

# Неканоническое влияние ингибиторов тирозинкиназ для терапии злокачественных опухолей на экспрессию генов

Кузеванова А.Ю., Карпукхин А.В., Алимов А.А.

ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»;  
115522, г. Москва, ул. Москворечье, д.1

Таргетные препараты для лечения онкологических заболеваний, в частности, мультикиназные ингибиторы сунитиниб и сорафениб, широко применяются в онкологической практике, и изучение особенностей их применения весьма актуально. На модели культивируемых раковых клеток *in vitro* показано, что ингибиторы киназ способны усиливать экспрессию генов опухолевой прогрессии (*SNAI1*, *SNAI2*, *CD44*, *CDH1*, *CLDN1*), связанных с эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП). Показана активация таких генов при действии низких доз тирозинкиназных ингибиторов – сунитиниба и сорафениба. Активация изученных генов была различной в разных культурах и зависела от примененного препарата. Предположено, что в силу локального неравномерного распределения лекарственных средств в тканях опухоли, ингибиторы киназ могут являться одной из причин активации экспрессии генов, ассоциированных с ЭМП, и, таким образом, способствовать ее прогрессии.

**Ключевые слова:** экспрессия, гены, сунитиниб, сорафениб, злокачественные опухоли

**Для цитирования:** Кузеванова А.Ю., Карпукхин А.В., Алимов А.А. Неканоническое влияние ингибиторов тирозинкиназ для терапии злокачественных опухолей на экспрессию генов. *Медицинская генетика* 2021; 20(12): 34-39.

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2021.12.34-39

**Автор для корреспонденции:** Кузеванова Анна Юрьевна, e-mail: anka.kuzevanka@yandex.ru

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках государственного задания Минобрнауки России для ФГБНУ «МГНЦ» на выполнение НИР в 2021 году.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Поступила:** 01.12.2021.

## *The non-canonical effect of tyrosine kinase inhibitors for the treatment of malignant tumors on gene expression*

Kuzevanova A.Yu., Karpukhin A.V., Alimov A.A.

Research Centre for Medical Genetic  
1, Moskvorechie st., Moscow, 115522, Russian Federation

Targeted drugs for the treatment of oncological diseases, in particular, the inhibitors of Sunitinib and Sorafenib, are widely used in oncological practice and the study of the peculiarities of their application is very relevant. On the models of cultured cancer cells *in vitro* it was shown that kinase inhibitors are able to strengthen the expression of tumor progression genes (*SNAI1*, *SNAI2*, *CD44*, *CDH1*, *CLDN1*) associated with the epithelial-mesenchymal transition (EMT). The activation of such genes is shown under the action of low doses of tyrosine kinase inhibitors - Sunitinib and Sorafenib. The activation of the studied genes was different in different cultures and depended on the applied drug. It was assumed that due to the local uneven distribution of drugs in tissues of the tumor, kinase inhibitors may be one of the reasons for activating the expression of genes associated with the epithelial-mesenchymal transition, and thus contribute to its progression.

**Keywords:** expression, genes, sunitinib, sorafenib, malignant tumors.

**For citation:** Kuzevanova A.Yu., Karpukhin A.V., Alimov A.A. The non-canonical effect of tyrosine kinase inhibitors for the treatment of malignant tumors on gene expression. *Medicinskaya genetika [Medical genetics]* 2021; 20(12): 34-39. (In Russ.)

**DOI:** 10.25557/2073-7998.2021.12.34-39

**Corresponding author:** Anna Yu. Kuzevanova, e-mail: anka.kuzevanka@yandex.ru

**Funding.** The research was carried out within the state assignment of Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation.

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

**Accepted:** 01.12.2021.

## Введение

Последнее десятилетие ознаменовалось разработкой целого ряда принципиально новых терапевтических подходов для лечения онкологических заболеваний. Тем не менее, даже в случае хирургической резекции опухоли с последующим лечением, доля пациентов с рецидивом остается достаточно большой и может достигать десятков процентов [1]. Использование лекарственных средств на основе ингибиторов тирозинкиназы является неотъемлемой частью современных схем химиотерапии, где они применяются как в моно, так и в комбинированных режимах [2]. К отличительной особенности таргетных препаратов на основе мультикиназных ингибиторов можно отнести, с одной стороны, их селективное дозозависимое действие на мишени, с другой — трудно контролируемое влияние на весь спектр сигнальных путей, связанных с таргетным белковым продуктом гена. Частично это обусловлено вариативностью значений константы ингибирования, которая, например, для рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3) сунитинибом составляет: 0,002 мкМ; 0,009 мкМ; 0,017 мкМ соответственно [3]. Кроме того, в настоящее время обсуждается вклад мультинаправленного действия ингибиторов киназ на изменение экспрессии сигнальных молекул и, как следствие, на активацию опухолевой прогрессии, ведущей к рецидиву [4]. Неравномерность распределения препарата в опухолевой ткани и последующее усиление опухолевой гетерогенности, по-видимому, могут являться важными причинами недостаточной эффективности применяемых схем лечения [5]. Изменение клетками опухоли фенотипа под воздействием экзогенных и эндогенных факторов, называемое эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП), является важнейшим этапом опухолевой прогрессии, который включает подавление экспрессии гена E-кадгерина, нарушение межклеточных контактов, реорганизацию цитоскелета, усиление клеточной подвижности, а также деградацию межклеточного матрикса за счет усиления экспрессии матриксных металлопротеаз клетками опухоли [6]. Этот процесс ассоциирован с активацией экспрессии ряда ядерных факторов, включая TWIST1/2, ZEB1/2, SNAI1/2, а также изменением уровня экспрессии мембранных белков CD44, CLDN1, CDH1 [7]. Перечисленные гены рассматриваются в качестве молекулярно-генетических маркеров опухолевой прогрессии, и изучение особенностей их экспрессии под воздействием лекарственных средств является одним из актуальных направлений в области молекулярной онкологии в настоящее время [8]. Целью нашего пилотного исследования яв-

лялась оценка изменения экспрессии генов опухолевой прогрессии при действии ингибиторов киназ сунитиниба и сорафениба на клетки опухоли в зависимости от концентрации препарата.

## Методы

### Культивирование клеток

Перевиваемые клеточные линии меланомы melMTP, аденокарциномы альвеолярного базального эпителия A549, карциномы толстой кишки HT29 и HCT116 культивировали в стандартных условиях в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, в клеточном CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. В качестве тестируемых субстанций мультикиназных ингибиторов использовали: sunitinib malate ≥98% (HPLC), Sigma-Aldrich, США; sorafenib ≥98% (HPLC), Sigma-Aldrich, США. Стоковый раствор препаратов готовили с использованием диметилсульфоксида (ДМСО), для получения растворов тестируемых концентраций использовали фосфатно-солевой буфер. В контрольные клетки (клетки сравнения) во всех случаях вносили эквивалентное по объему количество ДМСО.

### MTT тест

Оценку метаболической активности клеток проводили стандартным образом с использованием тетразолиевого красителя (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия). Тестируемые препараты добавляли к клеткам через 24 часа после посева, инкубировали 72 часа в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Затем в культуру клеток вносили рабочий раствора МТТ (5 мг/мл) и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе 2 часа. По завершении инкубации среду в планшете заменяли на раствор ДМСО и определяли оптическую плотность раствора формазана при длине волны 550 нм. Измерение проводили с использованием многофункционального планшетного анализатора «Perkin Elmer EnSpire Model 2300 Multilabel Microplate Reader», Perkin Elmer.

### Проточная цитометрия

Измерение соотношения между фракциями живых и мертвых клеток в образце проводили с использованием набора «Abcam's Apoptosis/Necrosis Detection Kit» в строгом соответствии с протоколом производителя. Набор позволяет определять фракции клеток с локализацией фосфатидилсерина на наружной стороне мембраны (зеленая флуоресценция, Ex/Em = 490/525 нм) и долю мертвых клеток (поздняя стадия апоптоза и некроза) с проницаемой для 7-аминоактиномицина мембраной (красная флуоресценция, Ex/Em = 546/647 нм),

а также оценить долю живых клеток благодаря окрашиванию их цитоплазмы CytoCalcein Violet 450 (синяя флуоресценция, Ex/Em = 405/450 нм). Измерения осуществлялись на проточном цитометре CytoFLEX, Beckman Coulter, Германия.

#### *Количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР)*

Суммарную фракцию РНК из клеток выделяли общепринятым способом с использованием реагента «ExtractRNA», Евроген, Россия. Образцы дополнительно обрабатывали ДНКазой I, после чего проводили очистку с использованием набора «CleanRNA Standard», Евроген, Россия. Синтез комплементарной цепи ДНК осуществляли с использованием набора реагентов «MMLV RT kit», Евроген, Россия. Относительное определение уровня представленности транскрипта в образце проводили с использованием стандартного оборудования и программного обеспечения компании Thermo Fisher Scientific, США, Applied Biosystems QuantStudio 5. В качестве внутреннего контроля использовали ген *GAPDH*. Праймеры для тестирования уровня экспрессии генов *CD44*, *CLDN1*, *CDH1*, *SNAI1* и *SNAI2* были выбраны на основании существующих в литературе рекомендаций [9]. В качестве контроля использовали необработанные ингибиторами соответствующие культивируемые клетки, относительно экспрессии генов в которых определяли экспрессию исследуемых генов после воздействия на клетки ингибиторов тирозинкиназ.

#### *Статистическая обработка данных*

Статистическую обработку данных осуществляли с использованием пакета программ Microsoft Excel 2019.

### **Результаты и обсуждение**

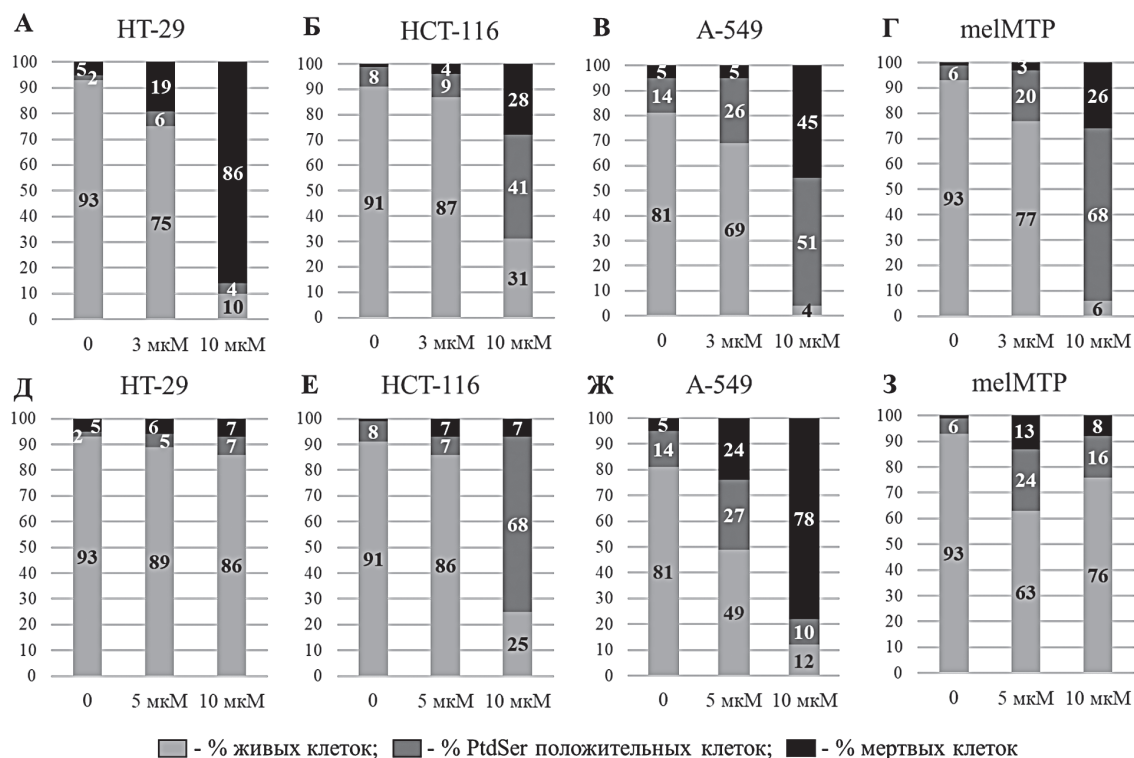
На первоначальном этапе для проведения исследования была сформирована панель перевиваемых клеточных линий, полученных из опухолей различной локализации, которая включала клетки меланомы линии melMTP, аденокарциномы альвеолярного базального эпителия A549, карциномы толстой кишки HT29 и HCT116. Определена их чувствительность к тестируемым мультикиназным ингибиторам. В качестве критерия чувствительности использовали значение концентрации полумаксимального ингибирования, IC50, определенное с использованием МТТ теста. Это позволило ранжировать клетки по чувствительности к сунитинибу и сорафенибу в следующей последовательности: для сунитиниба: HCT116

< melMTP < HT29 < A549 (значения IC50 7,4 мкМ; 14,5 мкМ; 15,1 мкМ; 18,2 мкМ соответственно); для сорафениба: HCT116 < A549 < melMTP < HT29 (значения IC50 4,4 мкМ; 5,2 мкМ; 13,1 мкМ; 13,2 мкМ соответственно). Полученные данные показали, что используемая панель клеточных линий содержала как чувствительные, так и устойчивые к действию ингибиторов клетки. Однако оценка цитотоксичности киназных ингибиторов с использованием МТТ теста имеет ряд ограничений и не в полной мере отражает весь спектр действия тестируемых концентраций на особенности течения внутриклеточных процессов. Для уточнения эффекта действия препаратов на исследуемые популяции клеток были проведены дополнительные эксперименты с использованием проточной цитометрии.

В экспериментах по оценке действия мультикиназных ингибиторов на популяции раковых клеток, растущих в культуре, оценивали способность внутриклеточных неспецифических эстераз активировать флуоресцентный зонд CytoCalcein Violet 450; активность ферментов флиппаз по накоплению фосфатидилсерина на внешней стороне мембраны, а также проницаемость клеточной мембраны для 7-аминоактиномицина. Дополнительно определяли относительное изменение количества клеток популяции. Использовали несколько концентраций препаратов. Для сунитиниба были использованы концентрации 3 мкМ, 10 мкМ; для сорафениба — 5 мкМ и 10 мкМ. Результаты тестирования представлены на **рис. 1** и в **табл. 1** и **2**.

Согласно полученным данным, представленным в табл. 1, тестируемые концентрации ингибиторов способны подавить пролиферативную активность клеток, однако доля жизнеспособных клеток среди них остается высокой, о чем свидетельствуют данные представленные в табл. 2.

Для оценки возможной активации генов опухолевой прогрессии в результате действия киназных ингибиторов были проведены специальные эксперименты по подбору концентраций препаратов, тормозящих, но не блокирующих полностью пролиферативную активность клеток. Тестировались концентрации 0,15 мкМ, 0,5 мкМ, 1 мкМ, 3 мкМ, 5 мкМ, 10 мкМ. Для продолжения исследований в качестве максимально высокой была выбрана концентрация 3 мкМ, которая при расщепе клеток в количестве  $2 \times 10^4$ , позволяла получить конfluence 70–80% через 10–17 суток в зависимости от клеточной линии и используемого препарата. В отсутствие ингибиторов киназ это значение достигается на 4–5-е сутки после стандартного расщепе. В качестве минимальной концентрации использовали концентрацию 0,15 мкМ для обоих препара-



**Рис. 1.** Результаты проточной цитометрии клеток после 72 часов культивирования в присутствии: А, Б, В, Г – сунитиниба; Д, Е, Ж, З – сорафениба. По оси ординат – доля клеток в процентах; по оси абсцисс – концентрация препарата; 0 – диметилсульфосид.

Таблица 1

**Относительное изменение численности клеточной популяции после 72 часов культивирования в присутствии ингибиторов киназ, RI\***

| Клеточная линия                | Концентрация препарата |     |                |      |          |
|--------------------------------|------------------------|-----|----------------|------|----------|
|                                | Сунитиниб, мкМ         |     | Сорафениб, мкМ |      | Контроль |
|                                | 3                      | 10  | 5              | 10   |          |
| Меланома melMTP                | 0,4                    | 0,3 | 0,3            | 0,3  | 1        |
| Аденокарцинома легкого A549    | 1                      | 0,6 | 0,23           | 0,16 | 1        |
| Карцинома толстой кишки HT-29  | 0,6                    | 0,2 | 0,79           | 0,51 | 1        |
| Карцинома толстой кишки HCT116 | 0,7                    | 0,3 | 0,18           | 0,14 | 1        |

**Примечание:** \*  $RI = N_{tr}/N_{ntr}$ , где RI – относительный показатель численности клеточной популяции (relative indicator);  $N_{tr}$  – число клеток после обработки;  $N_{ntr}$  – число клеток в группе сравнения (без обработки)

Таблица 2

**Доля жизнеспособных клеток ( $N_v$ )\* после 72 часов культивирования в присутствии ингибиторов киназ, проценты (%)**

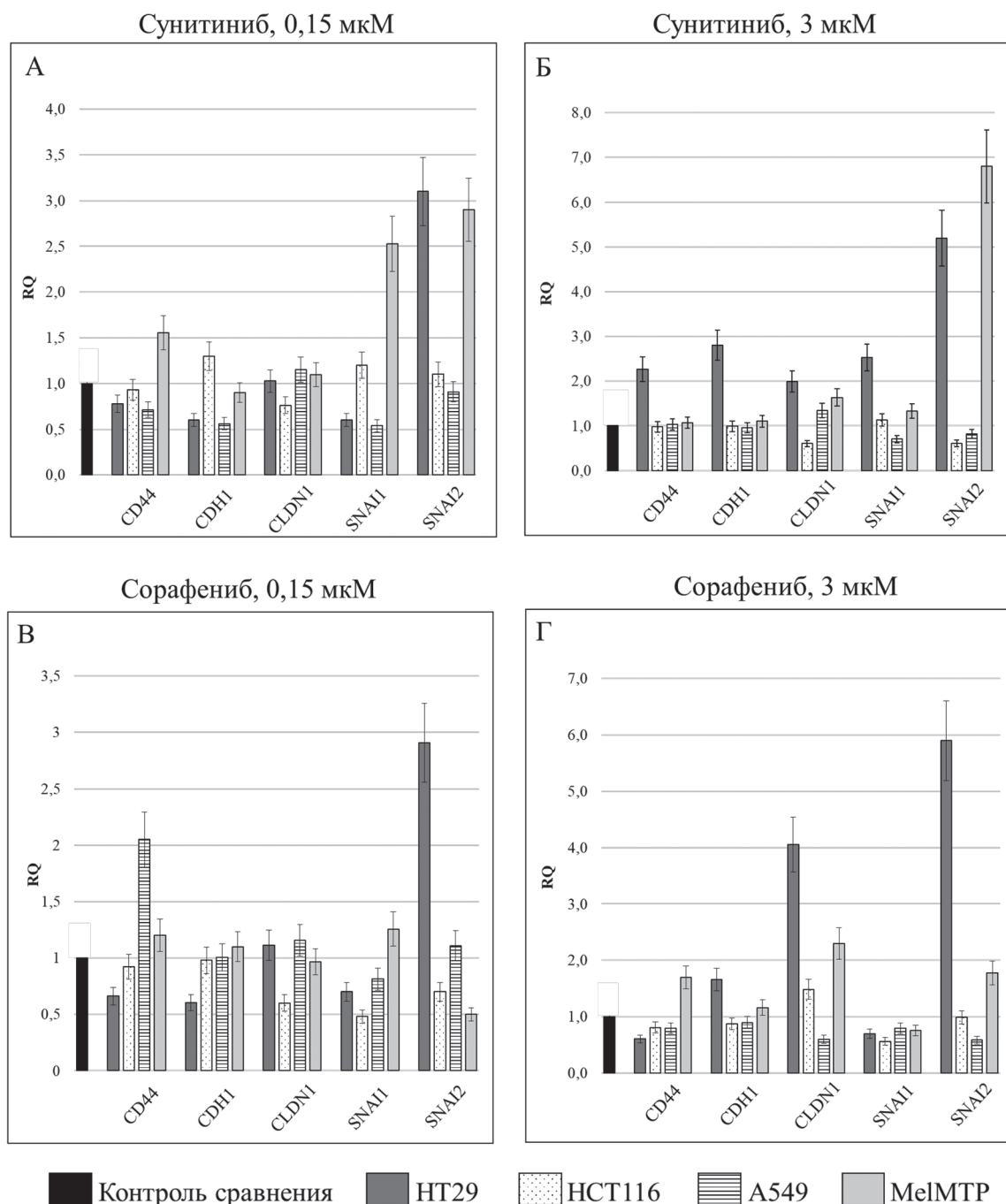
| Клеточная линия                | Концентрация препарата |    |                |    |          |
|--------------------------------|------------------------|----|----------------|----|----------|
|                                | Сунитиниб, мкМ         |    | Сорафениб, мкМ |    | Контроль |
|                                | 3                      | 10 | 5              | 10 |          |
| Меланома melMTP                | 77                     | 6  | 63             | 76 | 93       |
| Аденокарцинома легкого A549    | 69                     | 4  | 49             | 12 | 81       |
| Карцинома толстой кишки HT-29  | 75                     | 10 | 89             | 86 | 93       |
| Карцинома толстой кишки HCT116 | 87                     | 31 | 86             | 25 | 91       |

**Примечание:** \*  $N_v = N_{all} - N_{ps} - N_d$ , где  $N_{all}$  – суммарная фракция всех клеток, использованных для расчетов;  $N_v$  – жизнеспособные клетки с активными эстеразами;  $N_{ps}$  – фракция клеток с фосфатидилсерин на внешней стороне мембраны;  $N_d$  – мёртвые клетки с мембраной, проницаемой для 7-аминоактиномицина.

ратов. Результаты оценки изменения уровня экспрессии генов представлены на **рис. 2**.

Из представленных на **рисунке** данных следует, что даже очень низкие концентрации киназных ингибито-

ров (0,15 мкМ) способны оказать влияние на усиление экспрессии генов-маркеров ЭМП. Как видно, разные культуры в разной степени чувствительны к воздействию низких доз препаратов: в случае сунитиниба за-



**Рис. 2.** Сравнение уровней экспрессии генов *CD44*, *CDH1*, *CLDN1*, *SNAI1*, *SNAI2* в опухолевых клетках, культивируемых в присутствии тирозинкиназных ингибиторов: А – сунитиниба в концентрации 0,15 мкМ; Б – сунитиниба в концентрации 3 мкМ; В – сорафениба в концентрации 0,15 мкМ; Г – сорафениба в концентрации 3 мкМ. По оси Y – относительное количество транскрипта.

регистрировано усиление транскрипционной активности ядерных факторов *SNAIL* и *SNAI2* в клетках меланомы *melMTP* и *SNAI2* в клетках карциномы прямой кишки *HT29*. Существуют различия и в действии разных препаратов: для сорафениба усиление экспрессии гена *SNAI2* наблюдали только в клетках карциномы прямой кишки *HT29*. Однако низкие дозы сорафениба усиливали экспрессию маркера опухолевой прогрессии *CD44* в клетках аденокарциномы легкого *A549*. Обращает внимание, что и чувствительность генов к активации экспрессии также различна. Наиболее легко активируемыми среди исследованных оказались гены *SNAIL* и *SNAI2*.

При тестировании определенной экспериментально концентрации 3 мкМ в обоих случаях наблюдали изменение экспрессии генов, кодирующих как ядерные факторы транскрипции, так и мембранные белки. В случае сунитиниба было зарегистрировано усиление экспрессии мРНК генов *CD44*, *CLDN1*, *CDH1*, *SNAIL* и *SNAI2* в клетках аденокарциномы толстой кишки *HT29*. Для сорафениба увеличение мРНК было отмечено для генов *CLDN1* в клетках линий *HT29* и *melMTP*, а также *SNAI2* в клетках аденокарциномы толстой кишки *HT29*. Обращает на себя внимание, что наблюдаемые эффекты носили специфичный характер и наблюдались не во всех типах тестируемых раковых клеток, что можно объяснить различиями структурно-функциональных свойств культур, производных от разных типов рака. Наибольшая чувствительность к действию препаратов была зарегистрирована у клеток карциномы толстой кишки *HT29*, минимальная — у клеток карциномы толстой кишки *HCT116*. Это наблюдение позволяет предположить отсутствие прямой связи гистологической природы опухоли с неканоническим влиянием мультикиназных ингибиторов на активацию экспрессии генов. Полученный результат предполагает существование механизмов активации экспрессии этих генов при участии мультикиназных ингибиторов, которые могут быть связаны с взаимодействием сигнальных путей. Создание специальных тестовых систем, позволяющих оценить подобные эффекты в клинической практике, позволит в будущем повысить качество терапевтического лечения

онкобольных в рамках концепции персонализированной медицины.

### Заключение

Таким образом, изучено изменение экспрессии генов, влияющих на ЭМП, при воздействии на культуры раковых клеток мультикиназных ингибиторов. Обнаружена активация таких генов при действии низких доз тирозинкиназных ингибиторов сунитиниба и сорафениба. Активация изученных генов была различной в разных культурах и зависела от примененного препарата. Найденное явление может проявляться в злокачественных опухолях больных и приводить к прогрессии опухоли и усилению ее злокачественности.

### Литература/References

1. Mahvi D.A., Liu R., Grinstaff M.W., Colson Y.L., Raut C.P. Local Cancer Recurrence: The Realities, Challenges, and Opportunities for New Therapies. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):488-505. doi:10.3322/caac.21498
2. Huang L., Jiang S., Shi Y. Tyrosine kinase inhibitors for solid tumors in the past 20 years (2001-2020). *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):143. doi:10.1186/s13045-020-00977-0
3. Faivre S., Demetri G., Sargent W., Raymond E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6(9):734-745. doi:10.1038/nrd2380
4. López de Andrés J., Griñán-Lisón C., Jiménez G., Marchal J.A. Cancer stem cell secretome in the tumor microenvironment: a key point for an effective personalized cancer treatment. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):136. doi:10.1186/s13045-020-00966-3
5. Zhu L., Jiang M., Wang H., et al. A narrative review of tumor heterogeneity and challenges to tumor drug therapy. *Ann Transl Med.* 2021;9(16):1351. doi:10.21037/atm-21-1948
6. Yang J., Antin P., Berx G., et al. Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition [published correction appears in *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2021 Dec;22(12):834]. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020;21(6):341-352. doi:10.1038/s41580-020-0237-9
7. Lamouille S., Xu J., Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(3):178-196. doi:10.1038/nrm3758
8. Hwang H.S., Go H., Park J.M., et al. Epithelial-mesenchymal transition as a mechanism of resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear cell renal cell carcinoma. *Lab Invest.* 2019;99(5):659-670. doi:10.1038/s41374-019-0188-y
9. Hwang H.S., Go H., Park J.M., et al. Epithelial-mesenchymal transition as a mechanism of resistance to tyrosine kinase inhibitors in clear cell renal cell carcinoma. *Lab Invest.* 2019;99(5):659-670. doi:10.1038/s41374-019-0188-y