

DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-59-71



# Механизмы цитотоксической активности пиррол-карбоксамидов в отношении опухолевых клеточных сублиний с множественной лекарственной устойчивостью

А.Р. Галембикова<sup>1</sup>, П.Д. Дунаев<sup>1</sup>, Ф.Ф. Бикиниева<sup>1</sup>, И.Г. Мустафин<sup>1</sup>, П.Б. Копнин<sup>2</sup>, С.С. Зыкова<sup>3</sup>,  
Ф.И. Мухутдинова<sup>1</sup>, Е.А. Сарбазян<sup>4</sup>, С.В. Бойчук<sup>1, 5-7</sup>

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

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт канцерогенеза ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России; Россия, 115522 Москва, Каширское шоссе, 24;

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Пермская государственная фармацевтическая академия» Минздрава России; Россия, 614081 Пермь, ул. Полевая, 2;

<sup>4</sup>ФГБОУ ВО «Казанский национальный исследовательский технологический университет»; Россия, 420015 Казань, ул. К. Маркса, 68;

<sup>5</sup>Научно-исследовательская лаборатория «Биомаркер», Институт фундаментальной медицины и биологии ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Россия, 420008 Казань, ул. Кремлевская, 18;

<sup>6</sup>ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России; Россия, 125993 Москва, ул. Баррикадная, 2/1, стр. 1;

<sup>7</sup>Центральная научно-исследовательская лаборатория ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России; Россия, 420012 Казань, ул. Бутлерова, 49

**Контакты:** Сергей Васильевич Бойчук [boichuksergei@mail.ru](mailto:boichuksergei@mail.ru)

**Введение.** Вещества, именуемые митотическими ядами и влияющие на динамическое состояние микротрубочек веретена деления, являются хорошо известными и эффективными химиотерапевтическими препаратами. Эти вещества связываются с микротрубочками, влияя тем самым на процессы полимеризации или деполимеризации тубулина, что в конечном счете приводит к остановке клеточного цикла в М-фазе (митотическая катастрофа) и последующей гибели клеток по механизму апоптоза. В предыдущих исследованиях мы показали высокую цитотоксическую и противоопухолевую активность пиррол-карбоксамидов (ПК) (ПК-61 и ПК-84) в отношении широкого спектра опухолевых клеточных линий эпителиального происхождения, включая трижды негативный рак молочной железы, рак легких и предстательной железы.

**Цель исследования** – изучить цитотоксическую активность ПК-61 и ПК-84 в отношении опухолевых клеточных линий с множественной лекарственной устойчивостью.

**Материалы и методы.** Исследования проводили на клеточных линиях трижды негативного рака молочной железы, резистентного к паклитакселу (HCC1806 Tx-R), и остеосаркомы, резистентной к доксорубину (SaOS-2 Dox-R). Согласно ранее проведенным исследованиям обе опухолевые клеточные сублинии имели фенотип множественной лекарственной устойчивости.

**Результаты.** Противоопухолевая активность ПК обусловлена их способностью ингибировать процессы полимеризации тубулина. Данные иммунофлуоресцентной микроскопии показали способность ПК нарушать процессы сборки тубулина в опухолевых клетках. В результате ингибирования полимеризации тубулина в этих клетках происходит остановка клеточного цикла в М-фазе, что приводит к накоплению митотических клеток и индуцирует апоптоз.

**Заключение.** Результаты исследований показывают высокую цитотоксическую активность соединений ПК-61 и ПК-84 в отношении опухолевых клеточных линий с множественной лекарственной устойчивостью, что открывает перспективы для создания новых эффективных противоопухолевых средств на основе ПК.

**Ключевые слова:** микротрубочки, деполимеризация тубулина, клеточный цикл, апоптоз, множественная лекарственная устойчивость, трижды негативный рак молочной железы, остеосаркома, пиррол-карбоксамиды, паклитаксел, винбластин, доксорубин

**Для цитирования:** 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

## Mechanisms of cytotoxic activity of pyrrole-carboxamides against multidrug-resistant tumor cell sublines

A.R. Galembikova<sup>1</sup>, P.D. Dunaev<sup>1</sup>, F.F. Bikinieva<sup>1</sup>, I.G. Mustafin<sup>1</sup>, P.B. Kopnin<sup>2</sup>, S.S. Zyкова<sup>3</sup>, F.I. Mukhutdinova<sup>4</sup>, E.A. Sarbazyan<sup>4</sup>, S.V. Boichuk<sup>1,5-7</sup>

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

<sup>2</sup>Research Institute of Carcinogenesis of the N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia; 24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115522, Russia;

<sup>3</sup>Perm State Pharmaceutical Academy, Ministry of Health of Russia; 2 Poleyaya St., Perm 614990, Russia;

<sup>4</sup>Kazan National Research Technological University, 68 Karl Marx St., Kazan 420015, Russia;

<sup>5</sup>Research Laboratory "Biomarker", Institute of Fundamental Medicine and Biology of the Kazan Federal University, 18 Kremlevskaya St., Kazan 420008, Russia;

<sup>6</sup>Russian Medical Academy of Continuing Professional Education, Ministry of Health of Russia; Bld. 1, 2/1 Barricadnaya St., Moscow 125993, Russia;

<sup>7</sup>Central Research Laboratory of the Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia; 49 Butlerova St., Kazan 420012, Russia

**Contacts:** Sergei Vasilyevich Boichuk [boichuksergei@mail.ru](mailto:boichuksergei@mail.ru)

**Introduction.** Mitotic poisoning agents (MPAs) affecting the dynamic state of the microtubules, are the well-known and effective chemotherapeutic agents. Mitotic poisoning agents are binding to the microtubules, and thereby interfere with tubulin polymerization or depolymerization dynamic state, resulting in the cell cycle arrest in M-phase (mitotic catastrophe) and subsequent apoptotic cell death. We reported previously about potent cytotoxic activities against the pyrrole-carboxamides (PCs) (PC-61 and PC-84) against broad spectrum of cancer cell lines, including triple negative breast cancer, lung and prostate cancer.

**Aim.** To examine the cytotoxic activities of PC-61 and PC-84 against multidrug-resistant cancer cell lines indicated above. **Materials and methods.** Study was performed on the triple-negative paclitaxel-resistant breast cancer cell line HCC1806 Tx-R and doxorubicin-resistant osteosarcoma SaOS-2 Dox-R cell line.

**Results.** The cytotoxic activity of PCs was due to the inhibition of tubulin polymerization. Immunofluorescence staining data revealed PCs ability to interfere with tubulin's assembly in multidrug-resistant cancer cell lines. As an outcome of inhibition of tubulin polymerization, PCs induced cell cycle arrest in M-phase, and further led to apoptotic cell death of cancer cells.

**Conclusion.** Collectively, we demonstrated potent cytotoxic activity of PCs against cancer cell lines with multidrug-resistant phenotype, which arising the possibilities to develop novel and effective anti-tumor agents that belongs to mitotic poisoning agents.

**Keywords:** microtubules, tubulin depolymerization, cell cycle, apoptosis, multidrug resistance, triple negative breast cancer, osteosarcoma, pyrrole-carboxamides, paclitaxel, vinblastine, doxorubicin.

**For citation:** Galembikova A.R., Dunaev P.D., Bikinieva F.F. et al. Mechanisms of cytotoxic activity of pyrrole-carboxamides against multidrug-resistant tumor cell sublines. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2023;10(3):59–71. (In Russ.). DOI: 10.17650/2313-805X-2023-10-3-59-71

### ВВЕДЕНИЕ

Микротрубочки являются важными регуляторами широкого спектра физиологических процессов, включая пролиферацию и миграцию клеток, транспорт везикул в процессе эндоцитоза и хромосомную сегрегацию во время митоза. Последний процесс рассматривается как привлекательная молекулярная мишень для действия противоопухолевых препаратов, что подтверждается наличием довольно большого количества как природных, так и синтетических низкомолекулярных соединений, эффективно влияющих на динамическое состояние микротрубочек и вызывающих последующую гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза вследствие незавершенности клеточного цикла и так называемой катастрофы в митозе [1, 2]. Молекулярный механизм действия химиотерапевтических препаратов, мишенью которых являются микротрубочки, обусловлен их способностью вмешиваться в динамическое состояние микротрубочек посред-

вом ингибирования или усиления полимеризации тубулина. К веществам, которые ингибируют процессы полимеризации тубулина, относятся алкалоиды барвинка, колхицин и его аналоги, майтанзин и пиронетин [3–6], а к химиопрепаратам (ХП), способствующим полимеризации тубулина, — таксаны (паклитаксел, доцетаксел) [7, 8]. Помимо таксанов, продукты морских губок (например, лаулималид [9] и пелорозид А [10]) также усиливают полимеризацию тубулина и стабилизируют микротрубочки, приводя к аналогичным для клетки фатальным последствиям [11].

Было обнаружено, что помимо «классических» ХП, избирательно влияющих на динамическое состояние микротрубочек, способностью оказывать влияние на процессы полимеризации тубулина обладают также некоторые таргетные препараты, относящиеся к группе ингибиторов рецепторных и нерцепторных киназ. Например, тивантиниб изначально разрабатывался как ингибитор тирозинкиназы c-Met и довольно

успешно прошел клинические испытания именно в качестве таргетного препарата [12]. Однако результаты последующих исследований продемонстрировали, что терапевтический эффект данного лекарственного средства может быть обусловлен не только ингибированием соответствующего сигнального пути в опухолевых клетках [13], но и его способностью влиять на процессы полимеризации тубулина [14]. Аналогичным образом ригосертиб, ингибирующий активность полоподобной киназы типа 1 (Plk1) [15], в дальнейшем также показал способность эффективно препятствовать процессу полимеризации тубулина [16]. Для некоторых химических соединений была обнаружена обратная закономерность. Например, для нокодазола – известного митотического яда (МЯ), нарушающего процессы деполимеризации тубулина, впоследствии была обнаружена высокая активность в отношении ряда киназ, включая ABL, c-KIT, BRAF и MEK [17, 18]. Некоторые ингибиторы киназ, которые клинически одобрены или в настоящее время проходят клинические испытания II или III фазы (например, селонсертиб, маситиниб, нинтеданиб, PF0477736, мезилат SNS-314, MPI0479605 и понатиниб), проявили стабилизирующий эффект на микротрубочки без прямого взаимодействия с тубулином [19, 20].

Митотические яды (в первую очередь таксаны и алкалоиды барвинка) обычно используются в терапии пациентов с солидными злокачественными новообразованиями, а также гемобластомами преимущественно в составе комбинированной химиотерапии. Однако их длительное применение ограничено, в том числе вследствие образования резистентности опухолей. Вторичная резистентность злокачественных новообразований к данным химиотерапевтическим препаратам может быть следствием развития в опухолевых клетках различных адаптационных механизмов, среди которых выделяют повышение экспрессии в опухолевых клетках ABC-транспортеров [21, 22], изменение уровня экспрессии специфических изоформ  $\beta$ -тубулина [23], мутации  $\beta$ -тубулина, остановку клеточного цикла вследствие активации соответствующих чек-поинтов и др. [24]. Кроме того, использование МЯ сопряжено с развитием серьезных побочных эффектов, включающих периферическую нейропатию, миело- и иммуносупрессию и другие, что существенным образом ограничивает их продолжительное использование и является стимулом для разработки новых эффективных и менее токсичных химиотерапевтических препаратов с аналогичным механизмом действия.

Результаты ранее проведенных нами исследований показали высокую цитотоксическую и противоопухолевую активность этил-2-аминопиррол-3-карбоксилатов (пиррол-карбоксамидов, ПК) в отношении довольно широкого спектра опухолевых клеточных линий и ксенографтных опухолей [25–27]. Молекулярный механизм их действия обусловлен способностью влиять на динамическое состояние микротрубочек

путем ингибирования полимеризации тубулина, что приводит к остановке клеточного цикла в М-фазе и гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза. Эти данные, свидетельствующие о противоопухолевой активности пиррол-содержащих химических соединений, согласуются с результатами других исследований. Например, в зарубежной научной литературе имеются данные о цитотоксической и проапоптотической активности некоторых пиррол-содержащих соединений, осуществляемой за счет их способности оказывать влияние на процессы полимеризации тубулина [28, 29]. В 2020–2021 гг. наша научная группа синтезировала пиррол-содержащие химические соединения, основной молекулярной мишенью для которых явился колхициновый сайт связывания в молекуле тубулина, что обуславливало их способность эффективно нарушать процессы полимеризации данного белка [30]. В результате комплексного анализа их активности, основанного как на методах компьютерного моделирования, так и на биологических методах, мы выявили 2 лидерных соединения (ПК-61 и ПК-84), обладающих наибольшей аффинностью к колхицин-связывающему домену тубулина и максимальной биологической активностью в отношении данной клеточной мишени. Ожидаемыми результатами данного взаимодействия на клеточном уровне были накопление опухолевых клеток эпителиального происхождения в М-фазе клеточного цикла и их последующая гибель по механизму апоптоза. Следует отметить, что проапоптотическая активность данных соединений подтверждена *in vivo* на ксенографтных моделях злокачественных опухолей молочной железы [30].

Результаты настоящего исследования иллюстрируют высокую активность вышеуказанных лидерных соединений в отношении опухолевых клеточных сублиний с признаками множественной лекарственной устойчивости (МЛУ), что имеет, на наш взгляд, большое научно-практическое значение и создает предпосылки для разработки новых противоопухолевых препаратов, эффективных в отношении широкого спектра злокачественных новообразований, в том числе с признаками вторичной резистентности к ХП, используемым в настоящее время в практической онкологии.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Химические соединения.** Пиррол-карбоксамиды 61 и 84 были синтезированы в наших лабораториях в соответствии со стандартными протоколами, как показано в предыдущих исследованиях [30–32]. Структуры и спектры ядерного магнитного резонанса ПК-61 и ПК-84 приведены в опубликованной ранее статье [30]. Паклитаксел, винбластин (SigmaAldrich, США), ПК-61 и ПК-84 были растворены в 100 % диметилсульфоксиде (ДМСО) (SigmaAldrich, США). В качестве контроля клетки инкубировали в культуральной среде с соответствующей концентрацией ДМСО

(конечная концентрация 0,1 %). Пиррол-карбоксамиды 61 и 84 использовались в концентрации, близкой к IC50 (10 мкМ), паклитаксел (1 мкМ) и винбластин (0,01 мкМ) были использованы в данных концентрациях, подобранных ранее [30].

#### **Клеточные линии и условия их культивирования.**

В настоящем исследовании использовали 2 опухолевые клеточные сублинии – клеточную линию трижды негативного рака молочной железы, резистентную к паклитакселу (HCC1806 Tx-R), и клеточную линию остеосаркомы, резистентную к доксорубину (SaOS-2 Dox-R), ранее полученные в нашей лаборатории путем последовательного культивирования материнских опухолевых линий с постепенно увеличивающимися концентрациями ХП [33]. Линии HCC1806 и SaOS-2 получены из Американской коллекции клеточных культур (American Type Culture Collection, ATCC). Все клеточные линии культивировали во влажной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С (LamSystems, 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).

**Анализ жизнеспособности клеточных линий.** Опухолевые клетки засеивали в 96-луночные плоскодонные планшеты (Corning Inc., США). Спустя 24 ч инкубировали в присутствии ПК-61 и ПК-84 или растворителя (DMCO) в течение 48 ч. Затем к клеткам добавляли реагент MTS (Promega, США) на 1 ч. Жизнеспособность клеток оценивали на спектрофотометре MultiScan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 492 нм. Половинную ингибирующую концентрацию (IC 50) исследуемых соединений определяли с использованием электронного ресурса <http://ic50.tk/> (по состоянию на 25.04.2023). Все данные нормализованы относительно контрольных клеток. Были проведены 3 повтора для каждого экспериментального условия.

**Вестерн-блоттинг.** Для приготовления клеточных экстрактов клетки лизировали буфером для радиоиммунопреципитации – RIPA (25 мМ Tris-HCl (pH 7,6); 150 мМ NaCl; 5 мМ ЭДТА; 1 % NP-40; 1 % дезоксихолат натрия; 0,1 % SDS) с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз. Лизаты клеточных культур инкубировали в RIPA буфере течение 20 мин при 4 °С, а затем центрифугировали в течение 30 мин при 13000 об./мин при 4 °С. Концентрацию белка в образцах определяли с помощью BCA (Thermo Fisher Scientific, США) по методу Брэдфорда. Образцы, 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 соответствующем буфере (25 мМ Tris, метанол (pH 8,3)) при 350 мА в течение 1,5 ч при 4 °С.

Для блокирования неспецифических взаимодействий и разведения антител использовали 5 % обезжиренное сухое молоко. Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали с первичными антителами (АТ) в течение 16 ч при 4 °С, а затем со вторичными АТ, конъюгированными с HRP (Santa Cruz Biotechnology, США), в течение 1 ч. Экспрессию белков определяли в системе визуализации хемилюминесценции Fusion Solo S (Vilber Lourmat, Франция). Эксперименты проводили в трех повторностях.

**Иммунофлуоресцентная микроскопия.** Для проведения иммунофлуоресцентного окрашивания исследуемых образцов опухолевые клетки засеивали на покровные стекла, предварительно покрытые поли-L-лизин (Sigma-Aldrich, США), и культивировали в 6-луночных плоскодонных планшетах (Corning Inc., США) в течение 48 ч, а затем в исследуемую культуру клеток вносили вышеуказанные химические соединения и культивировали в течение 8 ч. После инкубации покровные стекла с клетками фиксировали 4 % раствором формальдегида в течение 15 мин при комнатной температуре. После трехкратного отмыва фосфатно-солевым буфером клетки инкубировали в блокирующем растворе (фосфатно-солевой буфер с 5 % козьей сывороткой и 0,3 % Triton X-100) в течение 60 мин при комнатной температуре. Далее к клеткам добавляли АТ к p-H3 (Ser10), конъюгированные со вторичными АТ Alexa Fluor 488 (Cell Signaling, США) и разведенные в соотношении 1: 200 в фосфатно-солевом буфере, содержащем 1 % бычий сывороточный альбумин и 0,3 % Triton X-100 (инкубация в течение 16 ч при 4 °С). После трехкратного отмыва фосфатно-солевым буфером к клеткам добавляли 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 °С. После блокирования неспецифических сайтов связывания клеточные образцы инкубировали с первичными моноклональными АТ к  $\alpha$ -тубулину (Sigma-Aldrich, США) в течение 16 ч при 4 °С. После отмыва фосфатно-солевым буфером клетки инкубировали со вторичными АТ, конъюгированными с тexasским красным (Invitrogen, США), в течение 60 мин при комнатной температуре. В дальнейшем проводили окрашивание ядер красителем DAPI (Sigma-Aldrich, США).

Для индукции деполимеризации микротрубочек клетки предварительно подвергали холодовому шоку (планшеты с клетками находились на льду в течение 1 ч) и далее культивировали в предварительно подогретой до 37 °С культуральной среде в присутствии исследуемых соединений в течение 2 ч для стимуляции полимеризации тубулина. Далее проводили описанную выше окраску на  $\alpha$ -тубулин. Клетки визуализировали на флуоресцентном микроскопе Olympus BX63 (Olympus, Япония).

Для каждого экспериментального условия были проведены 2 повтора.

**Проточная цитофлуориметрия.** Анализ клеточного цикла в опухолевых клетках выполняли на проточном цитофлуориметре Guava Muse (Luminex, США) с использованием набора CellCycleKit (Luminex, США) в соответствии с протоколом производителя. Были проведены 5 повторов для каждого экспериментального условия.

Статистическую обработку данных проводили с помощью теста Краскела–Уоллиса с последующим тестом Манна–Уитни–Уилкоксона с корректировкой Бенджамини–Хохберга в программном обеспечении R (R Foundation for Statistical Computing, Австрия; доступно онлайн: <https://www.R-project.org/>, по состоянию на 25.04.2023).

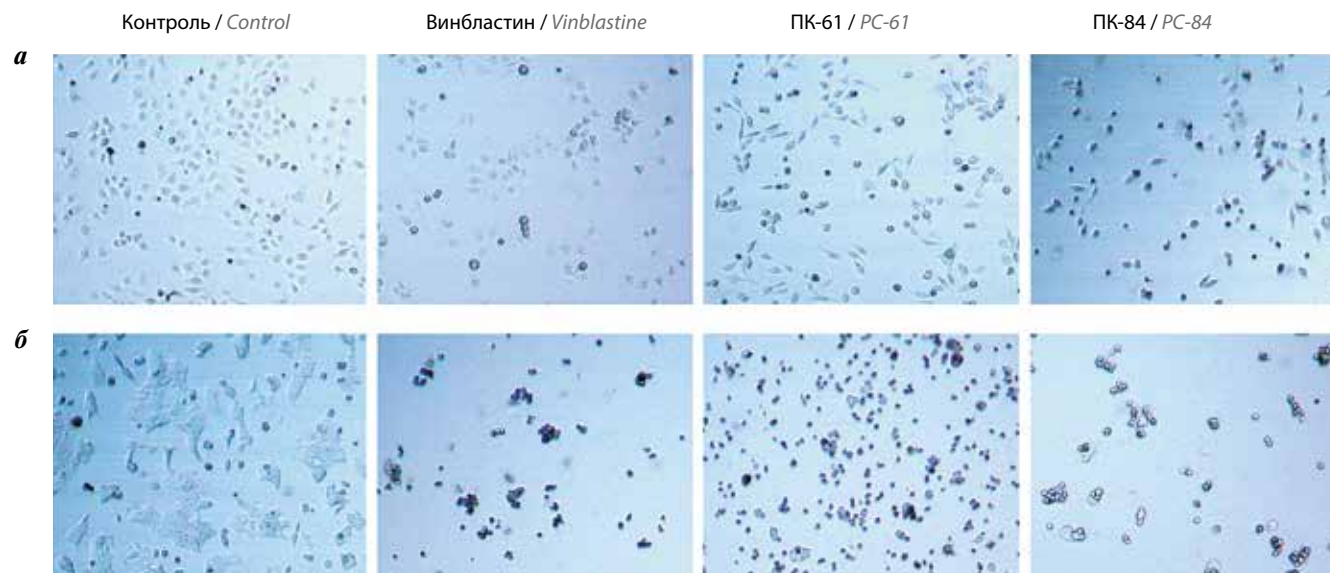
## РЕЗУЛЬТАТЫ

На начальном этапе исследования было обнаружено, что инкубация опухолевых клеток с фенотипом МЛУ с соединениями ПК-61 и ПК-84 приводит к накоплению клеток округлой формы (рис. 1). Аналогичные результаты получены при культивировании опухолевых клеток с винбластином.

С учетом результатов проведенного нами ранее компьютерного моделирования, показавших, что колхициновый домен тубулина является наиболее вероятным сайтом связывания ПК с тубулином [30], следующим этапом исследований стало изучение способности данных соединений влиять на процессы полимеризации тубулина на клеточном уровне. С этой целью клетки сублинии HCC1806 Tx-R культивировали с вышеуказанными ПК, а также ХП винбластином

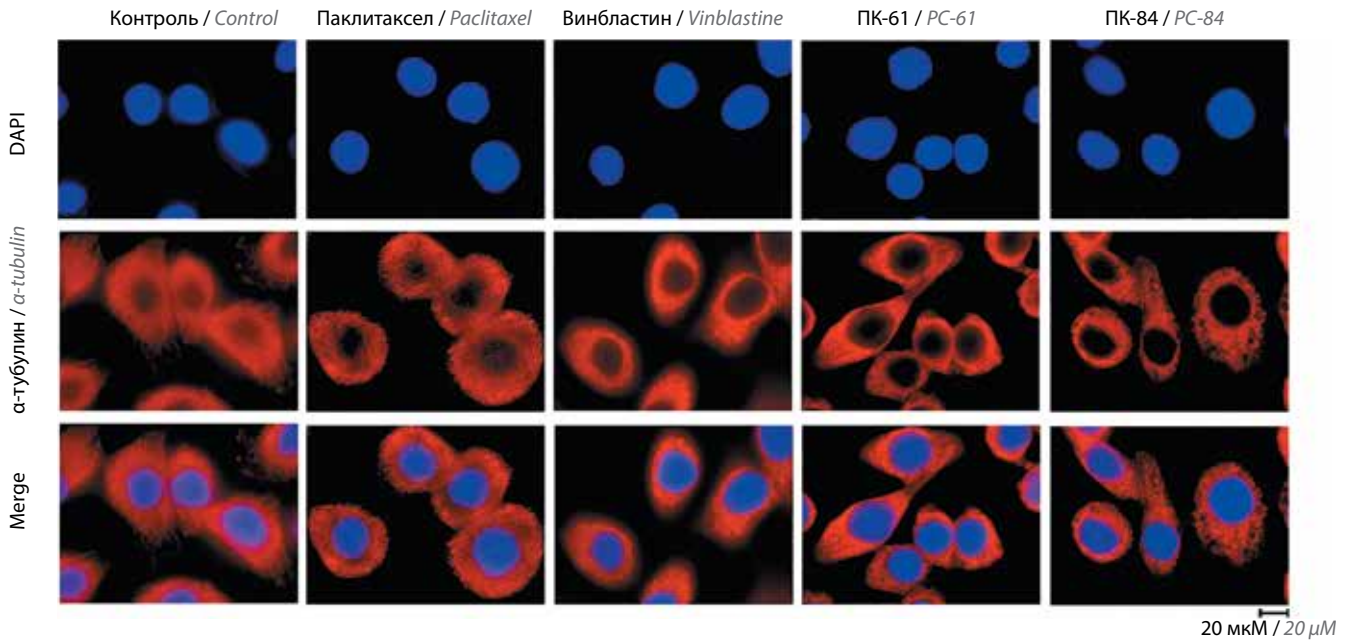
и паклитакселом в течение 8 ч, после чего проводили иммунофлуоресцентное окрашивание для выявления структурных изменений в  $\alpha$ -тубулине. Было обнаружено, что в результате культивирования опухолевых клеток с ПК наблюдается диффузное окрашивание  $\alpha$ -тубулина (рис. 2). Аналогичная картина наблюдалась при культивировании опухолевых клеток с винбластином, что свидетельствует о нарушении процессов полимеризации микротрубочек тубулина. В то же время инкубация опухолевых клеток с паклитакселом приводила к образованию характерных тяжей и пучков тубулина, что говорит о нарушении процессов динамического равновесия белков цитоскелета в сторону их стабилизации (см. рис. 2).

Аналогичные результаты были получены в экспериментах на клетках, предварительно подвергнутых «холодовому шоку», что позволило оценить динамику полимеризации микротрубочек после их разрушения в результате часовой инкубации клеток при 4 °С и последующего культивирования клеток в физиологических условиях (37 °С в течение 2 ч) для последующей инициации процессов полимеризации тубулина. Как и ожидалось, после «разрушения» сети тубулина в результате воздействия на клетки «холодового шока» нормализация условий их культивирования приводила к восстановлению сетчатой структуры данного белка, что являлось отражением процессов активной сборки микротрубочек (рис. 3). В то же время в клетках, культивированных после «холодового шока» в присутствии винбластина, а также ПК, аналогичных изменений не наблюдалось, что подтверждало их способность ингибировать процессы сборки микротрубочек и полимеризации тубулина (см. рис. 3).



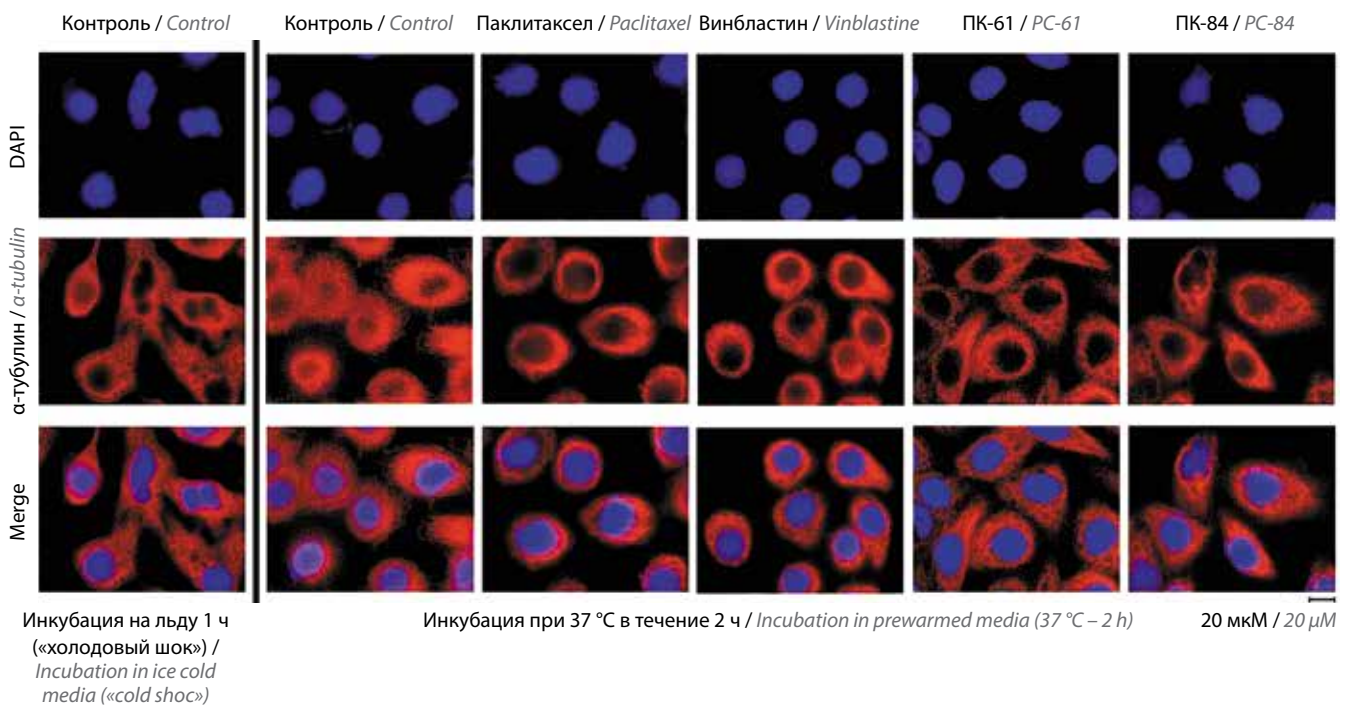
**Рис. 1.** Морфологические изменения в клетках сублинии HCC1806 Tx-R (а) и SaOS-2 Dox-R (б), культивированных в течение 24 ч в присутствии растворителя (диметилсульфоксида) (отрицательный контроль), винбластина (0,01 мкМ) (положительный контроль), пиррол-карбоксамидов 61 (ПК-61) и 84 (ПК-84) (10 мкМ).  $\times 10$

Fig. 1. Changes in morphology of HCC1806 Tx-R (a) and SaOS-2 Dox-R (b) cancer cells treated by pyrrole-carboxamides 61 (PC-61) and 84 (PC-84) (10  $\mu$ M), vinblastine (0,01  $\mu$ M) (positive control), dimethyl sulfoxide (negative control) for 24 h.  $\times 10$



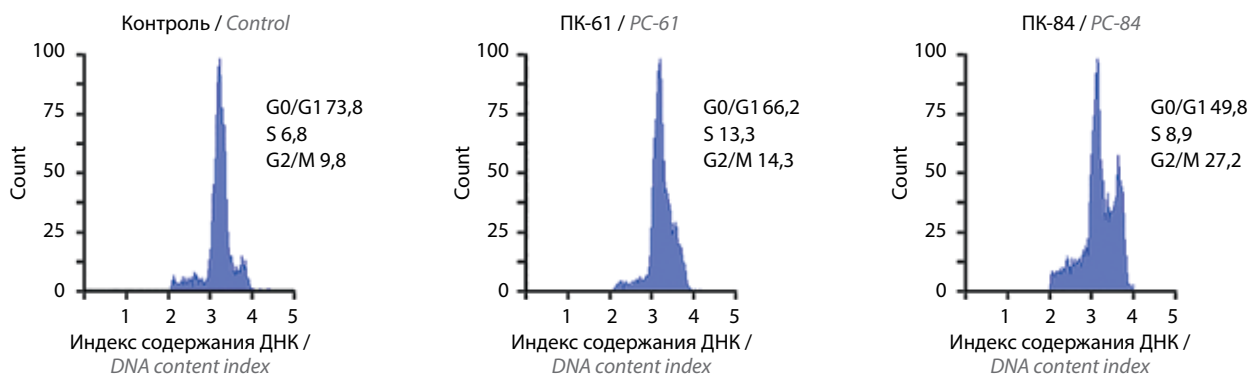
**Рис. 2.** Ингибирование сборки микротрубочек в опухолевых клетках линии HCC1806 Tx-R под влиянием пиррол-карбоксамидов (ПК). Клетки HCC1806 Tx-R инкубировали с диметилсульфоксидом (контроль), паклитакселом (10 мкМ), винбластином (0,01 мкМ), ПК-61 и ПК-84 (10 мкМ) в течение 8 ч, а затем фиксировали смесью метанола и ацетона и окрашивали моноклональными антителами к  $\alpha$ -тубулину (красный цвет) и ядерным красителем DAPI (синий цвет).  $\times 100$

**Fig. 2.** Pyrrole-carboxamides (PCs) disrupt the microtubules network in cancer cells. HCC1806 Tx-R breast cancer cells were treated with dimethyl sulfoxide (control), Paclitaxel (10  $\mu\text{M}$ ), Vinblastine (0,01  $\mu\text{M}$ ), PC-61 and PC-84 (10  $\mu\text{M}$ ) for 8 h, fixed with a mixture of methanol and acetone, and stained with monoclonal antibodies targeting  $\alpha$ -tubulin (red). DAPI nuclear staining (blue) was used to outline the nuclei.  $\times 100$



**Рис. 3.** Ингибирование сборки микротрубочек в опухолевых клетках линии HCC1806 Tx-R под влиянием пиррол-карбоксамидов (ПК), предварительно подвергшихся «холодовому шоку». Клетки сублинии HCC1806 Tx-R инкубировали на льду в течение 1 ч, затем при 37 °С в течение 2 ч в присутствии диметилсульфоксида (контроль), паклитаксела (10 мкМ), винбластина (0,01 мкМ), ПК-61 и ПК-84 (10 мкМ). Клетки фиксировали смесью метанола и ацетона и окрашивали моноклональными антителами к  $\alpha$ -тубулину (красный цвет) и ядерным красителем DAPI (синий цвет).  $\times 100$

**Fig. 3.** Pyrrole-carboxamides (PCs) inhibit the microtubules assembly in cancer cells. HCC1806 were incubated in ice-cold culture medium ("cold shock") within 1 h in presence of dimethyl sulfoxide (control), Paclitaxel (10  $\mu\text{M}$ ), Vinblastine (0,01  $\mu\text{M}$ ), PC-61 and PC-84 (10  $\mu\text{M}$ ). After 1 h, the media were replaced with pre-warmed medium (37 °C) and cells were further cultured for 2 h to initiate tubulin polymerization. Cells were fixed with a mixture of methanol and acetone, and stained with monoclonal antibodies targeting  $\alpha$ -tubulin (red). DAPI nuclear staining (blue) was used to outline the nuclei.  $\times 100$



**Рис. 4.** Накопление опухолевых клеток линии SaOS-2 Dox-R в G2/M-фазе клеточного цикла под влиянием пиррол-карбоксамидов (ПК). Репрезентативные изображения распределения фаз клеточного цикла в клетках сублинии остеосаркомы SaOS-2 Dox-R, культивированных в присутствии диметилсульфоксида (контроль), ПК-61 и ПК-84 (10 мкМ) в течение 12 ч. S – синтетическая фаза клеточного цикла; G0 – фаза покоя клеточного цикла; G1 – пресинтетическая фаза клеточного цикла; G2 – постсинтетическая фаза клеточного цикла; M – фаза митоза клеточного цикла

**Fig. 4.** Accumulation of SaOS-2 Dox-R cancer cells in the G2/M phases after treatment with pyrrole-carboxamides (PCs). Representative histograms illustrating the changes in cell cycle profile of SaOS-2 Dox-R cells treated with dimethyl sulfoxide (negative control), PC-61, and PC-84 (10 μM) for 12 h. S – the synthetic phase of the cell cycle; G0 – the resting phase of the cell cycle; G1 – the presynthetic phase of the cell cycle; G2 – the post-synthetic phase of the cell cycle; M – the mitosis phase of the cell cycle

**Таблица 1.** Распределение фаз клеточного цикла в клетках сублинии остеосаркомы SaOS-2 Dox-R после воздействия пиррол-карбоксамидов 61 (ПК-61) и ПК-84 (10 мкМ) (n = 5)

**Table 1.** Cell cycle distribution in SaOS-2 Dox-R cancer subline treated with pyrrole-carboxamide 61 (PC-61) and PC-84 (10 μM) (n = 5)

Группа / Group	G0/G1	S	G2/M
Контроль / Control	75,8 ± 2,7	5,80 (5,5–5,9)	9,4 ± 3,4
ПК-61	67,9 ± 2,3*	9,6 ± 2,1*	15,1 ± 2,5*
ПК-84	48,0 (48–48,5) **	11,1 ± 0,9 *	28,30 (27,6–29) *

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

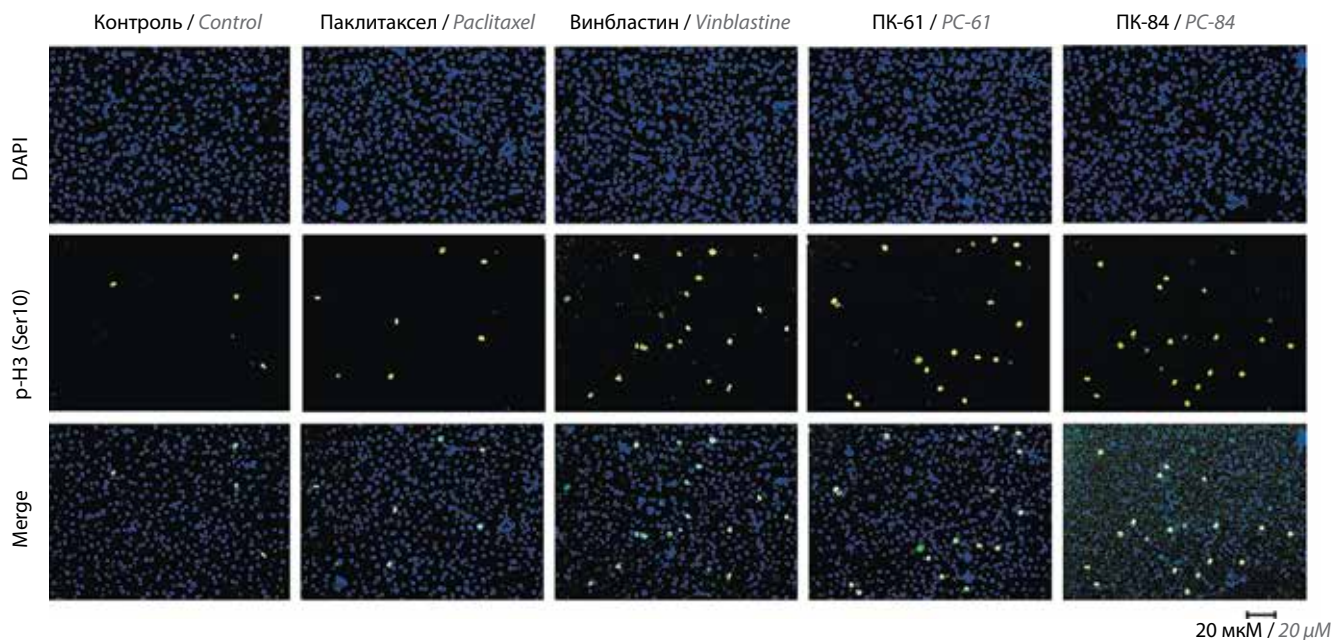
**Примечание.** Нормально распределенные данные представлены как среднее ± стандартное отклонение; ненормально распределенные данные – как медиана (межквартильный интервал). S – синтетическая фаза клеточного цикла; G0 – фаза покоя клеточного цикла; G1 – пресинтетическая фаза клеточного цикла; G2 – постсинтетическая фаза клеточного цикла; M – фаза митоза клеточного цикла.

**Note.** Normally, distributed data are presented as mean ± standard deviation, non-normally distributed data – as median (interquartile range). S – the synthetic phase of the cell cycle; G0 – the resting phase of the cell cycle; G1 – the presynthetic phase of the cell cycle; G2 – the post-synthetic phase of the cell cycle; M – the mitosis phase of the cell cycle.

Таким образом, снижение уровня конfluenceности опухолевых клеточных культур и повышение количества клеток округлой формы при их инкубации с ПК (см. рис. 1) могли быть результатом нарушения процессов полимеризации белка тубулина в опухолевых клетках, что приводило к остановке клеточного цикла в одной из точек рестрикции. Для подтверждения правомочности данной гипотезы проведен анализ фаз клеточного цикла в опухолевых клетках. Результаты проточной цитофлуориметрии показывают увеличение количества клеток сублинии SaOS-2 Dox-R в фазах G2/M после их инкубации с ПК (рис. 4).

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла представлен в табл. 1. Аналогичные данные были получены в отношении клеток сублинии HCC1806 Tx-R.

С учетом накопления клеток округлой формы после воздействия на опухолевые клетки ПК (рис. 1) и накопления клеток в G2/M-фазах клеточного цикла (рис. 4) в дальнейшем было проведено изучение уровня экспрессии маркеров M-фазы в клетках, культивированных с ПК. Результаты иммунофлуоресцентной микроскопии, представленные на рис. 5, показывают, что после воздействия ПК на опухолевые клетки сублинии HCC1806 Tx-R происходит значительное увеличение числа клеток, экспрессирующих гистон 3, фосфорилированный по остаткам серина в положении 10 (p-H3 (Ser10)), являющийся, как известно, общепринятым маркером митоза. Аналогичные данные были получены в отношении винбластина, но не паклитаксела, что являлось косвенным свидетельством наличия резистентности к паклитакселу у данной опухолевой сублинии.



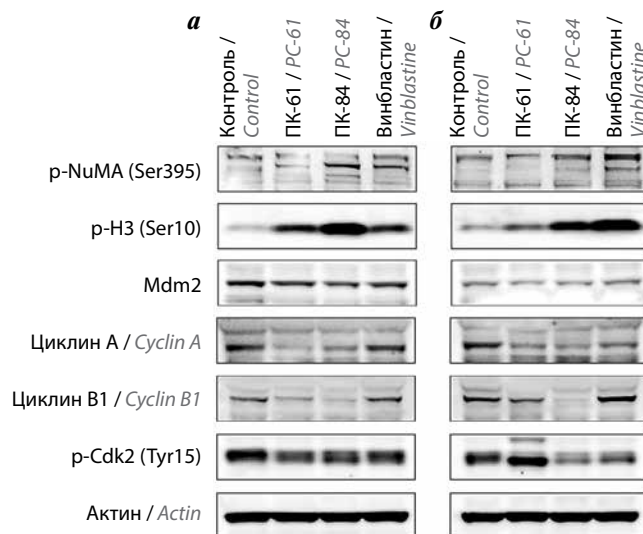
**Рис. 5.** Накопление опухолевых клеток линии HCC1806 Tx-R в M-фазе под влиянием пиррол-карбоксамидов (ПК). Репрезентативные изображения клеток сублинии HCC1806 Tx-R, инкубированных в присутствии диметилсульфоксида (отрицательный контроль), паклитаксела (1 мкМ), винбластина (0,01 мкМ, положительный контроль), ПК-61 (10 мкМ) и ПК-84 (10 мкМ) в течение 8 ч. Клетки фиксировали 4 % параформальдегидом и окрашивали антителами к p-H3 (Ser10), конъюгированными с флуорохромом Alexa 488 (зеленый цвет) и ядерным красителем DAPI (синий цвет).  $\times 10$

**Fig. 5.** Pyrrole-carboxamides (PCs) induce accumulation of HCC1806 Tx-R breast cancer cells in M-phase. The representative images of cancer cells treated with dimethyl sulfoxide (negative control), paclitaxel (1  $\mu$ M), and vinblastine (0.01  $\mu$ M) (positive control), PC-61 and 84 (10  $\mu$ M) for 8 h. The cells were fixed with 4 % paraformaldehyde and immunostained by using Alexa 488-conjugated anti-p-H3 (Ser10) antibody (green color). Cell nuclei were outlined by staining with DAPI (blue color).  $\times 10$

Повышение экспрессии p-H3 (Ser10) в опухолевых клетках после воздействия на них ПК и винбластина было также подтверждено методом иммуноблоттинга (рис. 6). Помимо этого, было обнаружено значительное усиление экспрессии фосфорилированной формы белка NUMA (p-NuMa (Ser395)), также являющегося маркером M-фазы клеточного цикла (см. рис. 6). Напротив, после воздействия на опухолевые клетки ПК экспрессия p-Cdk2 (Tyr15), циклина A2, B1 и Mdm2 снижалась. Следует отметить, что в опухолевых клетках, культивированных с винбластином, изменения в экспрессии большинства вышеуказанных белков были менее выраженными по сравнению с ПК, что свидетельствует о большей (по сравнению с ХП) способности синтезированных нами химических соединений вызывать нарушения регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках с фенотипом МЛУ.

Следствием выраженных нарушений в регуляции клеточного цикла опухолевых сублиний рака молочной железы и остеосаркомы с фенотипом МЛУ явилась их последующая гибель, о чем свидетельствовали данные колориметрического MTS-теста. Значения половинных концентраций соединений, ингибирующие жизнеспособность опухолевых клеток (IC50), представлены в табл. 2.

Чтобы выяснить, явилась ли цитотоксическая активность ПК *in vitro* следствием активации апоптоза в опухолевых клетках, проведен анализ экспрессии маркеров апоптоза (расщепленные формы каспазы-3



**Рис. 6.** Нарушения регуляции клеточного цикла в опухолевых клетках сублиний HCC1806 Tx-R и SaOS-2 Dox-R под влиянием пиррол-карбоксамидов 61 (ПК-61) и 84 (ПК-84). Уровень экспрессии p-NuMA (Ser395), p-H3 (Ser10), Mdm2, циклинов A2 и B1, p-Cdk2 (Tyr15) в клетках сублиний HCC1806 Tx-R (a) и SaOS-2 Dox-R (б) после их культивирования с диметилсульфоксидом (отрицательный контроль), ПК-61, 84 (10 мкМ) и винбластином (0,01 мкМ) в течение 48 ч. Уровень экспрессии актина использовали в качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах

**Fig. 6.** Pyrrole-carboxamides 61 (PC-61) and 84 (PC-84) induce abnormalities of cell cycle regulation in HCC1806 Tx-R and SaOS-2 Dox-R cancer sublines. Immunoblot analysis for the expression of p-NuMA (Ser395), p-H3 (Ser10), Mdm2, cyclins A2 and B1, and p-Cdk2 (Tyr15) in HCC1806 Tx-R (a) and SaOS-2 Dox-R (б) cells treated with dimethyl sulfoxide (negative control), PC-61 and 84 (both 10  $\mu$ M), and Vinblastine (0.01  $\mu$ M) for 48 h. Actin stain was used as a loading control



**Таблица 2.** Значения  $IC_{50}$  (мкМ) для пиррол-карбоксамидов 61 (ПК-61) и 84 (ПК-84), доксорубицина (Dox), паклитаксела (Tx) и индекс резистентности в сублиниях HCC1806 Tx-R и SaOS-2 Dox-R ( $n = 3$ )

**Table 2.**  $IC_{50}$  values (in the micromolar range) for pyrrole-carboxamides 61 (PC-61) and 84 (PC-84), doxorubicin (Dox), paclitaxel (Tx) and resistance index in HCC1806 Tx-R and SaOS-2 Dox-R cancer sublines ( $n=3$ )

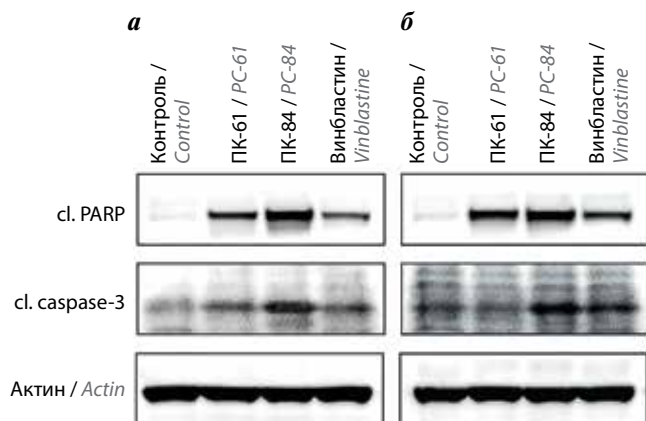
Клеточная линия Cell line	ПК-61 PC-61	ПК-84 PC-84	Dox	Tx
HCC1806 Tx-R	13,5 ± 0,9	7,2 ± 0,3	1,8 ± 0,5 [34]	5,4 ± 1 [34]
HCC1806	8,4 ± 0,3 [30]	7,2 ± 0,6 [30]	0,22 ± 0,004 [34]	0,22 ± 0,01 [34]
Индекс резистентности сублинии HCC1806 Tx-R Resistance index of HCC1806 Tx-R subline	1,6	1	81,8 [34]	24,5 [34]
SaOS-2 Dox-R	5,3 ± 0,1	9,1 ± 0,4	0,97±0,12	0,0000000039 ± 0,0000000008
SaOS-2	2,3 ± 0,07	5,1 ± 0,03	0,16±0,02	0,0000001196 ± 0,0000000209
Индекс резистентности сублинии SaOS-2 Dox-R Resistance index of SaOS-2 Dox-R subline	2,3	1,8	6,1	30,7

и поли(АДФ-рибоза)-полимеразы до и после воздействия на них ПК. Действительно, мы обнаружили значительное увеличение экспрессии маркеров апоптоза в клеточных сублиниях HCC1806 Tx-R и SaOS-2 Dox-R после воздействия на них ПК (рис. 7). Следует отметить, что ПК проявляли большую проапоптотическую активность для обеих клеточных сублиний по сравнению с винбластином.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на довольно успешные результаты клинического применения ХП, основной мишенью для которых являются микротрубочки, длительное использование данных лекарственных средств в составе моно- и комбинированной терапии многих злокачественных новообразований имеет ряд серьезных ограничений, включающих в себя низкую биодоступность большинства ХП данной группы, а также тяжелые побочные системные эффекты (например, периферическая нейропатия, миелосупрессия и др.). Кроме того, быстрое развитие вторичной резистентности опухолей к данным ХП является одним из серьезных и клинически значимых факторов, снижающих их эффективность при длительном использовании. Вторичная резистентность к ХП данной группы может являться следствием различных механизмов, включающих в себя активацию АВС-транспортеров, обеспечивающих усиленную экскрецию ХП из опухолевых клеток [35], мутации *TUB*, изменения изоформ тубулина и его посттрансляционные модификации [23] и т.д. Вышеизложенное является мощным драйвером для разработки и последующего внедрения в практическую онкологию новых ХП с аналогичным механизмом действия, способных эффективно обходить вышеуказанные адаптационные механизмы в опухолевых клетках, в том числе с признаками МЛУ.

Известно, что производные химических соединений на основе пиррола и пиразола широко используются для поиска потенциальных кандидатов при разработке новых лекарственных соединений, обладающих противоопухолевой активностью. Результаты исследований последних лет, в том числе нашей научной группы, иллюстрируют их выраженные антипролиферативные и цитотоксические



**Рис. 7.** Индукция апоптоза в опухолевых клетках сублиний HCC1806 Tx-R и SaOS-2 Dox-R под влиянием пиррол-карбоксамидов 61 (ПК-61) и 84 (ПК-84). Уровень экспрессии расщепленных форм поли(АДФ-рибоза)-полимеразы и каспазы-3 (cl. PARP, cl. caspase-3) в клетках сублиний HCC1806 Tx-R (а) и SaOS-2 Dox-R (б) после их культивирования с диметилсульфоксидом (отрицательный контроль), ПК-61, ПК-84 (10 мкМ) и винбластином (0,01 мкМ) в течение 48 ч. Актин использовался в качестве контроля белковой нагрузки в исследуемых образцах

**Fig. 7.** Pyrrole-carboxamides 61 (PC-61) and 84 (PC-84) induce apoptosis of HCC1806 Tx-R and SaOS-2 Dox-R cancer sublines. Immunoblot analysis for apoptosis markers (e. g., cleaved forms of poly(ADP-ribose)-polymerases and caspase-3) in HCC1806Tx-R breast cancer (A) and SaOS-2 Dox-R osteosarcoma (B) after treatment with dimethyl sulfoxide (negative control), PC-61 and PC-84 (10 μM), and vinblastine (0,01 μM) for 48 h. Actin stain is used as a loading control

эффекты в отношении опухолевых клеток различного происхождения как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, было показано, что химическое соединение N-(2-хлорпиридин-4-ил)-5-(4-метилфенил)-1-(хинолин-2-ил)-1H-пирозол-3-карбоксамид обладает выраженным антипролиферативным и цитотоксическим эффектами в отношении различных опухолевых клеточных линий *in vitro*, включая гепатоцеллюлярную карциному человека, рак молочной железы и толстой кишки, посредством нарушения регуляции клеточного цикла и накопления опухолевых клеток в G1-фазе клеточного цикла [36]. Производные 4,5-дигидро-1H-тиено[2',3':2,3]тиэпино[4,5-с]пирозол-3-карбоксамиды эффективны в отношении опухолевой клеточной линии аденокарциномы легкого A549, у которой была обнаружена гиперэкспрессия рецептора эпидермального фактора роста (epidermal growth factor receptor, EGFR). Результаты молекулярного докинга показали высокий уровень гомологии между данным химическим соединением и ингибитором EGFR-сигнального пути gefитинибом в отношении их связывания как с EGFR, так и с конформационно измененной формой данного рецептора, обусловленной его активацией, т. е. фосфорилированием [37]. Согласно данным недавно проведенных исследований, производные 4-бензоиламино-1H-пирозол-3-карбоксамиды являются мощными ингибиторами CDK2-киназы и проявляют высокую антипролиферативную активность в отношении опухолевых клеточных линий различного происхождения по сравнению с нетрансформированными клетками [38]. О производных 1-этилпирозол-3-карбоксамиды также сообщалось, что они являются эффективными ингибиторами фактора, индуцируемого гипоксией 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1), что подавляет HIF-1-опосредованный ответ на гипоксию посредством влияния на уровень экспрессии карбоангидразы IX [39]. Проведенный анализ взаимосвязи между структурой и функцией данных соединений показал, что наибольшей цитотоксической активностью, коррелировавшей со способностью ингибировать активность изоферментов карбоангидразы, обладали бензолсульфонамиды [40–43].

Результаты других исследований, в том числе наших, иллюстрируют взаимосвязь противоопухолевой активности пиррол-содержащих соединений и их способности влиять на динамическое состояние тубулина, что индуцирует апоптоз опухолевых клеток в результате остановки клеточного цикла в M-фазе (митотическая катастрофа). Одно из первых сообщений об эффективности соединений на основе пиррола, приводящих к дестабилизации микротрубочек, было опубликовано еще в 2007 г. и показало высокую активность тетразамещенного бромированного пиррола JG03–14 в отношении микротрубочек, что, в свою очередь, приводило к образованию аберрантных митотических волокон, накоплению опухолевых клеток в G2/M-фазах клеточного цикла и последующей активации вну-

треннего (митохондриально-опосредованного) пути апоптоза [44]. Известно, что JG03–14 является аналогом комбретастина А-4 – природного продукта, полученного из южноафриканского дерева *Combretum caffrum* и являющегося хорошо известным агентом природного происхождения, дестабилизирующим микротрубочки. Несмотря на высокую биологическую активность комбретастина А-4 в отношении микротрубочек, основным препятствием для клинического применения этого вещества является его цис-изоформа олефинового мостика, которая довольно быстро трансформируется в менее активную транс-изоформу. Для предотвращения перехода из цис- в транс-изоформу и стабилизации структуры олефиновый мостик комбретастина А-4 был заменен пиррольным кольцом, что привело к созданию целого ряда аналогов JG03–14 с мощной противоопухолевой активностью [45]. Другие исследователи обнаружили, что цис-рестриктированные аналоги комбретастина А-4, которые содержат пиррольное кольцо, расположенное между двумя арильными кольцами, также проявляют высокую антипролиферативную активность в отношении опухолевых клеточных линий различного происхождения из-за их способности ингибировать полимеризацию тубулина, блокировать клеточный цикл в метафазе и активировать митохондриально-опосредованный путь апоптоза [46].

Следует отметить, что во всех сообщениях, представленных выше, подчеркивалось, что активность соединений на основе пиррола в отношении деполимеризации тубулина обусловлена их связыванием с колхициновым доменом в молекуле тубулина. Эти данные согласуются с результатами исследований нашей научной группы, изучающей противоопухолевую активность пиррол-3-карбоксилатов на моделях как *in vitro*, так и *in vivo*. Например, мы обнаружили, что цитотоксическая и антипролиферативная активность этих соединений также обусловлена их способностью вмешиваться в динамическое состояние микротрубочек путем ингибирования полимеризации тубулина [25–27]. Это, в свою очередь, приводило к остановке клеточного цикла опухолевых клеток в M-фазе и индуцировало их апоптоз в результате незавершенности клеточного цикла.

На основании полученных нами ранее данных были синтезированы новые химические соединения, относящиеся к ПК, для их последующего изучения в качестве эффективных ингибиторов полимеризации тубулина, обладающих высокой активностью в отношении опухолевых клеток эпителиального происхождения (рак молочной железы, легких, простаты и др.). В частности, в результате комплексного анализа биологической активности и компьютерного моделирования 38 новых химических соединений обнаружены 2 лидерных соединения (ПК-61 и ПК-84), обладающих наименьшей энергией связывания с колхициновым доменом в молекуле тубулина и максимальной

биологической активностью в отношении широкого спектра опухолевых клеток эпителиального происхождения как *in vitro*, так и *in vivo* [30].

Было также показано, что данные химические соединения способны нарушать процессы полимеризации тубулина [30]. В рамках настоящего исследования мы показали высокую цитотоксическую и проапоптотическую активность данных соединений в отношении опухолевых клеток с признаками МЛУ. Воздействие ПК на опухолевые клетки приводило к выраженным изменениям в их морфологии, схожим с изменениями, происходящими под влиянием тубулин-деполимеризующего ХП винбластин. Способность ПК-61 и ПК-84 нарушать динамическое состояние белков цитоскелета также подтверждена результатами иммунофлуоресцентной микроскопии, показавшими диффузное распределение  $\alpha$ -тубулина в клетках, культивированных с ПК, а также с винбластином (см. рис. 2, 3). В результате нарушения формирования сети микротрубочек после воздействия ПК в опухолевых клетках наблюдались дезрегуляция клеточного цикла и их селективное накопление в М-фазе, о чем свидетельствовало значительное увеличение числа p-H3-Ser10-положительных клеток (см. рис. 5), также сопровождаемое увеличением уровня экспрессии данного белка в опухолевых клетках (см. рис. 6). Нарушения регуляции клеточного цикла после воздействия на опухолевые клетки ПК подтверждались изменениями в экспрессии других белков-регуляторов клеточного цикла, а именно Mdm2, p-Cdk-Tyr15 и циклинов B1 и A2 (см. рис. 6). Это согласуется с изменениями в морфологии клеток, культивированных с ПК (см. рис. 1), и данными проточной цитофлуориметрии, показавшими существенное увеличение числа клеток в G2/M-фазах клеточного цикла (см. рис. 4). Результатом нарушений регуляции клеточного цикла опухолевых клеток явилась их гибель по механизму апоптоза, о чем свидетельствовали повышенные уровни экспрессии расщепленных форм поли(АДФ-рибоза)-полимераза и каспазы-3 (см. рис. 7).

Таким образом, соединения 2-амино-1-бензамидо-5-(2-(нафтилен-2-ил)-2-оксоэтилиден)-4-оксо-4,5-дигидро-1-Н-пиррол-3-карбоксамид (ПК-61)

и 22-амино-5-(3,3-диметил-2-оксобутилиден)-4-оксо-1-[2-(фениламино)-бензамидо]-4,5-дигидро-1-Н-пиррол-карбоксамид (ПК-84) обладают выраженной цитотоксической и проапоптотической активностью в отношении опухолевых клеточных сублиний различного происхождения с ранее доказанными фенотипическими признаками резистентности к ХП. Данная активность ПК явилась следствием способности вышеуказанных химических соединений нарушать процессы динамического равновесия белков цитоскелета, в частности тубулина, препятствуя его полимеризации. Это, в свою очередь, приводит к нарушениям в регуляции клеточного цикла, селективному накоплению клеток в М-фазе и последующей их гибели по механизму апоптоза.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Было показано, что 2 соединения, относящихся к группе пиррол-карбоксамидов (ПК-61 и ПК-84), проявляют высокую цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток с признаками МЛУ как эпителиального, так и мезенхимального происхождения *in vitro*. Противоопухолевая активность этих соединений обусловлена их способностью к деполимеризации тубулина, что приводит к нарушению формирования сети микротрубочек в опухолевых клетках, вызывая тем самым остановку клеточного цикла в М-фазе и запуская гибель клеток по механизму апоптоза. Это показывает, что ПК, имеющие высокое сродство к колхициновому сайту связывания в тубулине, должны рассматриваться как перспективный класс противоопухолевых соединений и, следовательно, могут использоваться в качестве основы для разработки нового класса ХП с описанным выше механизмом действия. Изучение стабильности ПК в плазме, их способностей всасываться в желудочно-кишечном тракте и проникать через гематоэнцефалический барьер в настоящее время является предметом наших исследований, результаты которых будут важными для последующей оценки перспективности разработки и внедрения ПК в качестве лекарственных препаратов для терапии пациентов с солидными злокачественными новообразованиями, в том числе с фенотипом МЛУ.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Parker A.L., Kavallaris M., McCarroll J.A. Microtubules and their role in cellular stress in cancer. *Front Oncol* 2014;4:1–19. DOI: 10.3389/fonc.2014.00153
2. Dumontet C., Jordan M.A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 2010;9(10):790–803. DOI: 10.1038/nrd3253
3. Gigant B., Wang C., Ravelli R.B. et al. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature* 2005;435(7041):519–22. DOI: 10.1038/nature03566
4. 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
5. Yang J., Wang Y., Wang T. et al. Pironetin reacts covalently with cysteine-316 of  $\alpha$ -tubulin to destabilize microtubule. *Nat Commun* 2016;7:12103. DOI: 10.1038/ncomms12103
6. Prota A.E., Setter J., Waight A.B. et al. Pironetin binds covalently to  $\alpha$ Cys316 and perturbs a major loop and helix

- of  $\alpha$ -tubulin to inhibit microtubule formation. *J Mol Biol* 2016;428(15):2981–8. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.06.023
7. Steinmetz M.O., Protá 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
  8. 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* 2015;2015:690916. DOI: 10.1155/2015/690916
  9. 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.
  10. 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
  11. Protá 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
  12. Munshi N., Jeay S., Li Y. et al. ARQ 197, a novel and selective inhibitor of the human c-met receptor tyrosine kinase with antitumor activity. *Mol Cancer Ther* 2010;9(6):1544–53. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-09-1173
  13. Katayama R., Aoyama A., Yamori T. et al. Cytotoxic activity of tivantinib (ARQ 197) is not due solely to c-MET inhibition. *Cancer Res* 2013;73(10):3087–96. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-3256
  14. Aoyama A., Katayama R., Oh-Hara T. et al. Tivantinib (ARQ 197) exhibits antitumor activity by directly interacting with tubulin and overcomes ABC transporter-mediated drug resistance. *Mol Cancer Ther* 2014;13(12):2978–90. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0462
  15. Gumireddy K., Reddy M.V.R., Cosenza S.C. et al. ONO1910, a non-ATP-competitive small molecule inhibitor of Plk1, is a potent anticancer agent. *Cancer Cell* 2005;7:275–86. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.02.009
  16. Jost M., Chen Y., Gilbert L.A. et al. Combined CRISPR/a-based chemical genetic screens reveal that rigosertib is a microtubule-destabilizing agent. *Mol Cell* 2017;68(1):210–23. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.09.012
  17. Park H., Hong S., Hong S. Nocodazole is a high-affinity ligand for the cancer-related kinases ABL, c-KIT, BRAF, and MEK. *Chem Med Chem* 2012;7(1):53–6. DOI: 10.1002/cmdc.201100410
  18. Guo X., Zhang X., Li Y. et al. Nocodazole increases the ERK activity to enhance MKP-1 expression which inhibits p38 activation induced by TNF- $\alpha$ . *Mol Cell Biochem* 2012;364(1–2):373–80. DOI: 10.1007/s11010-012-1239-5
  19. Tanabe K. Microtubule depolymerization by kinase inhibitors: unexpected findings of dual inhibitors. *Int J Mol Sci* 2017;18(12):2508. DOI: 10.3390/ijms18122508
  20. Ramirez-Rios S., Michallet S., Peris L. et al. A new quantitative cell-based assay reveals unexpected microtubule stabilizing activity of certain kinase inhibitors, clinically approved or in the process of approval. *Front Pharmacol* 2020;11:543. DOI: 10.3389/fphar.2020.00543
  21. Krishna R., Mayer L.D. Multidrug resistance (MDR) in cancer: mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci* 2000;11(4):265–83. DOI: 10.1016/S0928-0987(00)00114-7
  22. Mechetner E., Kyshtoobayeva A., Zonis S. et al. Levels of multidrug resistance (MDR1) P-glycoprotein expressing by human breast cancer correlate with in vitro resistance to taxol and doxorubicin. *Clin Cancer Res* 1998;4(2):389–98.
  23. Kavallaris M., Kuo D.Y., Burkhart C.A. et al. Taxol-resistant epithelial ovarian tumors are associated with altered expression of specific beta-tubulin isoforms. *J Clin Invest* 1997;100(5):1282–93. DOI: 10.1172/JCI119642
  24. Kavallaris M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nat Rev Cancer* 2010;10(3):194–204. DOI: 10.1038/nrc2803
  25. 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 mitosis processes and induce the death of tumor cells *in vitro*. *Citologiya = Cytology* 2014;56:439–42. (In Russ.).
  26. 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
  27. 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
  28. Carta D., Bortolozzi R., Sturlese M. et al. Synthesis, structure-activity relationships and biological evaluation of 7-phenyl-pyrroloquinolinone 3-amide derivatives as potent antimetastatic agents. *Eur J Med Chem* 2017;127:643–60. DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.10.026
  29. Brindisi M., Ulivieri 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
  30. 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
  31. 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
  32. Zykova S., Kizimova I., Syutkina A. 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
  33. Boichuk S., Bikinieva F., Valeeva E. et al. Establishment and characterization of multi-drug resistant p53-negative osteosarcoma SaOS-2 subline. *Diagnostics* 2023;13:2646. DOI: 10.3390/diagnostics13162646
  34. 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
  35. 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.
  36. Pirol Ş.C., Çalıřkan B., Durmaz I. et al. Synthesis and preliminary mechanistic evaluation of 5-(p-tolyl)-1-(quinolin-2-yl)pyrazole-3-carboxylic acid amides with potent anti-proliferative activity on human cancer cell lines. *Eur J Med Chem* 2014;87:140–9. DOI: 10.1016/j.ejmech.2014.09.056
  37. Ke J., Lu Q., Wang X. et al. Discovery of 4,5-dihydro-1H-thieno[2',3':2,3]thiopyrrolo [4,5-c]pyrazole-3-carboxamide derivatives as the potential epidermal growth factor receptors for tyrosine kinase inhibitors. *Molecules* 2018;23:1980. DOI: 10.3390/molecules23081980
  38. Lin T., Li J., Liu L. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of 4-benzoylamino-1H-pyrazole-3-carboxamide derivatives as potent CDK2 inhibitors. *Eur J Med Chem* 2021;215:113281. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113281
  39. Yasuda Y., Arakawa T., Nawata Y. et al. Design, synthesis, and structure-activity relationships of 1-ethylpyrazole-3-carboxamide compounds as novel hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors. *Bioorg Med Chem* 2015;23(8):1776–87. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.02.038

40. Gul H.I., Mete E., Eren S.E. et al. Designing, synthesis and bioactivities of 4-[3-(4-hydroxyphenyl)-5-aryl-4,5-dihydropyrazol-1-yl]benzenesulfonamides. *J Enzyme Inhib Med Chem* 2017;32(1):169–75. DOI: 10.1080/14756366.2016.1243536
41. Gul H.I., Yamali C., Bulbul M. et al. Anticancer effects of new dibenzenesulfonamides by inducing apoptosis and autophagy pathways and their carbonic anhydrase inhibitory effects on hCA I, hCA II, hCA IX, hCA XII isoenzymes. *Bioorg Chem* 2018;78:290–7. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.03.027
42. Gul H.I., Yamali C., Sakagami H. et al. New anticancer drug candidates sulfonamides as selective hCA IX or hCA XII inhibitors. *Bioorg Chem* 2018;77:411–9. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.01.021
43. Yamali C., Sakagami H., Uesawa Y. et al. Comprehensive study on potent and selective carbonic anhydrase inhibitors: synthesis, bioactivities and molecular modelling studies of 4-(3-(2-arylidenehydrazine-1-carbonyl)-5-(thiophen-2-yl)-1H-pyrazole-1-yl) benzenesulfonamides. *Eur J Med Chem* 2021;217:113351. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113351
44. Mooberry S.L., Weiderhold K.N., Dakshnamurthy 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
45. Da C., Telang N., Barelli P. et al. Pyrrole-based antitubulin agents: two distinct binding modalities are predicted for C-2 analogues in the colchicine site. *ACS Med Chem Lett* 2012;3(1):53–7. DOI: 10.1021/ml200217u
46. Romagnoli R., Oliva P., Salvador M.K. et al. A facile synthesis of diaryl pyrroles led to the discovery of potent colchicine site antimetabolic agents. *Eur J Med Chem* 2021;214:113229. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113229

**Благодарность.** Авторы выражают благодарность профессору кафедры общей и органической химии Пермской государственной фармацевтической академии Н.М. Игидову за помощь в синтезе ПК, изученных в данном исследовании.

**Acknowledgment.** The authors acknowledge Professor N.M. Igidov from Perm State Academy of Pharmacy for the help in synthesis of PCs used in present study.

#### Вклад авторов

А.Р. Галембикова: разработка концепции и дизайна исследования, проведение исследования, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, редактирование, окончательное утверждение версии статьи;  
 П.Д. Дунаев: иммунофлуоресцентный анализ, анализ и интерпретация данных;  
 Ф.Ф. Бикиниева: вестерн-блоттинг, анализ и интерпретация данных;  
 И.Г. Мустафин: цитофлуориметрический анализ, анализ и интерпретация данных;  
 С.С. Зыкова, П.В. Копнин: научное консультирование;  
 Ф.И. Мухутдинова: участие в выполнении экспериментов по иммунофлуоресцентной микроскопии;  
 Е.А. Сарбазян: анализ и интерпретация данных;  
 С.В. Бойчук: разработка концепции и дизайна исследования, анализ и интерпретация данных, написание текста статьи, редактирование, окончательное утверждение версии статьи.

#### Authors' contribution

A.R. Galembikova: development of the concept and design of the study, research, analysis and interpretation of data, article writing, editing, in the final approval of the version of the article;  
 P.D. Dunaev: immunofluorescence analysis, data analysis and interpretation;  
 F.F. Bikinieva: Western blotting, analysis and interpretation of data;  
 I.G. Mustafin: flow cytometry, analysis and interpretation of data;  
 S.S. Zykov, P.V. Kopnin: scientific consulting;  
 F.I. Mukhutdinova: participation in performing experiments on immunofluorescence microscopy;  
 E.A. Sarbazyan: analysis and interpretation of data;  
 S.V. Boichuk: development of the concept and design of the study, analysis and interpretation of data, article writing, editing, in the final approval of the version of the article.

#### 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>  
 Ф.Ф. Бикиниева / F.F. Bikinieva: <https://orcid.org/0000-0002-9012-6525>  
 И.Г. Мустафин / I.G. Mustafin: <https://orcid.org/0000-0001-9683-3012>  
 С.С. Зыкова / S.S. Zyкова: <https://orcid.org/0000-0002-7395-4951>  
 П.В. Копнин / P.V. Kopnin: <https://orcid.org/0000-0002-2078-4274>  
 Ф.И. Мухутдинова / F.I. Mukhutdinova: <https://orcid.org/0009-0004-9666-0130>  
 Е.А. Сарбазян / E.A. Sarbazyan: <https://orcid.org/0009-0005-4068-662X>  
 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 authors declare no conflict of interest.

**Финансирование.** Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-00014) и в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета (ПРИОРИТЕТ-2030).

**Funding.** The study was carried out with the support of the Russian Science Foundation (grant No. 21-75-00014) and was performed as a part of Russia Strategic Academic Leadership Program (PRIORITY-2030) of Kazan Federal University of Ministry of Health.

**Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики.** Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Все пациенты подписали информированное согласие на участие в исследовании.

**Compliance with the rights and principles of bioethics.** The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of the Kazan State Medical University, Ministry of Health of Russia.

All patients signed an informed consent to participate in the study.

**Статья поступила:** 29.05.2023. **Принята к публикации:** 09.06.2023.

**Article submitted:** 29.05.2023. **Accepted for publication:** 09.06.2023.