

ЕПИШКИНА А. А., ДЕРЯБИНА О. Н., БЛИНОВА Е. В., РУБАДАНОВА Н. Р.
ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОИЗВОДНЫХ
ПИРИДИНКАРБОНОВЫХ КИСЛОТ IN VITRO¹

Аннотация. Рак молочной железы – один из наиболее часто встречающихся видов злокачественных опухолей у женщин, занимающий второе место в структуре смертности после рака легких. Для оценки роли обратного транспорта как механизма первичной резистентности опухолевых клеток к новым противоопухолевым агентам, были использованы две клеточные линии трижды негативного рака молочной железы человека, одна из которых экспрессирует (культура клеток MDA-MB-231 (HTB-26), ATCC, США), а другая не экспрессирует протеин обратного транспорта рака молочной железы BCRP (BT20, ATCC, США). В работе изучены соединения пиридинкарбоновых кислот с лабораторными шифрами ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19. Экспериментально было показано наличие первичной резистентности к соединению ЛХТ-13-17 и ее отсутствие к веществу ЛХТ-17-19, обусловленное обратным BCRP-опосредованным транспортом молекул активного вещества.

Ключевые слова: пиридинкарбоновые кислоты, трижды негативный рак молочной железы, BCRP-протеин.

EPISHKINA A. A., DERYABINA O. N., BLINOVA E. V., RUBADANOVA N. R.
IN VITRO STUDY OF THE PHARMACOLOGICAL EFFICIENCY OF
PYRIDINECARBOXY ACID DERIVATIVES

Abstract. Breast cancer is one of the most common types of malignant tumors in women, ranking second in the structure of mortality after lung cancer. To assess the role of reverse transport as a mechanism of primary resistance of tumor cells to new antitumor agents, two triple-negative human breast cancer cell lines were used, one of which expresses (cell culture MDA-MB-231 (HTB-26), ATCC, USA) and the other does not express the breast cancer reverse transport protein BCRP (BT20, ATCC, USA). In this work, compounds of pyridinecarboxylic acids with laboratory codes LHT-13-19 and LHT-17-19 were studied. The presence of primary resistance to the LHT-13-17 compound and its absence to the LHT-17-19 substance, due to the reverse BCRP-mediated transport of the active substance molecules, was experimentally shown.

Keywords: pyridinecarboxylic acids, triple-negative breast cancer, BCRP protein.

¹ Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации НШ-843.2022.3 (соглашение №075-15-2022-842 от 12 мая 2022 г.).

Введение. Онкологические заболевания являются второй по значимости причиной смертности населения на Земле. Онкологическая заболеваемость также растет в течение последних десятилетий как в экономически развитых, так и в развивающихся странах, вследствие, главным образом, повышения воздействия различных факторов риска, а также увеличения продолжительности жизни. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), рак молочной железы (РМЖ) является причиной смертности женщин во всем мире (возрастная группа: 20–59 лет) (Мировая статистика здравоохранения, 2013 г.). По данным глобального онкологического проекта (GLOBOCAN 2012) рак молочной железы считается второй наиболее часто встречающейся патологией в мире [1].

Рак молочной железы является часто встречающимся заболеванием в менее развитых и промышленно развитых странах, а также второй заметной причиной смертности в Европе и Соединенных Штатах Америки после рака легких [2].

Рак молочной железы представляет собой патологию, возникающую из ткани молочной железы, особенно из молочных протоков (протоковая карцинома составляет 80% случаев), а также из долек [1].

Трижды негативный рак молочной железы (ТНРМЖ) – молекулярный подтип опухоли составляет примерно 15% инвазивного рака молочной железы (РМЖ). Определяется отсутствием экспрессии рецептора эстрогена / рецептора прогестерона и рецептора 2 эпидермального фактора роста человека (HER2).

ТНРМЖ более распространен у женщин в пременопаузе, у носителей мутаций гена предрасположенности к раку молочной железы 1 или 2 (BRCA 1/2). ТНРМЖ имеет неблагоприятный прогноз по сравнению с другими подтипами РМЖ. Данный подтип характеризуется более агрессивным клиническим течением, более ранними рецидивами с метастатическим распространением и снижением общей выживаемости [3; 4].

Пациенты с трижды негативным раком молочной железы имеют различные клинические исходы, в том числе неоднородные показатели полного патологического ответа (pCR) после неoadъювантной химиотерапии (НАСТ) на ранней стадии заболевания, а также различный ответ на терапию и последующую выживаемость при метастазах [5]. Генетическая гетерогенность опухоли может в значительной степени объясняться этим феноменом [6; 7].

Крупные усилия по секвенированию генома расширили понимание молекулярной гетерогенности ТНРМЖ. Приблизительно 70% ТНРМЖ перекрывается с базальноподобным внутренним подтипом. Молекулярные подтипы TNBC также были идентифицированы Lehmann et al., которые включают базальноподобный 1 (BL1), базальноподобный 2 (BL2), иммуномодулирующий (IM), мезенхимальный (M), мезенхимальный стволоподобный (MSL), и люминальный андрогенный рецептор (LAR) [6]. Они были далее классифицированы Burstein

et al. на четыре подтипа: положительные по андрогенным рецепторам (AR), мезенхимальные, базальноподобные иммуносупрессивные и базальноподобные иммуноактивируемые [7]. Несколько исследований показали, что эти подтипы могут предсказывать ответ на таргетную терапию. Однако эти подтипы обычно не используются в клинической практике, и цитотоксическая химиотерапия остается основным методом лечения. Дальнейшее понимание молекулярной и транскриптомической характеристики ТНPMЖ может привести к новой молекулярно-таргетной терапии ТНPMЖ [8].

Цель работы: изучить фармакологическую активность некоторых производных пиридинкарбоновых кислот *in vitro*.

Материал и методы. Для оценки роли обратного транспорта как механизма первичной резистентности опухолевых клеток к новым противоопухолевым агентам, были использованы две клеточные линии трижды негативного рака молочной железы человека, одна из которых экспрессирует (культура клеток MDA-MB-231 (НТВ-26), АТСС, США), а другая не экспрессирует протеин обратного транспорта рака молочной железы BCRP (BT20, АТСС, США).

В качестве объекта исследования изучены 2 соединения: производные пиридинкарбоновых кислот, соединения с лабораторными шифрами ЛХТ-13-19 и ЛХТ-17-19, синтезированные в отделе химии и технологии синтетических лекарственных средств и аналитического контроля Всесоюзного научного центра по безопасности биологически активных веществ под руководством д.х.н, профессора С. Я. Скачиловой.

Опухолевые линии инкубировали в течение 24 часов в присутствии исследуемых веществ в следующих средних подавляющих концентрациях: для соединения ЛХТ-17-19 – $4,8 \times 10^{-5}$ М, для ЛХТ-13-19 – $8,4 \times 10^{-5}$ М, для АХ-554 – $2,3 \times 10^{-4}$ М.

Первоначально клетки каждой опухолевой линии рассеивались в количестве 8×10^3 штук на лунку в 96-ячеечный планшет. Водные растворы соединений добавляли в среду культивирования спустя 24 часа после начала культивации в эффективной противоопухолевой концентрации. Вещество в каждой изученной концентрации вносили в 5 лунок. Культуры инкубировали в CO₂-инкубаторе в затемненных условиях в течение 24 часов.

Оценку выживаемости клеток проводили с помощью колориметрического теста с трифенилтетразолия хлоридом.

Результаты. Инкубация опухолевых клеток культуры BT20, не экспрессирующей BCRP-протеин, с $8,4 \times 10^{-5}$ М соединения ЛХТ-13-19 также сопровождалась формированием заметного цитостатического эффекта, проявляющегося в гибели в среднем 77% опухолевых клеток. Однако экспозиция той же концентрации действующего вещества исследуемого соединения в культуре BCRP-позитивного трижды негативного рака молочной железы не

вызывала цитотоксического действия (различия при межгрупповом сравнении достоверны при $p = 0,001$), следовательно, молекула ЛХТ-13-19 подвергается обратному переносу из опухолевых клеток культуры трижды негативного рака молочной железы и не может рассматриваться в качестве альтернативы препаратам, к которым сформирована первичная или вторичная резистентность (рис. 1).

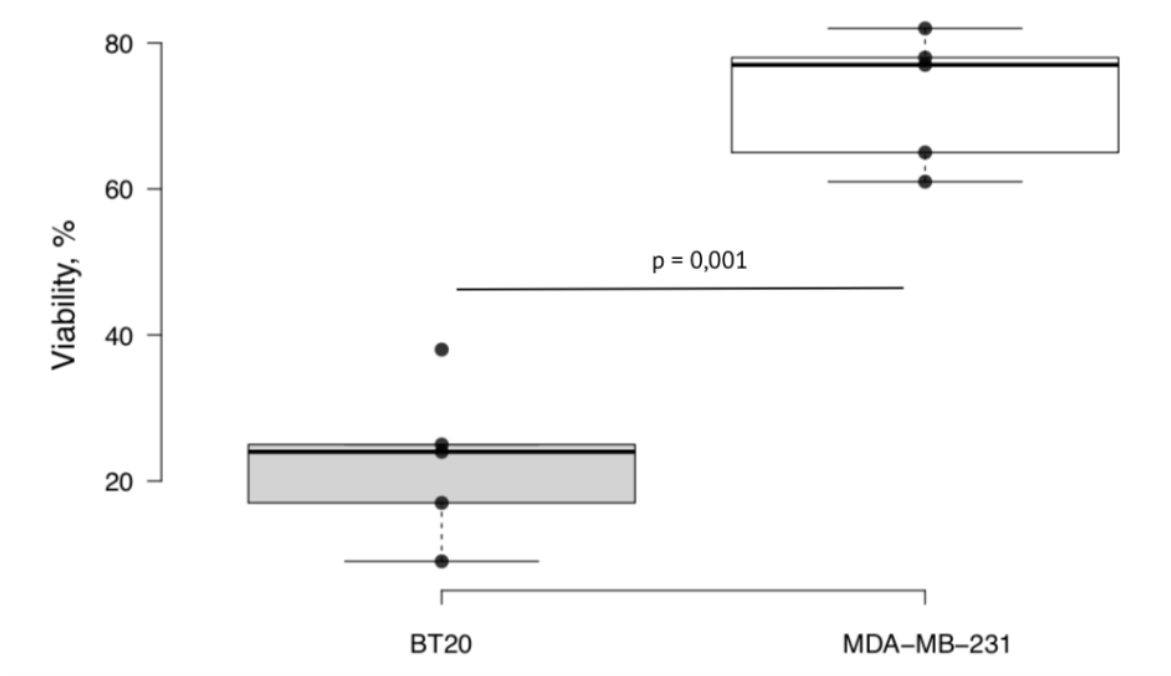


Рис. 1. Зависимость цитотоксического действия соединения ЛХТ-13-19 в концентрации $8,4 \times 10^{-5}$ М в линейных координатах при культивировании в культурах клеток рака молочной железы человека BT20 и MDA-MB-231; по оси ординат – процент выживших клеток в тесте МТТ; достоверность различий определена с использованием критерия Манна-Уитни.

Инкубация опухолевых клеток культуры BT20, не экспрессирующей BCRP-протеин, с соединением ЛХТ-17-19 в концентрации $4,8 \times 10^{-5}$ М, сопровождалась формированием значительного цитостатического эффекта, проявляющегося в гибели в среднем 86,5% опухолевых клеток. Экспозиция той же концентрации фармацевтической субстанции соединения в культуре BCRP-позитивного рака молочной железы также вызывала формирование сопоставимого цитотоксического действия (различия при межгрупповом сравнении недостоверны, $p = 0,06$). Это свидетельствует о том, что на представленной модели резистентного трижды негативного рака молочной железы в отношении соединения ЛХТ-17-19 не происходит активации механизма обратного транспорта молекулы лекарственного вещества (рис. 2).

Таким образом, резистентность к доксорубину и паклитакселу тройного негативного РМЖ может быть обусловлена обратным BCRP-опосредованным транспортом молекул

активного вещества. Подобный эффект наблюдается у соединения ЛХТ-13-19, тогда как соединение ЛХТ-17-19 не обладает резистентностью, обусловленное обратным BCRP-опосредованным транспортом молекул активного вещества.

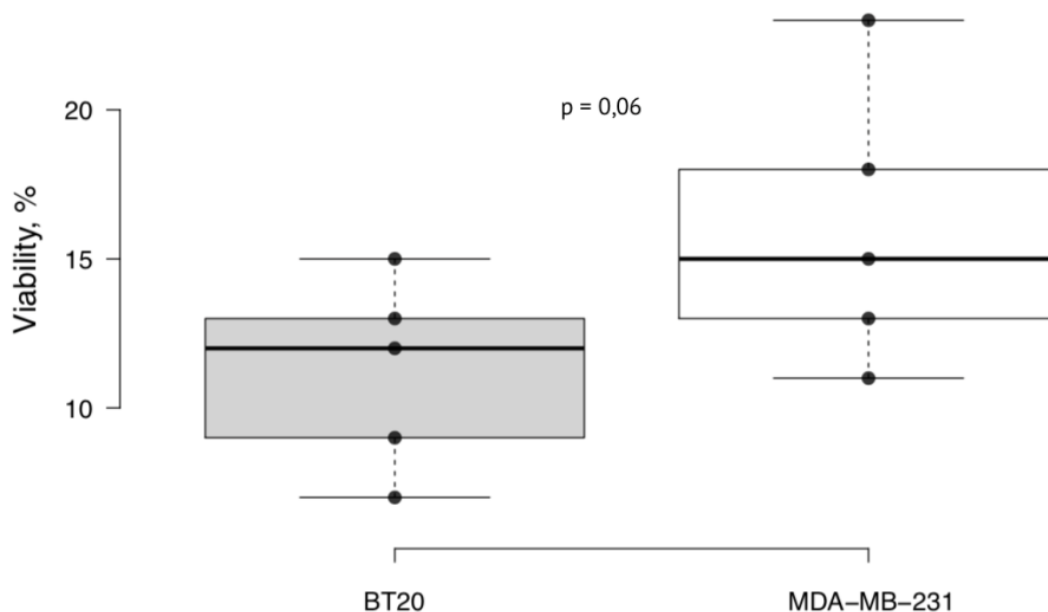


Рис. 2. Зависимость цитотоксического действия соединения ЛХТ-17-19 в концентрации $4,8 \times 10^{-5}$ М в линейных координатах при культивировании культурах клеток рака молочной железы человека BT20 и MDA-MB-231; по оси ординат – процент выживших клеток в тесте МТТ; достоверность различий определена с использованием критерия Манна-Уитни.

Заключение. Цитотоксическое действие исследуемых производных пиридинкарбоновых кислот на молекулярно подобных культурах трижды негативного рака молочной железы человека имеет различие, обусловленное экспрессией BCRP-протеина, способствующего обратному транспорту молекул из опухолевой клетки. Это позволило выделить две потенциальные молекулы – кандидата и исключить одну молекулу с точки зрения первичной резистентности опухоли. Экспериментально было показано наличие первичной резистентности к соединению ЛХТ-13-17 и ее отсутствие к веществу ЛХТ-17-19, обусловленное обратным BCRP-опосредованным транспортом молекул активного вещества.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gonche M., Purnamdar Z., Salehinia H. Incidence, mortality and epidemiology of breast cancer in the world Asian package // J. Cancer Prev. APJCP. – 2016. – Vol. 17, supp. 3. – P. 43–46.
2. Czerny G., Khmelik E., Czerny B., Toth T. New stage breast cancer based on TNM. Arch of Virchow // International J. Patol. – 2018. – Vol. 472 (5). – P. 697–703.

3. Dent R., Trudeau M., Pritchard K. I., Hanna V. M., Kahn H. K., Savka K. A. Triple-negative breast cancer: clinical features and recurrence pattern // *Wedge Cancer Res.* – 2007. – Vol. 13 (15). – P. 4429–4434.
4. Savci-Heijink C. D., Halfwerk H., Hooijer G.K.J., Horlings H.M., Wesseling J., van de Vijver M. J. A retrospective analysis of the metastatic behavior of breast cancer subtypes // *Treatment of breast cancer.* – 2015. – Vol. 150 (3). – P. 547–557.
5. Silva J. L., Cardoso Nunes N.C., Izetti P. Triple negative breast cancer: a thorough review of biomarkers // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* – 2020. – Vol. 145. – P. 102855.
6. Lehmann B. D., Pitenpole J. A. Clinical implications of molecular heterogeneity in triple negative breast cancer // *Breast.* – 2015. – Vol. 24 (2). – P. 36–40.
7. Burshtein M. D., Tsimelzon A., Poazh G. M. Comprehensive genomic analysis reveals new subtypes and targets for triple-negative breast cancer // *Wedge Cancer Res.* – 2015. – Vol. 21 (7). – P. 1688–1698.
8. Sukumar Ja., Gast K., Quiroga D., Lustberg M., Williams N. Triple-negative breast cancer: promising predictive biomarkers under development // *Expert Review of Anticancer Therapy.* – 2021. – Vol. 21 (2). – P. 135–148.