

## ПРОТИВОБЛАСТОМНЫЕ СРЕДСТВА

### ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ПРОГЕСТЕРОНА НА ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ И ЭКСПРЕССИЮ мРНК ЭСТРОГЕННОГО РЕЦЕПТОРА АЛЬФА В КЛЕТКАХ HeLa

А. В. Семейкин<sup>1</sup>, Е. Н. Карева<sup>1</sup>, Т. А. Федотчева<sup>1</sup>, А. С. Лунина<sup>1</sup>,  
И. С. Левина<sup>2</sup>, В. М. Ржезников<sup>3</sup>, Н. Л. Шимановский<sup>1</sup>

Изучено влияние новых лигандов рецепторов прогестерона прегна-D'-пентарана — 6-метоксиимино-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион (K1047), 17 $\alpha$ -ацетокси-3 $\beta$ -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-она (бутерол), прогестерона (P<sub>4</sub>) и медроксипрогестерона ацетата на жизнеспособность клеток HeLa и экспрессию в них гена эстрогенного рецептора (ER $\alpha$ ). Установлена высокая цитостатическая активность K-1047 и бутерола, превосходящая препараты сравнения в среднем на 15 %,  $p < 0,05$ . Бутерол и K1047 ( $10^{-6}$  М) подавляли экспрессию гена ER $\alpha$  на 83,4 – 98,6 % соответственно.

**Ключевые слова:** гестагены; бутерол; медроксипрогестерона ацетат; жизнеспособность клеток; экспрессия генов; рецепторы эстрогенов.

#### ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на то, что прогестины широко применяют для терапии рака эндометрия (медроксипрогестерон, мегестрол) и профилактики гормонзависимых гиперплазий тканей репродуктивного тракта женщины (медроксипрогестерон, прогестерон) [4] и достаточно хорошо известны их механизмы действия (подавление экспрессии эстрогенных рецепторов (преимущественно типа альфа) в ткани-мишени [10] и снижение активности инсулиноподобных факторов роста [1, 7]), они не всегда эффективны и могут вызывать побочные эффекты (тромбоэмболии, эрозия шейки матки, дисменорея и др.), что делает актуальным расширение спектра существующих препаратов гестагенов.

В этом аспекте интерес представляет возможность модификации молекулы прогестерона, позволяющая получать новые синтетические гестагены — прегна-D'-пентараны путем введения дополнительного карбоцикла в 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -положения молекулы прогестерона [3].

В настоящей работе исследовано действие нового прегна-D'-пентаран-6-метоксиимино-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-диона (K1047) [8], а также отечественного прогестина 17 $\alpha$ -ацетокси-3 $\beta$ -бутаноилокси-6-метил-прегна-4,6-диен-20-он (бутерол), проявляющего высокую специфическую гормональную активность [2, 9] в сравнении с прогестероном и медрок-

сипрогестероном, на жизнеспособность культивируемых клеток рака шейки матки HeLa и экспрессию в них мРНК эстрогенных рецепторов (ER $\alpha$ ).

#### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Культуру HeLa (из банка клеток Института вирусологии им. И. И. Мечникова) выращивали в стандартных условиях (37 °С, 5 % CO<sub>2</sub>) на среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (“ПанЭко”) с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки и 40 мкг/мл гентамицина (“ПанЭко”, Россия). Все манипуляции проводили в ламинарбоксе ЛС (Россия). Исследуемые соединения (6-метоксиимино-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -циклогексанопрегн-4-ен-3,20-дион, K1047, синтезирован в лаборатории химии стероидных соединений, зав. д.х.н. И. В. Заварзин, Института органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН), бутерол (синтезирован в ФГБУ “Эндокринологический научный центр” Минздрава России), прогестерон (“Sigma”), медроксипрогестерона ацетат (МПА) (“Sigma”) растворяли в диметилсульфоксиде до концентрации  $10^{-2}$  М, последовательно разводили в среде инкубации и вносили в лунки плоскостонного 96-луночного планшета Costar до конечных концентраций  $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  М.

Инкубацию проводили в течение 4 – 7 сут, затем оценивали жизнеспособность клеток культуры при помощи МТТ-теста [12], учитывая оптическую плотность лунок при 530 нм на планшетном фотометре “Униплан” (“Пикон”, Россия).

Экспрессию мРНК ER $\alpha$  в клетках после инкубации в течение 7 сут оценивали методом RT-ПЦР (iCycleriQ5 real-time PCR (“BioRad”, США)). В качестве гена сравнения использовали ген GAPDH (глицеральдегид-фосфатдегидрогеназа, “Синтол”, Россия).

<sup>1</sup> ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н. И. Пирогова Минздрава России, Россия, 117997, Москва, ул. Островитянова, д. 1.

<sup>2</sup> ФГБУН Институт органической химии им. Н. Д. Зелинского РАН, Россия, Москва, Ленинский просп., 47.

<sup>3</sup> ФГБУ “Эндокринологический научный центр” Минздрава России, Россия, Москва.

Для оценки числа копий мРНК применяли  $\Delta\text{Ct}$ -метод по формуле  $1/2^{-\Delta\text{Ct}}$  (для выявления различий) и  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  (для определения кратности разницы), где  $\text{Ct}$  — пороговый цикл, соответствующий числу циклов амплификации, необходимых для достижения порогового значения флуоресценции метки,  $\Delta\text{Ct}$  — разница между пороговым циклом исследуемого гена и геном сравнения (GAPDH),  $\Delta\Delta\text{Ct}$  — сравнение значений  $\Delta\text{Ct}$  контрольного и опытного образцов.

Все данные исследования статистически обработаны с использованием программы Microsoft Office Excel 2007 и Graph Pad Prizm 5.0. Данные представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартная ошибка или Me — медиана. Проверку соответствия распределения выборочных значений закону нормального распределения проводили с помощью критерия Колмогорова — Смирнова. Сравнение значений для параметрических показателей производили с использованием критерия Стьюдента, для непараметрических — критерия Манна – Уитни ( $U$ ). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в исследовании принимали  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

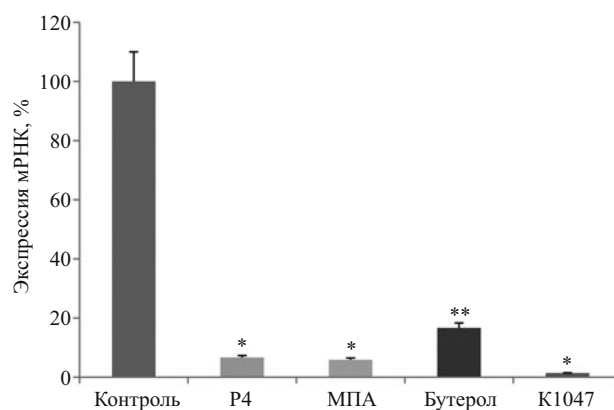
Достоверных колебаний показателя жизнеспособности культуры HeLa при инкубации в течение 4 сут с изучаемыми стероидами не выявлено. Влияние тестируемых соединений на жизнеспособность культуры HeLa при инкубации в течение 7 сут по данным МТТ-теста представлены в таблице.

Максимальное подавление жизнеспособности клеток культуры HeLa наблюдалась в присутствии бутерола (38,5 – 52,1 %) и соединения K1047 (13,3 – 38,0 %). Бутерол достоверно превосходит по цитостатической активности  $\text{P}_4$  и МПА во всех концентрациях ( $p < 0,05$ ).

Суммируя данные по действию соединений во всех изученных концентрациях ( $10^{-7}$  –  $10^{-5}$  М) на жизнеспособность клеток HeLa, ряд исследуемых веществ расположили по убыванию цитостатической активности: бутерол  $>$  K1047  $\geq$   $\text{P}_4$  = МПА.

Существенный вклад в проявленную бутеролом высокую цитостатическую активность вносит трансформация кольца А, а именно замена 3-кето-группы, характерной для пентарана, МПА и природных гестагенов, на сложноэфирную связь в бутероле. Цитостатический эффект стероидов носит дозозависимый характер, при этом бутерол достоверно активнее МПА во всех концентрациях (в среднем на 26,1 %).

В данной работе изучена связь между цитостатической активностью стероидных соединений и их влиянием на экспрессию ER $\alpha$ . Из литературных данных [6, 7, 11] известно, что гестагены (прогестерон, МПА) оказывают down-регуляцию на эстрогенные рецепторы (в основном ER $\alpha$ ), тем самым снижая эстрогенные эффекты.



Влияние прегна-D'-пентарана K1047, бутерола, прогестерона и МПА ( $10^{-6}$  М) на уровень экспрессии генов ER $\alpha$  в клетках HeLa (в % от контроля,  $M \pm SE$ ).

Примечание: контроль — 100 %.

\* Достоверное отличие от контроля ( $p < 0,05$ ),

\*\* достоверное отличие от  $\text{P}_4$  и МПА ( $p < 0,05$ ).

Оценку уровня экспрессии ER $\alpha$  проводили на 7 сут инкубации в присутствии  $10^{-6}$  М исследуемых соединений. Результаты исследования представлены на рисунке.

По данным, представленным на рисунке, все соединения в концентрации  $10^{-6}$  М вызывают снижение экспрессии гена ER $\alpha$  в клетках HeLa на 83,4 – 98,6 % ( $p = 0,05$ ).

Бутерол хотя и вызывает весьма значительное подавление экспрессии гена ER $\alpha$  (в среднем на 83,4 % относительно контроля), однако оно достоверно меньше (в среднем на 10,3 %), чем аналогичный показатель для препаратов сравнения (МПА — на 94,1 %,  $\text{P}_4$  — на 93,3 %). K1047 вызывал максимальное ингибирование (на 98,6 %).

Таким образом, отечественные производные прогестерона бутерол и K1047 превосходят либо равны прогестерону и МПА по цитостатической активности и являются перспективными соединениями для дальнейшего изучения в отношении гормонотерапии гиперпластических процессов тканей мишеней репродуктивного тракта женщины.

По-видимому, более высокое цитостатическое действие бутерола, чем других производных прогестерона, обусловлено не только подавлением экспрессии

**Влияние прегна-D'-пентарана K1047, бутерола, прогестерона и МПА на жизнеспособность клеток HeLa ( $n = 4 - 7$ , инкубация в течение 7 сут, подавление в процентах от контроля,  $M \pm SE$ )**

Концентрация, М	Прогестерон	МПА	Бутерол	K1047
$10^{-5}$	35,1 $\pm$ 6,1*	32,5 $\pm$ 4,8*	52,1 $\pm$ 2,0**	38,0 $\pm$ 12,6*
$10^{-6}$	10,2 $\pm$ 2,4	15,3 $\pm$ 3,3	43,7 $\pm$ 2,0**	16,4 $\pm$ 6,4*
$10^{-7}$	11,1 $\pm$ 4,5	8,2 $\pm$ 4,6	38,5 $\pm$ 3,6**	13,3 $\pm$ 10,8

\* Достоверные отличия от контроля (контроль — 0 % подавления);

\*\* отличия от  $\text{P}_4$  и МПА при  $p < 0,05$ .

ER $\alpha$  (у бутерола оно достоверно меньше при большей цитостатической активности), но и влиянием на другие факторы, такие как регуляторные системы роста и апоптоза [4, 5, 7, 11].

## ВЫВОДЫ

1. Все исследованные стероидные соединения (прогестерон, бутерол, К1047, МПА) обладают цитостатической активностью по отношению к клеткам HeLa. Более высокой, чем у препаратов сравнения, цитостатической активностью, обладает бутерол, вызывая подавление жизнеспособности клеток на 52,1 – 38,5 % в концентрациях  $10^{-5}$  –  $10^{-7}$  М.

2. В реализацию цитостатической активности прогестинов может вносить вклад их способность подавлять экспрессию ER $\alpha$  в клетках-мишенях. К1047 вызывает максимальное подавление экспрессии гена ER $\alpha$  — на 98,6 %.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Н. В. Бочкарева, И. В. Кондакова, Л. А. Коломиец и др., *Сиб. онкол. ж.*, 27(3), 86 – 93 (2008).

- Г. С. Гриненко, В. М. Ржезников, Л. Е. Голубовская и др., патент РФ RUS 2292209 (2004).
- А. В. Камерницкий, И. С. Левина, *Биоорганич. химия*, 31(2), 115 – 129 (2005).
- Е. Н. Карева, Н. Л. Шимановский, *Эксперим. и клин. фармакол.*, 74(4), 36 – 42 (2011).
- В. И. Кулаков, Г. Т. Сухих, Р. Г. Гатаулина, *Пробл. репродукции*, № 2, 15 – 26 (1999).
- Е. В. Одинцова, Т. А. Федотчева, В. В. Банин и др., *Вопросы биол. мед. и фарм. химии*, № 1, 93 – 97 (2012).
- А. В. Семейкин, И. С. Левина, Е. Н. Карева и др., *Рос. биотер. ж.*, № 1, 55 (2011).
- А. В. Семейкин, Т. А. Федотчева, И. С. Левина, и др., *Хим-фарм. журн.*, 48(6), 9 – 13 (2014); *Pharm. Chem J.*, 48(6), 363 – 367 (2014).
- П. В. Сергеев, Т. А. Федотчева, В. М. Ржезников и др., *Вестник Рос. академии мед. наук.*, № 5, 27 – 32 (2007).
- П. В. Сергеев, Н. Л. Шимановский, *Биохимическая фармакология*, Мед. информ. агентство, Москва (2010), сс. 467 – 527.
- S. D. McCarthy, J. F. Roche, N. Forde, *Physiol Genomics*, 44(2), 130 – 140 (2012).
- T. Mossmann, *J. Immunol. Methods*, 65, 55 – 63 (1983).

Поступила 03.11.15

## INFLUENCE OF PROGESTERONE DERIVATIVES ON THE VIABILITY AND EXPRESSION OF ESTROGEN RECEPTOR-ALPHA MRNA IN HELA CELLS

A. V. Semeikin<sup>1</sup>, E. N. Kareva<sup>1</sup>, T. A. Fedotcheva<sup>1</sup>, A. S. Lunina<sup>1</sup>, I. S. Levina<sup>2</sup>, V. M. Rzheznikov<sup>3</sup>, and N. L. Shimanovskii<sup>1</sup>

<sup>1</sup> N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, ul. Ostrovitianova 1, Moscow, 117997 Russia

<sup>2</sup> N. D. Zelinsky Institute of Organic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Leninskii Prospekt 47, Moscow, 119991 Russia

<sup>3</sup> Endocrinology Scientific Center, Ministry of Public Health of the Russian Federation, ul. Dm. Ulyanova 11, Moscow, 117036 Russia

We have studied the effect of new ligands of progesterone receptors, including pregna-D'-pentaran 6-methoxyimino-16a,17a-cyclohexanopregn-4-en-3,20-dione (K1047), 17a-acetoxy-3b-butanoyloxy-6-methyl-pregna-4,6-dien-20-one (buterol), progesterone (P4), and medroxyprogesterone acetate on the viability of HeLa cells and expression of estrogen receptor-alpha (Era) mRNA gene in these cells. K1047 and buterol exhibited high cytostatic activity, which exceeded the activity of reference compounds on the average by 15% ( $p < 0.05$ ). Both buterol and K-1047 (at  $10^{-6}$  M) effectively suppressed Era mRNA gene expression in HeLa cell culture by 83.4 – 98.6%.

**Keywords:** progestins; buterol; medroxyprogesterone acetate; cell viability; gene expression; estrogen receptors.