

## ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО 5-ОКСИПИРИМИДИНА (СНК-411) В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К-562

О. С. Кузнецова<sup>1</sup>, А. В. Таллерова<sup>1</sup>, А. А. Соколовская<sup>2</sup>, С. В. Никитин<sup>1</sup>, Л. П. Коваленко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»

<sup>2</sup> ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии»

Поступила в редакцию 20.10.2014 г.

**Аннотация.** Колориметрическим методом в тесте МТТ с использованием клеток эритромиелодной линии К-562 исследовали прямую цитотоксическую активность соединения СНК-411 и комбинаций СНК-411 с тегафуром и доксорубина гидрохлоридом. Соединения вносили в конечных концентрациях от  $10^{-7}$  М до  $10^{-4}$  М в 96-луночные плоскодонные планшеты с К-562 и инкубировали 48 ч. За 4 часа до окончания инкубации в каждую лунку вносили по 10 мкл раствора, содержащего 5 мг/мл МТТ. Оптическую плотность раствора измеряли при  $\lambda=545$  нм и  $\lambda_{\text{сравнения}}=630$  нм.

Выявлено, что соединение СНК-411 в концентрациях  $10^{-4}$  М и  $10^{-5}$  М обладает способностью подавлять рост клеток линии К-562, выражающейся в уменьшении долей жизнеспособных клеток на 36 % и 18 %, соответственно, а в сочетании с тегафуром проявляет аддитивность цитотоксического эффекта. Установлено приращение цитотоксических эффектов в комбинациях СНК-411 с доксорубина гидрохлоридом в сравнении с отдельно взятым соединением.

**Ключевые слова:** СНК-411, К-562, цитотоксическая активность, МТТ-тест, иммунотерапия рака

**Abstract.** The aim of the present study was to investigate cytotoxicity of SNK-411 and its combination with doxorubicin (DOX) and tegafur against the K-562, using the MTT-test as a marker for viability. The compounds were tested in a concentration range of  $10^{-7}$ - $10^{-4}$  M. Following 48 hr of incubation, the cells were washed once with RPMI-1640 and incubated for 4 hr with 100  $\mu$ l of 0.5 mg/ml solution of MTT. The trays were shaken for 15 min and the optical density was read on an ELISA reader (545nm/630nm).

SNK-411 had significant toxicity effect increasing by 36 % in  $10^{-4}$  M and 18 % in  $10^{-5}$  M concentrations. There were exponentiation effects in combination of tegafur with SNK-411. There were increased effects in combination of DOX with SNK-411.

**Keywords:** SNK-411, K-562, cytotoxicity, MTT-test, tumor immunotherapy

Основными направлениями изыскания противоопухолевых лекарственных средств являются разработка цитотоксических (цитостатиков) и мишень направленных («таргетных») агентов [1-5]. Одновременно, в связи с существенным прогрессом иммунофармакологических подходов при лечении различных заболеваний, активно развивается новое направление – иммунотерапия злокачественных новообразований [6], которая

лежит в русле идеи о развитии опухоли в зависимости от микроокружения [1].

Иммунотерапия онкологических заболеваний реализуется посредством влияния на распознавание или презентации антигена, активации иммунного ответа, стимуляции воспаления или эффекторного звена иммунной системы [4, 6-8].

Таким образом, разработка новых препаратов для иммунотерапии и иммунореабилитации злокачественных новообразований является актуальной задачей [6, 9].

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» разработано и запатентовано соединение СНК-411 (2-изобутил-4,6-диметил-5-оксипиримидин), обладающее противоопухолевой активностью. В частности, соединение вызывает увеличение количества клеток субпопуляций Т-лимфоцитов мышей и количества естественных киллерных клеток, действует на костномозговое кроветворение, обладает противовоспалительными свойствами и стимулирующим действием на показатели клеточного и гуморального иммунного ответа [10].

Целью работы явилось изучение *in vitro* прямого цитотоксического эффекта СНК-411, а также цитотоксических эффектов комбинаций соединения СНК-411 с тегафуром и доксорубицином гидрохлоридом в МТТ-тесте с использованием клеток эритромиелоидной линии К-562, которое является обязательным этапом разработки согласно методическим рекомендациям по доклиническому изучению противоопухолевой активности новых соединений [11].

#### МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследования цитотоксического эффекта СНК-411 проводили на клетках эритромиелоидной линии человека К-562 (Российская коллекция культур клеток позвоночных, Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки К-562 выращивали в полной питательной среде RPMI-1640 (ООО «Биолот»), содержащей 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 10 мМ НЕРЕС-буфера, 2 мМ/мл глутамин, 40 мкг/мл гентамицин при 37 °С и в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> [12, 13]. Все реагенты компании НПП «ПанЭко».

В качестве препаратов сравнения использовали классические цитостатические препараты доксорубицин гидрохлорид (Sigma-Aldrich) и тегафур (Sigma-Aldrich) [14]. Соединения вносили в конечных концентрациях от 10<sup>-7</sup> М до 10<sup>-4</sup> М *per se* или в комбинациях. Каждую концентрацию соединений, а также их комбинации, исследовали в триплетах. При разведении СНК-411 и тегафура применяли 1% раствор диметилсульфоксида (ДМСО) (ООО «Биолот»), приготовленный с использованием ФСБ (фосфатно-солевой буфер), доксорубицин гидрохлорид разводили в ФСБ.

Определение цитотоксической активности СНК-411 проводили колориметрическим методом с использованием МТТ-теста. Опухолевые

клетки в концентрации 2 x 10<sup>4</sup> клеток/лунку засеивали в 96-луночные плоскодонные планшеты, добавляли по 10 мкл соединений с достижением указанных конечных разведений и инкубировали 48 ч в стандартных условиях. В качестве контроля использовали триплет лунок со средой RPMI-1640 с добавлением 10 мкл 1% ДМСО [15].

За 4 ч до окончания инкубационного периода в каждую лунку вносили по 10 мкл раствора МТТ (3[4,5-диметил-тиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолий) (Sigma-Aldrich). Стоковый раствор 5 мг/мл в ФСБ стерилизовали через фильтры с диаметром пор 0.22 мкм. После окончания инкубации клетки осаждали центрифугированием планшет при 450 g в течение 10 мин.

Супернатант аккуратно отбирали и в каждую лунку добавляли по 100 мкл изопропанола, содержащего 0.04 М HCl – растворителя кристаллов формазана. Осадок ресуспендировали и инкубировали 10 мин при 37 °С. Оптическую плотность раствора измеряли на спектрофотометре (Awareness, Австрия) при λ=545 нм и λ<sub>сравнения</sub>=630 нм.

Каждый эксперимент повторяли 3 раза. Степень подавления роста клеток линии К-562 вычисляли по формуле:

$$N \% = (1 - \text{Опыт} / \text{Контроль}) \times 100.$$

Статистический анализ полученных данных проводили с использованием программы Statistica 10. Результаты выражали в виде средней арифметической и ее средней ошибки, проверку данных на нормальность распределения выборок определяли по критерию Шапиро-Уилка, статистическую обработку экспериментальных данных проводили с помощью непарного t-критерия Стьюдента. Оценку гомогенности дисперсий, полученных данных проводили по Levene's test. Значимость действия факторов определяли с помощью двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с последующей обработкой методом множественных сравнений по Newman-Keuls post hoc test. Различия считали статистически значимыми при p<0.05.

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На рис. 1 приведены результаты, характеризующие влияние соединения СНК-411 на рост клеток линии К-562 в МТТ-тесте. Из приведенных данных следует, что значимое цитотоксическое действие, выражающееся в уменьшении долей жизнеспособных клеток на 36 % и 18 %, соединение СНК-411 проявило в концентрациях 10<sup>-4</sup> М и 10<sup>-5</sup> М.

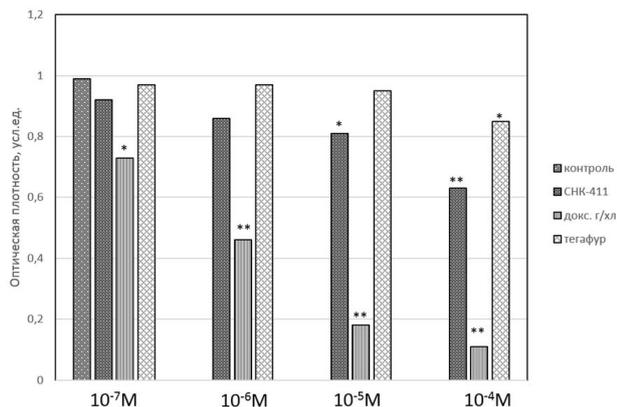


Рис. 1. Влияние СНК-411 на рост клеток линии К-562 в сравнении с доксорубицином гидрохлоридом и тегафуром в МТТ-тесте. Примечание: \* -  $p < 0.05$ , \*\* -  $p < 0.01$  статистическая значимость различий по сравнению с контрольной группой по непарному t-критерию Стьюдента.

Тевафур в этих же концентрациях снижал долю жизнеспособных клеток на 14 % и 4 % (рис. 1), что согласуется с ранее установленными данными [13; 16].

Таким образом, в концентрациях  $10^{-4}$  М и  $10^{-5}$  М соединение СНК-411 показывало прямой цитотоксический эффект выше, чем у тегафура, в 2 раза и 4.5 раза соответственно.

При испытании комбинации СНК-411 ( $10^{-5}$  М) + Тегафур ( $10^{-4}$  М) установлена аддитивность цитотоксических эффектов, количество жизнеспособных клеток снизилось на 34 % (рис. 1, рис. 2) против 18 % и 14 %, соответственно.

Доксорубин значительно снизил жизнеспособность клеток на 89 % ( $10^{-4}$  М), 81 % ( $10^{-5}$  М), 53 % ( $10^{-6}$  М), 14 % ( $10^{-7}$  М) и 11 % ( $10^{-8}$  М).  $IC_{50}$  доксорубина выявлено в концентрации  $10^{-6}$  М, что коррелируется с данными других исследований [2; 14].

При испытании комбинации доксорубина г/хл ( $10^{-7}$  М) с СНК-411 ( $10^{-5}$  М) происходило значимое увеличение подавления роста клеток, доля жизнеспособных клеток снизилась на 29 % против 14 % для отдельно взятых DOX ( $10^{-7}$  М) или 18% для СНК-411 ( $10^{-5}$  М).

Таким образом, по сравнению с отдельно взятыми соединениями приращение эффектов рассматриваемой комбинации составило 15 % и 11 %, соответственно.

В комбинации доксорубина г/хл ( $10^{-8}$  М) + СНК-411 ( $10^{-5}$  М) происходило значимое увеличение процента подавления роста клеток и составил 27 %, соответственно, против 11 % (DOX,  $10^{-8}$  М)

и 18 % (СНК-411,  $10^{-5}$  М). Выявлено приращение эффектов в комбинации по сравнению с отдельно взятыми соединениями. Не выявлено эффекта приращения действия доксорубина с более высокой концентрацией СНК-411. Результаты для DOX ( $10^{-7}$  М) + СНК-411 ( $10^{-4}$  М) и DOX ( $10^{-8}$  М) + СНК-411 ( $10^{-4}$  М) были 34 % и 33 %, соответственно (рис. 3).

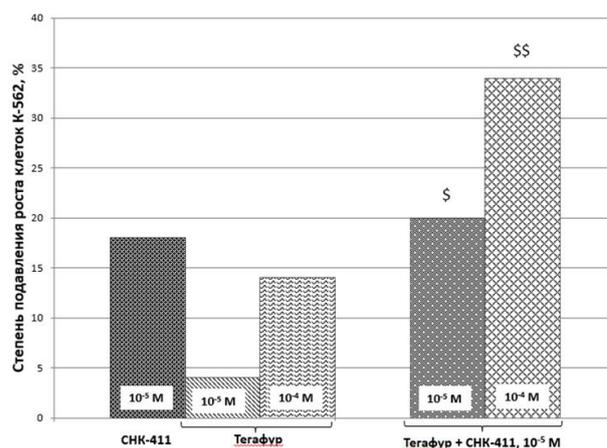


Рис. 2. Цитотоксический эффект соединения СНК-411 в концентрации  $10^{-5}$  М в комбинации с тегафуром; \$ - статистическая значимость различий по сравнению с группами СНК-411,  $10^{-5}$  М и тегафуром,  $10^{-5}$  М; \$\$ - статистическая значимость различий по сравнению с группами СНК-411,  $10^{-5}$  М и тегафуром,  $10^{-4}$  М (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующей обработкой методом множественных сравнений по Newman-Keuls test ( $p < 0.01$ )).

Анализ результатов показал, что СНК-411 в концентрациях  $10^{-4}$  М и  $10^{-5}$  М обладает способностью подавлять долю жизнеспособных клеток линии К-562 на 36 % и 18 %, а в сочетании с тегафуром выявлена аддитивность цитотоксического эффекта. Выявлены приращения эффектов СНК-411 в комбинациях с наименьшими концентрациями доксорубина гидрохлорида.

Согласно данным предыдущих исследований, соединение СНК-411, как и другие производные пиримидинового ряда, обладает избирательным действием на субпопуляцию иммунокомпетентных клеток, а именно: Т-хелперы, натуральные киллеры и цитотоксические Т-лимфоциты [10, 17]. Данные эффекты производных пиримидинов авторы объясняют стимуляцией лимфопоэза и активацией созревания предшественников Т-лимфоцитов до зрелых форм непосредственно в костном мозге с

последующим выходом в циркуляцию уже зрелых Т-клеточных форм [18].

Выявленный впервые прямой цитотоксический эффект *in vitro* для СНК-411 возможно объяснить тем, что производные пиримидина или пурина при включении в ДНК вызывают нарушение репликации или транскрипции и способствуют гибели активно пролиферирующих опухолевых клеток. В частности, препарат тегафур объединяет в молекуле пиримидиновое кольцо и тетрагидрофурановый остаток и является классическим препаратом при лечении злокачественных новообразований [17].

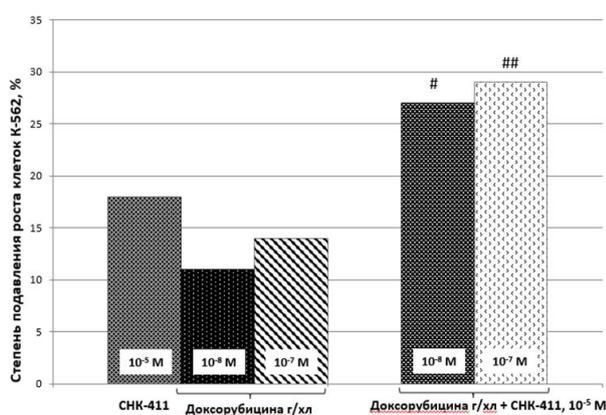


Рис.3. Цитотоксический эффект соединения СНК-411 в концентрации  $10^{-5}$  М в комбинации с доксорубином гидрохлоридом; # - статистическая значимость различий по сравнению с группами СНК-411,  $10^{-5}$  М и доксорубин гидрохлоридом,  $10^{-8}$  М; ## - статистическая значимость различий по сравнению с группами СНК-411,  $10^{-5}$  М и доксорубин гидрохлоридом,  $10^{-7}$  М (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с последующей обработкой методом множественных сравнений по Newman-Keuls test ( $p < 0.01$ )).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая изложенное можно заключить, что соединение СНК-411, в дополнение к ранее выявленному стимулирующему действию на противоопухолевое звено иммунитета, обладает цитотоксическим действием и что, особенно важно, проявляет аддитивность эффектов и приращение действия в различных концентрациях в сочетании с цитостатическими препаратами. Данное наблюдение рас-

ширяет спектр представлений о возможных механизмах противоопухолевой активности СНК-411.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лихтенштейн А. В. Исследования рака: бег с препятствиями / А. В. Лихтенштейн // Биохимия. — 2014. — Т.79. — № 5. — С. 493 – 500.
2. Cui X. Y. Hypoxia influences stem cell-like properties in multidrug resistant K-562 leu-kemic cells / X. Y. Cui [et al.]. // Blood Cells Molecules Diseases. — 2013. — №51. — P. 177-184.
3. Fauci J. M. Monoclonal antibody-based immunotherapy of ovarian cancer: Targeting ovarian cancer cells with the B7-H3-specific mAb 376.96 / J. M. Fauci [et al.]. // Gynecologic Oncology. — 2014. — №132. — P. 203-210.
4. Noguchi A. Impaired and imbalanced cellular immunological status assessed in advanced cancer patients and restoration of the T cell immune status by adoptive T-cell immunotherapy / A. Noguchi [et al.]. // International Immunopharmacology. — 2013. — Vol. 18. — № 1. — P. 90-97.
5. Taylor R.P. The role of complement in mAb-based therapies of cancer / R.P. Taylor, M.A. Lindorfer // Methods. — 2014. — №65. — P. 18-27.
6. Препараты, методы и схемы иммунотерапии опухолей: справочник / В. И. Новиков [и др.]. — М.: Медицина, 2006. — 152 с.
7. Ito F. Cancer Immunotherapy. Current Status and Future Directions / F. Ito, A. E. Chang // Surgical Oncology Clinics of North America. — 2013. — Vol. 22. — № 4. — P. 765-783.
8. Tucker Z. Adjuvant immunotherapy for non-small cells lung cancer / Z. C. G. Tucker [et al.]. // Cancer Treatment Reviews. — 2012. — № 38. — P. 650-661.
9. Иммунореабилитация (патофизиологические и клинические аспекты): [Рук. для врачей] / В. В. Чиркин, В. И. Карандашов, Ф. Н. Палеев. — М.: Медицина, 2003. — 400 с.
10. Производное 5-оксипиримидина, обладающее противоопухолевой активностью: пат. 2518889 Рос. Федерация. № 2011107831/04; заявл. 01.03.2011; опубл. 10.06.2014, Бюл. № 16, 4 с.
11. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / ред. колл. А. Н. Миронов [и др.]. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.
12. Черепович В. С. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки кле-

точной и лекарственной цитотоксичности / В. С. Черепович [и др.]. // Белорусский меди-цинский журнал. — 2006. — № 2(16). — С. 106-108.

13. Jedrych E. Evaluation of cytotoxic effect of 5-fluouracil on human carcinoma cells in microfluidic system / E. Jedrych [et al.]. // Sensors and Actuators B: Chemical. — 2011. — Vol. 160. — №1. — P. 1544 – 1551.

14. Островская Л. А. Сверхмалые дозы доксорубина: ингибирование опухолевого роста в эксперименте / Л. А. Островская [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2002. — № 4. — С. 52 – 54.

15. Mossman T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays / T. Mossman. // Journal of Immunological Methods.—1983. — № 65. — P. 55 - 63.

16. Anitha A. In vitro combinatorial anticancer effects of 5-fluouracil and curcumin loaded N,O-carboxymethyl chitosan nanoparticles toward colon cancer / A. Anitha [et al.]. // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. — 2014. — V. 38. — №1. — P. 238 – 251.

17. Сафаев Р. Д. Роль фторпиримидиновых препаратов в онкологической практике / Р. Д. Сафаев [и др.] // Oncology.ru («онкология»). — 2007. — Режим доступа: [http://www.oncology.ru/specialist/journal\\_oncology/archive/0408/015.pdf](http://www.oncology.ru/specialist/journal_oncology/archive/0408/015.pdf).

18. Сватко Л. Г. Методика комплексного лечения хронического кистозного синусита / Л. Г. Сватко, В. Н. Красножен, Е. М. Покровская // Вестник оториноларингологии. — 2008. — №6. — С. 7 - 9.

---

*Кузнецова Ольга Сергеевна* — аспирант, младший научный сотрудник, лаборатория лекарственной токсикологии, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва, Россия; e-mail: [olgapharm@inbox.ru](mailto:olgapharm@inbox.ru).

*Таллерова Анна Вадимовна* — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, лаборатория лекарственной токсикологии, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва, Россия; e-mail: [antatall@gmail.com](mailto:antatall@gmail.com).

*Соколовская Алиса Анатольевна* — ведущий научный сотрудник ФГБНУ «НИИ общей патологии и патофизиологии», г. Москва, Россия; e-mail: [alice.sokolovskaya@gmail.com](mailto:alice.sokolovskaya@gmail.com).

*Никитин Сергей Васильевич* — кандидат химических наук, старший научный сотрудник, отдел химии лекарственных средств, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» г. Москва, Россия; e-mail: [madji@list.ru](mailto:madji@list.ru).

*Коваленко Лариса Петровна* — доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник, лаборатория лекарственной токсикологии, ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова», г. Москва, Россия; e-mail: [kovalenko.larisa@mail.ru](mailto:kovalenko.larisa@mail.ru).

*Kuznetsova Olga S.* — postgraduate, junior research fellow, Department of Drug Toxicology, Zakusov State Institute of Pharmacology, Moscow, Russia; e-mail: [olgapharm@inbox.ru](mailto:olgapharm@inbox.ru).

*Tallerova Anna V.* — PhD, senior research fellow, Department of Drug Toxicology, Zakusov State Institute of Pharmacology, Moscow, Russia; e-mail: [antatall@gmail.com](mailto:antatall@gmail.com).

*Sokolovskaya Alice A.* — PhD, leading research fellow, The Institute of Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia; e-mail: [alice.sokolovskaya@gmail.com](mailto:alice.sokolovskaya@gmail.com).

*Nikitin Sergey V.* — PhD, senior research fellow, Department of Chemistry, Zakusov State Institute of Pharmacology, Moscow, Russia; e-mail: [madji@list.ru](mailto:madji@list.ru).

*Kovalenko Larisa P.* — PhD, leading research fellow, Department of Drug Toxicology, Zakusov State Institute of Pharmacology, Moscow, Russia; e-mail: [kovalenko.larisa@mail.ru](mailto:kovalenko.larisa@mail.ru).