

DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56



Производные 3-гидроксихиназолина, аналоги эрастина, индуцируют ферроптоз в клетках карциномы молочной железы

Л.М. Борисова, В.Н. Осипов, И.С. Голубева, М.П. Киселева, Д.А. Хоченков, А.А. Вартамян

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24

Контакты: Лариса Михайловна Борисова larib@inbox.ru

Введение. Программы раннего выявления опухоли заметно повысили выживаемость больных раком молочной железы, однако итоги лекарственной терапии данной патологии не всегда эффективны. Обнаруженная недавно железозависимая гибель клетки – ферроптоз – позволяет надеяться на продление ремиссии заболевания.

Цель исследования – изучение индукции ферроптоза в клетках рака молочной железы MCF7 производными 3-гидроксихиназолина, синтезированными в Научно-исследовательском институте экспериментальной диагностики и терапии опухолей Национального медицинского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, и оценка его противоопухолевой активности на перевиваемой карциноме молочной железы Ca-755.

Материалы и методы. В экспериментах *in vitro* использовали 2D-культивирование клеток, фазово-контрастную и флуоресцентную микроскопию. Исследования *in vivo* проведены на модели экспериментального роста карциномы молочной железы у самок гибридов иммунокомпетентных мышей F1 (C57Bl/6 × DBA/2).

Результаты. В работе были исследованы 5 производных 3-гидроксихиназолина – аналогов эрастина. Чистота всех соединений составила более 95 %. Гибель опухолевых клеток по типу ферроптоза идентифицировали по уровню перекисного окисления липидов при IC_{50} : 1/3 и 1/5. Уровень перекисного окисления липидов в клетках MCF7, индуцируемый соединением 3, был сравним с активностью эрастина как при 1/3, так и при 1/5 IC_{50} . Активность остальных 4 производных 3-гидроксихиназолина составляла 50–70 % активности эрастина. В экспериментах *in vivo* на карциноме молочной железы Ca-755 при использовании соединения 3 в дозе 30 мг/кг его противоопухолевый эффект был выше, чем у эрастина, применяемого в той же дозе.

Заключение. Полученные предварительные результаты позволяют предположить, что соединение 3 может рассматриваться в качестве перспективного противоопухолевого средства для лечения рака молочной железы.

Ключевые слова: производные 3-гидроксихиназолина, ферроптоз, рак молочной железы, противоопухолевая активность

Для цитирования: Борисова Л.М., Осипов В.Н., Голубева И.С. и др. Производные 3-гидроксихиназолина, аналоги эрастина, индуцируют ферроптоз в клетках карциномы молочной железы. Успехи молекулярной онкологии 2022;9(1): 48–56. DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56.

3-Hydroxyquinazoline derivatives, analogues of erastin, induced ferroptosis in breast cancer cells

L.M. Borisova, V.N. Osipov, I.S. Golubeva, M.P. Kiseleva, A.A. Vartanyan

N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoe Shosse, Moscow 115478, Russia

Contacts: Larisa Mikhailovna Borisova larib@inbox.ru

Introduction. Early malignant tumor detection programs have significantly increased the survival rate of breast cancer patients but the results of drug therapy for this pathology are not always highly effective. Recently discovered iron-dependent cell death, ferroptosis, makes it a promising therapeutic target to reduce the recurrence rates.

Objective – to study the induction of ferroptosis in breast cancer cells MCF-7 by quinazoline derivatives synthesized at the Research Institute of Experimental Diagnostics and Therapy of Tumors of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia and to evaluate its antitumor activity on transplanted breast carcinoma Ca-755.

Materials and methods. Derivatives of 3-hydroxyquinazoline were obtained by chemical synthesis and have a purity of at least 95 %. In this study 2D cultivation of MCF7 cells, phase-contrast and fluorescence microscopy, and a model

of experimental growth of breast carcinoma Ca-755 in female hybrids of immunocompetent mice F1 (C57Bl/6 × DBA/2) were used.

Results. Five derivatives of 3-hydroxyquinazoline, analogues of erastine, were studied in this work. The ferroptotic cell death was identified by the level of lipid peroxidation at the concentrations of 1/3 and 1/5 IC_{50} . The level of lipid peroxidation induced by compound 3 was comparable with the activity of erastin in MCF7 cells at both 1/3 and 1/5 of IC_{50} , the activity of the other four quinazoline derivatives was 50–70 % of the activity of erastin. In *in vivo* experiments at a dose of 30 mg/kg the antitumor efficacy of the compound 3 was higher than that of erastin at the same dose.

Conclusion. The data obtained suggest that quinazoline derivative 3 might be considered as a promising antitumor agent to treat breast cancer.

Key words: 3-hydroxyquinazoline derivatives, ferroptosis, breast cancer, antitumor activity

For citation: Borisova L.M., Osipov V.N., Golubeva I.S. et al. 3-Hydroxyquinazoline derivatives, analogues of erastin, induced ferroptosis in breast cancer cells. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii* = *Advances in Molecular Oncology* 2022;9(1): 48–56. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2022-9-1-48-56.

ВВЕДЕНИЕ

Заболеваемость раком молочной железы (РМЖ) растет не только в России, но и во всем мире. Программы раннего выявления этой опухоли в сочетании с различными методами лечения заметно повысили продолжительность жизни больных с данной патологией [1]. Несмотря на существенное улучшение результатов химиотерапии в последние годы, в большинстве случаев лечение РМЖ сопровождается развитием лекарственной резистентности: опухолевые клетки приобретают устойчивость к апоптозу [2]. Достигнуть реактивации апоптоза в резистентных к терапии опухолевых клетках практически нереально. По всей видимости, нужно искать возможности вовлечения других типов программируемой гибели клетки в их элиминирование. В последние годы появляется все больше сообщений, в которых указывается, что обнаруженный недавно новый тип регулируемой гибели клетки – ферроптоз [3] – способен вызывать гибель высокозлокачественных клеток, уцелевших после химиотерапии [4].

Ферроптоз сегодня рассматривается как железо-зависимая регулируемая гибель клетки, при которой в ней накапливаются продукты перекисного окисления фосфолипидов клеточных мембран [5]. Этот процесс происходит как в результате запуска реакции Фентона, вызывающего в присутствии железа окисление фосфолипидов, так и вследствие отказа механизмов антиоксидантной защиты клетки. Система антиоксидантной защиты включает глутатионпероксидазу 4 (GPX4), которая восстанавливает потенциально опасные гидроперекиси липидов в нетоксичные спирты, и глутатион (субстрат GPX4) – основной внутриклеточный антиоксидант [6, 7].

Недавно было показано, что клетки РМЖ репрограммируют метаболизм железа, активируя экспрессию рецептора трансферрина (CD71) и подавляя экспрессию ферритина, депонирующего железо в клетки, а также ферропортина-1 (FPN) – транспортного белка, выводящего железо из клетки [8, 9]. Ферритин на сегодняшний день рассматривается как маркер злокачественного поражения молочной железы [10]. Согласно последним данным, при повреждении клетки

по типу ферроптоза из нее высвобождаются так называемые молекулярные фрагменты, ассоциированные с повреждениями (damage-associated molecular patterns, DAMP), которые во внеклеточной среде выступают сильными провоспалительными факторами [11]. К их числу принадлежат ДНК, аденозинтрифосфат (АТФ), РНК, белки теплового шока, жирные кислоты, лейкотриены, простагландины, активирующие адаптивную иммунную систему и привлекающие к опухоли и метастазам иммунокомпетентные клетки.

Еще одним аргументом важности поиска соединений, индуцирующих ферроптоз в клетках РМЖ, стали опубликованные недавно данные о способности индукторов ферроптоза вызывать гибель клеток тройного негативного РМЖ [12]. Из-за отсутствия эффективной эндокринной и таргетной анти-HER2 (human epidermal growth factor receptor 2, рецептор эпидермального фактора роста, тип 2) терапии для пациентов с тройным негативным РМЖ характерны высокая частота развития рецидивов и плохой прогноз.

Ранее нами было показано, что производные 3-гидроксихиназолина обладают высокой цитотоксической активностью [13]: соединение OVN-002 – аналог эрастина – индуцировало ферроптоз в метастатических клетках меланомы [14], а серия производных 3-гидроксихиназолина – ферроптоз в клетках рака толстой кишки.

Цель исследования – изучение способности новых производных 3-гидроксихиназолина – аналогов эрастина – индуцировать ферроптоз в клетках РМЖ MCF7 и оценка их противоопухолевой активности на карциноме молочной железы Ca-755 мышей.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы

C11-BODIPY получен от Thermo Fisher Scientific (США), эрастин был приобретен у Sigma-Aldrich (США).

Синтез производных хиназолина

Производные 3-гидроксихиназолина были синтезированы в Научно-исследовательском институте

экспериментальной диагностики и терапии опухолей Национального медицинского исследовательского центра онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

Культивирование клеток

В работе были использованы клетки РМЖ MCF7 (ATCCR НТВ-22™). Клетки культивировали в полной среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco, США), содержащей 10 % телячью эмбриональную сыворотку (HyClone, США), 2,2 ммоль/мл глутамина («ПанЭко», Россия) и 0,01 мг/мл гентамицина («ПанЭко», Россия). В экспериментах использовали клетки 70–75 % конфлюэнтности.

Исследование влияния производных *in vitro* 3-гидроксихиназолина на индукцию ферроптоза

Клетки РМЖ MCF7 растили в полной среде DMEM в 24-луночном планшете. Через 24 ч роста клеток в CO₂-инкубаторе при 37 °С добавляли 1/3 и 1/5 IC₅₀ эрастина или 1/3 и 1/5 IC₅₀ исследуемых соединений и инкубировали в течение 5 ч. В качестве контроля использовали клетки, растущие в полной среде DMEM без индуктора ферроптоза, и клетки, инкубированные с эквимольным количеством ДМСО (диметилсульфоксида). Затем используемую среду заменяли свежей средой, не содержащей сыворотки, и добавляли 5 мкМ C11-BODIPY – флуорофор, который, переходя из тиоэфира в сульфоксид, меняет флуоресцентные характеристики (убывает поглощение красного цвета и нарастает поглощение зеленого). После инкубирования с флуоресцентной меткой в течение 30 мин клетки 3 раза промывали фосфатным буфером. Интенсивность флуоресценции определяли с помощью флуоресцентного микроскопа IN Cell Analyzer (GE Healthcare, США) при 510–550 нм.

Исследования *in vivo*

Животные. Исследования *in vivo* выполняли на самках мышей – гибридов F1 (C57Bl/6 × DBA/2) массой 20–22 г. Животных содержали в виварии при естественном освещении, на стандартном рационе питания и при свободном доступе к воде [15].

Опухолевая модель. Первичную оценку противоопухолевой активности исследуемого соединения (индуктора ферроптоза) проводили на перевиваемой карциноме молочной железы Ca-755 мышей по ранее описанной методике с незначительными модификациями [16–17]. Штамм поддерживали подкожными перевивками каждые 12 дней на самках мышей линии C57Bl/6.

Схема опыта. Группы животных формировали с учетом получения статистически достоверных результатов. Контрольная группа состояла из 10 мышей, каждая из 4 опытных групп – из 6. Мышам 1-й и 2-й опытных групп вводили соединение 3 в дозах 30 мг/кг

и 50 мг/кг соответственно, мышам 3-й и 4-й опытных групп – эрастин в дозах 30 мг/кг и 50 мг/кг соответственно.

Схема введения. Действие исследуемого соединения 3 сравнивали с эффектом эрастина. Эрастин и соединение 3 вводили мышам внутрибрюшинно ежедневно в течение 5 дней с интервалом в 24 ч. Начало времени введения – через 48 ч после трансплантации карциномы молочной железы Ca-755.

Критерии оценки противоопухолевого эффекта

Противоопухолевый эффект соединений оценивали по торможению роста опухоли (ТРО) и увеличению продолжительности жизни (УПЖ) леченых мышей по сравнению с контрольными животными [17]. Наблюдение за мышами проводили до их гибели. Минимальные критерии активности – ТРО ≥ 50 %, УПЖ ≥ 25 %. Эффективными считали дозы, вызывающие ТРО ≥ 70 % продолжительностью не менее 7 дней после окончания лечения [17].

Полученные данные обрабатывали статистически с использованием компьютерной программы Statistica 6.0. Различия между сравниваемыми группами считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Синтез производных 3-гидроксихиназолина

Производные 3-гидроксихиназолина (замещенные 3-гидрокси-2-(3,5-диметил-1H-пиразол-1-ил)-хиназолин-4(3H)-оны) (рис. 1), в которых к атому кислорода в 3-м положении присоединены различные бензиловые эфиры уксусной кислоты, были синтезированы по ранее описанной методике [13, 14]. Полученные соединения охарактеризованы данными спектров спектроскопии ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ¹H и масс-спектрометрии. Чистота всех соединений по результатам высокоэффективной жидкостной хроматографии составила более 95 %. Характеристика синтезированных соединений 1–5 представлена в табл. 1. и на рис. 1. Подробную информацию об этих соединениях можно найти в дополнительном материале к статье в приложении к журналу «Успехи молекулярной онкологии»: <https://umo.abvpress.ru/jour/issue/archive>.

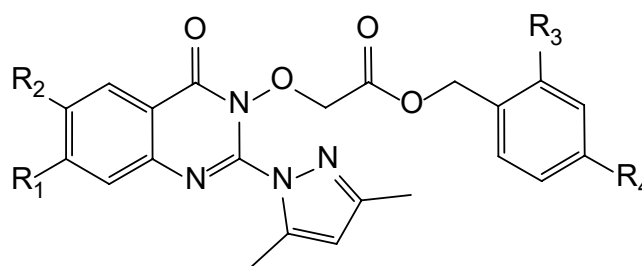


Рис. 1. Общая структура производных 3-гидроксихиназолина
Fig. 1. General structure of 3-hydroxyquinazolin derivatives

Таблица 1. Характеристика синтезированных соединений 1–5

Table 1. Characteristics of synthesized compounds 1–5

Соединение Compound	Заместители				Молекулярная масса Molecular weight	Масса молекулярного иона в масс-спектре (вид иона) The weight of a molecular ion in the mass spectrum (type of ion)	Спектр ЯМР ¹ H NMR ¹ H spectrum
	R1	R2	R3	R4			
1	OMe	OMe	H	H	464,48	465,2 (M + H) ⁺	7,49 (с, 1H), 7,30–7,44 (м, 5H), 7,20 (с, 1H), 6,13 (с, 1H), 5,14 (д, <i>J</i> = 16,9 Гц, 4H), 3,92 (д, <i>J</i> = 1,2 Гц, 6H), 2,39 (с, 3H), 2,09 (с, 3H)
2	OMe	OMe	F	H	482,47	483,2 (M + H) ⁺	7,37–7,51 (м, 3H), 7,16–7,30 (м, 3H), 6,11 (с, 1H), 5,22 (с, 2H), 5,11 (с, 2H), 3,88–3,95 (м, 7H), 2,39 (с, 3H), 2,09 (с, 3H)
3	H	Br	H	H	483,33	483,2 (M + H) ⁺	8,26 (д, <i>J</i> = 2,3 Гц, 1H), 8,04 (дд, <i>J</i> = 8,7; 2,4 Гц, 1H), 7,65 (д, <i>J</i> = 8,7 Гц, 1H), 7,34–7,49 (м, 4H), 6,16 (с, 1H), 5,16 (д, <i>J</i> = 6,9 Гц, 4H), 2,41 (с, 3H), 2,09 (с, 3H)
4	H	H	H	OMe	434,46	435,2 (M + H) ⁺	8,14–8,23 (м, 1H), 7,90 (ддд, <i>J</i> = 8,5; 7,2; 1,6, 1H), 7,71 (дт, <i>J</i> = 8,1; 0,9 Гц, 1H), 7,62 (ддд, <i>J</i> = 8,2; 7,2; 1,2 Гц, 1H), 7,25–7,37 (м, 2H), 6,87–6,98 (м, 2H), 6,15 (д, <i>J</i> = 1,1 Гц, 1H), 5,10 (д, <i>J</i> = 1,4 Гц, 4H), 3,75 (с, 3H), 2,41 (д, <i>J</i> = 0,8 Гц, 3H), 2,10 (с, 3H)
5	H	Br	H	Cl	517,0	517,2 (M + H) ⁺ , 539,1 (M + Na) ⁺	8,26 (д, <i>J</i> = 2,3 Гц, 1H), 8,04 (дд, <i>J</i> = 8,7, 2,4 Гц, 1H), 7,65 (д, <i>J</i> = 8,7 Гц, 1H), 7,34–7,51 (м, 4H), 6,16 (с, 1H), 5,16 (д, <i>J</i> = 7,2 Гц, 4H), 2,38–2,44 (с, 3H), 2,09 (с, 3H)

Примечание. ЯМР – ядерный магнитный резонанс.
Note. NMR – nuclear magnetic resonance.

Исследование влияния соединений 1–5, производных 3-гидрохиназолина, на индукцию ферроптоза *in vitro*

Цитотоксичность соединений на клетках MCF7 изучали с помощью МТТ-теста. Антипролиферативную активность препаратов оценивали по величине IC₅₀. При инкубировании клеток MCF7 с соединениями в диапазоне концентраций от 1 до 100 мкМ в течение 24 ч наблюдалось ингибирование роста клеток на 30–80 %. Выбранное нами время инкубирования клеток с аналогами эрастина в течение 24 ч для определения IC₅₀ согласуется с литературными данными [6]. Значения IC₅₀ соединений представлены в табл. 2. Для верификации полученных результатов мы определяли также IC₅₀ для доксорубина (DOX). Наибольшей цитотоксической активностью обладало соединение 3.

Ранее нами было показано, что инкубирование клеток меланомы и рака толстой кишки с производными гидроксихиназолина – аналогами эрастина – в течение 24 ч при 37 °С не вызывает фрагментации ядра, что является итогом апоптоза, генетически программируемой клеточной гибели I типа. Также на гибель клеток, индуцированную производными гидроксихиназолина, не оказывало влияния присутствие

Таблица 2. Результаты определения цитотоксической активности производных 3-гидроксихиназолина, эрастина и доксорубина на клетках рака молочной железы MCF7

Table 2. Results of determination of cytotoxic activity of 3-hydroxyquinazoline derivatives, erastin and doxorubicin on breast cancer cells MCF7

Исследуемые образцы Tested samples	IC ₅₀ , мкМ IC ₅₀ , μM
Эрастин	40
Соединение 1	20
Соединение 2	24
Соединение 3	19
Соединение 4	48
Соединение 5	22
Доксорубин	2,1

50 мкМ панкаспазного ингибитора апоптоза zVAD-fmk или 20 мкМ ингибитора аутофагии хлорокина. Для исключения индукции других типов гибели клетки в MCF7-клетках соединениями 1–5 мы исследовали индукцию ими ферроптоза при 1/3 и 1/5 IC₅₀. В качестве контроля использовали эрастин также при

1/3 и 1/5 IC_{50} . О гибели клеток MCF7 по типу ферроптоза судили по интенсивности перекисного окисления липидов, которое фиксировали после инкубирования клеток с флуоресцентной меткой C11-BODIPY (581/591 нм). В контрольных экспериментах без добавления соединений уровень перекисного окисления липидов был незначительным (рис. 2, а).

Уровень перекисного окисления липидов, индуцированного 1/3 IC_{50} соединения 3, был сравним с уровнем перекисного окисления липидов, индуцированного 1/3 IC_{50} эрастина (рис. 2, б, в). Уровень перекисного окисления липидов, индуцированного остальными 4 соединениями при 1/3 IC_{50} , составил 50–70 % уровня перекисного окисления липидов, индуцированного 1/3 IC_{50} эрастина (рис. 2, г). В клетках, инкубированных с эквимоллярным количеством ДМСО, интенсивность флуоресценции была невысокой и равнялась значениям интенсивности флуоресценции

контрольных клеток. Уровень перекисного окисления липидов, индуцированного эрастином или соединениями 1–5 при 1/5 IC_{50} , менялся незначительно по сравнению с уровнем этого показателя при 1/3 IC_{50} . Интенсивность флуоресценции C11-BODIPY при 1/5 IC_{50} была также наибольшей для соединения 3 (см. рис. 2г). Чувствительность клеток РМЖ МСF7 к действию соединения 3 позволила инициировать исследование его противоопухолевой активности на модели перевиваемой карциномы молочной железы мышей.

Исследование влияния соединения 3 на индукцию ферроптоза *in vivo*

Ранее мы подобрали оптимальные условия растворения эрастина: ДМСО в сочетании с 0,05 М фосфатным буфером (рН 4,5) или 25 % раствором коллидона. Соединение 3 плохо растворялось в этой системе

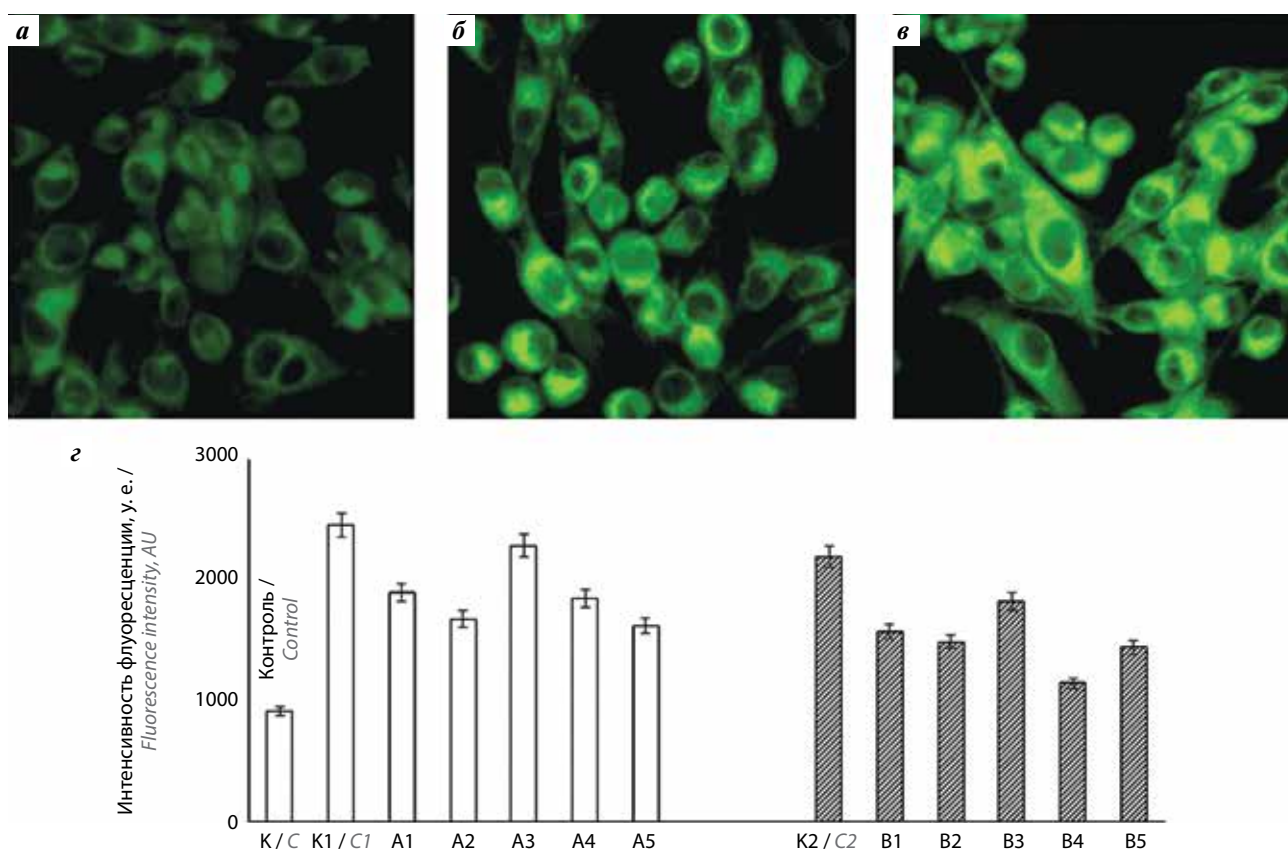


Рис. 2. Гибель клеток MCF7 по типу ферроптоза, индуцированная соединениями 1–5. Флуоресценция C11-BODIPY в клетках MCF7: а – контроль с 5 %-ным диметилсульфоксидом; б – инкубация клеток MCF7 с 1/3 IC_{50} соединения 3; в – инкубация клеток MCF7 с 1/5 IC_{50} эрастина; г – уровень перекисного окисления липидов, индуцированного соединениями 1–5 при 1/3 IC_{50} (A1–A5) и 1/5 IC_{50} (B1–B5). $\times 200$. $p < 0,05$ для всех опытных групп по сравнению с контролем. К – контроль (без добавления соединений или эрастина); K1 и K2 – перекисное окисление липидов, индуцированное 1/3 IC_{50} и 1/5 IC_{50} эрастина; A1 – 1/3 IC_{50} соединения 1; A2 – 1/3 IC_{50} соединения 2; A3 – 1/3 IC_{50} соединения 3; A4 – 1/3 IC_{50} соединения 4; A5 – 1/3 IC_{50} соединения 5; B1 – 1/5 IC_{50} соединения 1; B2 – 1/5 IC_{50} соединения 2; B3 – 1/5 IC_{50} соединения 3; B4 – 1/5 IC_{50} соединения 4; B5 – 1/5 IC_{50} соединения 5

Fig. 2. MCF7 cell death by ferroptosis type induced by compounds 1–5. Fluorescence of C11-BODIPY in MCF7 cells: а – control with 5 % dimethyl sulfoxide; б – growth of MCF7 cells with 1/3 IC_{50} of the 3 compound; в – growth of cells with 1/5 IC_{50} of erastin; г – the level of lipid peroxidation induced by compounds 1–5: 1/3 IC_{50} (A1–A5) and 1/5 IC_{50} (B1–B5). $\times 200$. $p < 0.05$ for all groups compared to control. C – control (without adding compounds or erastin); C1 and C2 – lipid peroxidation induced by 1/3 IC_{50} and 1/5 IC_{50} of erastin; A1 – 1/3 IC_{50} connection 1; A2 – 1/3 IC_{50} connection 2; A3 – 1/3 IC_{50} connection 3; A4 – 1/3 IC_{50} connection 4; A5 – 1/3 IC_{50} connection 5; B1 – 1/5 IC_{50} connection 1; B2 – 1/5 IC_{50} connection 2; B3 – 1/5 IC_{50} connection 3; B4 – 1/5 IC_{50} connection 4; B5 – 1/5 IC_{50} connection 5

Таблица 3. Сравнение противоопухолевой активности соединения 3 и эрастина (при его внутрибрюшинном введении) на Ca-755 у мышей

Table 3. Comparison of antitumor activity of 3 compound and erastin (with its intraperitoneal administration) on Ca-755 mice

Группа Group	Соединение, доза (мг/кг)/интервал (час) × число введений Compound, dose (mg/kg)/ interval (hour) × number of injections	Торможение роста опухоли, % Inhibition of tumor growth, %							Гибель от токсичности, n/n Death from toxicity, n/n
		1-й день после лечения 1 st day after treatment	4-й день после лечения 4 th day after treatment	8-й день после лечения 8 th day after treatment	12-й день после лечения 12 th day after treatment	16-й день после лечения 16 th day after treatment	20-й день после лечения 20 th day after treatment	24-й день после лечения 24 th day after treatment	
1	Соединение 3, 30/24 × 5 3 compound, 30/24 × 5	74*^	87*^	94*^	85*^	96*^	63*^	60*^	0/6
2	Соединение 3, 50/24 × 5 3 compound, 50/24 × 5	71*^	86*^	85*^	66*^	96*^	93*^	86*^	0/6
3	Эрастин, 30/24 × 5 Erastin, 30/24 × 5	62*^	60*^	81*^	71*^	74*^	78*^	76*^	0/6
4	Эрастин, 50/24 × 5 Erastin, 50/24 × 5	81*^	92*^	92*^	92*^	87*^	79*^	63*^	0/6

* $p < 0,05$; различия достоверны по отношению к контролю. ^ $p > 0,05$; различия недостоверны между 1-й и 3-й, 2-й и 4-й группами.

* $p < 0,05$; differences are significant in relation to control. ^ $p > 0,05$; differences are insignificant between groups 1 and 3, 2 and 4.

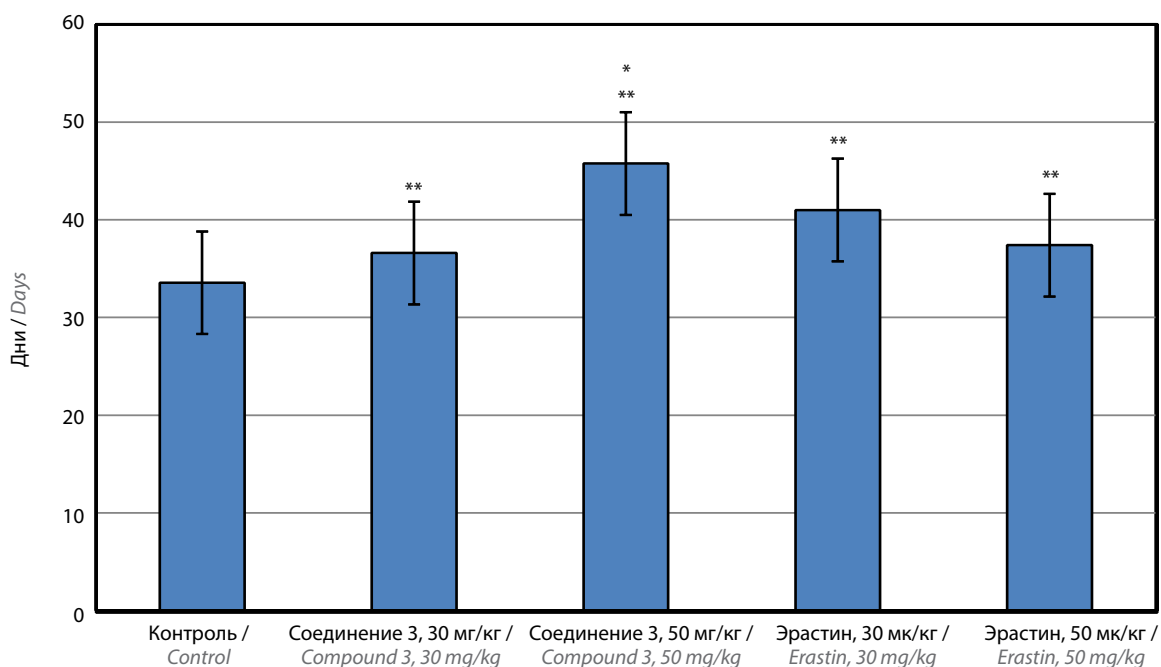


Рис. 3. Сравнение продолжительности жизни мышей с перевитой карциномой молочной железы Ca-755 в группе лечения соединением 3, эрастином и в группе контроля. * $p < 0,05$ по отношению к контролю. ** $p > 0,05$ между группами

Fig. 3. Comparison of the life expectancy of mice with transplanted breast carcinoma Ca-755 in the treatment group with compound 3, erastin and in the control group. * $p < 0,05$ versus control. ** $p > 0,05$ between groups

растворителей. Нам удалось повысить его растворимость следующим образом: субстанцию растворяли в ДМСО, далее добавляли кремофор, а затем воду для инъекций (до достижения необходимой конечной концентрации соединения 2,5 мг/мл и содержания ДМСО не более 10 %). В процессе растворения раствор подогревали на водяной бане до 60 °С для лучшей растворимости соединения. По этой же схеме растворяли и эрастин.

В дозе 30 мг/кг как соединение 3, так и эрастин оказали длительный высокий противоопухолевый эффект при карциноме молочной железы Ca-755 (табл. 3), но без значительного УПЖ животных, которая составила 9 и 22 % соответственно (рис. 3).

При лечении опухоли соединением 3 максимальный противоопухолевый эффект (ТРО 87–96 %; $p < 0,05$ по отношению к контролю) отмечался до 16-го дня наблюдения. Противоопухолевый эффект эрастина

при использовании той же дозы был недостоверно ниже в эти же сроки наблюдения: ТРО 64–74 % ($p < 0,05$ по отношению к контролю; $p > 0,05$ между группами). Далее до 24-го дня после окончания лечения эффект эрастина был недостоверно выше эффекта соединения 3: ТРО 76–78 и 60–63 % соответственно ($p < 0,05$ по отношению к контролю; $p > 0,05$ между 1-й и 3-й опытными группами) (см. табл. 3).

При увеличении дозы соединения 3 до 50 мг/кг высокий противоопухолевый эффект на уровне ТРО от 71–85 до 86–96 % отмечали в более продолжительный период: до 24-го дня после окончания лечения ($p > 0,05$ между 1-й и 2-й опытными группами).

В дозе 50 мг/кг противоопухолевая активность соединения 3 была недостоверно ниже активности эрастина в той же дозе: ТРО 71–85 и 81–92 % соответственно, с 1-го по 8-й день после окончания лечения ($p > 0,05$ между 2-й и 4-й опытными группами). Однако далее, с 16-го до 24-го дня наблюдения, активность соединения 3 превзошла активность эрастина: ТРО 86–96 и 63–87 % соответственно ($p < 0,05$ между 2-й и 4-й опытными группами).

Применение соединения 3 в дозе 50 мг/кг увеличивало продолжительность жизни животных на 36 % (см. рис. 3), что выше минимального критерия активности (УПЖ ≥ 25 %), тогда как эрастин не показал эффективности по этому критерию (УПЖ – 11 %) ($p < 0,05$ по отношению к контролю; $p > 0,05$ между всеми опытными группами).

ОБСУЖДЕНИЕ

Рак молочной железы встречается у женщин любого возраста после достижения половой зрелости. Программы раннего выявления этой опухоли заметно повысили выживаемость больных, однако итоги лекарственной терапии данной патологии не всегда эффективны. В большинстве случаев лечение РМЖ сопровождается развитием лекарственной резистентности, что переводит болезнь в терминальную, более агрессивную фазу роста [18]. Утрата программы клеточной гибели дает возможность опухолевой клетке сохранять жизнеспособность в присутствии высоких концентраций противоопухолевых лекарств. По всей видимости, нужно искать новые методы лечения, направленные на запуск альтернативных типов клеточной смерти.

Интерес к исследованиям, посвященным изучению возможности использования ферроптоза в терапии рака, в последние годы заметно возрос. Кроме эрастина, блокирующего транспорт цистина в клетку, синтезированы и охарактеризованы и другие индукторы ферроптоза, вызывающие истощение GPX4 в опухолевых клетках, например RSL3 (RAS-selective lethal 3) [19]. И те, и другие индукторы ферроптоза малорастворимы в воде, нестабильны, плохо проникают через плазматическую мембрану. Показана также их высокая токсичность для нормальных клеток [20, 21].

Эрастин – классический индуктор ферроптоза – был синтезирован в 2012 г. в лаборатории Брента Стоквелла. В его молекуле содержится структурный фрагмент хиназолина, который, очевидно, важен для индукции ферроптоза. Мы синтезировали аналоги эрастина с модифицированной структурой с заменой заместителей во 2-м и 3-м положениях хиназолинового цикла. Предполагалось, что такая замена приведет к усилению активности данных соединений по сравнению с эрастином и улучшит их растворимость.

Исследование *in vitro* способности соединений 1–5, производных 3-гидроксихиназолина, индуцировать ферроптоз в клетках MCF7 показало, что активность соединения 3 была сравнима с эффектом эрастина. Эти результаты подтверждены на экспериментальной модели карциномы молочной железы Ca-755 мышей. Соединение 3 показало высокий продолжительный противоопухолевый эффект в дозах 30 и 50 мг/кг при внутривентральном ежедневном введении в течение 5 дней. При использовании этого соединения в дозе 50 мг/кг продолжительность жизни животных увеличилась на 36 % по сравнению с применением эрастина (УПЖ – 11 %; $p < 0,05$).

Полученные недавно данные о репрограммировании метаболизма железа опухолевыми клетками чрезвычайно важны [22]. Стремительный рост опухоли требует намного большего расхода железа, чем метаболизм нормальных клеток. Одной из причин такого активного поглощения железа опухолевыми клетками является необходимость этого элемента для биосинтеза ДНК [23]. Железо также входит в состав дыхательных ферментов в качестве кофактора (при его недостатке ткани не могут усваивать кислород) [24] и участвует в генерации биологической энергии в живых организмах [25]. Можно предположить, что ферроптоз возникает из-за дисбаланса клеточных метаболических процессов (например, метаболизма липидов и кратковременного повышения уровня железа).

Следует отметить, что активация ферроптоза представляет собой энергетически менее затратную систему гибели клетки в отличие от апоптоза и других форм программированной гибели клеток. Индукция ферроптоза не требует процессинга эффекторов смерти, например, каспаз или газдерминов. Несмотря на несомненную перспективность активации ферроптоза в опухолевых клетках, к настоящему времени в клинической практике нет препарата, индуцирующего его. Полученные нами данные об индукции гибели клеток РМЖ и первичная оценка противоопухолевой активности аналога эрастина – соединения 3 – могут служить основанием для продолжения поиска индукторов ферроптоза в этом классе соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе химиотерапии не всегда удается убить все опухолевые клетки. Оставшаяся клеточная попу-

ляция приобретает новые мутации, что делает опухоль нечувствительной к предыдущему лечению. Опубликованные недавно данные о способности индукторов ферроптоза вызывать гибель резистентных к терапии опухолевых клеток привели нас к поиску низкомолекулярных активаторов ферроптоза. Мы основывались на результатах исследования блокирования апоптоза хелаторами железа [26] и соединениями, ингибирующими ферроптоз [27]. Так, кардиотоксичность доксорубина в клинической практике сегодня снижают соединениями, которые нейтрализуют ионы железа

или предотвращают образование радикалов кислорода [28].

Проведенные нами исследования показали, что производные 3-гидроксихиназолина индуцируют в MCF7-клетках ферроптоз, сравнимый с активностью эрастина. Соединение 3 оказывает более выраженный эффект на рост экспериментальной опухоли Ca-755 по сравнению с эрастином. Полученные предварительные результаты демонстрируют перспективность дальнейшего поиска потенциальных индукторов ферроптоза.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Harbeck N., Gnant M. Breast cancer. *Lancet* 2017;389(10074):1134–50. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31891-8.
- Waks A.G., Winer E.P. Breast cancer treatment: a review. *JAMA* 2019;321(3):288–300. DOI: 10.1001/jama.2018.19323.
- Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R. et al. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* 2012;149(5):1060–72. DOI: 10.1016/j.cell.2012.03.042.
- Viswanathan V.S., Ryan M.J., Dhruv H.D. et al. Dependency of a therapy-resistant state of cancer cells on a lipid peroxidase pathway. *Nature* 2017;547(7664):453–7. DOI: 10.1038/nature23007.
- Li J., Cao F., Yin H.L., Huang Z.J. et al. Ferroptosis: past, present and future. *Cell Death Dis* 2020;11(2):88. DOI: 10.1038/s41419-020-2298-2.
- Yang W.S., Stockwell B.R. Ferroptosis: death by lipid peroxidation. *Trends Cell Biol* 2016;26(3):165–76. DOI: 10.1016/j.tcb.2015.10.014.
- Gaschler M.M., Stockwell B.R. Lipid peroxidation in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;482(3):419–25. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.086.
- Marques O., da Silva B.M., Porto G. Iron homeostasis in breast cancer. *Cancer Lett* 2014;347(1):1–14. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.01.029.
- Chang V.C., Cotterchio M., Khoo E. Iron intake, body iron status, and risk of breast cancer: a systemic review and meta-analysis. *BMC Cancer* 2019;19(1):543–8. DOI: 10.1186/s12885-019-5642-0.
- Bitonto V., Alberti D., Ruiu R. et al. L-ferritin: a theranostic agent of natural origin for MRI visualization and treatment of breast cancer. *J Control Release* 2020;319:300–10. DOI: 10.1016/j.jconrel.2019.12.051.
- Tang R., Xu J., Zhang B. et al. Ferroptosis, necroptosis, and pyroptosis in anticancer immunity. *J Hematol Oncol* 2020;13(1):110–6. DOI: 10.1186/s13045-020-00946-7.
- Yu M., Gai C., Li Z. et al. Targeted exosome-encapsulated erastin induced ferroptosis in triple negative breast cancer cells. *Cancer Sci* 2019;110(10):3173–82. DOI: 10.1111/cas.14181.
- Неганова М.Е., Александрова Ю.Р., Пухов С.А. и др. Механизмы цитотоксического действия ряда циклических гидроксамовых кислот. *Биомедицинская химия* 2020;66(4):332–8. [Neganova M.E., Alexandrova Y.R., Pukhov S.A. et al. Mechanisms of cytotoxic action of a number of cyclic hydroxamic acids. *Biomedicinskaya himiya = Biomedical Chemistry* 2020;66(4):332–8. (In Russ.)]. DOI: 10.18097/PBMC20206604332.
- Борисова Л.М., Осипов В.Н., Гусев Д.В. и др. Производное 3-гидроксихиназолина, аналог эрастина, индуцирует ферроптоз в метастатических клетках меланомы. *Российский биотерапевтический журнал* 2021;20(1):67–73. [Borisova L.M., Osipov V.N., Gusev D.V. et al. A derivative of 3 hydroxyquinazoline, an analogue of erastin, induces apoptosis in metastatic melanoma cells. *Rossiiskij bioterapevticheskij zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal* 2021;20(1):67–73. (In Russ.)]. DOI: 10.17650/1726-9784-2021-20-1-67-73.
- Руководство по содержанию и использованию лабораторных животных. 8-е изд. Пер. с англ. Под ред. И.В. Белозерцевой, Д.В. Блинова, М.С. Красильщиковой. М.: ИРБИС, 2017. 336 с. [Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Translated from English. Ed. by I.V. Belozertseva, D.V. Blinov, M.S. Krasilschikova. Moscow: IRBIS, 2017. 336 p. (In Russ.)].
- Экспериментальная оценка противоопухолевых препаратов в СССР и США. Под ред. З.П. Софьиной, А.Б. Сыркиной, А. Голдина, И. Кляйн. М.: Медицина, 1980. 296 с. [Experimental evaluation of antitumor drugs in the USSR and the USA. Ed. by Z.P. Sofina, A.B. Syrkin, A. Goldin, A. Klein. Moscow: Medicine, 1980. 296 p. (In Russ.)].
- Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В кн.: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К., 2012. С. 642–657. [Treschalina E.M., Zhukova O.S., Gerasimova G.K. et al. Methodical recommendations for the preclinical study of the antitumor activity of drugs. In: *Guidelines for conducting preclinical studies of drugs. Part 1. Moscow: Grif and K., 2012. Pp. 642–57. (In Russ.)*].
- Ji X., Lu Y., Tian H. et al. Chemoresistance mechanisms of breast cancer and their countermeasures. *Biomed Pharmacother* 2019;114:108800. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.108800.
- Weiwei M., Bittker J.A., Lewis T.A. et al. Development of small-molecule probes that selectively kill cells induced to express mutant RAS. *Bioorg Med Chem Lett* 2012;22(4):1822–6. DOI: 10.1016/j.bmcl.2011.09.047.
- Lee H., Zandkarimi F., Zhang Y. et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis. *Nat Cell Biol* 2020;22(2):225–34. DOI: 10.1038/s41556-020-0461-8.
- Shibata Y., Yasui H., Higashikawa K. Erastin, a ferroptosis-inducing agent, sensitized cancer cells to X-ray irradiation via glutathione starvation *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One* 2019;14(12):e0225931. DOI: 10.1371/journal.pone.0225931.
- Hecht F., Pessoa C.F., Gentile L.B. et al. The role of oxidative stress on breast cancer development and therapy. *Tumour Biol* 2016;37(4):4281–91. DOI: 10.1007/s13277-016-4873-9.
- Zhang D.L., Ghosh M.C., Rouault T.A. The physiological functions of iron regulatory proteins in iron homeostasis – an update. *Front Pharmacol* 2014;5:124–9. DOI: 10.3389/fphar.2014.00124.

24. Kleingardner J.G., Bren K.L. Biological significance and applications of heme proteins and peptides. *Acc Chem Res* 2015;48(7):1845–52. DOI: 10.1021/acs.accounts.5b00106.
25. Orth M., Schapira A.H. Mitochondria and degenerative disorders. *Am J Med Genet* 2001;106(1):27–36. DOI: 10.1002/ajmg.1425.
26. Doroshow J.H. Prevention of doxorubicin-induced killing of MCF-7 human breast cancer cells by oxygen radical scavengers and iron chelating agents. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;135(1):330–5. DOI: 10.1016/0006-291x(86)90981-2.
27. Buranrat B., Connor J.R. Cytoprotective effects of ferritin on doxorubicin induced breast cancer cell death. *Oncol Rep* 2015;34(5):2790–6. DOI: 10.3892/or.2015.4250.
28. Gammella E., Maccarinelli F., Buratti P. et al. The role of iron in anthracycline cardiotoxicity. *Front Pharmacol* 2014;5:25–9. DOI: 10.3389/fphar.2014.00025.

Вклад авторов

В.Н. Осипов: синтез, очистка и характеристика производных 3-гидроксикиназолина, редактирование текста статьи;
Л.М. Борисова: разработка плана эксперимента *in vivo*, обработка и анализ результатов исследования *in vivo*, написание текста статьи, редактирование статьи;
И.С. Голубева, М.П. Киселева: проведение эксперимента *in vivo*;
Д.А. Хоченков: подготовка иллюстрационного материала;
А.А. Вартамян: разработка дизайна исследования, тестирование *in vitro* эрастина и производных 3-гидроксикиназолина, написание текста статьи.

Authors contributions:

V.N. Osipov: synthesis, purification and characterization of 3-hydroxyquinazoline derivatives, article editing;
L.M. Borisova: development of an *in vivo* experiment plan, processing and analysis of *in vivo* research results, article editing, article writing;
I.S. Golubeva, M.P. Kiseleva: conducting an *in vivo* experiment;
D.A. Khochenkov: preparation of illustrative material;
A.A. Vartanyan: study design development, *in vitro* testing of erastin and 3-hydroxyquinazoline derivatives, article writing.

ORCID авторов / ORCID of authors

Л.М. Борисова / L.M. Borisova: <https://orcid.org/0000-0003-4613-4584>
В.Н. Осипов / V.N. Osipov: <https://orcid.org/0000-0001-7726-4467>
И.С. Голубева / I.S. Golubeva: <https://orcid.org/0000-0002-7263-7444>
М.П. Киселева / M.P. Kiseleva: <https://orcid.org/0000-0002-4309-6722>
Д.А. Хоченков / D.A. Khochenkov: <https://orcid.org/0000-0002-5694-3492>
А.А. Вартамян / A.A. Vartanyan: <https://orcid.org/0000-0001-9342-5523>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено в рамках государственного задания по теме «Разработка подходов к созданию противоопухолевых агентов на основе соединений – потенциальных индукторов ферроптоза» (№ АААА-А19-119021890101-1, 2019–2021 гг.).

Financing. The study was performed in the framework research work No. АААА-А19-119021890101-1 “Development of approaches for search of antitumor agents based on potential inducers of ferroptosis” (2019–2021).

Соблюдение правил биоэтики. Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России. Исследование выполнено в соответствии с этическими нормами обращения с животными, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей.

Compliance with the rules of bioethics. The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology of the Ministry of Health of Russia. The study was performed in accordance with the ethical standards for the treatment of animals adopted by the European Convention for the protection of vertebrates used for research and other scientific purposes.

Статья поступила: 22.06.2021. **Принята к публикации:** 13.01.2022.

Article submitted: 22.06.2021. **Accepted for publication:** 13.01.2022.