

## Влияние пивалоил-замещённых пиррол-содержащих гетероциклических соединений на механизмы репарации повреждений ДНК клеток саркомы Юинга

Айгуль Рафиковна Галембикова<sup>1</sup>, Сергей Васильевич Бойчук<sup>1\*</sup>,  
Павел Дмитриевич Дунаев<sup>1</sup>, Рамиль Рамисович Хуснутдинов<sup>1</sup>,  
Светлана Сергеевна Зыкова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия;

<sup>2</sup>Пермский институт ФСИН России, г. Пермь, Россия

### Реферат

DOI: 10.17816/KMJ2018-245

**Цель.** Изучить механизмы репарации повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и регуляции клеточного цикла клеток саркомы Юинга под влиянием пивалоил-замещённых пиррол-содержащих гетероциклических соединений.

**Методы.** Исследования были выполнены на клеточной линии саркомы Юинга A673. Опухолевые клетки инкубировали в присутствии пивалоил-замещённых пиррол-содержащих гетероциклических соединений (соединение №20 и соединение №24) в течение 48 ч. Методом иммуноблоттинга были исследованы уровни экспрессии маркеров репарации однонитевых (фосфорилированные формы ATR и Chk1) и двунитевых (фосфорилированные формы H2AX, ATM, DNA-ПК, BRCA-1, Chk-2) разрывов ДНК. Анализ фаз клеточного цикла проводили методом проточной цитометрии (BD FACS Canto, США).

**Результаты.** Под влиянием пивалоил-замещённых пиррол-содержащих гетероциклических соединений в клетках саркомы Юинга повышался уровень экспрессии гистона 2A, фосфорилированного по остаткам серина в положении 139 ( $\gamma$ -H2AX), что свидетельствовало о наличии повреждений ДНК (двунитевых разрывов). Под влиянием пивалоил-замещённых пиррол-содержащих гетероциклических соединений в исследуемых клетках повышалась экспрессия фосфорилированных форм ATM-киназы и BRCA-1. Были также отмечены нарушения клеточного цикла, приводящие к накоплению клеток в фазах G2/M, и усиление гибели опухолевых клеток по механизму апоптоза.

**Вывод.** Пивалоил-замещённые пиррол-содержащие гетероциклические соединения индуцировали двунитевые повреждения ДНК в опухолевых клетках саркомы Юинга линии A673; в ответ на повреждение ДНК в опухолевых клетках активировались механизмы репарации двунитевых разрывов ДНК; несмотря на запуск системы репарации ДНК клетки A673 накапливались в G2/M-фазе клеточного цикла и погибали по механизму апоптоза.

**Ключевые слова:** саркома Юинга, повреждение и репарация ДНК, клеточный цикл, пивалоил-замещённые пиррол-содержащие гетероциклические соединения.

### Effect of pivaloyl-substituted pyrrole containing heterocyclic compounds on DNA repair pathways in Ewing's sarcoma

A.R. Galembikova<sup>1</sup>, S.V. Boychuk<sup>1</sup>, P.D. Dunaev<sup>1</sup>, R.R. Khusnutdinov<sup>1</sup>, S.S. Zyкова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

<sup>2</sup>Perm Penal Service Institute, Perm, Russia

**Aim.** To examine deoxyribonucleic acid (DNA) damage repair and cell cycle regulatory mechanisms of Ewing sarcoma cells exposed to pivaloyl-substituted pyrrole containing heterocyclic compounds.

**Methods.** The study was performed on A673 Ewing sarcoma cell line. The tumor cells were incubated for 48 h in the presence of pivaloyl-substituted pyrrole containing heterocyclic compounds (compounds №20 and №24). Western blot analysis was utilized to examine expression of the markers of DNA single-strand (phosphorylated forms of ATR and Chk1) and double-strand breaks (phosphorylated forms of H2AX, ATM, DNA-PC, BRCA-1, Chk-2). Analysis of the cell cycle phases was performed by flow cytometry (BD FACS Canto, USA).

**Results.** Pivaloyl-substituted pyrrole containing heterocyclic compounds substantially increased the expression of histone 2A phosphorylated on serine 138 ( $\gamma$ -H2AX) that indicates DNA damage (double-strand breaks). Under exposure to pivaloyl-substituted pyrrole containing heterocyclic compounds the studied cells increased expression of phosphorylated forms of ATM-kinase and BRCA-1. Also cell cycle disorders leading to substantial G2/M arrest and enhanced apoptosis of tumor cells were observed.

**Conclusion.** Pivaloyl-substituted pyrrole containing heterocyclic compounds induced DNA double-strand breaks in A673 Ewing sarcoma cell line; in response to DNA damage in tumor cells, the mechanisms of DNA double-strand breaks repair were activated; despite activation of DNA repair mechanisms, A673 cells underwent cell cycle arrest in the G2/M-phase and apoptosis.

**Keywords:** Ewing sarcoma, DNA damage and repair, cell cycle, pivaloyl-substituted pyrrole-containing heterocyclic compounds.

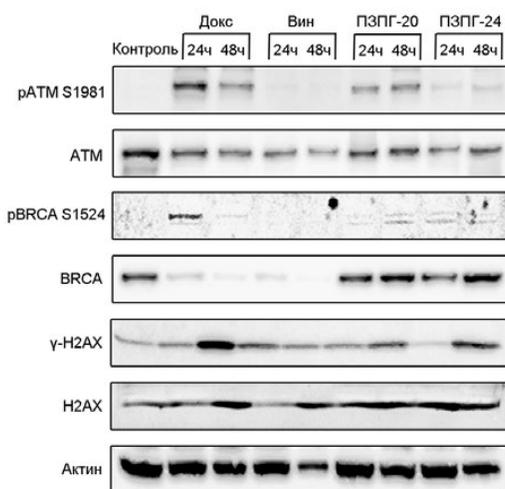
Саркома Юинга — одна из наиболее распространённых злокачественных опухолей костной ткани у детей и подростков. Заболевание впервые описал в 1921 г. американский патолог Джеймс Юинг (1866–1943). Саркома Юинга чаще встречается у мальчиков, пик заболеваемости приходится на возраст от 10 до 15 лет [1].

Данная опухоль в основном поражает диафизы длинных трубчатых костей. Кроме того, саркома Юинга может локализоваться в рёбрах, тазовых костях, лопатке и ключице. Клинически данное заболевание, как правило, проявляется болевым синдромом и развитием отёка в области поражённой кости [2]. Опухоль характеризуется весьма агрессивным течением, и у 20–30% пациентов на момент постановки диагноза отмечают метастазы (лёгкие, костная ткань, лимфатические узлы) [3].

Общая стратегия лечения саркомы Юинга включает химиотерапию с последующей оперативной и/или лучевой местной терапией [4]. К основным группам химиопрепаратов, применяемых в лечении саркомы Юинга, относятся алкилирующие агенты (ифосфамид, циклофосфамид), антрациклины (адриамицин, доксорубицин), этопозид, актиномицин D и алкалоиды барвинка (винбластин) [5, 6]. Пациентам с плохим гистологическим ответом на обычные дозы химиотерапии назначают высокие дозы бусульфана и мелфалан. Благодаря комбинации химиотерапии и местного лечения 5-летняя выживаемость больных составляет более 70%. Тем не менее, у ряда больных развиваются рецидивы опухоли, характеризующиеся тяжёлым течением и плохим прогнозом (2-летняя выживаемость после рецидива составляет 20%) [7, 8].

В соответствии с вышеизложенным представляло интерес изучить механизмы активности синтезированных нами пивалоил-замещённых пиррол-содержащих гетероциклических соединений (ПЗПГ) в отношении клеток саркомы Юинга. Ранее нами было установлено, что ПЗПГ вызывают в клетках гастроинтестинальных стромальных опухолей деполимеризацию белка тубулина. В результате этого клетки задерживаются в М-фазе клеточного цикла (митотическая катастрофа) и гибнут по механизму апоптоза [9].

Объектом исследования были опухолевые клетки саркомы Юинга линии А673 (АТСС, США). Клетки культивировали в стандартных условиях (37 °С, 5% CO<sub>2</sub>) в



**Рис. 1.** Изучение способности химиопрепаратов (доксорубицина, винбластин) и пивалоил-замещённых пиррол-содержащих гетероциклических соединений (ПЗПГ) индуцировать двуниевые разрывы ДНК в клетках саркомы Юинга линии А673 и их репарацию. Инкубация 24 и 48 ч.  $\gamma$ -H2AX — маркёр двуниевых разрывов ДНК; pATM S1981 — маркёр репарации двуниевых разрывов; pBRCA S1524 — маркёр активации гомологичной рекомбинации; H2AX, ATM, BRCA — общие (неактивированные) формы белков; актин отражает уровень белка в образцах. Доксорубицин (Докс) — 0,25 мкг/мл; винбластин (Вин) — 1 нмоль; ПЗПГ-20 — 5 мкмоль, ПЗПГ-24 — 5 мкмоль

культуральной среде DMEM («ПанЭКО») с добавлением L-глутамин («ПанЭКО»), эмбриональной телячьей сыворотки («HyClone») и антибиотиков («ПанЭКО»). При достижении 70% конfluентности к клеткам добавляли ПЗПГ №20 (ПЗПГ-20) и №24 (ПЗПГ-24) в количестве 5 мкмоль. Через 24 и 48 ч инкубации клетки подвергали лизису. Полученные клеточные лизаты методом электрофореза разделяли по молекулярной массе и детектировали с помощью биохимической реакции «антиген-антитело» методом иммуноблоттинга.

Были исследованы уровни экспрессии маркёров репарации однониевых (ATR, Chk-1) и двуниевых ( $\gamma$ -H2AX, ATM, DNA-PK, BRCA-1, Chk-2) повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК). В качестве препаратов сравнения были использованы доксорубицин в дозе 0,25 мкг/мл и винбластин в дозе 1 нмоль (Sigma-Aldrich, США).

Доксорубицин является противоопухолевым антибиотиком антрациклинового ряда и по механизму действия относится к ингибиторам ДНК-топоизомеразы II типа.

**Таблица 1.** Изучение влияния доксорубина, винбластин, ПЗПГ-20 и ПЗПГ-24 на фазы клеточного цикла опухолевых клеток линии А673

Исследуемое вещество	Фазы клеточного цикла			Апоптоз, %
	G0/G1, %	S, %	G2/M, %	
Контроль	77,1±1,0	4,8±1,6	15,4±1,6	2,1±0,9
Доксорубин, 0,25 мкг/мл	11,0±0,8*	4,1±1,0	81,8±2,1*	3,0±0,7
Винбластин, 1 нмоль	14,8±0,9*	1,3±0,6	54,0±1,2*	30,0±1,2*
ПЗПГ-20, 15 мкмоль	36,6±1,1*	8,0±0,7*	36,0±1,1*	19,4±1,1*
ПЗПГ-24, 15 мкмоль	40,3±1,2*	9,4±0,7*	33,5±0,9*	16,8±1,0*

Примечание: инкубация 48 ч; полученные результаты представлены в виде среднего арифметического значения ± стандартное отклонение; \*различия относительно контроля статистически значимы ( $p < 0,05$ ); ПЗПГ — пивалоил-замещённые пиррол-содержащие гетероциклические соединения.

Винбластин относится к митотическим ядам (так же, как и ПЗПГ, деполимеризует тубулин), является алкалоидом барвинка. Оба препарата используют в лечении саркомы Юинга.

Методом проточной цитометрии (BD FACS Canto, США) изучали влияние ПЗПГ-20, ПЗПГ-24 и химиопрепаратов на регуляцию фаз клеточного цикла опухолевых клеток линии А673, а также механизмы их гибели. Полученные результаты были подвергнуты статистической обработке с помощью программ Microsoft Excel 2007 и Biostatistica (S.A. Glantz, McGraw Hill, США). Для оценки достоверности различий изучаемых выборок использовали *t*-критерий Стьюдента. При  $p < 0,05$  различия считали статистически значимыми.

Было обнаружено, что ПЗПГ-20 и ПЗПГ-24 индуцируют фосфорилирование гистона 2 по серину 139 ( $\gamma$ -H2AX) в клетках саркомы Юинга линии А673 (рис. 1). Эффект был более выражен через 48 ч инкубации клеток с исследуемыми соединениями. Подобный эффект также отмечен у доксорубина и, в меньшей степени, у винбластин.

Повышенная экспрессия в опухолевых клетках  $\gamma$ -H2AX свидетельствует о появлении двунитевых разрывов ДНК. В пользу этого также свидетельствует активация соответствующих путей репарации ДНК, в частности белков АТМ-киназы, и BRCA1 (см. рис. 1). Увеличение экспрессии фосфорилированной формы BRCA1 свидетельствует об активации репарации двунитевых разрывов путём гомологичной рекомбинации.

Известно, что появление в клетках одонитевых разрывов ДНК сопровождается активацией соответствующих путей репарации повреждений ДНК, о чём может

свидетельствовать гиперэкспрессия фосфорилированных форм АТМ- и Chk1-киназы [10]. Результаты проведённых нами исследований показывают, что в клетках саркомы Юинга через 48 ч инкубации с соединениями ПЗПГ-20 и ПЗПГ-24 не повышалась экспрессия активированных (то есть фосфорилированных) вышеуказанных киназ, что свидетельствует о способности соединений ПЗПГ-20 и ПЗПГ-24 индуцировать в клетках линии А673 образование исключительно двунитевых разрывов ДНК.

Методом проточной цитометрии было установлено, что под влиянием ПЗПГ-20 и ПЗПГ-24 в опухолевых клетках линии А673 происходило нарушение регуляции фаз клеточного цикла, что проявлялось в виде накопления клеток в фазах G2/M клеточного цикла (табл. 1). Кроме того, соединения ПЗПГ-20 и ПЗПГ-24 индуцировали гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза (отмечалась повышенная экспрессия пропидия йодида, что указывает на наличие фрагментации молекул ДНК).

Таким образом, проведённые исследования свидетельствуют о способности ПЗПГ-20 и ПЗПГ-24 индуцировать в клетках саркомы Юинга образование двунитевых разрывов ДНК, что приводит к последующей активации АТМ-опосредованного пути репарации данных повреждений. Несмотря на активацию данной системы репарации повреждений ДНК, в опухолевых клетках происходила остановка клеточного цикла в фазе G2/M, а затем последующая их гибель по механизму апоптоза.

## ВЫВОДЫ

1. Клетки саркомы Юинга линии А673 чувствительны к пивалоил-замещённым пиррол-содержащим гетероциклическим

соединениям, индуцирующим образование двунитевых разрывов ДНК и последующую гибель опухолевых клеток по механизму апоптоза.

2. Полученные нами результаты свидетельствуют о чувствительности клеток саркомы Юинга линии А673 к пивалолил-замещённым пиррол-содержащим гетероциклическим соединениям *in vitro* и открывают перспективы для более углублённого изучения механизмов цитотоксического действия данных соединений в отношении опухолевых клеток саркомы Юинга.

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант мол\_а №16-34-01005).*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов по представленной статье.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Delattre O., Zucman J., Melot T. et al. The Ewing-family of tumors — a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N. Engl. J. Med.* 1994; 331 (5): 294–299. DOI: 10.1056/NEJM199408043310503.
2. Le Deley M.C., Delattre O., Schäfer K.L. et al. Impact of EWS-ETS fusion type on disease progression in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor: prospective results from the cooperative Euro-E.W.I.N.G. 99 trial. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28 (12): 1982–1988. DOI: 10.1200/JCO.2009.23.3585.
3. Van Doorninck J.A., Ji L., Schaub B. et al. Current treatment protocols have eliminated the prognostic advantage of type 1 fusions in Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 2010; 28 (12): 1989–1994. DOI: 10.1200/JCO.2009.24.5845.
4. Juergens C., Weston C., Lewis I. et al. Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr. Blood Cancer.* 2006; 47 (1): 22–29. DOI: 10.1002/pbc.20820.
5. Le Deley M.C., Paulussen M., Ian Lewis I. et al. Cyclophosphamide compared with ifosfamide in consolidation treatment of standard-risk Ewing sarcoma: results of the randomized noninferiority Euro-EWING99-R1 trial. *J. Clin. Oncol.* 2014; 32 (23): 2440–2448. DOI: 10.1200/JCO.2013.54.4833.
6. Womer R.B., West D.C., Krailo M.D. et al. Randomized controlled trial of interval-compressed chemotherapy for the treatment of localized Ewing sarcoma: a report from the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30 (33): 4148–4154. DOI: 10.1200/JCO.2011.41.5703.
7. Wagner L.M., McAllister N., Goldsby R.E. et al. Temozolomide and intravenous irinotecan for treatment of advanced Ewing sarcoma. *Pediatr. Blood Cancer.* 2007; 48 (2): 132–139. DOI: 10.1002/pbc.20697.
8. Haeusler J., Ranft A., Boelling T. et al. The value of local treatment in patients with primary, disseminated, multifocal Ewing sarcoma (PDMES). *Cancer.* 2010; 116 (2): 443–450. DOI: 10.1002/cncr.24740.
9. 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): 620–634. DOI: 10.1097/CAD.0000000000000372.
10. Kumagai A., Lee J., Yoo H.Y., Dunphy W.G. TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell.* 2006; 124 (5): 943–955. DOI: 10.1016/j.cell.2005.12.041.

УДК 617.713: 616-035

© 2018 Ожмухаметова Э.К. и соавторы

## Экспериментальная гнойная язва роговицы у кроликов как модель для исследования глазных лекарственных форм

Эльвира Келгембаевна Ожмухаметова<sup>1</sup>, Марат Нуkenович Мусин<sup>1</sup>, Айбол Баяхметов<sup>1</sup>, Балгын Адамбосынов<sup>1</sup>, Виталий Викторович Хуторянский<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Государственный медицинский университет, г. Семей, Казахстан;

<sup>2</sup>Университет Рединга, г. Рединг, Великобритания

### Реферат

DOI: 10.17816/KMJ2018-248

**Цель.** Создание экспериментальной модели гнойной язвы роговицы у кроликов для её использования при исследовании глазных лекарственных форм.

**Методы.** Формирование язвы роговицы сопровождается повышением температуры тела, которая была исследована в трёх группах кроликов: (1) без нанесения травмы; (2) с нанесением травмы и формированием гнойной язвы без лечения; (3) с нанесением травмы и лечением ципрофлоксацином. Параллельно проводили забор гнойного отделяемого для подсчёта колоний стафилококка. После выведения кроликов второй и третьей групп из эксперимента извлечённые роговицы были подвержены патоморфологическому анализу.