

### 3-ГИДРОКСИ-1,5-ДИАРИЛ-4-ПИВАЛОИЛ-2,5-ДИГИДРО-2-ПИРРОЛОНЫ НАРУШАЮТ ПРОЦЕССЫ МИТОЗА И ИНДУЦИРУЮТ ГИБЕЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК IN VITRO

© С. С. Зыкова,<sup>1</sup> С. В. Бойчук,<sup>2,\*</sup> А. Р. Галембикова,<sup>2</sup> Б. Р. Рамазанов,<sup>2</sup>  
И. Г. Мустафин,<sup>3</sup> Н. М. Игидов,<sup>3</sup> Т. Ф. Одегова<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Пермский институт Федеральной службы исполнения наказаний,

<sup>2</sup>Казанский государственный медицинский университет

и <sup>3</sup>Пермская фармацевтическая академия;

\* электронный адрес: boichuksergei@mail.ru

Показано, что одно из синтезированных нами соединений, относящееся к 3-гидрокси-1,5-диарил-4-пивалоил-2,5-дигидро-2-пирролонам, обладает способностью вызывать накопление клеток в фазе митоза и индуцировать их последующую гибель *in vitro*. Увеличение количества клеток в М-фазе под действием данного соединения не связано с усилением пролиферативной активности клеток, а обусловлено нарушением выхода клеток из фазы митоза. Действие соединения более выражено по отношению к опухолевым клеткам, чем к фибробластам человека. Необходимо проведение дальнейших исследований для изучения молекулярных механизмов действия соединений, относящихся к группе 3-гидрокси-1,5-диарил-4-пивалоил-2,5-дигидро-2-пирролонов.

Ключевые слова: арилиденариламины, пивалоилпировиноградная кислота, 3-гидрокси-1,5-диарил-4-пивалоил-2,5-дигидро-2-пирролоны, фибробласты, опухолевые клетки, катастрофа в митозе, апоптоз, противоопухолевая активность.

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в последнее время в области терапии больных злокачественными новообразованиями, эффективность нехирургических методов лечения (химио- и радиотерапии) продолжает оставаться невысокой, что обуславливает необходимость поиска новых эффективных лекарственных средств.

Известно, что гетероциклические структуры, содержащие азот в качестве гетероатома, обладают разнообразными видами биологической активности — противомикробной, противовоспалительной и анальгетической (Насакин, 2000; Ширинкина, 2000; Зыкова, 2002; Пидэмский, 2008). В качестве удобных синтонов для получения гетероциклических систем широко используются 1,3,4-трикарбонильные соединения, которые представлены различными ацил- и арилпировиноградными кислотами. Из 1,3,4-трикарбонильных соединений в качестве реагента, обладающего достаточно низкой токсичностью, была выбрана пивалоилпировиноградная кислота. Продуктами взаимодействия пивалоилпировиноградной кислоты с арилиденариламинами являются замещенные 3-гидрокси-1,5-диарил-4-пивалоил-2,5-дигидро-2-пирролоны (рис. 1), которые обладают умеренной бактериостатической активностью, ранее исследованной на кафедре микробиологии Пермской государственной фармацевтической академии (Зыкова, 2002).

В настоящее время имеются единичные исследования по изучению противоопухолевой активности у 4-пивалоилзамещенных-2-пирролонов. Например, исследова-

ния, проведенные на некоторых опухолевых линиях (MCF-7 — рак молочной железы, NCI-H460 — рак легких и др.) в ряде случаев выявили значительное (>50 %) торможение роста опухолей (Зыкова, 2002).

В настоящей работе исследовали *in vitro* противоопухолевую активность синтезированных нами 4-пивалоилзамещенных-2-пирролонов, и в частности их способность нарушать процесс митоза в опухолевых клетках и индуцировать их последующую гибель.

#### Материал и методика

Было исследовано 7 соединений, относящихся к классу 4-пивалоилзамещенных-2-пирролонов. Объектами исследования служили фибробласты человека линии BJ tert (контроль), опухолевые клетки линии HeLa S3 (аденокарцинома шейки матки), U2OS (остеосаркома) и H1299 (немелкоклеточный рак легкого). Клетки культивировали в полной культуральной среде DMEM (или RPMI-1640), содержащей антибиотики (пенициллин и стрептомицин), L-глутамин (ПАНЭКО, Россия) и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США). Клетки культивировали в соответствующей культуральной среде в присутствии вышеуказанных соединений в течение 72 ч при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>.

Считали общее количество клеток, количество клеток в фазе митоза, а также количество жизнеспособных и погибших клеток, оцениваемых по включению трипанового

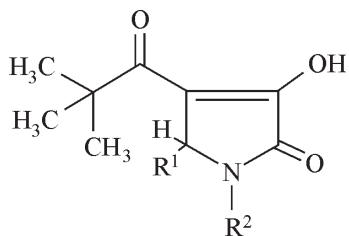


Рис. 1. Общая формула замещенных 3-гидроксн-1,5-диарил-4-пивалоил-2,5-дигидро-2-пирролонов.

синего. Подсчет количеств клеток в фазе митоза, а также анализ клеточного цикла проводили методом проточной цитометрии, используя моноклональные антитела (МАТ) к гистону 3 (H3) (Cell Signaling, США) и иодистый пропидий (Sigma, США).

### Результаты

В ходе проведения скрининга на предмет потенциальной противоопухолевой активности 4-пивалоилзамещенных-2-пирролонов было выявлено соединение 5-амино-4-пивалоил-1-о-бромфенил-2-пирролон, обладающее способностью вызывать гибель клеток *in vitro*. Было обнаружено, что на ранних сроках культивирования (24 ч)

в присутствии этого соединения (5 и 10 мкМ) у всех исследованных клеточных линий значительно увеличивалось количество клеток округлой формы (при  $P < 0.01$ ) (рис. 2, показано *стрелками*), что позволило высказать предположение о возможном накоплении данных клеток в М-фазе клеточного цикла. Последующие исследования подтвердили правомочность данного предположения. Увеличение количества клеток, находившихся в стадии митоза, было подтверждено методами иммунофлуоресценции, а также проточной цитометрии, позволившими выявить значительное увеличение числа H3-позитивных клеток спустя 24 ч их культивирования в присутствии 5-амино-4-пивалоил-1-о-бромфенил-2-пирролона (рис. 3).

Увеличение числа митотических клеток под влиянием исследованного соединения было обусловлено, на наш взгляд, задержкой клеток в М-фазе клеточного цикла и не являлось следствием стимуляции их пролиферативной активности. В пользу этого свидетельствовали следующие факты. Во-первых, общее число клеток спустя 24 ч культивирования с тестируемыми соединениями не отличалось существенным образом от контрольного значения. Во-вторых, значительное увеличение количества клеток в М-фазе клеточного цикла наблюдали в значительно большей степени в опухолевых клетках, чей митотический индекс был изначально существенно выше по сравнению с фибробластами человека. В-третьих, на последующих сроках инкубации (48 и 72 ч) данное соединение вызыва-

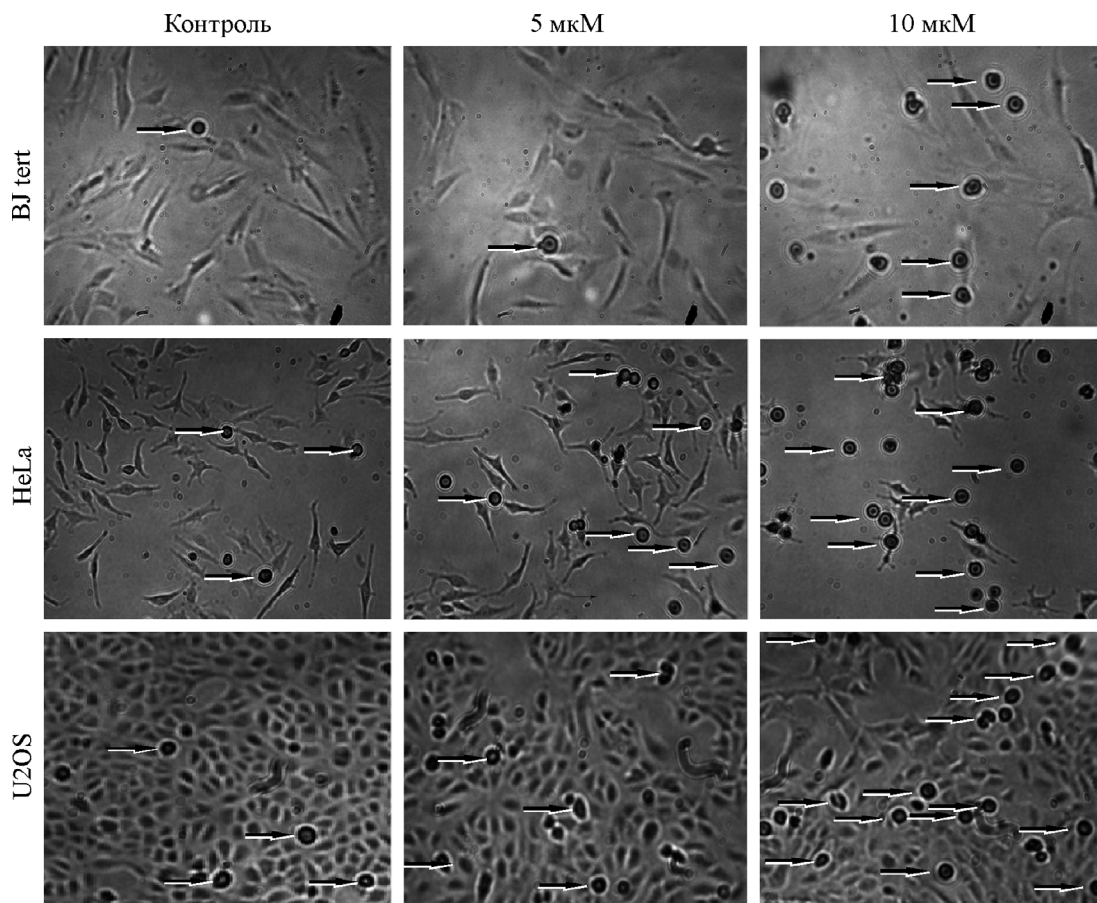


Рис. 2. Дозозависимое увеличение числа клеток округлой формы (*стрелки*) при культивировании фибробластов человека линии BJ tert, опухолевых клеток линий HeLa и U2OS в присутствии 5-амино-4-пивалоил-1-о-бромфенил-2-пирролона (5 и 10 мкМ) в течение 24 ч.

Об. 100×.

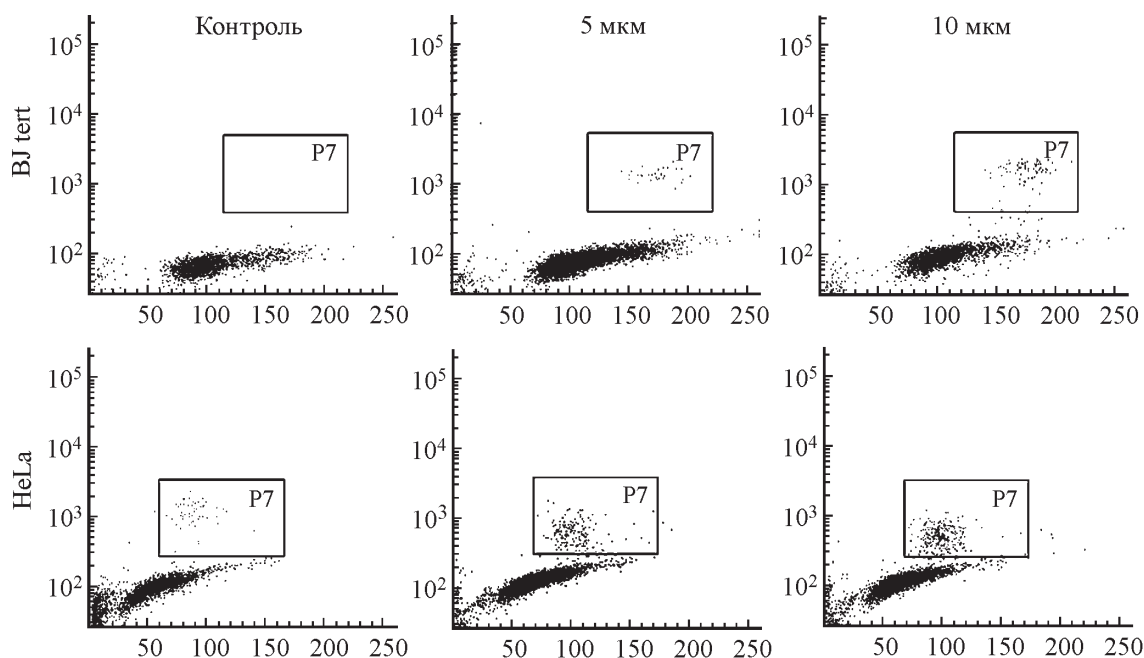


Рис. 3. Изменение числа фибробластов линии BJ tert и клеток линии HeLa в М-фазе клеточного цикла через 24 ч культивирования в присутствии 5-амино-4-пивалоил-1-о-бромфенил-2-пирролона.

По горизонтали — интенсивность флуоресценции иодистого пропидия (содержание ДНК); по вертикали — число клеток в М-фазе (регион P7, выделен рамкой), оцениваемое по интенсивности свечения моноклональных антител к гистону 3, меченных FITC.

ло гибель клеток, о чем свидетельствовало значительное уменьшение числа жизнеспособных клеток, оцениваемого по включению трипанового синего (при  $P < 0.01$ ), и общего числа клеток. Кроме того, данные, полученные методом проточной цитометрии, выявили увеличение числа гиподиплоидных клеток в присутствии вышеуказанного соединения, что указывало на индукцию апоптоза как одного из возможных механизмов их гибели.

### Обсуждение

В настоящее время в практической онкологии имеется несколько групп лекарственных препаратов, основной механизм действия которых обусловлен их способностью нарушать процессы деления (т. е. митоза) опухолевых клеток и индуцировать их последующую гибель. К первой группе препаратов, обладающих подобной активностью, относятся винкаалкалоиды, обладающие сродством к молекулам тубулина микротрубочек и тем самым препятствующие его полимеризации, что приводит к остановке митоза на стадии метафазы. Другая группа лекарственных препаратов относится к таксанам, которые в отличие от винкаалкалоидов связываются со свободным тубулином (Diaz, 1993) и повышают скорость его полимеризации, стимулируя тем самым сборку и стабилизацию уже сформировавшихся микротрубочек, что препятствует в дальнейшем деполимеризации тубулина и распаду микротрубочек. Таким образом, таксаны нарушают функционирование клеток при митозе (М-фаза) и в интерфазе. Нарушения процессов митоза делают невозможным продолжение клеточного цикла, что приводит к последующей гибели клетки, например вследствие запуска в ней процессов программированной клеточной гибели (апоптоза). Данный феномен получил название «катастрофы в митозе» (Vakifahmetoglu, 2005). Следовательно,

способность лекарственных противоопухолевых препаратов инициировать «митотическую катастрофу» в опухолевых клетках является одним из механизмов, обуславливающих эффективность их применения (Еом, 2005).

Результаты наших исследований показали, что некоторые из соединений, относящихся к классу пятичленных азотсодержащих гетероциклических соединений, также обладают способностью нарушать процессы митоза клеток и вызывать их последующую гибель. Накопление клеток в М-фазе под действием исследованных соединений может свидетельствовать о нарушении выхода клеток из стадии митоза, что приводит к их последующей гибели вследствие незавершенности клеточного цикла. Обнаруженный нами эффект подобен эффекту противоопухолевых препаратов из группы таксанов, нарушающих процессы деполимеризации тубулина, что приводит к незавершенности процесса митоза («митотическая катастрофа») и последующей гибели клеток. Несмотря на то что преимущественным механизмом гибели клеток в данном случае является апоптоз, описаны также случаи гибели клеток по механизму некроза (Morse, 2005). Данный вариант гибели клеток является преобладающим у клеток с нарушениями в регуляции программы апоптоза, в частности имеющих р53-зависимые дефекты в системе поддержания генетической стабильности и регуляции апоптоза. Проведение дальнейших исследований позволит исследовать молекулярные механизмы обнаруженного нами феномена накопления клеток в М-фазе клеточного цикла под действием вышеуказанных соединений, а также их последующей гибели.

Важно отметить, что обнаруженный нами эффект 4-пивалоилзамещенных-2-пирролонов при их использовании в малых концентрациях (1 и 5 мкМ) был значительно более выражен в некоторых опухолевых клеточных линиях, чем в фибробластах человека (рис. 2), что

позволяет рассматривать их в качестве потенциальных кандидатов, обладающих противоопухолевой активностью и большей широтой терапевтического действия («терапевтическое окно») по сравнению с имеющимися в настоящее время противоопухолевыми препаратами, нарушающими процессы митоза опухолевых клеток и индуцирующими их последующую гибель (таксаны и винкалкалоиды). Таким образом, проведенные исследования показали, что среди 4-пивалоилзамещенных-2-пирролонов поиск веществ, обладающих противоопухолевой активностью, является актуальным и весьма перспективным.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 13-04-00255 и 14-04-32304 мол\_а).

### Список литературы

- Зыкова С. С. 2002. Реакции некоторых 1,2,4-трикарбонильных и 1,3,4,6-тетракарбонильных систем с аминами и арилиденарилaminaми в синтезе биологически активных веществ. Автореф. канд. дис. Пермь. 22 с.
- Зыкова С. С., Козьминых В. О., Игидов Н. М. 2002. Синтез и фармакологическая активность 3-гидрокси-1,5-диарил-4-пивалоил-2,5-дигидро-2-пирролонов. Хим.-фарм. журн. 36 (4) : 23—26. (Zykova S. S., Kozminykh V. O., Igidov N. M. 2002. Synthesis and pharmacological activity of 3-hydroxy-1,5-diaryl-4-pivaloyl-2,5-dihydro-2-pyrrolone. Chem.-Farm. J. 36 (4) : 23—26.)
- Насакин О. Е., Лычиков А. Н., Каюков Я. С., Шевардов В. П. 2000. Противоопухолевая активность некоторых производных полинитрилов. Хим.-фарм. журн. 34 (4) : 11—14. (Nasakin O. E., Lyschikov A. N., Kayukov Ya. S., Sheverdov V. P. 2000. Anti-tumor activity of some derivatives polynitriles. Chem.-Farm. J. 34 (4) : 11—14.)
- Пидэмский Е. Л., Махмудов Р. Р. 2008. Скрининг и изучение механизма действия флоголитиков, нейротропных и противомикробных средств. Пермь: Пермский ун-т. 1 : 116 с. (Pidemsky E. L., Mahmudov R. R. 2008. Screening and scrutiny of the mechanisms of action flogoliticov, neurotropic and antimicrobials. Perm: Perm. un-t. 1 : 116 p.)
- Ширинкина С. С., Игидов Н. М., Березина Е. С., Козьминых В. О. 2000. Взаимодействие пивалоилпировиноградной кислоты с арилиденарилaminaми в синтезе новых биологически активных соединений. Материалы юбил. межвуз. научно-практ. конф. Пермской гос. фарм. акад. Пермь. 1 : 82. (Shirinkina S. S., Igidov N. M., Berezina E. S., Kozminykh V. O. 2000. The interaction between pivaloilpirovinoogradnoy acid and arilidenarilamins in the synthesis of new biologically active compounds. Materials of the anniversary intercollege scientific and practical conference of Perm State Pharm. Acad. Perm. 1 : 82.)
- Diaz J. F., Andreu J. M. 1993. Assembly of purified GDP-tubulin into microtubules induced by taxol and taxotere: reversibility, ligand stoichiometry, and competition. Biochemistry. 32 : 2747—2755.
- Eom Y. W., Kim M. A., Park S. S., Goo M. J., Kwon H. J., Sohn S., Kim W. H., Yoon G., Choi K. S. 2005. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. Oncogene. 24 : 4765—4777.
- Morse D. L., Gray H., Payne C. M., Gillies R. J. 2005. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. Mol. Cancer Ther. 4 : 1495—1504.
- Vakifahmetoglu H., Olsson M., Zhivotovsky B. 2008. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. Cell Death Differ. 15 : 1153—1162.

Поступила 4 II 2014

### 3-HYDROXY-1,5-DIARYL-4-PIVALOYL-2,5-DIHYDRO-2-PYRROLONES INDUCE THE MITOTIC EXIT FAILURE AND CELL DEATH IN TUMOR CELLS *IN VITRO*

S. S. Zykova,<sup>1</sup> S. V. Boichuk,<sup>2,\*</sup> A. R. Galebikova,<sup>2</sup> B. R. Ramazanov,<sup>2</sup>  
I. G. Mustafin,<sup>3</sup> N. M. Igidov,<sup>3</sup> T. F. Odegova<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Perm Institute of the Federal Penal Service, <sup>2</sup> Kazan State Medical University  
and <sup>3</sup> Perm State Pharmaceutical Academy;  
e-mail: boichuksergei@mail.ru

Some compound referring to the 3-hydroxy-1,5-diaryl-4-pivaloyl-2,5-dihydro-2-pyrrolones have been found to cause an increase in the number of mitotic cells and their subsequent death *in vitro*. This increased in the number of mitotic cells was not associated with increased cellular proliferative activity and was likely due to mitotic exit failure. Of note, the effect was more pronounced in the tumor cells when compared to human fibroblasts. Further studies are needed to investigate the molecular mechanisms of action of the compounds belonging to the class of 3-hydroxy-1,5-diaryl-4-pivaloyl-2,5-dihydro-2-pyrrolones.

**Key words:** arylidenarilamines, acylpyruvic acid, 3-hydroxy-1,5-diaryl-4-pivaloyl-2,5-dihydro-2-pyrrolones, fibroblasts, tumor cells, mitotic catastrophe, apoptosis, anti-tumor activity.