

КОМБИНАЦИЯ ИНГИБИТОРОВ IX ИЗОФОРМЫ КАРБОАНГИДРАЗЫ И ГЕФИТИНИБА УГНЕТАЕТ ИНВАЗИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ КЛЕТОК НЕМЕЛКОКЛЕТОЧНОГО РАКА ЛЕГКОГО

© 2024 А.С. Бунев¹, А.А. Шетнев², О.С. Шемчук³, П.К. Кожухов³, Т.В. Шаронова⁴,
И.И. Тюряева^{4,5}, М.Г. Хотин⁵, С.В. Агеев^{3,4}, Д.К. Холмуродова⁶, Ж.А. Ризаев⁶,
К.Н. Семенов^{3,4,6}, В.В. Шаройко^{1,3,4,6*}

¹ Тольяттинский государственный университет, Центр медицинской химии,
445020 Тольятти, Россия; электронная почта: sharoyko@gmail.com

² Институт биофизики будущего, 141701 Долгопрудный, Московская обл., Россия

³ Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова, 197022 Санкт-Петербург, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, 199034 Санкт-Петербург, Россия

⁵ Институт цитологии РАН, 194064 Санкт-Петербург, Россия

⁶ Научно-практический центр иммунологии, аллергологии и геномики человека,
Самаркандский государственный медицинский университет, 100400 Самарканд, Узбекистан

Поступила в редакцию 10.06.2024

После доработки 24.10.2024

Принята к публикации 05.11.2024

IX изоформа карбоангидразы человека (КАЧ IX) играет ключевую роль в поддержании pH-гомеостаза злокачественных новообразований, формируя благоприятное микроокружение для роста, инвазии и метастазирования опухолевых клеток. Исследования последних лет установили, что ингибирование активности КАЧ IX, экспрессирующей на поверхности опухолевых клеток, значительно повышает эффективность классических химиотерапевтических агентов и позволяет подавлять резистентность опухолевых клеток к химиотерапии, а также повышать их чувствительность к применяемым препаратам (в т.ч. понижать необходимую дозу цитостатиков). В данной работе изучалась способность новых ингибиторов КАЧ IX на основе замещенных 1,2,4-оксадиазолсодержащих первичных ароматических сульфаниламидов в условиях гипоксии потенцировать цитостатический эффект gefitinib (селективный ингибитор тирозинкиназного домена рецептора эпидермального фактора роста). Изучен комбинированный цитотоксический эффект gefitinib и ингибиторов КАЧ IX – 4-(3-фенил-1,2,4-оксадиазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамида (1), 4-(5-(тиофен-3-ил)-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бензолсульфонамида (2), 4-(3-(пиридин-2-ил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамида (3) и 4-(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бензолсульфонамида (4), а также их влияние на пролиферацию, активацию каспаз 3/7 и клеточный цикл на примере клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549 в условиях физиологической гипоксии. Установлено, что сочетание ингибиторов 1 и 2 и gefitinib угнетает инвазивный потенциал клеток A549, при этом ингибитор 1 обладает наибольшим эффектом и может рассматриваться как перспективный кандидат для дальнейших исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: комбинированная терапия, микроокружение опухоли, ингибиторы карбоангидразы человека, клеточная линия аденокарциномы легкого человека A549, онкологические заболевания, гипоксия, сульфаниламиды, 1,2,4-оксадиазолы, gefitinib.

DOI: 10.31857/S0320972524120065 EDN: IFJGQW

ВВЕДЕНИЕ

Рак легких по-прежнему остается одной из основных причин смертности от онкологических

заболеваний во всем мире; при этом большинство пациентов имеют запущенную форму заболевания и неблагоприятный долгосрочный прогноз [1]. Немелкоклеточный рак легких (НМРЛ) составляет примерно 85% случаев рака легких [1]. Gefitinib – селективный ингибитор тирозинкиназ-

* Адресат для корреспонденции.

ного домена рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), вызывает снижение пролиферации и усиление апоптоза клеток, а также повышает противоопухолевую активность химиотерапевтических препаратов и лучевой терапии. Гефитиниб показал эффективность при лечении пациентов с немелкоклеточной аденокарциномой легкого с мутациями в гене *EGFR* в экзоне 21 (L858R) и делециями в экзоне 19 [2]. Однако в большинстве случаев успех терапии гефитинибом носит временный характер. Опухолевые клетки приобретают резистентность к гефитинибу, и после года терапии заболевание может прогрессировать [3]. Применение гефитиниба как адъювантного агента в комбинированной химиотерапии продлевает выживаемость пациентов с НМЛР без прогрессирования заболевания [4]. Было также установлено, что резистентности клеток аденокарциномы легкого к химиопрепаратам способствует фермент карбоангидраза IX изоформа (КАЧ IX), трансмембранный металлофермент, содержащий в активном центре ион цинка. КАЧ IX нейтрализует ацидоз в опухолевых клетках [5]. Повышенная экспрессия КАЧ IX является маркером неблагоприятного прогноза для пациентов с НМРЛ [6]; фермент синтезируется в условиях гипоксии под контролем транскрипционного фактора-1 α , индуцируемого гипоксией (HIF1 α) [5].

Каталитическая активность КАЧ IX в значительной степени обеспечивает адаптацию опухолевых клеток к неблагоприятным условиям дефицита кислорода и энергосубстратов. В частности, каталитическая функция внеклеточного домена фермента играет ключевую роль в работе ряда транспортных белков и позволяет избежать внутриклеточного ацидоза (поддерживается слабощелочной внутриклеточный pH) [7]. В то же время ацидификация внеклеточной среды (в среднем в микроокружении гипоксической опухоли pH составляет 6,5–6,8) [8] нарушает клеточную адгезию в здоровых тканях, облегчая пролиферацию и инвазию опухолевых клеток, а также их метастазирование [9]. Более того, КАЧ IX-зависимый межклеточный ацидоз [8] может способствовать нарушению межклеточных адгезионных контактов за счет подавления экспрессии белка адгезии Е-кадгерина, а также трансформации злокачественных клеток в менее дифференцированное состояние [10]. При этом опухолевые клетки приобретают так называемый фенотип «стволовости» (увеличение доли опухолевых стволовых клеток в опухоли), что делает опухолевый фенотип более агрессивным и устойчивым ко многим

химиотерапевтическим препаратам [11]. Последние данные указывают на то, что роль КАЧ IX в гипоксических опухолях выходит далеко за рамки регуляции pH-гомеостаза.

Комбинированная терапия онкологических заболеваний основывается на феноменах синергетического действия различных химиотерапевтических препаратов [12]. При комбинировании препаратов с различным механизмом действия можно создать условия для их применения в оптимальной дозе, что снижает побочные эффекты и повышает в целом переносимость химиотерапии [13]. Примечательно, что препараты, механизм действия которых различается, способны совместно эффективно подавлять рост опухолей, что, помимо прочего, позволяет уменьшить вероятность развития резистентности опухолевых клеток к химиотерапии. Более того, в случае уже сформировавшейся резистентности использование адъювантных агентов в комбинации с классическими химиотерапевтическими препаратами в ряде случаев позволяет преодолеть лекарственную устойчивость агрессивных фенотипов [14]. Таким образом, разработка эффективных ингибиторов КАЧ IX для их комбинированного использования в сочетании с клинически одобренными противоопухолевыми препаратами может оказаться успешной стратегией преодоления резистентности опухолей к химиотерапии. В ряде научных работ было показано, что существует взаимосвязь между транскрипцией генов *HIF1A* и *CAIX* (кодирует трансмембранный белок семейства карбоангидраз, который участвует в регуляции клеточного pH) и экспрессией *EGFR* в гипоксических клетках, в том числе НМРЛ [15, 16], и установлено, что активация сигнального каскада через EGFR усиливает клеточный ответ на гипоксию и действует как фактор выживания опухолевых клеток [17]. Ингибирование транскрипции генов, регулируемых гипоксией, может быть одной из стратегий лечения химиорезистентных опухолей с использованием ингибиторов тирозинкиназного домена EGFR. Совокупность вышеуказанных экспериментальных фактов определила выбор комбинации новых ингибиторов КАЧ IX и ингибитора тирозинкиназного домена EGFR – гефитиниба – для проведения исследований, результаты которых представлены в статье. Таким образом, на данном этапе исследования была поставлена задача изучить эффективность совместного действия четырех новых ингибиторов КАЧ IX с цитостатическим препаратом гефитинибом на клеточную линию аденокарциномы

Принятые сокращения: КИ – клеточный индекс; НМРЛ – немелкоклеточный рак легких; CI – комбинационный индекс; DAPI – дигидрохлорид 4',6-диамидино-2-фенилиндол; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; HIF1 α – транскрипционный фактор-1 α , индуцируемый гипоксией.

легкого человека A549 в условиях физиологической гипоксии. Клетки линии A549 известны устойчивостью к gefitinibu ($IC_{50} = 21$ мкМ в условиях нормоксии) [18] и не имеют мутаций в гене *EGFR* (wild-type *EGFR*) [19]. Изучен комбинированный цитотоксический эффект gefitiniba и ингибиторов КАЧ IX на цитотоксичность, а также их влияние на пролиферацию, активацию каспаз 3/7 и клеточный цикл на примере клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549 в условиях физиологической гипоксии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. В исследовании использовались следующие соединения: диметилсульфоксид (ДМСО; «Панэко», Россия), gefitinib («Sigma-Aldrich», США), $CoCl_2$ («Sigma-Aldrich») и ингибиторы КАЧ IX: 4-(3-фенил-1,2,4-оксадиазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамид (1), 4-(5-(тиофен-3-ил)-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бензолсульфонамид (2), 4-(3-(пиридин-2-ил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамид (3) и 4-(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бензолсульфонамид (4). Ингибиторы синтезированы согласно методике, опубликованной в работе Krasavin et al. [20]. Характеризация синтезированных соединений проводилась методами 1H и ^{13}C ЯМР-спектроскопии (Bruker AVANCE DPX 400; «Bruker», США) и масс-спектрометрии высокого разрешения с ионизацией электрораспылением (Bruker microTOF; «Bruker»), а также включала измерение температуры плавления (Electrothermal IA 9300; «Electrothermal», Великобритания).

Характеризация соединений 1–4. 4-(3-фенил-1,2,4-оксадиазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамид (1). Выход – 181 мг (59%). Бежевое твердое вещество, $t_{пл}$ 295–297 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,59 (s, 1H); 8,18 (d, J ¼ 6,9 Hz, 2H); 8,02 (s, 1H); 7,88 (s, 2H); 7,75 (t, J ¼ 7,1 Hz, 1H); 7,67 (t, J ¼ 7,5 Hz, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 176,0 (C); 164,6 (C); 148,5 (C); 134,0 (CH); 133,2 (CH); 130,1 (CH); 128,4 (CH); 128,2 (CH); 127,4 (C); 123,6 (C). HRMS (ESI, m/z): рассчитано для $C_{12}H_9N_3O_3S_2$ $[M + H]^+$ – 308,0158; найдено – 308,0155.

4-(5-(тиофен-3-ил)-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бензолсульфонамид (2). Выход – 157 мг (51%). Бежевое твердое вещество, $t_{пл}$ 279–281 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,70 (s, 1H); 8,26 (d, J ¼ 8,4 Hz, 2H); 8,04 (t, J ¼ 6,7 Hz, 2H); 7,89 (dd, J ¼ 5,0, 2,9 Hz, 1H); 7,77 (d, J ¼ 5,1 Hz, 1H); 7,55 (s, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 172,6 (C); 167,7 (C); 147,1 (C); 132,8 (CH); 129,9 (CH); 129,5 (C); 128,2 (CH); 127,1 (CH); 126,8 (CH); 125,0 (C). HRMS (ESI, m/z): рассчитано для $C_{12}H_9N_3O_3S_2$ $[M + Na]^+$ – 329,9978; найдено – 329,9987.

4-(3-(пиридин-2-ил)-1,2,4-оксадиазол-5-ил)тиофен-2-сульфонамид (3). Выход – 222 мг (72%). Бежевое твердое вещество, $t_{пл}$ 239–241 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,87 (s, 1H); 8,79 (d, J ¼ 4,5 Hz, 1H); 8,15 (d, J ¼ 7,7 Hz, 1H); 8,10 (s, 1H); 8,06 (t, J ¼ 7,6 Hz, 1H); 7,97 (s, 2H); 7,64 (t, J ¼ 5,0 Hz, 1H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 171,5 (C); 168,7 (C); 150,8 (CH); 149,0 (C); 145,9 (C); 138,2 (CH); 136,1 (CH); 128,5 (CH); 126,7 (CH); 124,6 (C); 123,9 (CH). HRMS (ESI, m/z): рассчитано для $C_{11}H_8N_4O_3S_2$ $[M + Na]^+$ – 330,9930; найдено – 330,9941.

4-(5-метил-1,2,4-оксадиазол-3-ил)бензолсульфонамид (4). Выход – 206 мг (86%). Белое твердое вещество, $t_{пл}$ 214–215 °C. 1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,18 (d, J ¼ 8,5 Hz, 2H); 8,00 (d, J ¼ 8,5 Hz, 2H); 7,53 (s, 2H); 2,68 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 178,4 (C); 167,2 (C); 146,9 (C); 129,7 (C); 128,0 (CH); 127,1 (CH); 12,5 (CH $_3$). HRMS (ESI, m/z): рассчитано для $C_9H_9N_3O_3S$ $[M + H]^+$ – 240,0437; найдено – 240,0433.

Культивирование клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549. Клетки аденокарциномы легкого человека A549 (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Институт цитологии РАН) культивировали в среде (далее «полная» среда) DMEM («Gibco», США) с добавлением 10% инактивированной бычьей эмбриональной сыворотки (FBS; «Gibco») без применения антибиотиков. Пересев клеток проводили с использованием раствора, содержащего 0,25% трипсина, и раствора Версена (0,02% ЭДТА) в соотношении 1/3 («Биолот», Россия). В эксперименте по клеточной миграции клетки линии A549 подвергались химически-индуцированной гипоксии с использованием известного миметика гипоксии $CoCl_2$ ($C = 100$ мкМ) [21–23]. Остальные эксперименты проводили в условиях физиологической гипоксии при 1%-ном содержании кислорода в газовой смеси. В качестве контроля использовали клетки, к которым добавляли ДМСО (финальное разведение – 1 : 1000), т.к. исследуемые соединения 1–4 были растворены в ДМСО.

Цитотоксичность. Изучение цитотоксичности соединений 1–4 и gefitiniba проводилось с использованием реагента МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид) на клетках линии A549. Клетки культивировали в CO_2 -инкубаторе при +37 °C в увлажненной атмосфере, содержащей воздух и 5% CO_2 , в полной питательной среде. В результате взаимодействия МТТ с NAD(F)H-зависимыми клеточными оксидоредуктазами образуется окрашенный продукт – формазан с максимумом поглощения при длине волны 540 нм, содержание которого пропорционально количеству жизнеспособных клеток. Для проведения эксперимента клетки открепляли от культуральных флаконов, проводили подсчет

числа клеток на анализаторе жизнеспособности клеток Luna-II («Logos Biosystems», Южная Корея), затем клетки переносили в 96-луночный планшет («Thermo Scientific», США) и инкубировали в течение ночи в CO₂-инкубаторе: за это время происходило прикрепление клеток к поверхности лунок (в каждую лунку вносили 5000 клеток в 200 мкл полной среды). Клетки инкубировали в течение 24 ч в условиях физиологической гипоксии, после чего в лунки добавляли растворы, содержащие соединения 1–4 и/или гефитиниб. Клетки инкубировали в планшетах в течение 48 ч в CO₂-инкубаторе при +37 °С. По окончании инкубационного периода культуральную среду удаляли путем инвертирования планшета. Далее, в лунки вносили 100 мкл полной среды DMEM-F12 и 20 мкл МТТ-реактанта, и планшеты с клетками инкубировали в течение 1 ч в CO₂-инкубаторе при +37 °С. После удаления надосадочной жидкости кристаллы формазана растворяли в течение 15 мин при перемешивании в ДМСО (200 мкл на лунку). Поглощение измеряли на планшетном ридере Allsheng AMR-100 («Allsheng», Китай). Величину IC₅₀ рассчитывали с использованием пакета программ Graphpad Prism («GraphPad Software Inc.», США), $n = 6$.

Клеточная миграция. Скорость клеточной миграции изучалась в режиме реального времени с использованием системы клеточного анализа xCELLigence RTCA DP («ACEA Biosciences», США). В лунки нижней камеры CIM-планшета (CIM-Plate 16; «ACEA Biosciences») вносили по 160 мкл среды DMEM, содержащей 10% FBS и 100 мкМ CoCl₂. Клетки линии A549, предварительно инкубированные в течение 24 ч с 100 мкМ CoCl₂, переносили в лунки верхней камеры CIM-планшета (3·10⁴ клеток на лунку) в среде DMEM без сыворотки с 100 мкМ CoCl₂ и добавляли тестируемые соединения – гефитиниб до конечной концентрации 10 мкМ и/или ингибиторы КАЧ IX до конечной концентрации 25 или 50 мкМ. Значение импеданса каждой лунки автоматически регистрировалось системой xCELLigence каждые 15 мин в течение 48 ч и выражалось в виде единиц клеточного индекса (КИ), отражающего изменение числа клеток на микроэлектронных сенсорах, расположенных с обратной стороны пористого дна лунок верхней камеры. Миграция клеток происходит в пределах 20–24 ч. Однако изучался эффект тестируемых соединений за период 48 ч, что дает дополнительную информацию об ингибирующей способности соединений 1 и 2. Все образцы анализировали в 3–4 повторах. Анализ полученных данных проводили с использованием программного обеспечения RTCA 2.0.0.1301 («ACEA Biosciences»). Анализ кривых проводили с использованием коэффициента наклона кривых (α) и t -критерия Стьюдента.

Подготовка клеток для проточной цитометрии. Для проведения анализа методом проточной цитометрии клетки линии A549 высевали в чашки Петри диаметром 40 мм («ТТР», Швейцария) в количестве 5·10⁴ клеток в 2 мл полной среды и предварительно инкубировали в течение 24 ч в гипоксическом инкубаторе (содержание O₂ – 1%). Спустя 24 ч среду в чашках меняли на среду с добавлением исследуемых ингибиторов ($C = 25$ мкМ или 50 мкМ) и гефитиниба ($C = 10$ мкМ). Через 24 и 48 ч клетки анализировали с использованием проточного цитометра CytoFLEX S («Beckman Coulter», США). Полученные данные обрабатывались с использованием пакета программ CytExpert («Beckman Coulter»). Перед анализом полностью собранные трипсинизацией с поверхности чашек клетки в одинаковом объеме переносили в пробирки, содержащие кондиционную среду, перемешивали и отбирали по 0,1 мл для определения жизнеспособности и концентрации клеток. Затем к суспензии клеток добавляли дигидрохлорид 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI; $C = 2$ мкг/мл; «Sigma-Aldrich»), и суспензию клеток перемешивали в течение 30 сек, после чего анализировали на проточном цитометре. Проводился анализ не менее 2000 событий в координатах FSC-A log/SSC-A log.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла. Анализ клеточного цикла является одним из методов изучения пролиферации клеток. Этим методом исследуются фазы клеточного цикла – распределение клеток по G₁/G₀-, S- и G₂/M-фазам клеточного цикла путем определения относительного содержания ДНК в клетках с использованием ДНК-связывающего флуоресцентного красителя DAPI. Клетки линии A549 трипсинизировали, осаждали и разводили полной средой до концентрации 1·10⁶ клеток/мл. К полученной суспензии клеток добавлялась смесь DAPI ($C = 100$ мкг/мл) и Triton X-100 ($C = 1\%$) в соотношении 1/5 («Sigma-Aldrich»). Окрашивание и пермеабиллизацию клеток проводили в течение 1 мин при комнатной температуре при медленном перемешивании. Для анализа использовалось не менее 10 000 окрашенных клеток. Данные обрабатывались с использованием пакета программ ModFit LT («Verity Software House», США).

Определение активности каспаз 3/7. Активность каспаз, выявляемая при каспаза-зависимом апоптозе, определялась с использованием набора реактивов для проточной цитометрии CellEvent™ Caspase-3/7 Green («Invitrogen», США) в соответствии с протоколом производителя. В состав набора входит флуорогенный субстрат для активированных каспаз 3 и 7, который состоит из пептида DEVD, конъюгированного с красителем, связывающим ДНК. При проникновении в клетки суб-

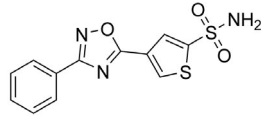
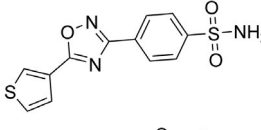
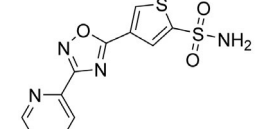
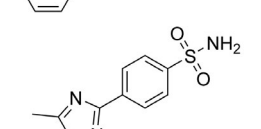
страт не флуоресцирует, поскольку пептид DEVD ингибирует взаимодействие красителя с ДНК. При индукции апоптоза каспазы активируются и расщепляют пептид DEVD, что позволяет красителю связываться с ДНК и флуоресцировать. После трипсинизации определяли концентрацию клеток, которые затем разводили полной средой до концентрации $5 \cdot 10^5$ клеток/мл. После этого к 0,2 мл суспензии клеток линии A549 добавляли 0,2 мкл реагента CellEvent™ ($C = 500$ нМ). Клетки инкубировали в течение 30 мин при 37 °C в CO₂-инкубаторе. За 5 мин до окончания инкубации добавлялся раствор DAPI ($C = 2$ мкг/мл) для детектирования доли погибших или поздних апоптотических клеток. По окончании инкубации пробы анализировались на проточном цитометре. Флуоресценция возбуждалась лазерами 488 нм для регистрации сигнала каспаз 3/7 в канале FITC и 375 нм – для регистрации сигнала DAPI.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

С использованием кинетического метода остановленного потока в нашем предыдущем исследовании измерение констант ингибирования рекомбинантной КАЧ IX для соединений на основе замещенных 1,2,4-оксадиазолсодержащих первичных ароматических сульфаниламидов выявило серию ингибиторов-лидеров КАЧ IX – соединения 1–4 со значениями констант ингибирования (K_i), лежащими в наномолярном и субнаномолярном концентрационном диапазоне (табл. 1) [17].

Цитотоксическое действие ингибиторов КАЧ IX и гефитиниба на клетки аденокарциномы легкого A549. Изучение влияния ингибиторов 1–4, гефитиниба и их комбинированного влияния на жизнеспособность клеток линии A549 прово-

Таблица 1. Новые ингибиторы КАЧ IX

№	Структура	K_i , нМ
1		$0,24 \pm 0,02$
2		$1,80 \pm 0,13$
3		$0,39 \pm 0,03$
4		$0,53 \pm 0,04$

дилось в условиях нормоксии и физиологической гипоксии (1% O₂). Было установлено, что в условиях физиологической гипоксии, по данным ОТ-ПЦР, отмечается повышение уровня экспрессии мРНК *HIF1A* в 2,1 раза и мРНК *CAIX* – в 1,5 раза по сравнению с контролем (условия нормоксии) (рис. П1 в Приложении). На уровне белка отмечена стабилизация HIF1α (повышение относительной экспрессии в 19 раз) в условиях физиологической гипоксии, которая была подтверждена методом иммуоблоттинга. Уровень КАЧ IX также повышается, но в меньшей степени (рис. П2 в Приложении).

В табл. 2 представлены результаты анализа жизнеспособности клеток линии A549 в присутствии ингибиторов 1–4 и гефитиниба в условиях нормоксии и физиологической гипоксии. В экспе-

Таблица 2. Жизнеспособность клеток линии A549 и комбинационный индекс, характеризующий эффективность совместного действия ингибиторов 1–4 и гефитиниба в условиях нормоксии и физиологической гипоксии

№	Нормоксия		Гипоксия	
	Ингибитор IC_{50} , мкМ	Ингибитор + гефитиниб IC_{50} , мкМ/*CI	Ингибитор IC_{50} , мкМ	Ингибитор + гефитиниб IC_{50} , мкМ/CI
1	$58,3 \pm 5,6$	$29,0 \pm 3,3/0,97$	$45,6 \pm 4,2$	$15,1 \pm 1,6/0,92$
2	$60,4 \pm 5,9$	$32,3 \pm 4,1/1,01$	$35,4 \pm 2,9$	$12,2 \pm 1,8/0,93$
3	$76,1 \pm 6,8$	$41,7 \pm 2,8/1,02$	$45,6 \pm 4,3$	$19,1 \pm 1,8/1,01$
4	–	$80,3 \pm 6,3/–$	$53,4 \pm 6,6$	$24,1 \pm 2,9/1,04$

Примечание. Условия нормоксии и физиологической гипоксии (C (гефитиниба) = 10 мкМ, время инкубации – 48 ч). CI – Комбинационный индекс; *CI < 1, CI = 1 и CI > 1 показывают синергизм, аддитивный эффект или антагонизм действия соответственно. На основе данных IC_{50} для гефитиниба, соединений 1–4 и их комбинации с гефитинибом были рассчитаны значения CI. В условиях физиологической гипоксии для комбинации ингибитора 1 с гефитинибом и ингибитора 2 с гефитинибом CI < 1, что свидетельствует о синергизме их действия; для комбинации ингибитора 3 с гефитинибом и ингибитора 4 с гефитинибом CI ≈ 1 показывает аддитивное действие.

рименте использовалась фиксированная концентрация гефитиниба ($C = 10$ мкМ), при которой он как моноагент не влиял на выживаемость клеток в условиях нормоксии и физиологической гипоксии. Как видно из табл. 2, сочетанное действие ингибиторов 1–3 и гефитиниба в условиях нормоксии приводит к снижению величины IC_{50} в 2 (ингибитор 1), 1,9 (ингибитор 2) и 1,8 (ингибитор 3) раза соответственно по сравнению с индивидуальными ингибиторами 1–3. В условиях физиологической гипоксии комбинированное действие приводит к уменьшению величины IC_{50} в 3 (ингибитор 1), 2,9 (ингибитор 2), 2,4 (ингибитор 3) и 1,6 (ингибитор 4) раза соответственно по сравнению с индивидуальными ингибиторами 1–4.

Селективность цитотоксического действия ингибиторов 1–4 была изучена на клетках линии ARPE-19 (линия клеток пигментного эпителия сетчатки глаза человека) в условиях физиологической гипоксии. Выживаемость клеток линии ARPE-19 для ингибиторов 1–4 ($C = 50$ мкМ) составляла 72,3%, 83,0%, 92,3% и 95,1% соответственно (рис. ПЗ в Приложении).

Влияние ингибиторов КАЧ IX и гефитиниба на миграцию клеток аденокарциномы легкого A549 в условиях гипоксии (100 мкМ $CoCl_2$). Одной из основных причин прогрессирования рака является возникновение метастазов, которые могут распространяться на другие органы и ткани. Важным фактором, приводящим к формированию метастазов, является миграционная способность опухолевых клеток [24]. Поэтому, кроме действия комбинаций новых ингибиторов КАЧ IX 1–4 с гефитинибом на пролиферацию опухолевых клеток, была проведена оценка влияния этих комбинаций на миграцию клеток аденокарциномы легкого A549 в условиях химически-индуцированной гипоксии. Оценку клеточной миграции проводили в режиме реального времени электроимпедансным методом.

Полученные данные, оцениваемые по коэффициентам наклона кривых (α), свидетельствуют о том, что ингибитор 1 в концентрации 25 мкМ только в период до 24 ч в сочетании с гефитинибом ($C = 10$ мкМ) снижал миграцию клеток линии A549 по сравнению с эффектом индивидуального гефитиниба (рис. 1, а; $p < 0,05$). При повышении концентрации ингибитора 1 до 50 мкМ в сочетании с гефитинибом наблюдается ингибирование миграции клеток линии A549 как за период 24 ч ($p < 0,01$), так и за период 48 ч ($p < 0,005$) по сравнению как с контрольными клетками, так и с клетками, инкубированными в присутствии индивидуального гефитиниба (рис. 1, б). Соотношение $\alpha(ДМСО)/\alpha(ингибитор\ 1 + гефитиниб)$ за 24 ч составило 1,93, а за 48 ч – 1,58. В то же время

индивидуальный ингибитор 1 в концентрации 50 мкМ также уменьшал миграционную активность клеток по сравнению с контрольными клетками в период первых суток.

Ингибитор 2 в концентрации 25 мкМ в комбинации с гефитинибом снижал миграционную активность клеток как в течение 24 ч ($p < 0,05$), так и за 48 ч ($p < 0,05$) по сравнению с индивидуальным гефитинибом (рис. 2, а). Соотношение $\alpha(ДМСО)/\alpha(ингибитор\ 2 + гефитиниб)$ за 24 ч составляло 1,36. Однако после 30 ч эксперимента данный эффект исчезал. Через 24 ч эксперимента не было выявлено отличий в миграции клеток линии A549 под действием ингибитора 2 в концентрации 50 мкМ по сравнению с контрольными клетками, но в сочетании с гефитинибом ингибитор 2 снижал миграционную активность клеток ($p < 0,005$; рис. 2, б). Соотношение $\alpha(ДМСО)/\alpha(ингибитор\ 2 + гефитиниб)$ за 24 ч составляло 1,8.

Ингибитор 3 в концентрациях 25 мкМ (рис. 3, а) и 50 мкМ (рис. 3, б) в сочетании с гефитинибом действовал на миграционную активность клеток линии A549 так же, как и индивидуальный гефитиниб (хотя в начальный период эксперимента наблюдается небольшое подавление клеточной миграции) за период 24 ч и 48 ч. Индивидуальный ингибитор 3 за общий период времени 48 ч не влиял на миграцию клеток линии A549 по сравнению с контролем (рис. 3, а и б).

Ингибитор 4 в концентрации 25 мкМ в сочетании с гефитинибом в первые 24 ч демонстрирует тенденцию к ингибированию клеточной миграции, однако никаких значимых отличий не наблюдается между кривыми (рис. 4, а). В следующие сутки клетки, культивируемые как в присутствии индивидуального гефитиниба, так и гефитиниба в комбинации с ингибитором 4, на биосенсорах регистрируются в большем количестве по сравнению с контролем и клетками, обработанными только ингибитором 4 (рис. 4, а). Ингибитор 4 в концентрации 50 мкМ в сочетании с гефитинибом в первые 24 ч ингибирует миграцию клеток по сравнению с контрольными клетками ($p < 0,05$) и с клетками, обработанными только гефитинибом ($p < 0,05$), соотношение $\alpha(ДМСО)/\alpha(ингибитор\ 4 + гефитиниб)$ за 24 ч составило 1,34. После 30 ч эксперимента характер наклона кривой для ингибитора 4 ($C = 50$ мкМ) и гефитиниба меняется, демонстрируя увеличение КИ до уровня, сравнимого с таковым для клеток, обработанными только ингибитором 4, а также контрольных клеток (рис. 4, б).

Несмотря на то что ингибиторы 1 и 2 в концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ в комбинации с гефитинибом (10 мкМ) и по отдельности значительно снижают миграционную подвижность клеток в первые 24 ч, позднее во всех случаях наблюдается

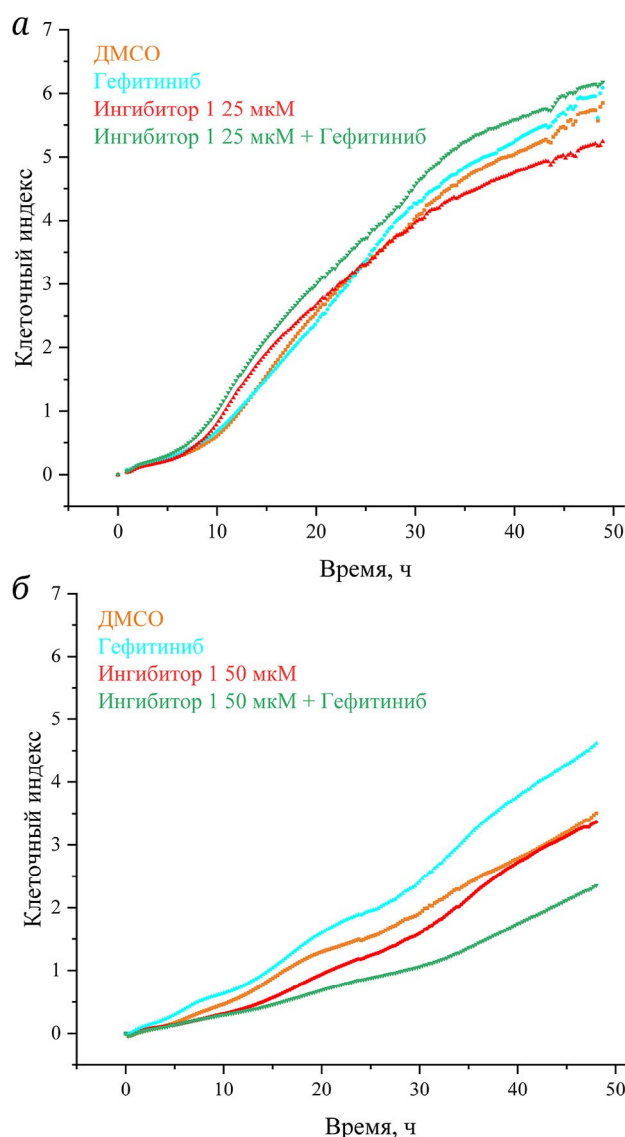


Рис. 1. Эффект ингибитора 1 и gefitiniba на миграцию клеток линии A549 в зависимости от концентрации ингибитора 1 и времени культивирования. а – Инкубация с gefitinibом (10 мкМ) и ингибитором 1 (25 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения клеточного индекса (КИ); б – инкубация с gefitinibом (10 мкМ) и ингибитором 1 (50 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения КИ. Показаны результаты одного репрезентативного измерения из трех разных экспериментов

увеличение КИ. Действительно, миграция клеток обычно происходит в период 20–24 ч, а позднее, помимо миграции, вклад в повышение КИ может давать клеточная пролиферация. Это объясняет временный положительный эффект от химиотерапии различными противоопухолевыми препаратами, в том числе и gefitinibом. Таким образом, опухолевые клетки приобретают резистентность к gefitinibu, и по прошествии некоторого времени заболевание начинает прогрессиро-

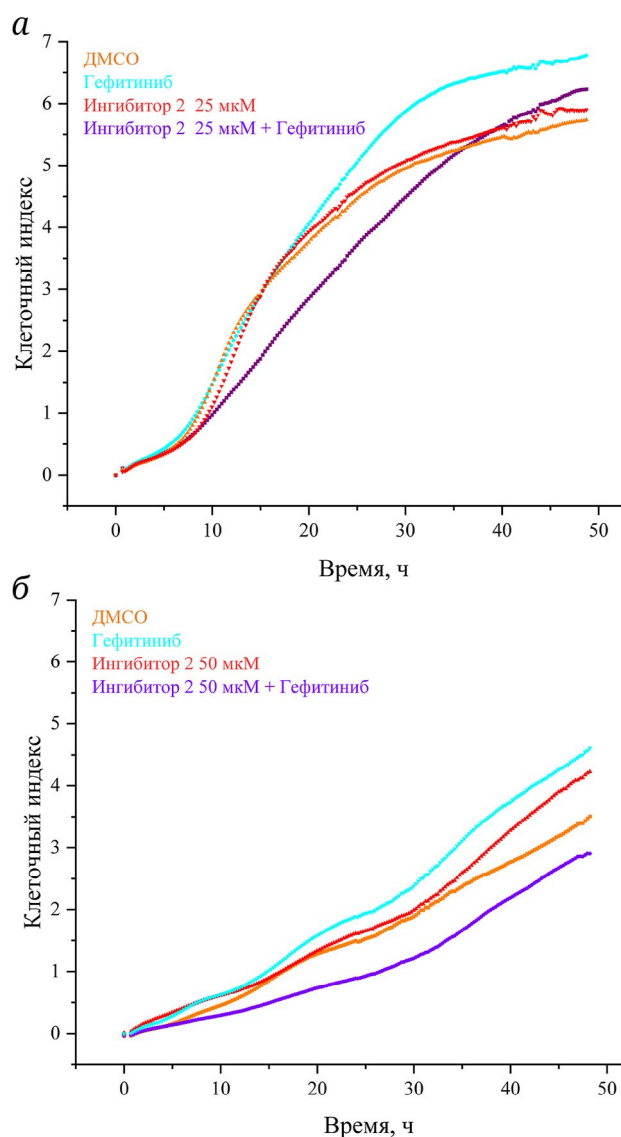


Рис. 2. Эффект ингибитора 2 и gefitiniba на миграцию клеток линии A549 в зависимости от концентрации ингибитора 2 и времени культивирования. а – Инкубация с gefitinibом (10 мкМ) и ингибитором 2 (25 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения клеточного индекса (КИ); б – инкубация с gefitinibом (10 мкМ) и ингибитором 2 (50 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения КИ. Показаны результаты одного репрезентативного измерения из трех разных экспериментов

вать [9]. Интерпретируя результаты эксперимента за последние 24 ч, а именно увеличение КИ, также нельзя исключать вероятность спонтанного метастазирования. В клинической практике встречаются случаи, когда монотерапия противоопухолевым препаратом вызвала повышенную миграцию раковых клеток. Так, сунитиниб значительно подавлял рост первичной опухоли, но усугублял ее гипоксию, тем самым увеличивая метастазирование [25].

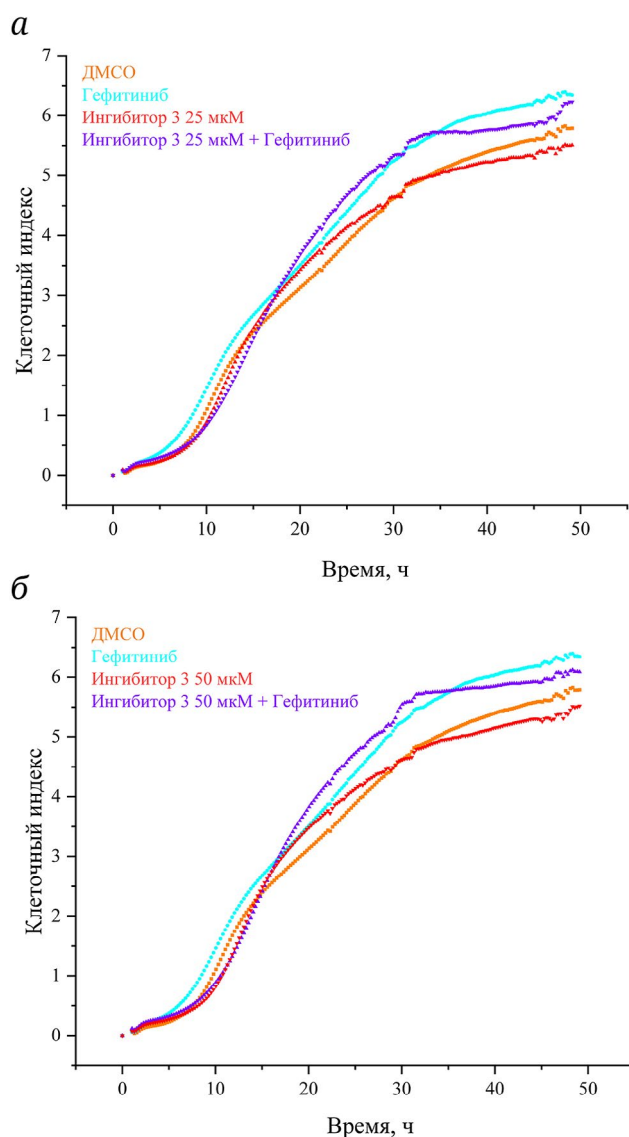


Рис. 3. Эффект ингибитора 3 и гефитиниба на миграцию клеток линии A549 в зависимости от концентрации ингибитора 3 и времени культивирования. *а* – Инкубация с гефитинибом (10 мкМ) и ингибитором 3 (25 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения клеточного индекса (КИ); *б* – инкубация с гефитинибом (10 мкМ) и ингибитором 3 (50 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения КИ. Показаны результаты одного репрезентативного измерения из трех разных экспериментов

По совокупности проведенных исследований можно заключить, что ингибиторы 1, 3 и 4 в концентрациях 25 мкМ и 50 мкМ не изменяют миграционную активность клеток линии аденокарциномы легкого человека A549, кроме эффекта ингибитора 2 в концентрации 50 мкМ, который проявился спустя 40 ч после начала эксперимента. При этом ингибиторы 1 и 2 ($C = 50$ мкМ) в сочетании с гефитинибом ($C = 10$ мкМ) проявляли стабильное ингибирующее действие на миграци-

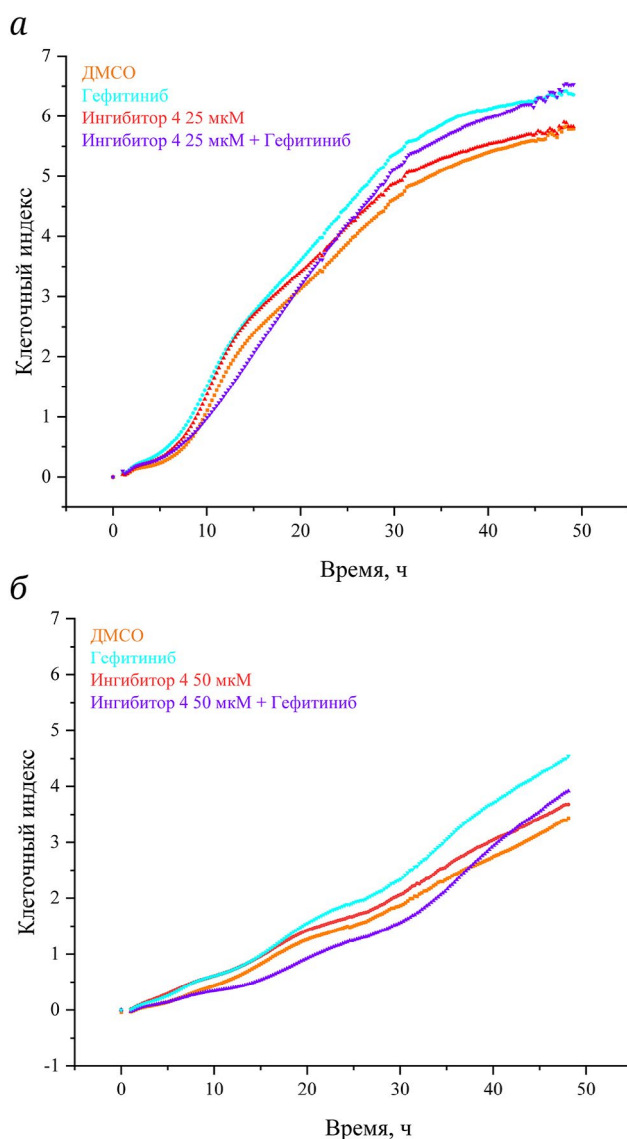


Рис. 4. Эффект ингибитора 4 и гефитиниба на миграцию клеток линии A549 в зависимости от концентрации ингибитора 4 и времени культивирования. *а* – Инкубация с гефитинибом (10 мкМ) и ингибитором 4 (25 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения клеточного индекса (КИ); *б* – инкубация с гефитинибом (10 мкМ) и ингибитором 4 (50 мкМ), добавленным к клеткам перед началом измерения КИ. Показаны результаты одного репрезентативного измерения из трех разных экспериментов

онную активность клеток линии A549, кроме того, в случае комбинации ингибитора 1 с гефитинибом миграция клеток подавлялась эффективнее всего. Таким образом, комбинации ингибиторов КАЧ IX с гефитинибом оказали большее влияние не только на выживаемость опухолевых клеток, но и на их подвижность, чем эти же соединения, взятые по отдельности. Ввиду того что адаптация опухолевых клеток к гипоксическим условиям способствует выбросу метастазов, а ингибиторы КАЧ IX

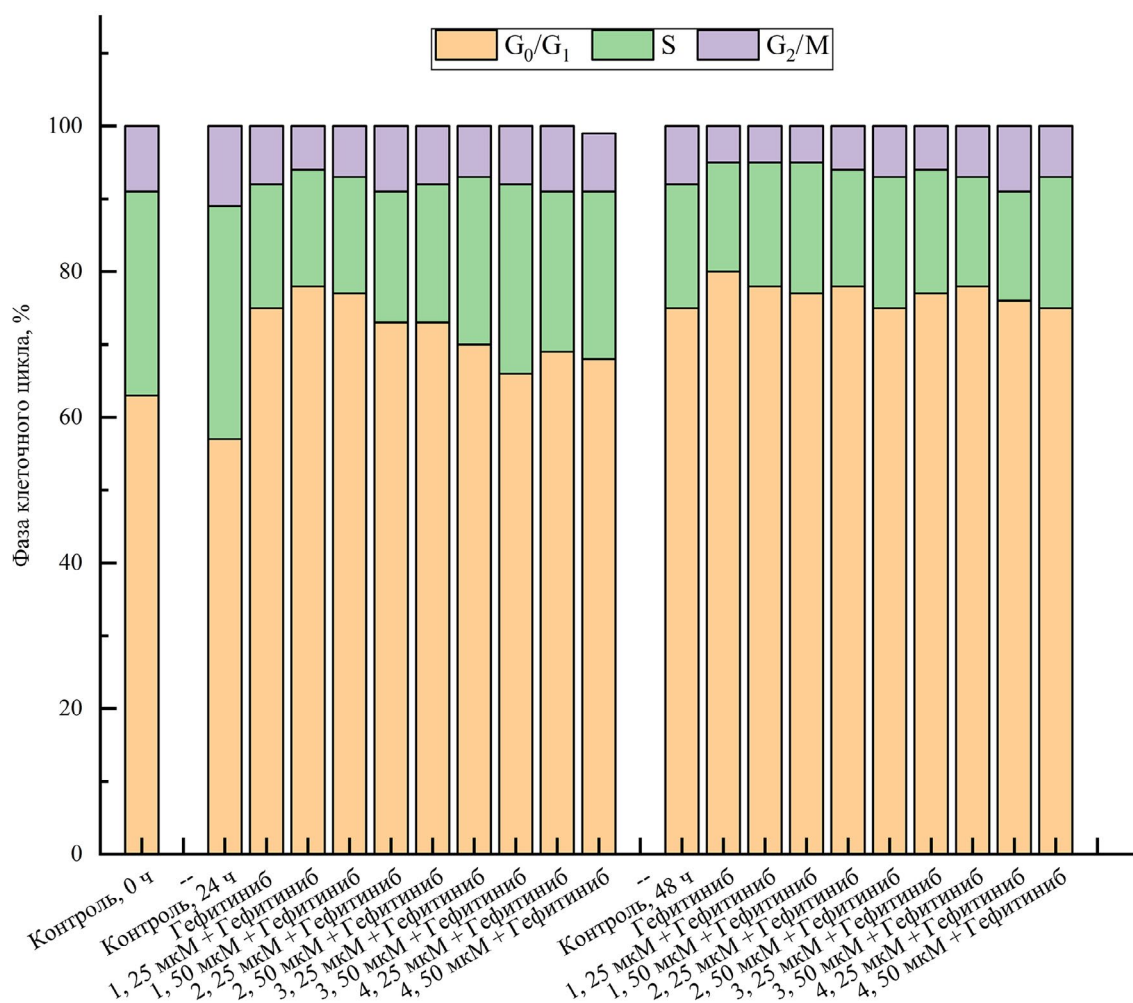


Рис. 5. Распределение клеток линии A549 по фазам клеточного цикла в присутствии ингибиторов КАЧ IX и гефитиниба (24 ч и 48 ч) в условиях физиологической гипоксии (1% O_2)

эффективно действуют на метастатический потенциал опухолевых клеток [24], использование ингибиторов КАЧ IX в противоопухолевой терапии как части комбинационной терапии имеет большие перспективы.

Влияние комбинированного действия ингибиторов КАЧ IX и гефитиниба на распределение клеток по фазам клеточного цикла клеток линии A549. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла, полученный методом проточной цитометрии, показал (рис. 5), что через 24 ч инкубации в условиях физиологической гипоксии происходит значительное накопление клеток в фазе G_0/G_1 , инкубированных в присутствии индивидуального гефитиниба (до $75,7 \pm 0,4\%$ клеток) и в сочетании с ингибитором 1 (до $78,1 \pm 1,2\%$ клеток) по сравнению с контрольными клетками ($57,7 \pm 1,8\%$). Действие других ингибиторов КАЧ IX в сочетании с гефитинибом также оказывало цитостатический эффект на клетки линии A549. Клетки накапливались в фазе G_0/G_1 , однако доля таких клеток была ниже по сравнению с

действием гефитиниба, в особенности в сочетании с ингибитором 3 ($70,8 \pm 1,0\%$ (25 мкМ) и $67,3 \pm 0,7\%$ (50 мкМ) при уровне достоверности $p < 0,05$ и $p < 0,005$ соответственно), что свидетельствует о разной начальной динамике прохождения клеток по фазам клеточного цикла.

Через 48 ч в присутствии гефитиниба доля клеток в фазе G_0/G_1 возросла до $81,0 \pm 1,2\%$. При совместном действии ингибиторов КАЧ IX и гефитиниба к 48 ч инкубации торможение клеток в фазах G_0/G_1 выравнивалось во всех образцах на уровне 77–80% (рис. 5).

Влияние комбинированного действия ингибиторов КАЧ IX и гефитиниба на активность каспаз 3/7 и апоптоз. На рис. 6 представлены точечные цитограммы контрольных образцов клеток линии A549 в присутствии ДМСО или 10 мкМ гефитиниба (рис. 6, а), а также ингибиторов 1 и 2, проявивших в сочетании с гефитинибом способность индуцировать апоптоз опухолевых клеток в условиях физиологической гипоксии (рис. 6, б и в).

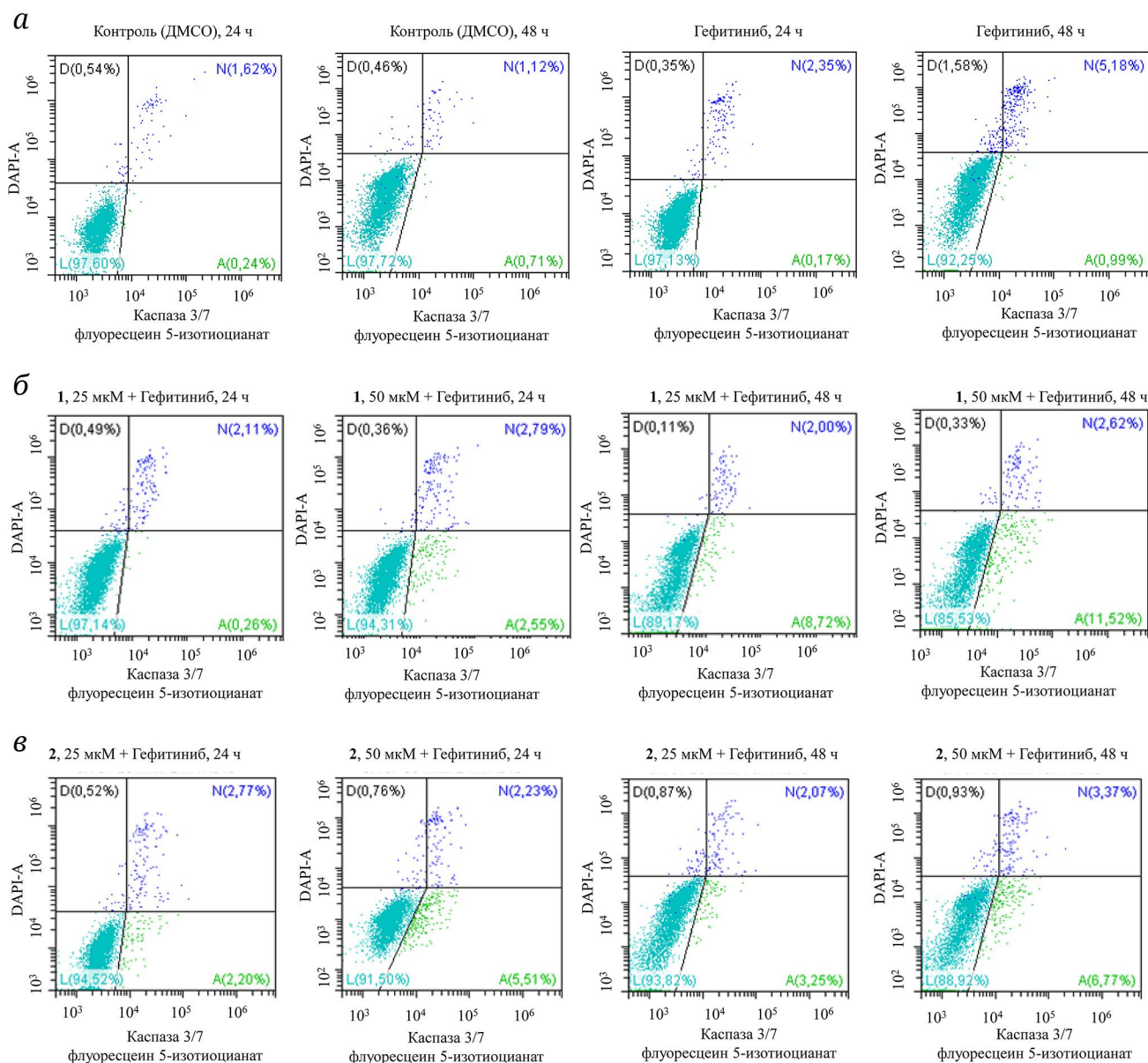


Рис. 6. Ингибиторы КАЧ IX в сочетании с гепитинибом вызывают каспаза 3/7-зависимый апоптоз клеток линии A549. *а* – Инкубация с гепитинибом (10 мкМ) в течение 24 ч и 48 ч; *б* – инкубация с гепитинибом (10 мкМ) и ингибитором 1 (25 и 50 мкМ) в течение 24 ч и 48 ч; *в* – инкубация с гепитинибом (10 мкМ) и ингибитором 2 (25 и 50 мкМ) в течение 24 ч и 48 ч. Типы клеток: D – погибшие клетки; N – поздние апоптотические клетки; L – живые клетки; A – ранние апоптотические клетки

Ранние апоптотические клетки позиционируются в нижнем правом квадрате и обозначены как A (каспазы 3/7⁺; DAPI⁻), поздние апоптотические клетки – в правом верхнем квадрате – как N (каспазы 3/7⁺; DAPI⁺). На цитограммах прослеживается дозо- и время-зависимое появление популяции ранних апоптотических клеток (A), которое свидетельствует об активации каспаз 3/7 в клетках линии A549 под действием ингибиторов 1 и 2 (рис. 6, б и в; табл. 3). Для ингибиторов 3 и 4 не наблюдалось появления ранних апоптотических клеток даже через 48 ч инкубации с модуляторами ответа (табл. 3).

Изучен комбинированный цитотоксический эффект гепитиниба и ингибиторов КАЧ IX (1–4), а также их влияние на пролиферацию, активацию каспаз 3/7 и клеточный цикл на примере клеточной линии аденокарциномы легкого человека A549 в условиях физиологической гипоксии. В условиях физиологической гипоксии для комбинации ингибитора 1 с гепитинибом и ингибитора 2 с гепитинибом рассчитаны значения CI, величины которых были меньше единицы, что свидетельствует о синергизме их действия. Установлено, что сочетание ингибиторов 1 и 2 с гепитинибом вызывает гибель клеток по механизму

Таблица 3. Цитометрический анализ активации каспаз 3/7 в клетках линии A549 в условиях физиологической гипоксии (1% O₂)

Тестируемый ингибитор, условия		Ранние апоптотические клетки, % (среднее ± SD)	Поздние апоптотические клетки, % (среднее ± SD)	Клеточная гибель, % (среднее ± SD)
ДМСО 24 ч		0,25 ± 0,05	1,53 ± 0,10	0,48 ± 0,18
ДМСО 48 ч		1,20 ± 0,47	1,34 ± 0,52	0,42 ± 0,14
Гефитиниб, 10 мкМ, 24 ч		0,17 ± 0,05	2,35 ± 0,41	0,51 ± 0,18
Гефитиниб, 10 мкМ, 48 ч		0,92 ± 0,14	3,78 ± 1,26	1,30 ± 0,35
№ 1	25 мкМ, 24 ч	0,28 ± 0,02	1,98 ± 0,12	0,40 ± 0,10
	25 мкМ, 48 ч	7,79 ± 0,81	3,16 ± 1,01	0,39 ± 0,28
	50 мкМ, 24 ч	2,09 ± 0,47	2,88 ± 0,22	0,26 ± 0,10
	50 мкМ, 48 ч	10,95 ± 0,69	2,90 ± 0,48	0,38 ± 0,13
№ 2	25 мкМ, 24 ч	1,77 ± 0,38	2,72 ± 0,11	0,48 ± 0,06
	25 мкМ, 48 ч	3,68 ± 0,37	2,55 ± 0,42	1,21 ± 0,30
	50 мкМ, 24 ч	4,66 ± 0,83	2,20 ± 0,37	1,24 ± 0,50
	50 мкМ, 48 ч	6,69 ± 0,55	3,03 ± 0,45	0,86 ± 0,07
№ 3	25 мкМ, 24 ч	0,23 ± 0,08	1,39 ± 0,45	0,87 ± 0,09
	25 мкМ, 48 ч	0,30 ± 0,13	2,04 ± 0,44	2,35 ± 0,53
	50 мкМ, 24 ч	0,26 ± 0,21	2,05 ± 1,33	1,41 ± 0,74
	50 мкМ, 48 ч	0,98 ± 0,65	2,05 ± 0,18	1,89 ± 0,23
№ 4	25 мкМ, 24 ч	0,44 ± 0,13	3,34 ± 1,23	0,42 ± 0,07
	25 мкМ, 48 ч	0,24 ± 0,09	3,16 ± 0,10	1,08 ± 0,24
	50 мкМ, 24 ч	0,33 ± 0,14	2,71 ± 0,74	0,46 ± 0,07
	50 мкМ, 48 ч	0,20 ± 0,11	4,80 ± 0,47	1,29 ± 0,36

каспаза 3/7-зависимого апоптоза и угнетает инвазивный потенциал клеток A549, из которых ингибитор 1 обладает наибольшим эффектом и может рассматриваться как перспективное соединение-лидер для дальнейших исследований.

Вклад авторов. А.С. Бунев – концепция, проведение экспериментов; А.А. Шетнев – синтез соединений; О.С. Шемчук – проведение экспериментов, статистическая обработка результатов, написание текста статьи; П.К. Кожухов – проведение экспериментов; Т.В. Шаронова – синтез соединений; И.И. Тюреева – проведение экспериментов, редактирование текста статьи; М.Г. Хотин – проведение экспериментов, редактирование текста статьи; С.В. Агеев – проведение экспериментов; Д.К. Холмуродова – обсуждение, проведение экспериментов; Ж.А. Ризаев – обсуждение, финансовые ресурсы; К.Н. Семенов – концепция, обсуждение

и руководство работой; В.В. Шаройко – концепция, руководство работой, редактирование финального текста статьи, финансовые ресурсы.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-73-20264).

Благодарности. Исследование выполнено с использованием объекта инфраструктуры «Центр клеточных технологий» Института цитологии РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistry.moscow.com>).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., and Forman, D. (2011) Global cancer statistics, *Cancer J. Clinic.*, **61**, 69-90, <https://doi.org/10.3322/CAAC.20107>.
2. Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. L., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. C., Christiani, M. D., Settleman, J., and Haber, D. A. (2004) Activating

- mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib, *New Eng. J. Med.*, **350**, 2129-2139, <https://doi.org/10.1056/NEJMOA040938>.
3. Pao, W., and Chmielecki, J. (2010) Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer, *Nat. Rev. Cancer*, **10**, 760, <https://doi.org/10.1038/NRC2947>.
 4. Sim, E. H. A., Yang, I. A., Wood-Baker, R., Bowman, R. V., and Fong, K. M. (2018) Gefitinib for advanced non-small cell lung cancer, *Cochrane Database Syst. Rev.*, **1**, <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006847.PUB2>.
 5. Sowa, T., Menju, T., Chen-Yoshikawa, T. F., Takahashi, K., Nishikawa, S., Nakanishi, T., Shikuma, K., Motoyama, H., Hijiya, K., Aoyama, A., Sato, T., Sonobe, M., Harada, H., and Date, H. (2017) Hypoxia-inducible factor 1 promotes chemoresistance of lung cancer by inducing carbonic anhydrase IX expression, *Cancer Med.*, **6**, 288-297, <https://doi.org/10.1002/CAM4.991>.
 6. Lie, M., Mazure, N. M., Hofman, V., Ammadi, R. E., Ortholan, C., Bonnetaud, C., Havet, K., Venissac, N., Mograbi, B., Mouroux, J., Pouyssegur, J., and Hofman, P. (2010) High levels of carbonic anhydrase IX in tumour tissue and plasma are biomarkers of poor prognostic in patients with non-small cell lung cancer, *Br. J. Cancer*, **102**, 1627, <https://doi.org/10.1038/SJ.BJC.6605690>.
 7. Becker, H. M. (2020) Carbonic anhydrase IX and acid transport in cancer, *Br. J. Cancer*, **122**, 157, <https://doi.org/10.1038/S41416-019-0642-Z>.
 8. Lee, S. H., McIntyre, D., Honess, D., Hulikova, A., Pacheco-Torres, J., Cerdán, S., Swietach, P., Harris, A. L., and Griffiths, J. R. (2018) Carbonic anhydrase IX is a pH-stat that sets an acidic tumour extracellular pH *in vivo*, *Br. J. Cancer*, **119**, 622, <https://doi.org/10.1038/S41416-018-0216-5>.
 9. Debreova, M., Csaderova, L., Burikova, M., Lukacikova, L., Kajanova, I., Sedlakova, O., Kery, M., Kopacek, J., Zatovicova, M., Bizik, J., Pastorekova, S., and Svastova E. (2019) CAIX regulates invadopodia formation through both a pH-dependent mechanism and interplay with actin regulatory proteins, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 2745, <https://doi.org/10.3390/IJMS20112745>.
 10. Succio, M., Amiranda, S., Sasso, E., Marciano, C., Finizio, A., De Simone, G., Garbi, C., and Zambrano, N. (2023) Carbonic anhydrase IX subcellular localization in normoxic and hypoxic SH-SY5Y neuroblastoma cells is assisted by its C-terminal protein interaction domain, *Heliyon*, **9**, e18885, <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2023.E18885>.
 11. Peppicelli, S., Andreucci, E., Ruzzolini, J., Bianchini, F., Nediani, C., Supuran, C. T., and Calorini, L. (2020) The carbonic anhydrase IX inhibitor SLC-0111 as emerging agent against the mesenchymal stem cell-derived pro-survival effects on melanoma cells, *J. Enzyme Inhibit. Med. Chem.*, **35**, 1185-1193, <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1764549>.
 12. Yap, T. A., Omlin, A., and De Bono, J. S. (2013) Development of therapeutic combinations targeting major cancer signaling pathways, *J. Clin. Oncol.*, **31**, 1592-1605, <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.6418>.
 13. Partridge, A. H., Burstein, H. J., and Winer, E. P. (2001) Side effects of chemotherapy and combined chemohormonal therapy in women with early-stage breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.*, **2001**, 135-142, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jncimonographs.a003451>.
 14. Blagosklonny, M. V. (2005) Overcoming limitations of natural anticancer drugs by combining with artificial agents, *Trends Pharmacol. Sci.*, **26**, 77-81, <https://doi.org/10.1016/J.TIPS.2004.12.002>.
 15. Lu, Y., Liu, Y., Oeck, S., and Glazer, P. M. (2018) Hypoxia promotes resistance to EGFR inhibition in NSCLC cells via the histone demethylases, LSD1 and PLU-1, *Mol. Cancer Res.*, **16**, 1458-1469, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-17-0637>.
 16. Ma, J. S. Y., Kim, J. Y., Kazane, S. A., Choi, S., Yun, H. Y., Kim, M. S., Rodgers, D. T., Pugh H. M., Singer, O., Sun, S. B., Fonslow, B. R., Kochenderfer, J. N., Wright, T. M., Schultz, P. G., Young, T. S., Kim, C. H., and Cao, Y. (2016) Versatile strategy for controlling the specificity and activity of engineered T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **113**, E450-E458, <https://doi.org/10.1073/PNAS.1524193113>.
 17. Swinson, D. E. B., and O'Byrne, K. J. (2006) Interactions between hypoxia and epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung cancer, *Clin. Lung Cancer*, **7**, 250-256, <https://doi.org/10.3816/CLC.2006.N.002>.
 18. Ono, M., Hirata, A., Kometani, T., Miyagawa, M., Ueda, S., Kinoshita, H., Fujii, T., and Kuwano M. (2004) Sensitivity to gefitinib (Iressa, ZD1839) in non-small cell lung cancer cell lines correlates with dependence on the epidermal growth factor (EGF) receptor/extracellular signal-regulated kinase 1/2 and EGF receptor/Akt pathway for proliferation, *Mol. Cancer Ther.*, **3**, 465-472, <https://doi.org/10.1158/1535-7163.465.3.4>.
 19. Tracy, S., Mukohara, T., Hansen, M., Meyerson, M., Johnson, B. E., and Jänne, P. A. (2004) Gefitinib induces apoptosis in the EGFR L858R non-small-cell lung cancer cell line H3255, *Cancer Res.*, **64**, 7241-7244, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1905>.
 20. Krasavin, M., Shetnev, A., Sharonova, T., Baykov, S., Kalinin, S., Nocentini, A., Sharoyko, V., Poli, G., Tuccinardi, T., Presnukhina, S., Tennikova, T. B., and Supuran, C. T. (2019) Continued exploration of 1,2,4-oxadiazole periphery for carbonic anhydrase-targeting primary arene sulfonamides: Discovery of subnanomolar inhibitors of

- membrane-bound hCA IX isoform that selectively kill cancer cells in hypoxic environment, *Eur. J. Med. Chem.*, **164**, 92-105, <https://doi.org/10.1016/J.EJMECH.2018.12.049>.
21. Wu, D., and Yotnda, P. (2011) Induction and testing of hypoxia in cell culture, *J. Visual. Exp.*, **54**, 2899, <https://doi.org/10.3791/2899>.
 22. Paneerselvam, C., and Ganapasam, S. (2020) β -Escin alleviates cobalt chloride-induced hypoxia-mediated apoptotic resistance and invasion via ROS-dependent HIF-1 α /TGF- β /MMPs in A549 cells, *Toxicol. Res.*, **9**, 191-201, <https://doi.org/10.1093/TOXRES/TFAA019>.
 23. Bahadori, M. B., Vandghanooni, S., Dinparast, L., Eskandani, M., Ayatollahi, S. A., Ata, A., and Nazemiyeh, H. (2019) Triterpenoid corosolic acid attenuates HIF-1 stabilization upon cobalt (II) chloride-induced hypoxia in A549 human lung epithelial cancer cells, *Fitoterapia*, **134**, 493-500, <https://doi.org/10.1016/J.FITOTE.2019.03.013>.
 24. Pastorekova, S., and Gillies, R. J. (2019) The role of carbonic anhydrase IX in cancer development: links to hypoxia, acidosis, and beyond, *Cancer Metastasis Rev.*, **38**, 65-77, <https://doi.org/10.1007/S10555-019-09799-0>.
 25. Hedlund, E. M. E., McDonald, P. C., Nemirovsky, O., Awrey, S., Jensen, L. D. E., and Dedhar, S. (2019) Harnessing induced essentiality: targeting carbonic anhydrase IX and angiogenesis reduces lung metastasis of triple negative breast cancer xenografts, *Cancers*, **11**, 1002, <https://doi.org/10.3390/CANCERS11071002>.

COMBINATION OF CARBONIC ANHYDRASE ISOFORM IX INHIBITORS AND GEFITINIB SUPPRESSES ON THE INVASIVE POTENTIAL OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELLS

A. S. Bunev¹, A. A. Shetnev², O. S. Shemchuk³, P. K. Kozhukhov³, T. V. Sharonova⁴,
I. I. Tyuryaeva^{4,5}, M. G. Khotin⁵, S. V. Ageev^{3,4}, D. K. Kholmurodova⁶, J. A. Rizaev⁶,
K. N. Semenov^{3,4,6}, and V. V. Sharoyko^{1,3,4,6*}

¹ Medicinal Chemistry Center, Togliatti State University, 445020 Togliatti, Russia

² Institute of Biophysics of the Future, 141701 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

³ Pavlov First St. Petersburg State Medical University, 197022 St. Petersburg, Russia

⁴ St. Petersburg State University, 199034 St. Petersburg, Russia

⁵ Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064 St. Petersburg, Russia

⁶ Scientific and Practice Center for Immunology, Allergology and Human Genomics, Samarkand State Medical University, 100400 Samarkand, Uzbekistan

Human carbonic anhydrase isoform IX (CA IX) plays a key role in maintaining the pH homeostasis of malignant neoplasms, creating a favorable microenvironment for the growth, invasion and metastasis of tumor cells. Recent studies have established that inhibition of the activity of CA IX, expressed on the surface of tumor cells, significantly increases the effectiveness of classical chemotherapeutic agents and makes it possible to suppress the resistance of tumor cells to chemotherapy, as well as increase their sensitivity to the drugs used (including reducing the required dose of cytostatics). In this work, we studied the ability of new CA IX inhibitors based on substituted 1,2,4-oxadiazole-containing primary aromatic sulfonamides to potentiate the cytostatic effect of gefitinib (a selective inhibitor of the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor) under hypoxic conditions. In this work, we studied the combined effect of gefitinib and CA IX inhibitors – 4-(3-phenyl-1,2,4-oxadiazol-5-yl)thiophene-2-sulfonamide (**1**), 4-(5-(thiophene-3-yl)-1,2,4-oxadiazol-3-yl)benzenesulfonamide (**2**), 4-(3-(pyridin-2-yl)-1,2,4-oxadiazol-5-yl)thiophene-2-sulfonamide (**3**) and 4-(5-methyl-1,2,4-oxadiazol-3-yl)benzenesulfonamide (**4**) on cytotoxicity, proliferation, activation of caspases 3/7 and cell cycle using the example of human lung adenocarcinoma cell line A549 under conditions of hypoxia. It was found that combination of compounds **1** and **2** with gefitinib inhibits the invasive potential of A549 cells, of which inhibitor **1** had the greatest effect and can be considered as a promising candidate for further research.

Keywords: combination therapy, tumor microenvironment, human carbonic anhydrase inhibitors, human lung adenocarcinoma cell line A549, cancer, hypoxia, sulfonamides, 1,2,4-oxadiazoles, gefitinib