

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-130-146>

Деполимеризация тубулина как основной молекулярный механизм цитотоксической и противоопухолевой активности пиррол-содержащих гетероциклических соединений

А.Р. Галембикова¹, П.Д. Дунаев¹, Т.В. Ивойлова¹, А.И. Гилязова¹, А.Э. Галяутдинова¹, Е.Г. Михеева¹, С.С. Зыкова², Н.М. Игидов², П.Б. Копнин³, С.В. Бойчук^{1,4-6}

¹ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49;

²ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России; Россия, 614081 Пермь, ул. Полевая, 2;

³Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

⁴Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»; Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18;

⁵ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

⁶Отделение медицинских и биологических наук, Академия наук Республики Татарстан; Россия, 420111 Казань, ул. Баумана, 20

Контакты: Сергей Васильевич Бойчук boichuksergei@mail.ru

Введение. Микротрубочки представляют собой высокодинамичные полимеры димеров α - и β -тубулина, которые играют большую роль во многих клеточных процессах, таких как внутриклеточный транспорт и клеточная пролиферация, что делает их привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии злокачественных новообразований. Вещества, влияющие на динамическое состояние тубулиновых микротрубочек, именуется митотическими ядами и являются эффективными и широко применяемыми в лечении различных опухолей химиопрепаратами. Митотические яды приводят к полимеризации (стабилизации) или деполимеризации тубулина, что вызывает задержку клеток в М-фазе (митотическую катастрофу) и их последующую гибель по механизму апоптоза. Однако эффективность данных химиопрепаратов снижается из-за активации в опухолевых клетках механизмов вторичной лекарственной устойчивости. Поэтому поиск новых соединений, нацеленных на тубулин, эффективных также в отношении опухолей с множественной лекарственной устойчивостью, является актуальной научно-практической задачей современной онкологии.

Цель исследования – изучить цитотоксическую и противоопухолевую активность некоторых пирролсодержащих гетероциклических соединений (ЕРС-91, ЕРС-92 и РСА-93) в отношении опухолевых клеточных линий эпителиального и мезенхимального происхождения, в том числе с фенотипом множественной лекарственной устойчивости.

Материалы и методы. Исследования проводили на клеточных линиях человека – трижды негативного рака молочной железы НСС1806, гастроинтестинальной стромальной опухоли GIST T-1, остеосаркомы SaOS-2, – чувствительных к химиопрепаратам (паклитаксел, доксорубицин), их резистентных сублиниях (НСС1806 Tx-R, GIST T-1 Tx-R, SaOS-2 Dox-R), а также на мышинной недифференцированной колоректальной аденокарциноме линии Colon-26, имеющей первичную резистентность к химиопрепаратам.

Результаты. Цитотоксическая активность ЕРС-91 и РСА-93 обусловлена их способностью к деполимеризации тубулина. Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии и вестерн-блоттинга свидетельствуют о способности данных соединений нарушать процессы сборки тубулиновых микротрубочек и предотвращать полимеризацию тубулина в опухолевых клетках. Ингибирование полимеризации тубулина в этих клетках приводило к митотической катастрофе и накоплению в популяции округлых митотических клеток с последующей их гибелью по механизму апоптоза. РСА-93 также показал высокий противоопухолевый эффект за счет проапоптотической активности в отношении синотрансплантата Colon-26.

Заключение. Результаты исследований показали высокую цитотоксическую активность ЕРС-91 и РСА-93 в отношении опухолевых клеточных линий эпидермального и мезенхимального происхождения, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью, а также высокую противоопухолевую активность РСА-93 на модели синотрансплантата Colon-26, что открывает перспективы для создания новых эффективных противоопухолевых препаратов на основе пиррола.

Ключевые слова: микротрубочки, деполимеризация тубулина, клеточный цикл, апоптоз, митотическая катастрофа, множественная лекарственная устойчивость, трижды негативный рак молочной железы, гастроинтестинальная стромальная опухоль, остеосаркома, колоректальная аденокарцинома, этил-пиррол-карбоксила, пиррол-карбоксамиды, паклитаксел, винбластин, доксорубин

Для цитирования: Галембикова А.Р., Дунаев П.Д., Ивойлова Т.В. и др. Деполимеризация тубулина как основной молекулярный механизм цитотоксической и противоопухолевой активности пирролсодержащих гетероциклических соединений. Успехи молекулярной онкологии 2024;11(2):130–46.

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-130-146>

Depolymerization of tubulin as the main molecular mechanism of the cytotoxic and antitumor activity of pyrrole-containing heterocyclic compounds

A.R. Galembikova¹, P.D. Dunaev¹, T.V. Ivoilova¹, A.I. Gilyazova¹, A.E. Galyautdinova¹, E.G. Mikheeva¹, S.S. Zykova², N.M. Igidov², P.B. Kopnin³, S.V. Boichuk^{1, 4–6}

¹Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan 420012, Russia;

²Perm State Academy of Pharmacy, Ministry of Health of Russia; 2 Polevaya St., Perm 614990, Russia;

³N.N. Blokhin National Medical Russian Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia;

⁴Biomarker Research Laboratory, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan (Volga Region) Federal University; 18 Kremlevskaya St., Kazan 420008, Russia;

⁵Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barricadnaya St., Moscow 125993, Russia;

⁶Division of Mecial and Biological Sciences, Tatarstan Academy of Sciences; 20 Bauman St., Kazan 420111, Russia

Contacts: Sergei Vasilyevich Boichuk boichuksergei@mail.ru

Introduction. Microtubules are highly dynamic polymers of α , β -tubulin dimers involves in a broad spectrum of the processes, such as intracellular transport and cell proliferation. This makes them an attractive molecular target for anti-cancer therapies. Substances that affect the dynamic state of tubulin microtubules are known as the mitotic poisons that are effective and widely used in the chemotherapy of various tumors. Mitotic poisons are able to interfere with polymerization (stabilization) or depolymerization of tubulin, which in turn leads to the arrest of cells in the M-phase (named as a mitotic catastrophe) and their subsequent death via activation of apoptotic mechanisms. However, the effectiveness of MP-based therapies is gradually decreasing over the time due to development of multiple drug resistance mechanisms in cancer cells. Thus, development of novel compounds selectively targeting tubulin and effectively overcoming multiple drug resistance phenotype in cancer is an urgent need in current oncology.

Aim. To examine the cytotoxic and antitumor activities of several pyrrole-containing heterocyclic compounds (EPC-91, EPC-92 and PCA-93) against cancer cell lines with epithelial and mesenchymal origin, including those with multiple drug resistance phenotype.

Materials and methods. Studies were performed on parental human cancer cell lines – triple-negative breast cancer HCC1806, gastrointestinal stromal tumor GIST T-1, osteosarcoma SaOS-2, – sensitive to chemotherapy (paclitaxel, doxorubicin) and their resistant sublines (HCC1806 Tx-R, GIST T-1 Tx-R, SaOS-2 Dox-R), as well as on murine colorectal adenocarcinoma cell line Colon-26, exhibiting primary resistance to the aforementioned chemotherapeutic agents.

Results. The cytotoxic activities of EPC-91 and PCA-93 were due to their abilities to depolymerize tubulin. The results of immunofluorescence microscopy and Western blotting indicated that the compounds disrupt assembly of tubulin microtubules and prevent polymerization of α -tubulin in cancer cells. Inhibition of tubulin polymerizations led to significant increase in number of round-shaped and phospho-histone 3 (e. g. mitotic) cells, followed by their death through apoptosis. PCA-93 also exhibited potent anti-tumor effect against Colon-26 cells due to its anti-proliferative and proapoptotic activities.

Conclusion. The data shown here illustrates potent cytotoxic activities of EPC-91 and PCA-93 against multiple cancer cell lines *in vitro* including those with multiple drug resistance phenotype. Similarly, PCA-93 was found to be highly effective against Colon-26 cell *in vivo*, thereby illustrating the attractive platform for the development of novel pyrrole-based agents exhibiting potent anti-tumor activities.

Keywords: microtubules, tubulin depolymerization, cell cycle, apoptosis, mitotic catastrophe, multidrug resistance, triple-negative breast cancer, gastrointestinal stromal tumor, osteosarcoma, colorectal adenocarcinoma, ethyl-pyrrole-carboxyls, pyrrole-carboxamides, paclitaxel, vinblastine, doxorubicin

For citation: Galembikova A.R., Dunaev P.D., T.V. Ivoilova et al. Depolymerization of tubulin as the main molecular mechanism of the cytotoxic and antitumor activity of pyrrole-containing heterocyclic compounds. Uspekhi molekulyar-noy onkologii = Advances in Molecular Oncology 2024;11(2):130–46. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.17650/2313-805X-2024-11-2-130-146>

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что химические соединения, содержащие пиррольное кольцо, обладают широким спектром биологической активности, что делает их привлекательными для создания новых перспективных лекарственных соединений, обладающих в том числе противоопухолевой активностью [1]. Пирролсодержащие гетероциклические соединения представляют собой молекулярные структуры, обладающие способностью селективно связываться с рядом различных биологических мишеней посредством модификации их функциональных групп [2, 3]. К тому же соединения на основе пиррола можно использовать для разработки потенциальных противоопухолевых препаратов, благодаря их способности модулировать некоторые параметры фармакокинетики, такие как растворимость, липофильность, полярность и фармакодинамика, включая способность к образованию водородных связей и комплексов с координирующими металлами [4, 5]. Это объясняет наличие довольно широкого спектра лекарственных препаратов, синтезированных на основе пиррола, в том числе противогрибковые, противомикробные, противовоспалительные, антигипертензивные, противомаларийные и противоопухолевые средства, ингибиторы гидроксиметилглутарил-КоА-редуктазы, антидепрессанты, а также препараты, применяемые в лечении инфекции вируса иммунодефицита человека [6–8]. Также известно, что пирролсодержащие и пиррол-конденсированные гетероциклы можно использовать для разработки новых эффективных препаратов, проявляющих свою противоопухолевую активность за счет связывания с колхицинсвязывающим сайтом тубулина. Действительно, эти структуры дают большие возможности для расширения химического разнообразия тубулинсвязывающих агентов, благодаря существованию разных способов синтеза производных пиррола с различными функциональными группами, а также широкой модификации существующих молекул-кандидатов [9–15].

Микротрубочки представляют собой высокодинамичные полимеры α - и β -тубулина, которые играют большую роль во многих клеточных процессах, таких как внутриклеточный транспорт различных биологически активных веществ, а также регулируют процессы клеточного деления, что, безусловно, делает их привлекательной мишенью для противоопухолевой терапии злокачественных новообразований [16–20]. Вещества, влияющие на динамическое состояние тубулиновых микротрубочек, именуется митотическими ядами (МЯ) и в настоящее время широко применяются для терапии пациентов с различными онкологическими заболеваниями [21]. Белок тубулин – основной строительный элемент микротрубочек – содержит несколько различных сайтов связывания для низкомолекулярных лекарственных средств, относящихся к МЯ (таксаны, эпотилоны, алкалоиды барвинка, колхицин, лаулималид и майтанзин) [22–27]. В зависимо-

сти от влияния на динамическое состояние микротрубочек МЯ подразделяются на 2 основные группы: агенты, стабилизирующие микротрубочки за счет полимеризации тубулина (таксаны, эпотилоны и лаулималид), и агенты, дестабилизирующие микротрубочки за счет деполимеризации тубулина (колхицин, алкалоиды барвинка и майтанзин) [28, 29].

Алкалоиды барвинка связываются с участком β -тубулина, расположенным на границе между димерами тубулина [24], тогда как колхицин – с участком β -тубулина, расположенным на внутридимерном пространстве между α - и β -субъединицами [30]. Два других препарата – майтанзин и пиронетин – ингибируют полимеризацию тубулина посредством взаимодействия с доменами, отличными от сайтов связывания алкалоида барвинка и колхицина [31, 32]. Агенты, стабилизирующие микротрубочки (например, таксол, доцетаксел), взаимодействуют с таксоидным доменом на β -тубулине [33, 34]. Продукты морских губок (например, лаулималид [26] и пелорузид А [35]) так же, как и таксаны, усиливают полимеризацию микротрубочек и стабилизируют их посредством связывания с нетаксановым доменом на β -тубулине [36].

С точки зрения сайта связывания на тубулине агенты, взаимодействующие с колхицинсвязывающим сайтом, обладают рядом преимуществ, включая их способность преодолевать множественную лекарственную устойчивость (МЛУ) опухолей и ингибировать процессы ангиогенеза [37–40]. Более того, ингибиторы данного сайта имеют несколько существенных преимуществ перед другими МЯ, поскольку колхициновый сайт тубулина считается более восприимчивым к молекулам с благоприятными физико-химическими свойствами, которые улучшают биодоступность препарата при пероральном приеме по сравнению с таксанами и алкалоидами барвинка. Именно на этом основана точка зрения, что развитие МЛУ к препаратам с данным механизмом действия является гораздо более редким событием. В настоящее время описано большое количество ингибиторов колхицинсвязывающего сайта тубулина [41], которые можно использовать в качестве каркасов для создания мощных противоопухолевых производных, обладающих ограниченной токсичностью, лучшей растворимостью и т. д. [42].

Результаты ранее проведенных нами исследований показали высокую цитотоксическую и противоопухолевую активность этил-2-амино-пиррол-3-карбоксилатов [43–47] и 2-амино-пиррол-3-карбоксамидов [15, 48, 49] в отношении довольно широкого спектра опухолевых клеточных линий и ксенографтных опухолей. Молекулярный механизм действия данных пирролсодержащих гетероциклических соединений связан с нарушением динамического состояния тубулиновых микротрубочек, что приводит к выраженным нарушениям регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках, накоплению их в М-фазе и последующей гибели по механизму апоптоза. Эти данные согласуются

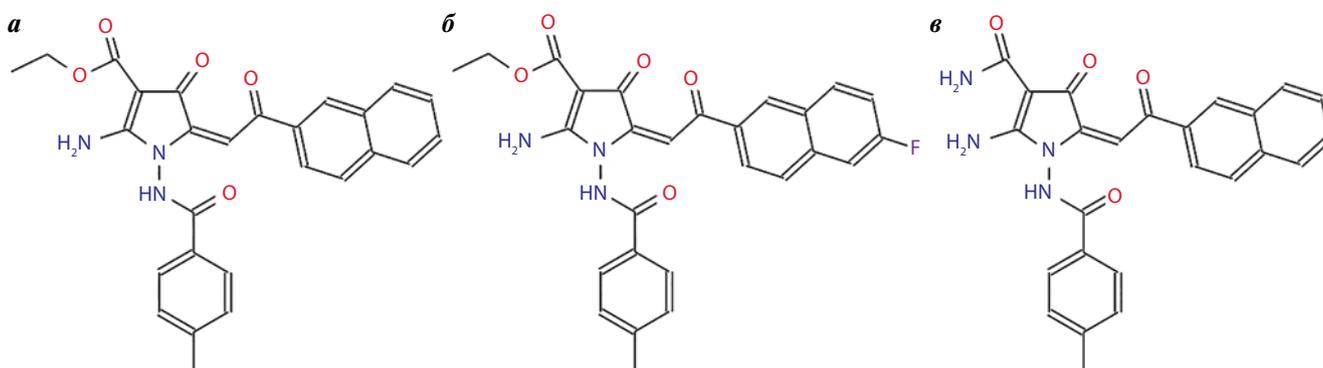


Рис. 1. Химические структуры EPC-91 (а), EPC-92 (б) и PCA-93 (в)
 Fig. 1. Chemical structures of EPC-91 (a), EPC-92 (b) and PCA-93 (c)

с результатами других исследователей, которые сообщают о цитотоксической и проапоптотической активности некоторых пирролсодержащих соединений, ингибирующих процессы полимеризации тубулина [50, 51]. В отношении большинства синтезированных нами пирролсодержащих гетероциклических соединений с помощью методов молекулярного докинга выявлена основная молекулярная мишень. Ею оказался колхициновый сайт в молекуле α -тубулина, что обусловило способность этих соединений эффективно нарушать процессы полимеризации данного белка и индуцировать гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза [15, 47, 48].

В настоящем исследовании показана высокая цитотоксическая и противоопухолевая активность новых синтезированных нами соединений из группы этилпиррол-карбоксилатов и пиррол-карбоксамидов в отношении опухолевых клеток эпидермального и мезенхимального происхождения, в том числе с фенотипом МЛУ. Полученные результаты, на наш взгляд, имеют большое научно-практическое значение и открывают перспективы для разработки новых противоопухолевых лекарственных средств на основе пиррола, эффективных в отношении широкого спектра злокачественных новообразований, в том числе с признаками вторичной резистентности к химиотерапевтическим препаратам, используемым в современной онкологии.

Цель исследования — изучить цитотоксическую и противоопухолевую активность некоторых пирролсодержащих гетероциклических соединений (EPC-91, EPC-92 и PCA-93) в отношении опухолевых клеточных линий эпителиального и мезенхимального происхождения, в том числе с фенотипом МЛУ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические соединения. Этил-2-амино-1-[4-метилбензамидо]-5-[2-(нафталин-2-ил)-2-оксоэтилиден]-4-оксо-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксилат (EPC-91), этил-2-амино-1-[4-метилбензамидо]-5-[2-(4-фторфенил)-2-оксоэтилиден]-4-оксо-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксилат (EPC-92) и 2-амино-1-[4-метилбензамидо]-5-[2-(нафталин-2-ил)-2-оксоэтилиден]-4-оксо-4,5-дигидро-1H-пиррол-3-карбоксилат (PCA-93) синтезированы в соответствии

с стандартными протоколами, как показано в предыдущих исследованиях [15, 47, 52–54]. Химические структуры EPC-91, EPC-92 и PCA-93 представлены на рис. 1. Доксорубин, паклитаксел, винбластин (Sigma-Aldrich, США), EPC-91, EPC-92 и PCA-93 были растворены в 100 % диметилсульфоксиде (ДМСО) (Sigma-Aldrich, США). В качестве контроля клетки инкубировали в культуральной среде с соответствующей концентрацией ДМСО (конечная концентрация 0,1 %). EPC-91, EPC-92 и PCA-93 использовались в концентрации, близкой к половинной ингибирующей концентрации (IC_{50}) (5 мкМ) (табл. 2), паклитаксел и винбластин — в концентрациях, подобранных ранее (10 и 0,01 мкМ соответственно) [15].

Клеточные линии и условия их культивирования.

В качестве объекта исследования использованы 6 опухолевых клеточных линий человека эпителиального (трижды негативный рак молочной железы линии HCC1806) и мезенхимального (остеосаркома линии SaOS-2, гастроинтестинальная стромальная опухоль линии GIST T-1) происхождения, в том числе 3 сублинии с приобретенной химиорезистентностью, а также мышьяная клеточная линия (недифференцированная колоректальная аденокарцинома линии Colon-26), имеющая первичную химиорезистентность, обусловленную тканевой специфичностью.

Сублинии опухолевых клеток с приобретенной химиорезистентностью были получены ранее в нашей лаборатории путем последовательного культивирования материнских опухолевых линий с постепенно увеличивающимися концентрациями химиопрепаратов: клеточная линия трижды негативного рака молочной железы, резистентная к паклитакселу (HCC1806 Tx-R) [55], клеточная линия остеосаркомы, резистентная к доксорубину (SaOS-2 Dox-R) [56], клеточная линия гастроинтестинальной стромальной опухоли, резистентная к паклитакселу (GIST T-1 TxR) [57]. Линии HCC1806, SaOS-2, Colon-26 получены из Американской коллекции типовых культур (American Type Culture Collection (ATCC), США), GIST T-1 — из метастаза гастроинтестинальной стромальной опухоли

желудка, имеющей гетерозиготную делецию из 57 пар оснований (V570-Y578) в 11-м экзоне *KIT* [58].

Все клеточные линии культивировали в стандартных условиях (влажная атмосфера с 5 % CO₂, 37 °С) CO₂-инкубатора (LAMSYSYSTEMS, Россия) в среде RPMI-1640 (ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 15 % эмбриональной бычьей сыворотки (HyClone, США), 1 % L-глутамина, 50 ЕД/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина (ООО «ПанЭко», Россия).

Оценка жизнеспособности клеточных линий. Опухолевые клетки высевали в 96-луночные плоскодонные планшеты (Corning Inc., США) и культивировали в течение 24 ч в стандартных условиях CO₂-инкубатора. Затем клетки инкубировали в течение 48 ч в присутствии EPC-91, EPC-92 и PCA-93, винбластин, паклитаксела, доксорубина или растворителя (DMCO) в соответствующих разведениях. Спустя 48 ч в лунки на 1 ч вносили реагент MTS (Promega, США). Клеточную жизнеспособность измеряли на спектрофотометре MultiScan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 492 нм. Половинную ингибирующую концентрацию исследуемых соединений определяли с использованием онлайн-калькулятора (<http://ic50.tk/> – по состоянию на 25.11.2023). Проведены 3 повтора для каждого исследуемого соединения.

Вестерн-блоттинг. Клеточные экстракты получали путем внесения к клеткам лизирующего буфера для радиоиммунопреципитации RIPA (25 мМ Tris-HCl; pH 7,6; 150 мМ NaCl; 5 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА); 1 % NP-40; 1 % дезоксихолат натрия; 0,1 % додецилсульфат натрия (SDS) с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз). Далее клеточные лизаты инкубировали в течение 20 мин на льду, центрифугировали в течение 30 мин при 13000 об/мин при 4 °С. Концентрацию белка в лизатах определяли по методу Брэдфорда (Thermo Fisher Scientific, США). Лизаты, содержащие 30 мкг белка, вносили в кассеты с 4–12 % Bis-Tris NuPAGE гелем (Invitrogen, США). Электрофорез проводили при 4 °С в течение 3 ч с использованием постоянного напряжения (80 В) в NuPAGE MOPS SDS буфере (Invitrogen, США). Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли в трансфер-буфере (25 мМ Tris; метанол (20 %); pH 8,3) при 350 мА в течение 1,5 ч при 4 °С. Для блокирования неспецифических взаимодействий и разведения антител использовали 1–5 % бычий сывороточный альбумин (BSA). Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с первичными антителами (АТ) в течение 16 ч при 4 °С, затем со вторичными АТ, конъюгированными с HRP (Santa Cruz Biotechnology, США), в течение 1 ч. Экспрессию белков оценивали в режиме хемилюминесценции в гель-документирующей системе Fusion Solo S (Vilber Lourmat, Франция). Эксперименты проводили в 3 повторностях.

Для оценки полимеризации тубулина и разделения его свободной и полимеризованной форм клеточные лизаты готовили согласно методике, описанной

С. Wittmann и соавт. [59]. К клеточному осадку добавляли 100 мкл холодного гипотонического буфера (50 мМ Tris-HCl; pH 6,8; 2 мМ ЭДТА; 0,5 % NP-40; 1 мМ MgCl₂ и смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз) и инкубировали при 37 °С в течение 5 мин в темноте. Затем клеточный лизат кратковременно перемешивали (Вортекс V-1 plus, Biosan, Латвия). После этого клеточные лизаты центрифугировали при 14400 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. Полимеризованная фракция тубулина находилась в осадке, свободная фракция – в надосадочной жидкости.

После разделения 2 фракций тубулина осадок ресуспендировали в 10 мкл модифицированного буфера RIPA (150 мМ NaCl; 1 % дезоксихолат натрия; 2 % IGEPAL CA-630; 0,4 % SDS; 50 мМ Tris и смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз) с 2 мкл ДНКазы Invitrogen TURBO (2 ед/мкл). Затем вносили дополнительно 50 мкл модифицированного буфера RIPA (150 мМ NaCl; 1 % дезоксихолат натрия; 2 % IGEPAL CA-630; 0,4 % SDS; 50 мМ Tris (pH 8,0); 5 мМ ЭДТА (pH 8,0) и смесь ингибиторов протеаз и фосфатаз) и несколько раз ресуспендировали и перемешивали (Вортекс V-1 plus, Biosan, Латвия). После полного растворения осадка лизат центрифугировали при 14400 об/мин при температуре 4 °С в течение 10 мин, затем супернатант помещали в отдельную пробирку (полимерная фракция тубулина). Далее проводились описанные выше этапы вестерн-блоттинга и детекция экспрессии α -тубулина в свободной и полимеризованной фракциях.

Были использованы следующие первичные АТ для вестерн-блоттинга: коктейль антител Cell Cycle and Apoptosis WB Cocktail (p-Cdk2 (Tyr15)/p-H3 (Ser10)/Actin/Cleaved PARP) (Abcam, США), циклин A2, расщепленная форма каспазы 3 (cl. caspase-3) (Cell Signaling, США), α -тубулин (Sigma-Aldrich, США) и β -актин (GenScript, США).

Имунофлуоресцентная микроскопия. Опухолевые клетки засеивали на покровные стекла, предварительно покрытые поли-L-лизинном (Sigma-Aldrich, США) и культивировали в 6-луночных плоскодонных планшетах (Corning Inc., США) в течение 48 ч. Затем в течение 8 ч опухолевые клетки культивировали в присутствии исследуемых соединений и препаратов сравнения.

Для визуализации p-H3-положительных клеток покровные стекла с клетками фиксировали 4 % раствором формальдегида в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем последовательно проводили: 3-кратный отмыв фосфатно-солевым буфером (ФСБ); инкубацию в блокирующем растворе (ФСБ с 5 % козьей сывороткой и 0,3 % Triton X-100) в течение 60 мин при комнатной температуре; инкубацию в присутствии АТ к p-H3 (Ser10), конъюгированных с вторичными АТ Alexa Fluor 488 (Cell Signaling, США) и разведенных в соотношении 1:200 в ФСБ, содержащем 1 % БСА и 0,3 % Triton X-100, в течение 16 ч при 4 °С; 3-кратный отмыв ФСБ. Перед визуализацией к клеткам

добавлялся ядерный краситель DAPI (Sigma-Aldrich, США).

Для исследования тубулиновых микротрубочек покровные стекла с клетками фиксировали смесью метанола и ацетона (соотношение 1:1) в течение 20 мин при -20°C . Затем последовательно проводили: 3-кратный отлив ФСБ; инкубацию в блокирующем растворе (ФСБ с 5 % козьей сывороткой и 0,3 % Triton X-100) в течение 60 мин при комнатной температуре; инкубацию в присутствии первичных моноклональных АТ к α -тубулину (Sigma-Aldrich, США) в течение 16 ч при 4°C ; 3-кратный отлив ФСБ; инкубацию со вторичными АТ, конъюгированными с техасским красным (Invitrogen, США) в течение 60 мин при комнатной температуре; 3-кратный отлив ФСБ. Для визуализации ядер к клеткам добавлялся краситель DAPI (Sigma-Aldrich, США). Визуализацию результатов проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus BX63 (Olympus, Япония). Для каждого экспериментального условия проведены 3 повтора.

Проточная цитофлуориметрия. Распределение опухолевых клеток по фазам клеточного цикла исследовали на проточном цитофлуориметре Guava Muse (Luminex, США) с помощью коммерческого набора Cell Cycle Kit (Luminex, США) в соответствии с протоколом производителя. Эксперименты проведены как минимум в 5 повторностях.

Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия Тьюки на множественные сравнения с использованием программного обеспечения R (R Foundation for Statistical Computing, Австрия; <https://www.R-project.org/> – по состоянию на 25.11.2023).

Оценка противоопухолевой активности соединений на сингенной модели. Противоопухолевые свойства (торможение роста опухоли) лидерных соединений оценивали с использованием сингенной модели. Восемь самкам мышей Balb/c в возрасте от 5 до 8 нед в латеральные области подкожно трансплантировали мышиную недифференцированную колоректальную аденокарциному линии Colon-26 (100 мкл суспензии в ФСБ Дульбекко содержало 200 тыс. клеток). После достижения опухолью объемов $\sim 50\text{ мм}^3$ мышей рандомизировали на 2 группы: мышам 1-й группы вводили внутривенно 100 мкл растворителя, мышам 2-й группы – 100 мкл лидерного соединения (10 мг/кг) на 10, 13, 16, 19, 22, 25 и 28-й день после трансплантации опухоли. Растворитель содержал 4,6 % ДМСО, 40 % ПЭГ-400, 5 % Твин-80 и 50,4 % деионизованной воды. Объемы опухолей измеряли штангенциркулем каждые 3 дня в течение 30 дней. Средние объемы опухолей в каждой экспериментальной группе рассчитывали следующим образом: длина \times ширина \times глубина $\times 0,5$. Затем строили кривые роста опухолей.

Выделенный опухолевый материал фотографировали, взвешивали, фиксировали в 4 % параформальдегиде и заливали в парафин. Затем проводили гистологическое окрашивание гематоксилином и эозином,

а также иммуногистохимическое окрашивание АТ к расщепленной форме каспазы-3 (Cell Signaling, США) парафиновых срезов. Изображения окрашенных образцов сняты с помощью микроскопа Olympus BX63 (Olympus, Токио, Япония).

Статистическую обработку проводили с использованием параметрических (t -критерий Стьюдента и критерий Фишера) и непараметрических (критерий Уилкоксона) методов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксическая активность ЕРС-91, ЕРС-92 и РСА-93 изучена на панели опухолевых клеточных линий с использованием колориметрического МТС-метода. Половинные ингибирующие рост клеток концентрации исследуемых соединений вычислены с помощью онлайн-калькулятора (<https://www.ic50.tk>) (табл. 1, 2). Согласно полученным значениям IC_{50} ЕРС-92 показал умеренную, а ЕРС-91 и РСА-93 – высокую цитотоксическую активность в отношении всех использованных опухолевых клеточных линий, в том числе с фенотипом МЛУ. При этом кратность изменений IC_{50} стандартных химиопрепаратов (доксорубин, паклитаксел, винбластин) (индекс резистентности) в сублиниях НСС1806 Тх-Р, SaOS-2 Dox-R и GIST T-1 Тх-Р по отношению к материнским линиям НСС1806, SaOS-2, GIST T-1 достигала очень высоких значений (например, индекс резистентности винбластин в сублинии НСС1806 Тх-Р был равен 800), в то время как индекс резистентности ЕРС-91, ЕРС-92 и РСА-93 варьировал от 0,5 до 3, что свидетельствует об отсутствии перекрестной устойчивости опухолевых клеток к отдельным химиопрепаратам (доксорубину, паклитакселу, винбластину).

При изучении цитотоксической активности ЕРС-91, ЕРС-92 и РСА-93 обнаружено, что 24-часовая инкубация опухолевых клеток в присутствии исследуемых соединений приводит не только к уменьшению конfluenceности клеточных культур, но и к изменению морфологии клеток, схожих с изменениями при их культивировании с химиопрепаратом класса винкалоидов винбластином. Накопление клеток округлой формы (предположительно митотических) под влиянием ЕРС-91, ЕРС-92, РСА-93 и винбластина показано на рис. 2.

Аналогичные морфологические изменения могут быть обусловлены схожим механизмом действия исследуемых соединений и винбластина. Винбластин-индуцированная митотическая катастрофа (остановка клеточного цикла в М-фазе) обусловлена ингибированием полимеризации тубулина и нарушением сборки микротрубочек веретена деления. Для обнаружения подобной активности у синтезированных нами соединений проведены следующие эксперименты. Опухолевые клетки сублинии НСС1806 Тх-Р инкубировали в течение 8 ч в присутствии ЕРС-91, ЕРС-92 и РСА-93,

Таблица 1. Значения половинных ингибирующих концентраций (IC_{50}) для EPC-91, EPC-92, PCA-93, доксорубицина (Dox), паклитаксела (Tx) и винбластина (Vin) в опухолевых линиях HCC1806, HCC1806 Tx-R, SaOS-2, SaOS-2 Dox-R, GIST T-1, GIST T-1 Tx-R, Colon-26 ($n = 3$), мкМ, среднее значение \pm стандартное отклонение

Table 1. Concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (IC_{50}) values (in the micromolar range) for EPC-91, EPC-92, PCA-93, doxorubicin (Dox), paclitaxel (Tx) and vinblastine (Vin) in HCC1806, HCC1806 Tx-R, SaOS-2, SaOS-2 Dox-R, GIST T-1, GIST T-1 Tx-R, Colon-26 cancer lines ($n = 3$), μM , mean \pm standard deviation

| Клеточная линия/сублиния Cell line/subline | PC-91 | EPC-92 | PCA-93 | Dox | Tx | Vin |
|---|----------------|----------------|----------------|-----------------------|---|---|
| HCC1806 Tx-R | 10,3 \pm 0,4 | 32,1 \pm 1,5 | 12,2 \pm 0,3 | 1,8 \pm 0,5 [60] | 5,4 \pm 1 [60] | (3 \pm 0,4) $\times 10^{-4}$ |
| HCC1806 | 3,5 \pm 0,4 | 15,7 \pm 1,2 | 5,2 \pm 0,8 | 0,22 \pm 0,004 [60] | 0,22 \pm 0,01 [60] | 0,25 \pm 0,019 |
| SaOS-2 Dox-R | 2 \pm 0,1 | 7,3 \pm 0,3 | 2,4 \pm 0,02 | 0,97 \pm 0,12 [56] | (3,9 \pm 0,8) $\times 10^{-9}$ [56] | (2,9 \pm 0,5) $\times 10^{-4}$ [56] |
| SaOS-2 | 2,5 \pm 0,1 | 5 \pm 0,2 | 1,1 \pm 0,1 | 0,16 \pm 0,02 [56] | (1,196 \pm 0,209) $\times 10^{-7}$ [56] | (1,22 \pm 0,21) $\times 10^{-3}$ [56] |
| GIST T-1 Tx-R | 1,7 \pm 0,2 | 2,4 \pm 0,4 | 1 \pm 0,05 | 6,5 \pm 1 [60] | 0,46 \pm 0,08 [60] | 0,073 \pm 0,009 |
| GIST T-1 | 1,4 \pm 0,1 | 5,2 \pm 0,1 | 0,6 \pm 0,07 | 0,04 \pm 0,005 [60] | <0,01 [60] | 0,044 \pm 0,007 |
| Colon-26 | 5,5 \pm 0,2 | 14,1 \pm 0,2 | 4 \pm 0,1 | >256 | 0,11 \pm 0,028 | 2 \pm 0,2 |

Примечание. Здесь и в табл. 2: в квадратных скобках указаны ссылки на публикации, в которых приведены значения IC_{50} для соответствующих химиопрепаратов.

Note. Here and in table 2: in square brackets are links to publications that provide IC_{50} values for the corresponding chemotherapy drugs.

Таблица 2. Индекс резистентности в сублиниях HCC1806 Tx-R, SaOS-2 Dox-R и GIST T-1 Tx-R

Table 2. Resistance index in HCC1806 Tx-R and SaOS-2 Dox-R cancer sublines

| Клеточная сублиния Cell subline | PC-91 | EPC-92 | PCA-93 | Dox | Tx | Vin |
|------------------------------------|-------|--------|--------|------------|-----------|----------|
| HCC1806 Tx-R | 3 | 2,1 | 2,4 | 81,8 [60] | 24,5 [60] | 800 |
| SaOS-2 Dox-R | 0,8 | 1,5 | 2,2 | 6,1 [56] | 30,7 [56] | 4,2 [56] |
| GIST T-1 Tx-R | 1,2 | 0,5 | 1,6 | 162,5 [60] | >46 [60] | 1,7 |

Примечание. Dox – доксорубицин; Tx – паклитаксел; Vin – винбластин.

Note. Dox – doxorubicin; Tx – paclitaxel; Vin – vinblastine.

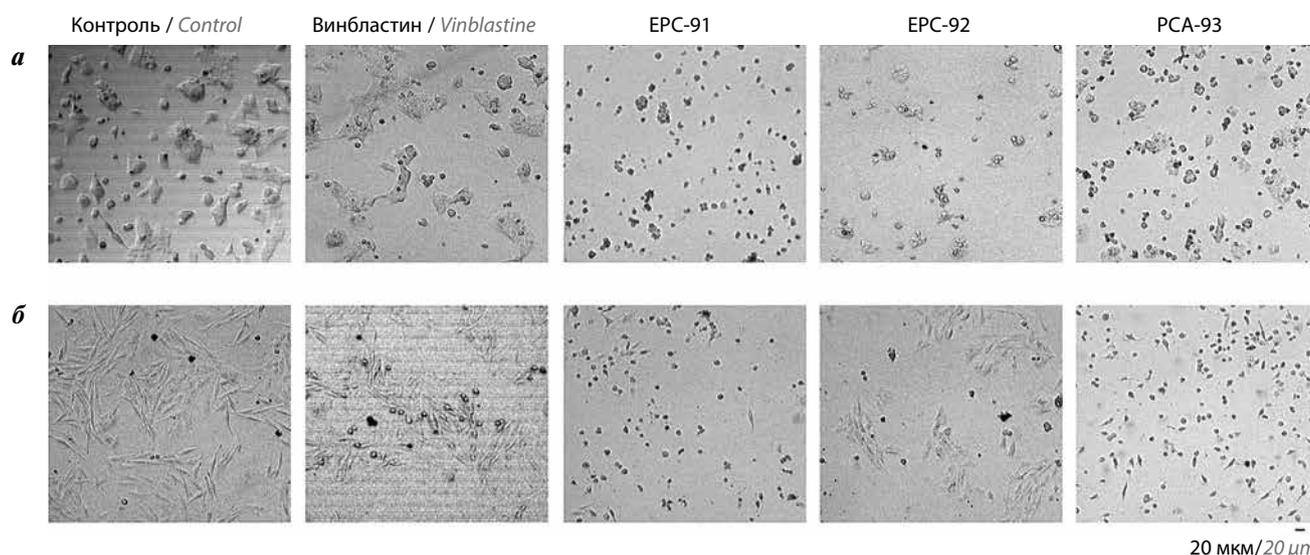


Рис. 2. Морфологические изменения в клетках сублиний SaOS-2 Dox-R (а) и GIST T-1 Tx-R (б), культивированных в течение 24 ч в присутствии растворителя (диметилсульфоксида) (отрицательный контроль) (5 мкМ), винбластина (0,05 мкМ) (положительный контроль), EPC-91 (5 мкМ), EPC-92 (5 мкМ) и PCA-93 (5 мкМ). $\times 10$

Fig. 2. Changes in morphology of SaOS-2 Dox-R (a) and GIST T-1 Tx-R (b) cancer cells treated by EPC-91 (5 μM), EPC-92 (5 μM), PCA-93 (5 μM), vinblastine (0,05 μM) (positive control), cultured in presence of the solvent DMSO (dimethyl sulfoxide) for 24 h. $\times 10$

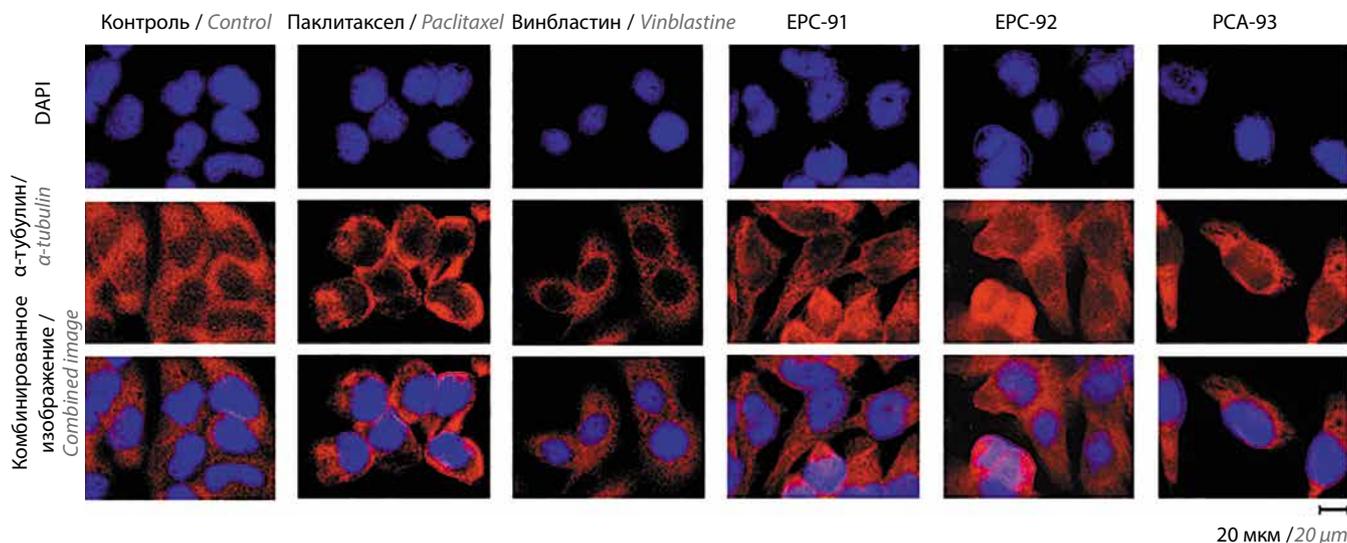


Рис. 3. Ингибирование сборки микротрубочек в опухолевых клетках линии HCC1806 Tx-R под влиянием EPC-91 и PCA-93. Клетки HCC1806 Tx-R инкубировали с диметилсульфоксидом (контроль), паклитакселом (10 мкМ), винбластинем (0,01 мкМ), EPC-91, EPC-92 и PCA-93 (5 мкМ) в течение 8 ч, затем фиксировали смесь метанола и ацетона (соотношение 1:1) и окрашивали антителами к α -тубулину (красный цвет) и ядерным красителем DAPI (синий цвет), $\times 100$

Fig. 3. EPC-91 and PCA-93 disrupt the microtubules network in cancer cells. HCC1806 Tx-R breast cancer cells were treated with dimethyl sulfoxide (control), paclitaxel (10 μ M), vinblastine (0,01 μ M), EPC-91, EPC-92 and PCA-93 (5 μ M) for 8 h, fixed with a mixture of methanol and acetone, and stained with mAbs targeting α -tubulin (red). DAPI nuclear staining (blue) was used to outline the nuclei, $\times 100$

а также винбластина (препарата, деполимеризующего тубулин) и паклитаксела (препарата, полимеризующего тубулин). Затем клетки фиксировали для иммунофлуоресцентного окрашивания на α -тубулин с целью выявления структурных изменений в сборке тубулиновых нитей.

Обнаружено, что под влиянием EPC-91 и PCA-93, а также винбластина в опухолевых клетках, в отличие от контроля, не визуализируются тонкие тубулиновые нити, по форме напоминающие паутину, а наблюдается диффузное окрашивание α -тубулина в виде взвеси, что свидетельствует о его деполимеризации и нарушении сборки тубулиновых микротрубочек (рис. 3). В свою очередь, паклитаксел приводит к конденсации тубулиновых нитей в виде тяжей и пучков, что говорит об изменении динамического состояния тубулиновых белков цитоскелета в сторону их стабилизации (см. рис. 3).

Для подтверждения деполимеризующего влияния на тубулин в исследуемых соединениях также проанализирована экспрессия его растворенной и полимеризованной форм. Выявлено достоверное повышение уровня экспрессии тубулина в растворимой (свободной) фракции клеток линии HCC1806 Tx-R, инкубированных в присутствии PCA-93 и винбластина, по сравнению с контрольными и инкубированными паклитакселом клетками (рис. 4). В свою очередь, в клетках, инкубированных в присутствии данного препарата, наблюдалась гиперэкспрессия α -тубулина в полимеризованной клеточной фракции, что подтверждает способность данного химиопрепарата инициировать полимеризацию тубулина.

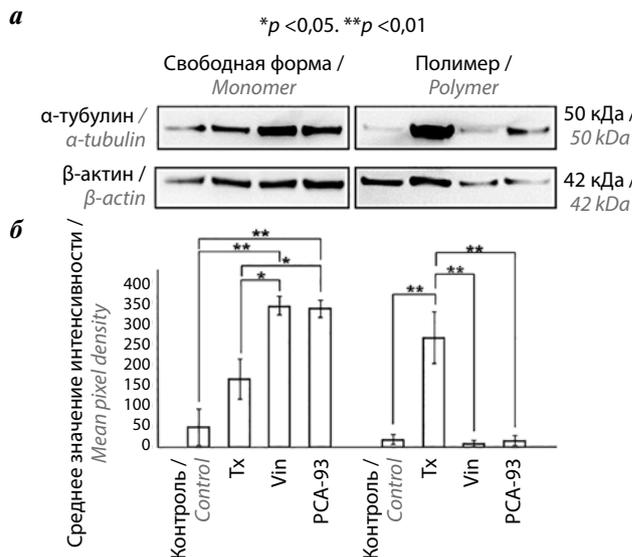


Рис. 4. Ингибирование полимеризации тубулина в опухолевых клетках линии HCC1806 Tx-R под влиянием PCA-93: а – данные вестерн-блоттинга, иллюстрирующие уровень экспрессии α -тубулина в растворимых (свободная форма) и полимеризованных (полимер) клеточных фракциях линии HCC1806 Tx-R после 24-часовой инкубации в присутствии паклитаксела (Tx) (10 мкМ), винбластина (Vin) (0,01 мкМ) и PCA-93 (5 мкМ). В качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах использовался β -актин; б – денситометрический анализ уровня экспрессии α -тубулина в растворимых (свободная форма) и полимеризованных (полимер) клеточных фракциях линии HCC1806 Tx-R, представленного на рис. 3, а

Fig. 4. PCA-93 inhibits α -tubulin polymerization in HCC1806 Tx-R tumor cells: а – Western Blot analysis of α -tubulin protein in soluble and polymerized cell fractions after treatment with paclitaxel (Tx) (10 μ M), vinblastine (Vin) (0,01 μ M), and PCA-93 (5 μ M). β -actin staining was used to show the comparable amounts of protein loaded into each sample; б – quantification by mean pixel density of level of α -tubulin expression in soluble (monomer) and polymerized (polymer) fractions in HCC1806 Tx-R line, presented in fig. 3, а

Таким образом, результаты иммунофлуоресцентного окрашивания и вестерн-блоттинга свидетельствуют о способности исследуемых соединений ингибировать процессы сборки микротрубочек и полимеризации тубулина, что может привести к остановке клеточного цикла в одной из точек рестрикции (М-фазе). Для подтверждения данной гипотезы исследовано распределение фаз клеточного цикла в опухолевых клетках под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93 методом проточной цитофлуориметрии. Результаты, представленные на рис. 5 и в табл. 3, свидетельствуют о преимущественном накоплении клеток сублинии SaOS-2 Dox-R, культивируемых в присутствии EPC-91, EPC-92 и PCA-93, в G2/M-фазе клеточного цикла. Аналогичные данные получены и в отношении других опухолевых клеточных линий.

Для подтверждения того, что появление округлых клеток под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93 (см. рис. 1) является результатом ареста клеток в фазе митоза (митотическая катастрофа), проведены дальнейшие исследования по выявлению маркеров М-фазы клеточного цикла с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии и вестерн-блоттинга.

Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии показали значительное увеличение количества р-Н3-положительных клеток линии HCC1806 Тх-Р под влиянием EPC-91 и PCA-93 по сравнению с контрольными клетками (рис. 6). Как известно, фосфорилирование гистона Н3 по серину в положении 10 связано непосредственно с процессами деления клетки, так как оно не наблюдается в интерфазе, а начинается в профазе, достигает максимума в метафазе и исчезает в телофазе митоза, поэтому фосфорилированная форма гистона Н3 (фосфо-Н3 (Ser10) считается классическим маркером митотических клеток. Повышение количества р-Н3-положительных клеток наблюдалось также в отношении винбластина, но не паклитаксела, что подтверждает наличие резистентности клеток сублинии HCC1806 Тх-Р к паклитакселу.

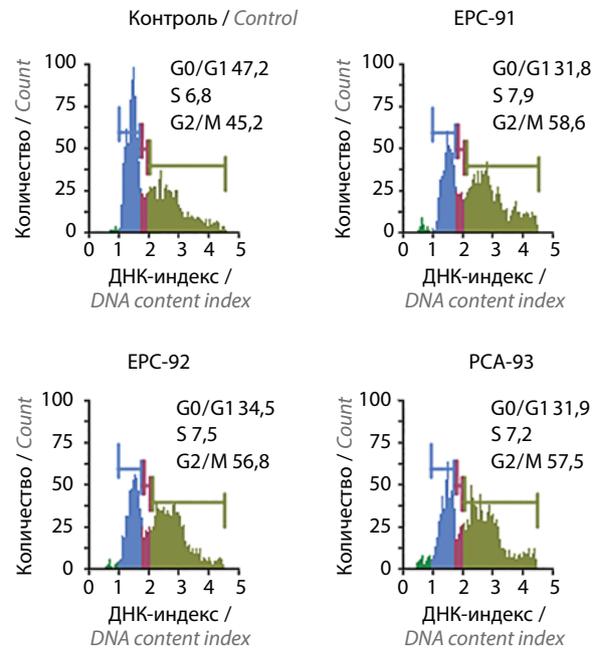


Рис. 5. Накопление опухолевых клеток линии SaOS-2 Dox-R в G2/M-фазе клеточного цикла под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93. Репрезентативные изображения распределения фаз клеточного цикла в клетках сублинии остеосаркомы SaOS-2 Dox-R, культивируемых в присутствии диметилсульфоксида (контроль) (5 мкМ), EPC-91 (5 мкМ), EPC-92 (5 мкМ) и PCA-93 (5 мкМ) в течение 24 ч

Fig. 5. Accumulation of SaOS-2 Dox-R cancer cells in the G2/M phases after treatment with EPC-91, EPC-92 and PCA-93. Representative histograms illustrating the changes in cell cycle profile of SaOS-2 Dox-R cells treated with dimethyl sulfoxide (negative control) (5 μM), EPC-91 (5 μM), EPC-92 (5 μM) and PCA-93 (5 μM) for 24 h

Результаты иммуноблоттинга, представленные на рис. 7, также свидетельствовали о повышении уровня экспрессии р-Н3 (Ser10) в материнских (SaOS-2, GIST T-1) и резистентных (SaOS-2 Dox-R, GIST T-1 Тх-Р) сублиниях клеток под влиянием EPC-91, EPC-92, PCA-93 и винбластина. В свою очередь, экспрессия белков, регулирующих клеточный цикл (p-Cdk2 (Tyr15) и циклин А2) под влиянием вышеуказанных соединений, напротив, снижалась.

Таблица 3. Распределение фаз клеточного цикла в клетках сублинии остеосаркомы SaOS-2 Dox-R после воздействия диметилсульфоксида (контроль), EPC-91, EPC-92 и PCA-93 (5 мкМ) (n = 5), среднее ± стандартное отклонение

Table 3. Cell cycle distribution in SaOS-2 Dox-R cancer subline treated with dimethyl sulfoxide (control), EPC-91, EPC-92 and PCA-93 (5 μM) (n = 5), mean ± standard deviation

| Воздействие Effects | Фаза G0/G1 G0/G1 phase | Фаза S S phase | Фаза G2/M G2/M phase |
|------------------------|---------------------------|-------------------|-------------------------|
| Контроль Control | 46,7 ± 0,9 | 6,8 ± 0,6 | 45,6 ± 0,4 |
| EPC-91 | 32,5 ± 0,9* | 8,5 ± 0,6** | 57,3 ± 1,4* |
| EPC-92 | 34,6 ± 1,0* | 7,7 ± 0,9 | 56,3 ± 1,6* |
| PCA-93 | 33,0 ± 1,1* | 7,9 ± 0,6*** | 55,9 ± 1,2* |

* p < 0,001. ** p < 0,01. *** p < 0,05.

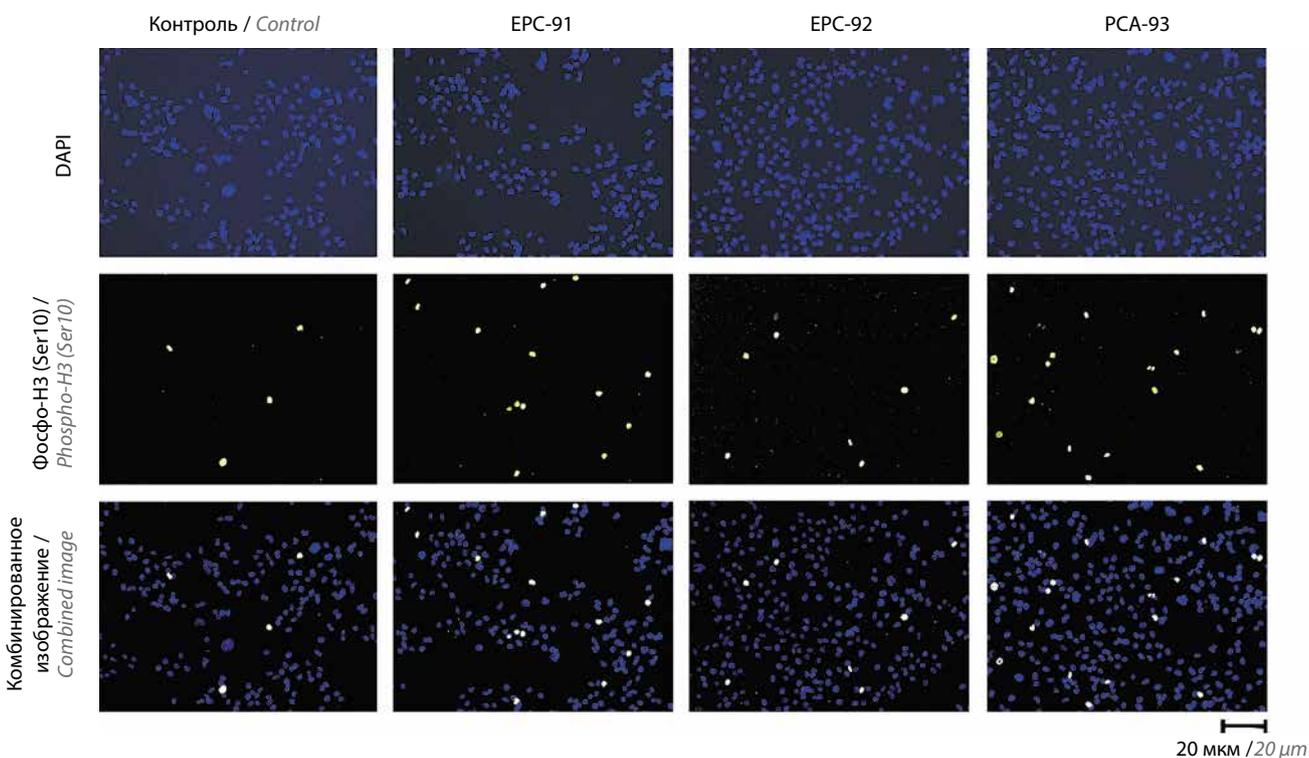


Рис. 6. Накопление опухолевых клеток линии HCC1806 Tx-R в M-фазе под влиянием EPC-91 и PCA-93. Репрезентативные изображения клеток сублинии HCC1806 Tx-R, инкубированных в присутствии диметилсульфоксида (отрицательный контроль), EPC-91 (5 мкМ), EPC-92 (5 мкМ) и PCA-93 (5 мкМ) в течение 8 ч. Клетки фиксировали 4 % параформальдегидом и окрашивали антителами к фосфорилированной форме гистона 3 (фосфо-Н3 (Ser10)), конъюгированными с флуорохромом Alexa488 (зеленый цвет) и ядерным красителем DAPI (синий цвет). ×10
Fig. 6. EPC-91 and PCA-93 induce accumulation of HCC1806 Tx-R breast cancer cells in M-phase. The representative images of cancer cells treated with dimethyl sulfoxide (negative control), EPC-91 (5 μM), EPC-92 (5 μM) and PCA-93 (5 μM) for 8 h. The cells were fixed with 4 % paraformaldehyde and immunostained by using the Alexa488-conjugated anti-histone H3 phosphorylated on residue Ser10 (anti-p-H3 (Ser10)) antibody (green color). Cell nuclei were outlined by staining with DAPI (blue color). ×10

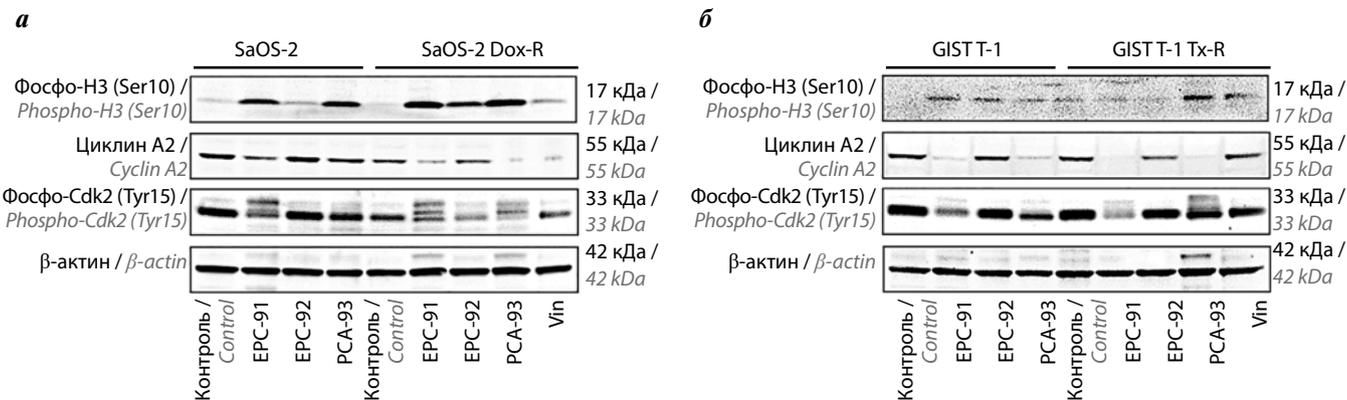


Рис. 7. Нарушения регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках линий SaOS-2, SaOS-2 Dox-R, GIST T-1, GIST T-1 Tx-R под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93. Уровень экспрессии циклина A2 и фосфорилированных форм гистона 3 (фосфо-Н3 (Ser10)) и циклинзависимой киназы 2 (фосфо-Cdk2 (Tyr15)) в клетках линий SaOS-2, SaOS-2 Dox-R (а) и GIST T-1, GIST T-1 Tx-R (б) после их культивирования с диметилсульфоксидом (контроль) (5 мкМ), EPC-91 (5 мкМ), EPC-92 (5 мкМ), PCA-93 (5 мкМ) и винбластином (Vin) (0,05 мкМ) в течение 48 ч. Уровень экспрессии β-актина использовали в качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах
Fig. 7. EPC-91, EPC-92 and PCA-93 induce abnormalities of cell cycle regulation in SaOS-2, SaOS-2 Dox-R, GIST T-1, GIST T-1 Tx-R cancer lines. Immunoblot analysis for the expression histone H3 phosphorylated on residue Ser10 (phospho-H3 (Ser10)), cyclin A2, and cyclin-dependent kinase 2 phosphorylated on residue Tyr15 (phospho-Cdk2 (Tyr15)) in SaOS-2, SaOS-2 Dox-R (a) and GIST T-1, GIST T-1 Tx-R (b) after treatment with dimethyl sulfoxide (control) (5 μM), EPC-91 (5 μM), EPC-92 (5 μM), PCA-93 (5 μM), and vinblastine (Vin) (0,05 μM) for 48 h. β-actin stain is used as a loading control

Данные нарушения в регуляции клеточного цикла, индуцированные EPC-91, EPC-92 и PCA-93, приводили к гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза, о чем свидетельствовало повышение уровней

экспрессии маркеров программируемой клеточной гибели – расщепленных форм поли(АДФ-рибоза)-полимеразы и каспазы 3 (рис. 8) под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93. Следует отметить, что EPC-91

и PCA-93 проявляли бóльшую проапоптотическую активность в отношении линий SaOS-2 Dox-R и GIST T-1 Tx-R по сравнению с винбластином.

Аналогичные результаты получены в отношении мышинной опухолевой клеточной линии Colon-26 (рис. 9). Следует отметить, что наиболее значимые изменения наблюдались в опухолевых клетках, культивированных в присутствии PCA-93. В связи с этим данное лидерное соединение было использовано для последующего изучения его противоопухолевых свойств.

Противоопухолевая активность PCA-93 изучалась на модели синотрансплантата Colon-26. Мышам линии Balb/c подкожно трансплантировали клетки линии Colon-26. После достижения объемов опухолей 50 см³ группы животных рандомизировали и интраперитонеально вводили растворитель (контроль) или PCA-93 в дозе 10 мг/кг на 10, 13, 16, 19, 22, 25 и 28-й дни эксперимента. Обнаружено, что на 30-й день

после инокуляции клеток Colon-26 у лабораторных животных контрольной группы размеры опухоли 8-кратно превышали аналогичный показатель у мышей, которым вводили соединение PCA-93 (рис. 10, а). Репрезентативные фотографии мышей с опухолями, а также размеры выделенных опухолей обеих групп показаны на рис. 10, б, в соответственно. Данные результаты коррелировали с объемом и массой опухолей. Важно, что за весь период эксперимента (30 дней) в группе животных, получавших инъекции соединения PCA-93, не наблюдалось системных побочных эффектов.

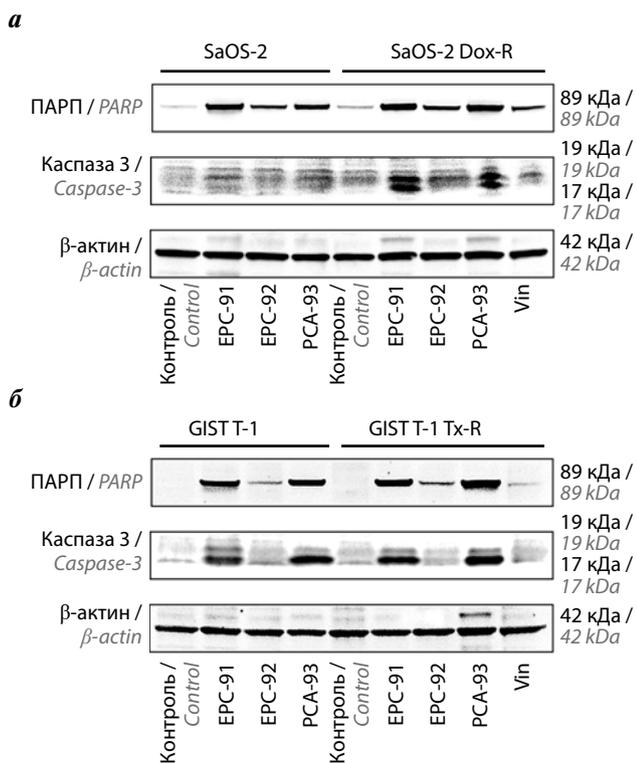


Рис. 8. Индукция апоптоза в опухолевых клетках линий SaOS-2, SaOS-2 Dox-R, GIST T-1, GIST T-1 Tx-R под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93. Уровень экспрессии расщепленных форм поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП) и каспазы 3 в клетках линий SaOS-2, SaOS-2 Dox-R (а) и GIST T-1, GIST T-1 Tx-R (б) после их культивирования с диметилсульфоксидом (контроль) (5 мкМ), EPC-91 (5 мкМ), EPC-92 (5 мкМ), PCA-93 (5 мкМ) и винбластином (Vin) (0,05 мкМ) в течение 48 ч. Уровень экспрессии β -актина использовали в качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах

Fig. 8. EPC-91, EPC-92 and PCA-93 induce apoptosis of SaOS-2, SaOS-2 Dox-R, GIST T-1, GIST T-1 Tx-R cancer lines. Immunoblot analysis for apoptosis markers (e. g., cleaved forms of poly-ADP-ribose polymerase (PARP) and caspase-3) in SaOS-2, SaOS-2 Dox-R (a) and GIST T-1, GIST T-1 Tx-R (b) after treatment with dimethyl sulfoxide (control) (5 μ M), EPC-91 (5 μ M), EPC-92 (5 μ M), PCA-93 (5 μ M), and vinblastine (Vin) (0,05 μ M) for 48 h. β -actin stain is used as a loading control

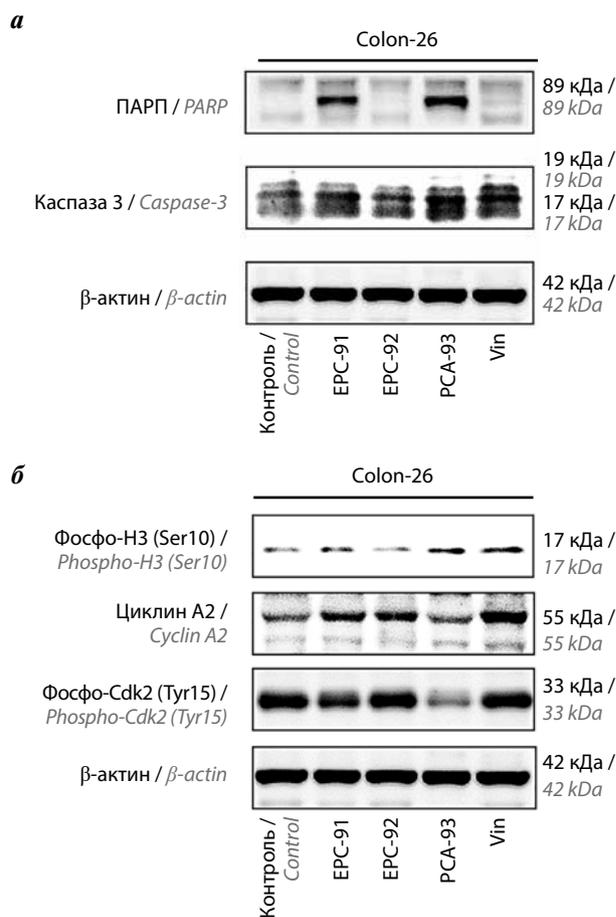


Рис. 9. Индукция апоптоза и нарушений регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках линии Colon-26 под влиянием EPC-91, EPC-92 и PCA-93. Уровень экспрессии расщепленных форм поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП) и каспазы 3 (а), циклина А2, фосфорилированных форм гистона 3 (фосфо-Н3 (Ser10)) и циклинзависимой киназы 2 (фосфо-Сdk2 (Tyr15)) (б) в клетках линии Colon-26 при культивировании в присутствии диметилсульфоксида (контроль) (5 мкМ), EPC-91 (5 мкМ), EPC-92 (5 мкМ), PCA-93 (5 мкМ) и винбластину (Vin) (0,05 мкМ) в течение 48 ч. Уровень экспрессии β -актина использовали в качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах

Fig. 9. EPC-91, EPC-92 and PCA-93 induce apoptosis and abnormalities of cell cycle regulation in Colon-26 cancer line. Immunoblot analysis for apoptosis markers (e. g., cleaved forms of poly-ADP-ribose polymerase (PARP) and caspase-3) (a) and for the expression of histone H3 phosphorylated on residue Ser10 (phospho-H3 (Ser10)), cyclin A2, and phosphorylated on residue Tyr15 (phospho-Cdk2 (Tyr15)) (b) in Colon-26 after treatment with dimethyl sulfoxide (control) (5 μ M), EPC-91 (5 μ M), EPC-92 (5 μ M), PCA-93 (5 μ M), and vinblastine (Vin) (0,05 μ M) for 48 h. β -actin stain is used as a loading control

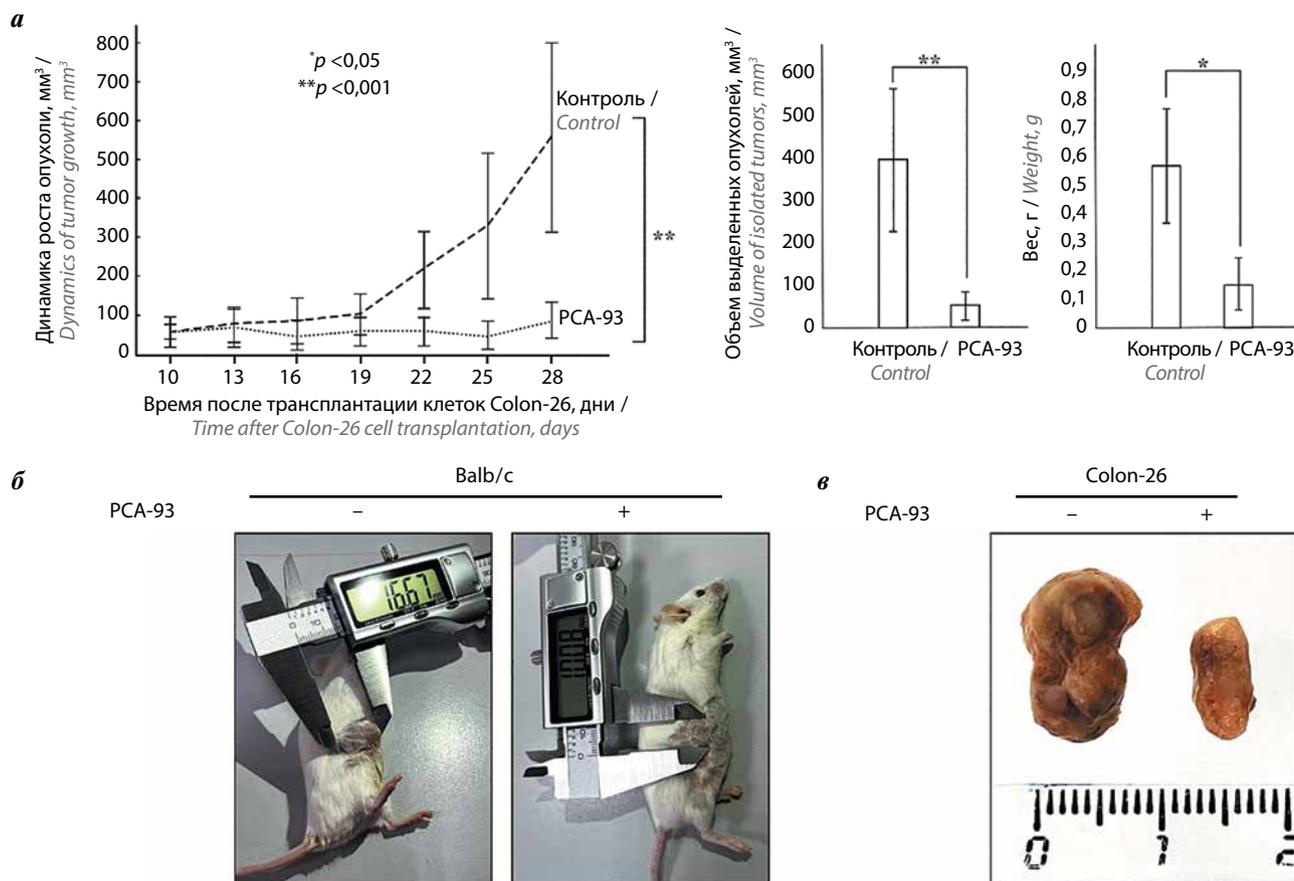


Рис. 10. Противоопухолевая активность PCA-93 на модели синотрансплантата Colon-26 мышей Balb/c: а – динамика роста опухолей, объемов и веса опухолей для каждой экспериментальной группы; б – изображения мышей с опухолью в каждой экспериментальной группе; в – репрезентативные изображения окончательных объемов опухоли в каждой экспериментальной группе. После подкожной инокуляции клеток Colon-26 (14-й день) мышей Balb/c рандомизировали на 2 группы (n = 4) и вводили внутривенно 100 мкл растворителя (отрицательный контроль) или PCA-93 (10 мг/кг). Объем опухоли в каждой группе измеряли штангенциркулем и рассчитывали следующим образом: длина × ширина × ширина × 0,5. Результаты выражали в виде среднего объема и веса опухолей (среднее ± ошибка среднего) (n = 5)

Fig. 10. Anti-tumor activity of PCA-93 in a Balb/c mice sinograft Colon-26 models: а – dynamics of the tumor growth, tumor volumes and weights for each experimental group; б – images mice with the tumor in each experimental group; в – representative images of the final tumor volumes in each experimental group. After subcutaneous inoculation of Colon-26 cells (day 14), Balb/c mice were randomized into 2 groups (n = 4) and administered i. p. 100 μL of vehicle (negative control) or PCA-93 (10 mg/kg). Tumor volumes in each group were assessed by calipers and calculated as length × width × width × 0.5. Results were expressed as the mean volume and weight of tumors (mean ± standard error) (n = 5)

Окрашивание опухолей гематоксилином и эозинном позволило выявить уменьшение клеточности и возникновение очагов некроза под влиянием PCA-93 (рис. 11). Данное соединение также проявляло проапоптотическую активность в отношении синотрансплантата Colon-26, о чем свидетельствовало повышение количества каспаза-3-позитивных клеток по сравнению с контролем.

ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез новых соединений, обладающих противоопухолевой активностью, в том числе в отношении клеток, резистентных к используемым в настоящее время химиопрепаратам, является одним из перспективных научных направлений в области фундаментальной и практической онкологии. Несмотря на довольно высокую эффективность лекарственных препаратов, оказывающих влияние на динамическое состояние микротрубочек веретена деления, их про-

должительное применение в виде как моно-, так и комбинированной химиотерапии имеет ряд серьезных ограничений, обусловленных системными побочными эффектами (миелосупрессией, периферической нейропатией и др.) и неуклонным развитием резистентности злокачественных новообразований к данным лекарственным средствам, а также к химиопрепаратам с иным механизмом действия [61–67]. Последнее может являться следствием усиленной экскреции химиопрепаратов из опухолевых клеток, обусловленной активацией АВС-транспортеров [66, 68], процессов репарации повреждений ДНК [69], изменением молекулярной мишени [70–73] и нарушениями фармакодинамики химиопрепарата и его биодоступности [74, 75] и др. Следовательно, синтез новых химических соединений, влияющих на опухолевые клетки с МЛУ и в то же время имеющих меньшую системную токсичность, представляет безусловный научно-практический интерес.

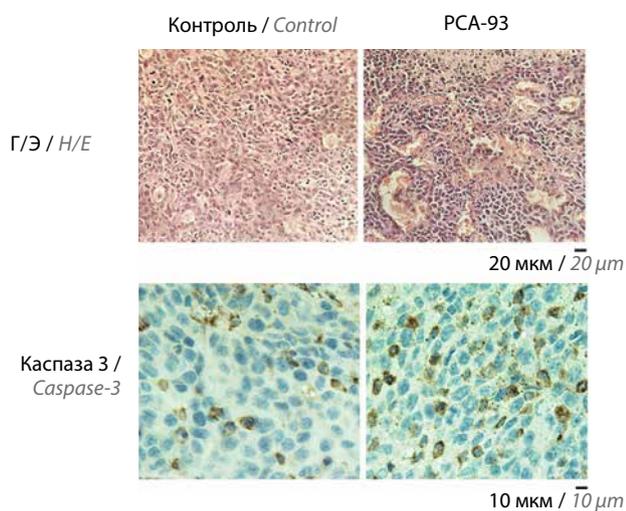


Рис. 11. Противоопухолевая и проапоптотическая активность соединения PCA-93 в отношении синотрансплантата Colon-26. Представительные изображения: окраска синотрансплантатов Colon-26 гематоксилином и эозином (Г/Э) (верхний ряд) и иммуногистохимическое окрашивание на расщепленную форму каспазы-3 (нижний ряд) у животных групп контроля и животных, получавших PCA-93 (10 мг/кг) в течение 7 дней

Fig. 11. PCA-93 exhibits anti-tumor and pro-apoptotic activities in Colon-26 sinografts. Representative images of hematoxylin and eosin-stained (H/E) (top row) and images of cleaved caspase-3 found by the IHC-staining (bottom row) of Colon-26 sinografts treated for 7 days with PCA-93 (10 mg/kg)

Ранее проведенные нами исследования показали, что пирролсодержащие гетероциклические соединения обладают высокой цитотоксической активностью в отношении широкого спектра трансформированных клеток *in vitro* [15, 43–49]. Было показано, что основным молекулярным механизмом действия данных соединений является их способность нарушать динамическое состояние микротрубочек веретена деления посредством ингибирования процессов полимеризации тубулина, что, в свою очередь, приводит к нарушениям в регуляции клеточного цикла, накоплению клеток в М-фазе и их последующей гибели по механизму апоптоза [15, 43–49]. С помощью методов компьютерного моделирования нам удалось выявить потенциальные сайты их связывания, находящиеся в колхициновом сайте α -тубулина [15, 47, 48]. Последующие исследования показали высокую противоопухолевую активность данных соединений *in vivo* на ксенографтных моделях опухолей [15, 45].

Данное исследование продемонстрировало высокую цитотоксическую активность новых синтезированных нами соединений в отношении довольно широкого спектра опухолевых клеток с фенотипом МЛУ. Примечательным являлся тот факт, что использованные в настоящей работе опухолевые клеточные линии отличались друг от друга типом гиперэкспрессированных АВС-транспортёров. В частности, для клеточной линии рака молочной железы HCC1806 основным транспортёром являлся ABCB1 (р-гликопротеин) [55], в то время как для клеток гастроинтестинальной стромальной опухоли характерна гипер-

экспрессия ABCC1 (MRP-1) [57], а для клеток аденокарциномы кишечника линии Colon-26 [76] и остеосаркомы линии SaOS-2 [56] – гиперэкспрессия ABCG2. Несмотря на выраженные различия в уровне экспрессии данных белков, все вышеуказанные клеточные линии были чувствительны к соединениям EPC-91 и PCA-93, что свидетельствует об их способности обходить различные адаптационные механизмы, направленные на экскрецию из опухолевых клеток химиопрепаратов разных групп. Наибольшая цитотоксическая активность выявлена для соединения PCA-93, что также подтверждено результатами данного исследования, проведенного на синографтной модели Colon-26: показана выраженная противоопухолевая активность данного соединения. Об этом свидетельствовали значительное сокращение размеров опухолей у животных, усиление гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза, а также значительное уменьшение количества пролиферирующих клеток.

Полученные нами данные коррелируют с результатами других исследований, свидетельствующих о высокой цитотоксической и противоопухолевой активности пирролсодержащих химических соединений. В пионерском исследовании S.L. Mooberry и соавт., опубликованном в 2007 г., показана высокая активность в отношении микротрубочек веретена деления соединения JG03–14, представляющего собой тетразамещенный бромированный пиррол. Результатами этого взаимодействия были нарушение регуляции клеточного цикла и накопление клеток в М-фазе вследствие образования aberrantных митотических волокон [77]. Последующие исследования показали, что способность пирролсодержащих соединений к деполимеризации тубулина является следствием их связывания с колхициновым доменом данного белка. Во всех источниках литературы, упомянутых выше, подчеркивалось, что активность соединений на основе пиррола в отношении деполимеризации тубулина обусловлена их связыванием с колхициновым доменом в молекуле тубулина. Это коррелирует с данными, полученными нашей исследовательской группой: выявлена способность многих этил-пиррол-карбоксилатов [47] и пиррол-карбоксамидов [15, 48] выступать в качестве эффективных лигандов при связывании с колхициновым сайтом тубулина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы показали, что 2 новых соединения, относящиеся к группе этил-пиррол-карбоксилатов (EPC-91) и пиррол-карбоксамидов (PCA-93), обладают наивысшей по сравнению с ранее синтезированными нами пирролсодержащими гетероциклическими соединениями цитотоксической и противоопухолевой активностью в отношении опухолевых клеток различного происхождения с фенотипом МЛУ. Это является следствием их способности нарушать процессы полимеризации α -тубулина, что приводит к выраженным нарушениям в регуляции

клеточного цикла и последующей гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза. Таким образом, этил-пиррол-карбоксилы и пиррол-карбоксамиды могут рассматриваться в качестве перспективных средств, обладающих противоопухолевой активностью, и являться платформой для разработки нового класса химио-

препаратов, эффективных в отношении широкого спектра злокачественных новообразований, в том числе у уже развившейся лекарственной устойчивостью к современным химиопрепаратам различных групп (ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа, ингибиторам микротрубочек веретена деления и др.).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Bhardwaj V., Gumber D., Abbot V. et al. Pyrrole: a resourceful small molecule in key medicinal hetero-aromatics. *RSC Adv* 2015;5:15233–66. DOI: 10.1039/C4RA15710A
- DeSimone R.W., Currie K.S., Mitchell S.A. et al. Privileged structures: applications in drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* 2004;7(5):473–93. DOI: 10.2174/1386207043328544
- Duarte C.D., Barreiro E.J., Fraga C.A.M. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. *Mini-Rev Med Chem* 2007;7(11):1108–19. DOI: 10.2174/138955707782331722
- Li Petri G., Spanò V., Spatola R. et al. Bioactive pyrrole-based compounds with target selectivity. *Eur J Med Chem* 2020;208:112783. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.112783
- Walsh C.T., Garneau-Tsodikova S., Howard-Jones A.R. Biological formation of pyrroles: Nature's logic and enzymatic machinery. *Nat Prod Rep* 2006;23:517–31. DOI: 10.1039/b605245m
- Ahmad S., Alam O., Naim M.J. et al. Pyrrole: An insight into recent pharmacological advances with structure activity relationship. *Eur J Med Chem* 2018;157:527–61. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.08.002
- Bianco M.C.A.D., Marinho D.I.L.F., Hoelz L.V.B. et al. Pyrroles as privileged scaffolds in the search for new potential HIV inhibitors. *Pharmaceuticals* 2021;14(9):893. DOI: 10.3390/ph14090893
- La Regina G., Bai R., Coluccia A. et al. New pyrrole derivatives with potent tubulin polymerization inhibiting activity as anticancer agents including hedgehog-dependent cancer. *J Med Chem* 2014;57:6531–52. DOI: 10.1021/jm500561a
- Jadala C., Prasad B., Prasanthi A.V.G. et al. Transition metal-free one-pot synthesis of substituted pyrroles by employing aza-Wittig reaction. *RSC Adv* 2019;9:30659–65. DOI: 10.1039/C9RA06778G
- Tang S., Zhou Z., Jiang Z. et al. Indole-based tubulin inhibitors: binding modes and sars investigations. *Molecules* 2022;27(5):1587. DOI: 10.3390/molecules27051587
- Romagnoli R., Oliva P., Salvador M.K. et al. A facile synthesis of diaryl pyrroles led to the discovery of potent colchicine site antimitotic agents. *Eur J Med Chem* 2021;214:113229. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113229
- Sun J., Chen L., Liu C. et al. Synthesis and biological evaluations of 1,2-diaryl pyrroles as analogues of combretastatin A-4. *Chem Biol Drug Des* 2015;86(6):1541–7. DOI: 10.1111/cbdd.12617
- Ma Z., Ma Z., Zhang D. Synthesis of multi-substituted pyrrole derivatives through [3+2] cycloaddition with tosylmethyl isocyanides (TosMICs) and electron-deficient compounds. *Molecules* 2018;23(10):2666. DOI: 10.3390/molecules23102666
- Mowery P., Mejia F.B., Franceschi C.L. et al. Synthesis and evaluation of the anti-proliferative activity of diaryl-3-pyrroline-2-ones and fused analogs. *Bioorganic Med Chem Lett* 2017;27(2):191–5. DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.11.076
- Boichuk S., Galembikova A., Syuzov K. et al. The design, synthesis, and biological activities of pyrrole-based carboxamides: the novel tubulin inhibitors targeting the colchicine-binding site. *Molecules* 2021;26(19):5780. DOI: 10.3390/molecules26195780
- Findeisen P., Mühlhausen S., Dempewolf S. et al. Six subgroups and extensive recent duplications characterize the evolution of the eukaryotic tubulin protein family. *Genome Biol Evol* 2014;6(9):2274–88. DOI: 10.1093/gbe/evu187
- Avila J. Microtubule functions. *Life Sci* 1992;50(5):327–34. DOI: 10.1016/0024-3205(92)90433-P
- Vukušić K., Buđa R., Tolić I.M. Force-generating mechanisms of anaphase in human cells. *J Cell Sci* 2019;132(18):jcs231985. DOI: 10.1242/jcs.231985
- de Forges H., Bouissou A., Perez F. Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. *Int J Biochem Cell Biol* 2012;44(2):266–74. DOI: 10.1016/j.biocel.2011.11.009
- Bonifacino J.S., Neeffes J. Moving and positioning the endolysosomal system. *Curr Opin Cell Biol* 2017;47:266–74. DOI: 10.1016/jceb.2017.01.008
- Wood K.W., Cornwell W.D., Jackson J.R. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(4):370–7. DOI: 10.1016/s1471-4892(01)00064-9
- von Hoff D.D. The taxoids: Same roots, different drugs. *Semin Oncol* 1997;24(13):S13-3–10.
- Bollag D.M., McQueney P.A., Zhu J. et al. Epothilones, a new class of microtubule-stabilizing agents with a taxol-like mechanism of action. *Cancer Res* 1995;55(11):2325–33.
- Gigant B., Wang C., Ravelli R.B.G. et al. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* 2005;435(7041):519–22. DOI: 10.1038/nature03566
- Hastie S.B. Interactions of colchicine with tubulin. *Pharmacol Ther* 1991;51(3):377–401. DOI: 10.1016/0163-7258(91)90067-V
- Mooberry S.L., Tien G., Hernandez A.H. et al. Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Res* 1999;59(3):653–60.
- Hamel E. Natural products which interact with tubulin in the vinca domain: Maytansine, rhizoxin, phomopsin a, dolastatins 10 and 15 and halichondrin B. *Pharmacol Ther* 1992;55(1):31–51. DOI: 10.1016/0163-7258(92)90028-X
- Jordan M.A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Cancer* 2004;4(4):253–65. DOI: 10.1038/nrc1317
- Stanton R.A., Gernert K.M., Nettles J.H. et al. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective. *Med Res Rev* 2011;31(3):443–81. DOI: 10.1002/med.20242
- Ravelli R.B., Gigant G., Curmi B. et al. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature* 2004;428(6979):198–202. DOI: 10.1038/nature02393
- Yang J., Wang Y., Wang T. et al. Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of α -tubulin to destabilize microtubule. *Nat Commun* 2016;7:12103. DOI: 10.1038/ncomms12103
- Prota A.E., Setter J., Waight A.B. et al. Pironetin binds covalently to α Cys316 and perturbs a major loop and helix of α -tubulin to inhibit microtubule formation. *J Mol Biol* 2016;428(15):2981–8. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.06.023

33. Steinmetz M.O., Prota A.E. Microtubule-targeting agents: strategies to hijack the cytoskeleton. *Trends Cell Biol* 2018;28(10):776–92. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.05.001
34. Fanale D., Bronte G., Passiglia F. et al. Stabilizing *versus* destabilizing the microtubules: A double-edge sword for an effective cancer treatment option? *Anal Cell Pathol (Amst)* 2015;2015:690916. DOI: 10.1155/2015/690916
35. West L.M., Northcote P.T., Battershill C.N., Peloruside A. A potent cytotoxic macrolide isolated from the New Zealand marine sponge *Mycale* sp. *J Org Chem* 2000;65(2):445–9. DOI: 10.1021/jo991296y
36. Prota A.E., Bargsten K., Northcote P.T. et al. Structural basis of microtubule stabilization by laulimalide and peloruside A. *Angew Chem Int Ed Engl* 2014;53(6):1621–5. DOI: 10.1002/anie.201307749.
37. Chaplin D.J., Hill S.A. The development of combretastatin A4 phosphate as a vascular targeting agent. *Int J Radiat Oncol* 2002;54(5):1491–6. DOI: 10.1016/S0360-3016(02)03924-X
38. Siemann D.W., Shi W. Dual targeting of tumor vasculature: combining Avastin and vascular disrupting agents (CA4P or OXi4503). *Anticancer Res* 2008;28(4 B):2027–31.
39. Lindamulage I.K., Vu H.-Y., Karthikeyan C. et al. Novel quinolone chalcones targeting colchicine-binding pocket kill multidrug-resistant cancer cells by inhibiting tubulin activity and MRP1 function. *Sci Rep* 2017;7(1):10298. DOI: 10.1038/s41598-017-10972-0
40. Gupta S., Banerjee M., Poddar A. et al. Biphasic kinetics of the colchicine-tubulin interaction: role of amino acids surrounding the A ring of bound colchicine molecule. *Biochemistry* 2005;44(30):10181–8. DOI: 10.1021/bi0505991
41. McLoughlin E.C., O'Boyle N.M. Colchicine-binding site inhibitors from chemistry to clinic: a review. *Pharmaceuticals* 2020;13(1):8. DOI: 10.3390/ph13010008
42. Arnst K.E., Banerjee S., Chen H. et al. Current advances of tubulin inhibitors as dual acting small molecules for cancer therapy. *Med Res Rev* 2019;39(4):1398–426. DOI: 10.1002/med.21568
43. Зыкова С.С., Бойчук С.В., Галембикова А.Р. и др. 3-гидрокси-1,5-диарил-4-пивалоил-2,5-дигидро-2-пирролоны нарушают процессы митоза и индуцируют гибель опухолевых клеток *in vitro*. *Цитология* 2014;56:439–42. Zykova S.S., Boychuk S.V., Galimbekova A.R. et al. 3-hydroxy-1,5-diaryl-4-pivaloyl-2,5-dihydro-2-pyrrolone disrupt the processes of mitosis and induce the death of tumor cells *in vitro*. *Citologiya = Cytology* 2014;56:439–42. (In Russ.).
44. Boichuk S., Galembikova A., Zykova S. 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;27(7):620–34. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000372
45. Boichuk S., Galembikova A., Dunaev P. et al. Ethyl-2-amino-pyrrole-3-carboxylates are active against imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumors *in vitro* and *in vivo*. *Anti-Cancer Drugs* 2019;30(5):475–84. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000753
46. Boichuk S., Bikinieva F., Mustafin I. et al. 2-Amino-pyrrole-carboxylate attenuates homology-mediated DNA repair and sensitizes cancer cells to doxorubicin. *Biochemistry (Mosc)* 2022;87(5):391–9. DOI: 10.1134/S0006297922050017
47. Boichuk S., Syuzov K., Bikinieva F. et al. Computational-based discovery of the anti-cancer activities of pyrrole-based compounds targeting the colchicine-binding site of tubulin. *Molecules* 2022;27(9):2873. DOI: 10.3390/molecules27092873
48. Boichuk S., Galembikova A., Bikinieva F. et al. 2-APCAs, the novel microtubule targeting agents active against distinct cancer cell lines. *Molecules* 2021;26(3):616. DOI: 10.3390/molecules26030616
49. Галембикова А.Р., Дунаев П.Д., Бикиниева Ф.Ф. и др. Механизмы цитотоксической активности пиррол-карбоксамидов в отношении опухолевых клеточных сублиний с множественной лекарственной устойчивостью. *Успехи молекулярной онкологии* 2023;10(3):59–71. DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-59-71
50. Carta D., Bortolozzi R., Sturlese M. et al. Synthesis, structure-activity relationships and biological evaluation of 7-phenyl-pyrroloquinolinone 3-amide derivatives as potent antimetabolic agents. *Eur J Med Chem* 2017;127:643–60. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.10.026
51. Brindisi M., Olivieri C., Alfano G. et al. Structure-activity relationships, biological evaluation and structural studies of novel pyrrolonaphthoxazepines as antitumor agents. *Eur J Med Chem* 2019;162:290–320. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.11.004
52. Zykova S.S., Galembikova A.R., Ramazanov B.R. et al. Synthesis and cytotoxic activity of ethyl 2-amino-1-benzamido-4-oxo-5-(2-oxo-2-arylethylidene)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxylates. *Pharm Chem J* 2016;49(12):817–20. DOI: 10.1007/s11094-016-1378-1
53. Zykova S.S., Igidov N.M., Zakhmatov A.V. et al. Synthesis and biological activity of 2-amino-1-aryl-5-(3,3-dimethyl-2-oxobutylidene)-4-oxo-n-(thiazol-5-yl)-4,5-dihydro-1H-pyrrole-3-carboxamides. *Pharm Chem J* 2018;52(3):198–204.
54. Zykova S.S., Kizimova I.A., Syutkina A.I. et al. Synthesis and cytostatic activity of (e)-ethyl-2-amino-5-(3,3-dimethyl-4-oxobutylidene)-4-oxo-1-(2-phenylaminobenzamido)-4,5-dihydro-1H-pyrrol-3-carboxylate. *Pharm Chem J* 2020;53:895–8. DOI: 10.1007/s11094-020-02096-z
55. Boichuk S., Galembikova A., Sitenkov A. et al. Establishment and characterization of a triple negative basal-like breast cancer cell line with multi-drug resistance. *Oncol Lett* 2017;14(4):5039–45. DOI: 10.3892/ol.2017.6795
56. Boichuk S., Bikinieva F., Valeeva E. et al. Establishment and characterization of multi-drug resistant p53-negative osteosarcoma SaOS-2 subline. *Diagnostics (Basel)* 2023;13(16):2646. DOI: 10.3390/diagnostics13162646
57. Хуснутдинов Р.Р., Галембикова А.Р., Бойчук С.В. Получение клона клеток гастроинтестинальной стромальной опухоли с признаками множественной лекарственной устойчивости и оценка его свойств. *Современные технологии в медицине* 2016;8(4):36–41. DOI: 10.17691/stm2016.8.4.05
58. Taguchi T., Sonobe H., Toyonaga S. et al. Conventional and molecular cytogenetic characterization of a new human cell line, GIST-T1, established from gastrointestinal stromal tumor. *Lab Invest* 2002;82(5):663–5. DOI: 10.1038/labinvest.3780461
59. Wittmann C., Sivchenko A.S., Bacher F. et al. Inhibition of microtubule dynamics in cancer cells by indole-modified latonduine derivatives and their metal complexes. *Inorg Chem* 2022;61(3):1456–70. DOI: 10.1021/acs.inorgchem.1c03154
60. Boichuk S., Dunaev P., Mustafin I. et al. Infigratinib (BGJ 398), a pan-FGFR inhibitor, targets P-glycoprotein and increases chemotherapeutic-induced mortality of multidrug-resistant tumor cells. *Biomedicines* 2022;10(3):601. DOI: 10.3390/biomedicines10030601
61. Marupudi N.I., Han J.E., Li K.W. et al. Paclitaxel: a review of adverse toxicities and novel delivery strategies. *Expert Opin Drug Saf* 2007;6(5):609–21. DOI: 10.1517/14740338.6.5.609
62. Young J.A., Howell S.B., Green M.R. Pharmacokinetics and toxicity of 5-day continuous infusion of vinblastine. *Cancer*

- Chemother Pharmacol 1984;12(1):43–5.
DOI: 10.1007/BF00255908
63. Mora E., Smith E.M., Donohoe C. et al. Vincristine-induced peripheral neuropathy in pediatric cancer patients. *Am J Cancer Res* 2016;6(11):2416–30.
 64. Abu Samaan T.M., Samec M., Liskova A. et al. Paclitaxel's mechanistic and clinical effects on breast cancer. *Biomolecules*. 2019;9(12):789. DOI: 10.3390/biom9120789
 65. Hashemi M., Zandieh M.A., Talebi Y. et al. Paclitaxel and docetaxel resistance in prostate cancer: molecular mechanisms and possible therapeutic strategies. *Biomed Pharmacother* 2023;160:114392. DOI: 10.1016/j.biopha.2023.114392
 66. Zhang Y., Yang S.H., Guo X.L. New insights into Vinca alkaloids resistance mechanism and circumvention in lung cancer. *Biomed Pharmacother* 2017;96:659–66. DOI: 10.1016/j.biopha.2017.10.041
 67. Toledo B., González-Titos A., Hernández-Camarero P. et al. A brief review on chemoresistance; targeting cancer stem cells as an alternative approach. *Int J Mol Sci* 2023;24(5):4487. DOI: 10.3390/ijms24054487
 68. Distefano M., Scambia G., Ferlini C. et al. Antitumor activity of paclitaxel (taxol) analogues on MDR-positive human cancer cells. *Anticancer Drug Des* 1998;13(5):489–99.
 69. Liu J., Yang X., Gao S. et al. DDX11-AS1 modulates DNA damage repair to enhance paclitaxel resistance of lung adenocarcinoma cells. *Pharmacogenomics* 2023;24(3):163–72. DOI: 10.2217/pgs-2022-0121
 70. Kavallaris M., Kuo D.Y., Burkhart C.A. et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isotypes. *J Clin Invest* 1997;100(5):1282–93. DOI: 10.1172/JCI119642
 71. Poruchynsky M.S., Giannakakou P., Ward Y. et al. Accompanying protein alterations in malignant cells with a microtubule-polymerizing drug-resistance phenotype and a primary resistance mechanism. *Biochem Pharmacol* 2001;62(11):1469–80. DOI: 10.1016/s0006-2952(01)00804-8
 72. Houghton J.A., Houghton P.J., Hazelton B.J. et al. *In situ* selection of a human rhabdomyosarcoma resistant to vincristine with altered beta-tubulins. *Cancer Res* 1985;45(6):2706–12.
 73. Stengel C., Newman S.P., Leese M.P. et al. Class III β -tubulin expression and *in vitro* resistance to microtubule targeting agents. *Br J Cancer* 2009;102:316–24. DOI: 10.1038/sj.bjc.6605489
 74. Rodríguez-Antona C. Pharmacogenomics of paclitaxel. *Pharmacogenomics* 2010;11(5):621–3. DOI: 10.2217/pgs.10.32
 75. Ezrahi S., Aserin A., Garti N. Basic principles of drug delivery systems – the case of paclitaxel. *Adv Colloid Interface Sci* 2019;263:95–130. DOI: 10.1016/j.cis.2018.11.004
 76. Tuy H.D., Shiomi H., Mukaisho K.I. et al. ABCG2 expression in colorectal adenocarcinomas may predict resistance to irinotecan. *Oncol Lett* 2016;12(4):2752–60. DOI: 10.3892/ol.2016.4937
 77. Mooberry S.L., Weiderhold K.N., Dakshanamurthy S. et al. Identification and characterization of a new tubulin-binding tetrasubstituted brominated pyrrole. *Mol Pharmacol* 2007;72(1):132–40. DOI: 10.1124/mol.107.034876

Благодарность. Авторы выражают благодарность А.М. Аухадиевой за помощь в проведении вестерн-блоттинга.

Acknowledgment. The authors acknowledge A.M. Aukhadieva for the help in conducting western blotting.

Вклад авторов

А.Р. Галембикова, С.В. Бойчук: разработка концепции и дизайна исследования, проведение исследования, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, редактирование;

П.Д. Дунаев: проведение иммунофлуоресцентного анализа, анализ и интерпретация данных;

Т.В. Ивойлова: проведение проточной цитометрии, MTS-теста, анализ и интерпретация данных;

А.И. Гилязова, А.Э. Галяутдинова: проведение исследований на лабораторных животных, анализ и интерпретация данных;

Е.Г. Михеева: гистологическое и иммуногистохимическое исследование синотрансплантатов, анализ и интерпретация данных;

С.С. Зыкова, Н.М. Игидов: синтез пирролсодержащих гетероциклических соединений;

П.Б. Копнин: вестерн-блоттинг, научное консультирование.

Authors' contributions

A.R. Galembikova, S.V. Boichuk: development of the concept and design of the study, research, analysis and interpretation of data, article writing, editing;

P.D. Dunaev: immunofluorescence analysis, data analysis and interpretation;

T.V. Ivoilova: flow cytometry, MTS-test, analysis and interpretation of data;

A.I. Gilyazova, A.E. Galyautdinova: conducting research on laboratory animals, analysis and interpretation of data;

E.G. Mikheeva: histological and immunohistochemical examination of synografts, analysis and interpretation of data;

S.S. Zyкова, N.M. Igidov: synthesis of pyrrole-containing heterocyclic compounds;

P. B. Kopnin: western-blotting, scientific consulting.

ORCID авторов / ORCID of authors

А.Р. Галембикова / A.R. Galembikova: <https://orcid.org/0000-0002-0293-2974>

П.Д. Дунаев / P.D. Dunaev: <https://orcid.org/0000-0002-5449-4435>

Т.В. Ивойлова / T.V. Ivoilova: <https://orcid.org/0009-0003-4348-9141>

А.И. Гилязова / A.I. Gilyazova: <https://orcid.org/0009-0003-0680-4595>

А.Э. Галяутдинова / A.E. Galyautdinova: <https://orcid.org/0009-0003-0885-5994>

Е.Г. Михеева / E.G. Mikheeva: <https://orcid.org/0000-0001-8213-427X>

С.С. Зыкова / S.S. Zyкова: <https://orcid.org/0000-0002-7395-4951>

Н.М. Игидов / N.M. Igidov: <https://orcid.org/0000-0003-0976-9951>

П.Б. Копнин / P.B. Kopnin: <https://orcid.org/0000-0002-2078-4274>

С.В. Бойчук / S.V. Boichuk: <https://orcid.org/0000-0003-2415-1084>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The author declares no conflict of interest.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-15-00001) и проведено в рамках Программы стратегического академического лидерства ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет» («Приоритет-2030»).
Funding. The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (RSF) (grant No. 20-15-00001) and was performed as a part of Russia Strategic Academic Leadership Program (“Priority-2030”) of Kazan (Volga Region) Federal University.

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России (протокол № 10 от 21.11.2023).

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The protocol of the study was approved by the committee on biomedical ethics of the Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia (protocol No. 10 dated 21.11.2023).