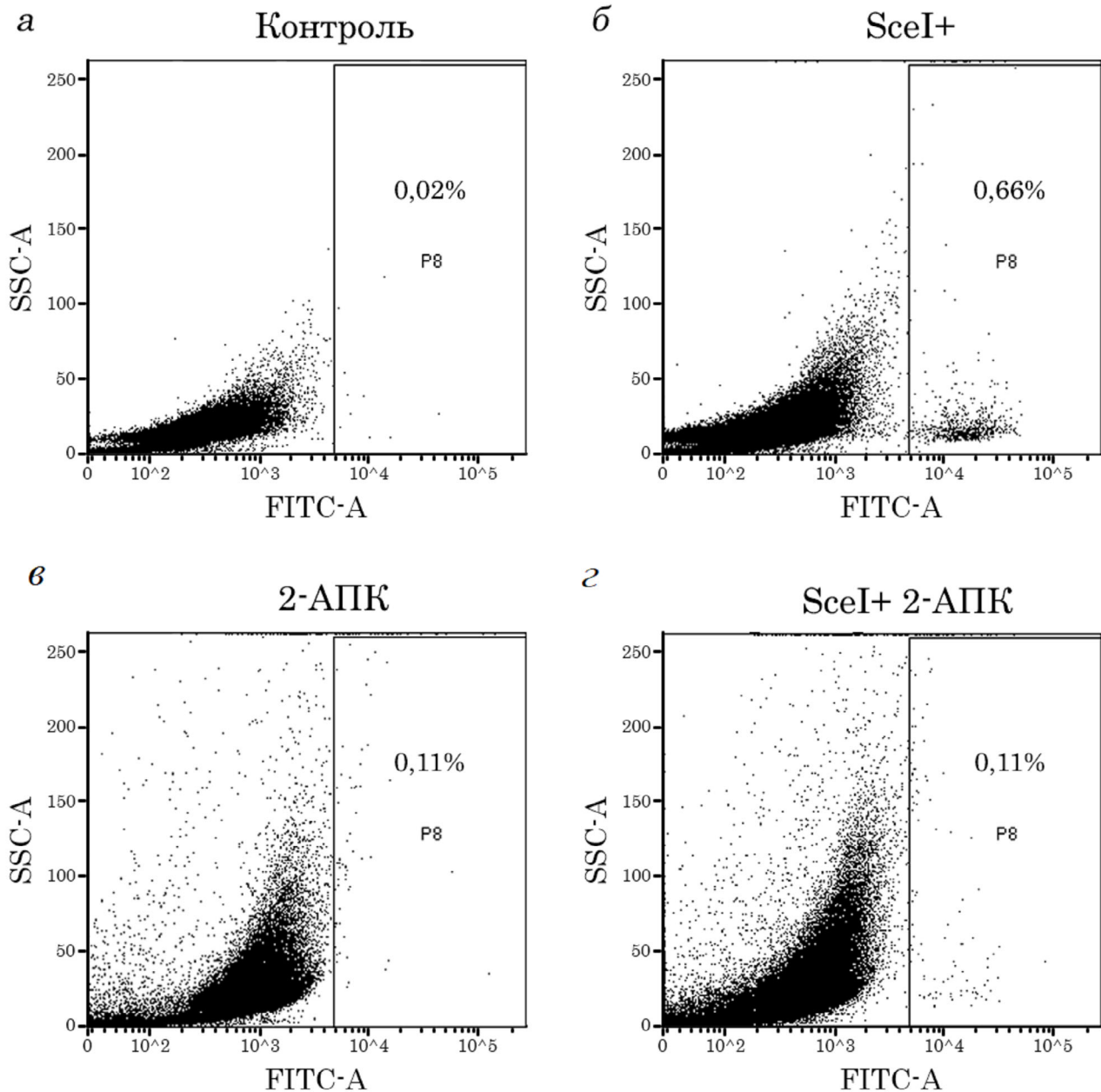


Рис. 6. Точечная (dot-plot) гистограмма клеточной линии U-2 OS DR GFP. По вертикали отображен параметр бокового светорассеяния (side scattering или SSC-A); по горизонтали – интенсивность флюоресценции GFP (Fluorescein isothiocyanate или FITC-A), которая отражает долю GFP-положительных клеток в процентах (выделено прямоугольником – P8). Клетки подвергали трансфекции контрольной (а и в) и SceI-содержащей (б и г) плазмидой и по истечении 12 ч инкубировали с 2-АПК (в и г) в течение 72 ч

скрипционном, так и на посттрансляционном уровнях. В уровнях экспрессии Rad51 опухолевыми клетками, культивированных в присутствии ингибитора белкового синтеза — циклогексемида и без него, не было обнаружено различий (рис. 4, а), что свидетельствовало об отсутствии способности данного соединения влиять на экспрессию Rad51 на транскрипционном уровне. В свою очередь, результаты, полученные при сочетанном использовании ингибитора протеасом — MG-132 и 2-АПК (рис. 4, в–е), а также коиммунопреципитации рекомбиназы Rad51 с убиквитином (рис. 5) свидетельствовали о способности 2-АПК влиять на уровень экспрессии Rad51 на посттрансляционном уровне, усиливая процессы протеасом-зависимой деградации рекомбиназы Rad51.

На заключительном этапе исследований была подтверждена способность 2-АПК ингибировать эффективность процессов гомологичной рекомбинации ДНК с помощью репортёрной клеточной линии U-2 OS DR, имеющую единичную копию гена *GFP*. Данная клеточная линия могла экспрессировать GFP (зелёный флуоресцентный белок) только при успешной репарации двунитевых разрывов ДНК, вызванных трансфекцией в клетки Scel-содержащей плазмиды. Таким образом, количество GFP-положительных клеток отражало эффективность гомологичной рекомбинации ДНК, в частности, 2-АПК почти 6-кратно снижало количество клеток, позитивных по уровню экспрессии GFP (рис. 6, з), относительно положительного контроля — индукция Scel-индуцированных разрывов

ДНК в клетках, культивированных с ДМСО (рис. 6, б).

Таким образом, результаты проведённого исследования свидетельствуют о способности пиррол-содержащего гетероциклического соединения — 2-АПК, ослаблять процессы гомологичной рекомбинации ДНК и вызывать сенситизацию опухолевых клеток к ингибитору ДНК-топоизомеразы типа II, доксорубину. Эти данные коррелируют с результатами исследований, показавших способность ингибиторов полимеризации тубулина влиять на транспорт белков репарации повреждений ДНК к месту повреждений, вызванных как ДНК-повреждающими химиопрепаратами [36], так и ионизирующим излучением [37], что раскрывает механизмы химио- и радиосенситизации опухолевых клеток под действием уже известных химиопрепаратов, а также соединений, обладающих способностью влиять на динамическое состояние микротрубочек веретена деления посредством нарушения процессов полимеризации/деполимеризации тубулина.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00001).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Benjamin, R. S. (2020) Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for osteosarcoma: a historical perspective, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1257**, 1-10, doi: 10.1007/978-3-030-43032-0_1.
- Marina, N. M., Smeland, S., Bielack, S. S., Bernstein, M., Jovic, G., et al. (2016) Comparison of MAP1E versus MAP in patients with a poor response to preoperative chemotherapy for newly diagnosed high-grade osteosarcoma (EURAMOS-1): an open-label, international, randomised controlled trial, *Lancet Oncol.*, **17**, 1396-1408, doi: 10.1016/S1470-2045(16)30214-5.
- Li, H., Wu, X., and Cheng, X. (2016) Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer, *J. Gynecol. Oncol.*, **27**, e43, doi: 10.3802/jgo.2016.27.e43.
- Xu, J., Pan, Q., and Ju, W. (2019) Ras inhibition by zoledronic acid effectively sensitizes cervical cancer to chemotherapy, *Anticancer Drugs*, **30**, 821-827, doi: 10.1097/CAD.0000000000000779.
- Galembikova, A., and Boichuk, S. V. (2021) Tyrosine kinase signaling profile in osteosarcomas: A potential therapeutic target for sensitization to doxorubicin, *Ann. Oncol.*, **32** (Suppl 6), S1365, doi: 10.1016/j.annonc.2021.08.2060.
- Boichuk, S., Bikinieva, F., Nurgatina, I., Dunaev, P., Valeeva, E., et al. (2020) Inhibition of AKT-signaling sensitizes soft tissue sarcomas (STS) and gastrointestinal stromal tumors (GIST) to doxorubicin via targeting of homology-mediated DNA repair, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8842, doi: 10.3390/ijms21228842.
- Galembikova, A., and Boichuk, S. (2021) Targeting of AKT-signaling pathway potentiates the anti-cancer efficacy of doxorubicin in A673 Ewing sarcoma cell line, *BioNanoSci.*, **11**, 1070-1082, doi: 10.1007/s12668-021-00901-x.
- Бойчук С. В., Дунаев П. Д., Галембикова А. Р. (2021) Ингибирование АКТ-сигнального пути в саркомах мягких тканей — новый подход к их сенситизации к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа, *Клин. Патифизиол.*, **27**, 75-87.
- Зыкова С. С., Кизимова И. А., Сюткина А. И., Токсарова Ю. С., Игидов Н. М., и др. (2019) Синтез и цитостатическая активность (Е)-этил-2-амино-5-(3,3-диметил-4-оксобутилен)-4-оксо-1-(2-фениламинобензамидо)-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксилата, *Хим. Фармацевт. Журн.*, **53**, 15-18, doi: 10.30906/0023-1134-2019-53-10-15-18.

10. Boichuk, S., Galembikova, A., Bikinieva, F., Dunaev, P., Aukhadieva, A., et al. (2021) 2-APCAs, the novel microtubule targeting agents active against distinct cancer cell lines, *Molecules*, **26**, 616, doi: 10.3390/molecules26030616.
11. Tomita, Y., Morooka, T., Hoshida, Y., Zhang, B., Qiu, Y., et al. (2006) Prognostic significance of activated AKT expression in soft-tissue sarcoma, *Clin. Cancer Res.*, **12**, 3070-3077, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1732.
12. Verschoor, A. J., Speetjens, F. M., Dijkstra, P. D. S., Fiocco, M., van de Sande, M. A. J., et al. (2020) Single-center experience with ifosfamide monotherapy as second-line treatment of recurrent/metastatic osteosarcoma, *Oncologist*, **25**, e716-e721, doi: 10.1634/theoncologist.2019-0528.
13. Amoroso, L., Castel, V., Bisogno, G., Casanova, M., Marquez-Vega, C., et al. (2020) Phase II results from a phase I/II study to assess the safety and efficacy of weekly nab-paclitaxel in paediatric patients with recurrent or refractory solid tumours: A collaboration with the European Innovative Therapies for Children with Cancer Network, *Eur. J. Cancer*, **135**, 89-97, doi: 10.1016/j.ejca.2020.04.031.
14. Breithaupt, H., and Küenzlen, E. (1983) High-dose methotrexate for osteosarcoma: toxicity and clinical results, *Oncology*, **40**, 85-89.
15. Wiseman, L. R., and Spencer, C. M. (1998) Paclitaxel. An update of its use in the treatment of metastatic breast cancer and ovarian and other gynaecological cancers, *Drugs Aging*, **12**, 305-334, doi: 10.2165/00002512-199812040-00005.
16. Goa, K. L., and Faulds, D. (1994) Vinorelbine. A review of its pharmacological properties and clinical use in cancer chemotherapy, *Drugs Aging*, **5**, 200-234, doi: 10.2165/00002512-199405030-00006.
17. Qin, S. Y., Cheng, Y. J., Lei, Q., Zhang, A. Q., and Zhang, X. Z. (2018) Combinational strategy for high-performance cancer chemotherapy, *Biomaterials*, **171**, 178-197, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.027.
18. Partridge, A. H., Burstein, H. J., and Winer, E. P. (2001) Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **30**, 135-142, doi: 10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003451.
19. LeBaron, S., Zeltzer, L. K., LeBaron, C., Scott, S. E., Zeltzer, P. M., et al. (1988) Chemotherapy side effects in pediatric oncology patients: drugs, age, and sex as risk factors, *Med. Pediatr. Oncol.*, **16**, 263-268, doi: 10.1002/mpo.2950160408.
20. Albain, K. S., Nag, S. M., Calderillo-Ruiz, G., Jordaan, J. P., Llombart, A. C., et al. (2008) Gemcitabine plus Paclitaxel versus Paclitaxel monotherapy in patients with metastatic breast cancer and prior anthracycline treatment, *J. Clin. Oncol.*, **26**, 3950-3957, doi: 10.1200/JCO.2007.11.9362.
21. Mokhtari, R. B., Kumar, S., Islam, S. S., Yazdanpanah, M., Adeli, K., et al. (2013) Combination of carbonic anhydrase inhibitor, acetazolamide, and sulforaphane, reduces the viability and growth of bronchial carcinoid cell lines, *BMC Cancer*, **13**, 378, doi: 10.1186/1471-2407-13-378.
22. Juergens, C., Weston, C., Lewis, I., Whelan, J., Paulussen, M., et al. (2006) Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial, *Pediatr. Blood Cancer*, **47**, 22-29.
23. Paulussen, M., Craft, A. W., Lewis, I., Hackshaw, A., Douglas, C., et al. (2008) European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study-92. Results of the EICESS-92 Study: two randomized trials of Ewing's sarcoma treatment-cyclophosphamide compared with ifosfamide in standard-risk patients and assessment of benefit of etoposide added to standard treatment in high-risk patients, *J. Clin. Oncol.*, **26**, 4385-4393, doi: 10.1200/JCO.2008.16.5720.
24. Le Chevalier, T., Pujol, J. L., Douillard, J. Y., Alberola, V., Monnier, A., et al. (1994) A three-arm trial of vinorelbine (Navelbine) plus cisplatin, vindesine plus cisplatin, and single-agent vinorelbine in the treatment of non-small cell lung cancer: an expanded analysis, *Semin. Oncol.*, **21** (Suppl 10), 28-34.
25. Зыкова С. С., Бойчук С. В., Галембикова А. Р., Рамазанов Б. Р., Мустафин И. Г., и др. (2014) 3-Гидрокси-1,5-диарил-4-пивалоил-2,5-дигидро-2-пирролоны нарушают процессы митоза и индуцируют гибель опухолевых клеток *in vitro*, *Цитология*, **56**, 439-442.
26. Зыкова С. С., Одегова Т. Ф., Бойчук С. В. Галембикова А. Р. (2014) Синтез и фармако-токсикологические характеристики 3-замещенных 3-гидрокси-6-фенил-3,4-дигидро-2Н-1,3-оксазинов, *Хим. Фарм. Журн.*, **11**, 10-14.
27. Бойчук С. В., Галембикова А. Р., Зыкова С. С., Хуснутдинов Р. Р. (2015) Нарушения регуляции клеточного цикла и репарации повреждений ДНК в опухолевых клетках под действием замещенного этилового эфира 2-амино-1Н-пиррол-3-карбоновой кислоты, *Совр. Пробл. Науки Образ.*, **5**, 116.
28. Зыкова С. С., Галембикова А. Р., Рамазанов Б. Р., Одегова Т. Ф., Игидов Н. М., и др. (2015) Цитотоксическая активность этиловых эфиров 2-амино-1-бензоил-амино-4-оксо-5-(2-оксо-2-арилэтилиден)-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоновых кислот, *Хим. Фарм. Журн.*, **12**, 19-23.
29. Boichuk, S., Galembikova, A., Zykova, S., Ramazanov, B., Khusnutdinov, R., et al. (2016) 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*, *AntiCancer Drugs*, **27**, 620-634, doi: 10.1097/CAD.0000000000000372.
30. Зыкова С. С., Игидов Н. М., Киселев М. А., Бойчук С. В., Галембикова А. Р., и др. (2016) Экспериментальное обоснование создания противоопухолевых средств на основе пирролсодержащих гетероциклов, *Журн. Науч. Статей «Здоровье и образование в XXI веке»*, **7**, 121-127.
31. Галембикова А. Р., Бойчук С. В., Зыкова С. С., Хуснутдинов Р. Р., Дунаев П. Д. (2017) Пивалоил-замещенные 2-пирролоны индуцируют гибель гастроинтестинальных стромальных опухолей, резистентных к иматинибу и химиопрепаратам, *Вопр. Онкол.*, **1**, 135-140.
32. Галембикова А. Р., Бойчук С. В., Дунаев П. Д., Хуснутдинов Р. Р., Зыкова С. С. (2018) Влияние пивалоил-замещенных пиррол-содержащих гетероциклических соединений на механизмы репарации повреждений ДНК клеток саркомы Юинга, *Казан. Мед. Журн.*, **2**, 245-248, doi: 10.17816/KMJ2018-245.
33. Зыкова С. С., Игидов Н. М., Захматов А. В., Киселев М. А., Галембикова А. Р., и др. (2018) Синтез и биологическая активность 2-амино-1-арил-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-N-(тиазол-5-ил)-4,5-дигидро-1Н-пиррол-3-карбоксамидов, *Хим. Фарм. Журн.*, **3**, 10-16.
34. Boichuk, S., Galembikova, A., Dunaev, P., Micheeva, E., Novikova, M., et al. (2019) Ethyl-amino-pyrrole-3-carboxylates are active against imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors *in vitro*, *AntiCancer Drugs*, **30**, 475-484, doi: 10.1097/CAD.0000000000000753.
35. Boichuk, S., Galembikova, A., Syuzov, K., Dunaev, P., Bikinieva, F., et al. (2021) The design, synthesis, and bio-

- logical activities of pyrrole-based carboxamides: the novel tubulin inhibitors targeting the colchicine-binding site, *Molecules*, **26**, 5780, doi: 10.3390/molecules26195780.
36. Poruchynsky, M. S., Komlodi-Pasztor, E., Trostel, S., Wilkerson, J., Regairaz, M., et al. (2015) Microtubule-targeting agents augment the toxicity of DNA-damaging agents by disrupting intracellular trafficking of DNA repair proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 1571-1576, doi: 10.1073/pnas.1416418112.
37. Markowitz, D., Ha, G., Ruggieri, R., and Symons, M. (2017) Microtubule-targeting agents can sensitize cancer cells to ionizing radiation by an interphase-based mechanism, *Onco Targets Ther.*, **10**, 5633-5642, doi: 10.2147/OTT.S143096.

2-APC ATTENUATES HOMOLOGY-MEDIATED DNA REPAIR AND SENSITIZES CANCER CELLS TO DOXORUBICIN

S. V. Boichuk^{1,2*}, F. F. Bikinieva¹, I. G. Mustafin¹,
S. S. Zyкова³, S. A. Ryzkin², and A. R. Galembikova¹

¹ Kazan State Medical University, 420012 Kazan, Russia; E-mail: boichuksergei@mail.ru

² Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, 125993 Moscow, Russia

³ Perm State Academy of Pharmacy, 614990 Perm, Russia

Besides high efficiency of the chemotherapeutic agents in cancer therapy, rapid development of tumor resistance and systemic adverse effects are considered as the major negative prognostic factors, especially for the patients with metastatic, unresectable and recurrent malignancies. Thus, identification of the novel molecular targets and development of the approaches to sensitize the tumors to the current chemotherapeutic regimens are important. The study was aimed to determine the ability of the pyrrole-based heterocyclic compound 2-APC that was synthesized in our lab, to sensitize cancer cells to the chemotherapeutic agent doxorubicin, a well-known topoisomerase II inhibitor. The experiments were performed on tumor cell lines, cultured with 2-APC, doxorubicin and paclitaxel. Expression of DNA repair proteins and markers of apoptosis was examined by western blotting. Protein-protein interactions were examined by co-immunoprecipitation. Synergism between the chemotherapeutic agents was assessed by using the computer program Synergy Finder. Results. Doxorubicin (Dox) exhibited the moderate cytotoxic activities against tumor cells in vitro, whereas combination of Dox and 2-APC significantly potentiated cytotoxic activity of Dox and induced apoptosis of cancer cells. This was due to 2-APC's ability to impair DNA damage repair mechanisms in cancer cells, which was evidenced by decreased expression of Rad51 recombinase as an outcome of its proteasome-based degradation. Besides 2-APC, similar activity was observed for paclitaxel, a well-known tubulin-binding agent. Chemotherapeutic agents and chemical compounds interfering with the microtubules dynamic state might potentiate cytotoxic activity of DNA-damaging chemotherapeutic agents in cancer cells due to the impairment of DNA repair mechanisms.

Keywords: pyrrole-based heterocycles compounds, tubulin polymerization, paclitaxel, doxorubicin, sensitization, apoptosis