

Н. О. Мешкова, О. В. Міщенко, В. В. Захаренко, Н. І. Шарикіна

## Цитостатична дія $\alpha_1$ -адреноблокаторів – похідних хіназоліну

ДУ «Інститут фармакології та токсикології  
Національної академії медичних наук України», м. Київ

*Ключові слова:* похідні хіназоліну, цитостатична дія, лінія недрібноклітинного раку легенів A-549, тест-стандарт Ерлотиніб

Сьогодні значна увага приділяється вивченню таргетних, молекулярно спрямованих протипухлинних засобів, які мають конкретні мішені впливу на злоякісно змінені проліферативні процеси [1].

Наприкінці ХХ – початку ХХІ століття значну увагу привернули низькомолекулярні сполуки-похідні хіназоліну, які виявляли здатність блокувати один з головних сигнальних шляхів, у якому центральна роль належить рецептору епідермального фактора росту (EGFR) [2].

Зв'язування похідними хіназоліну АТФ блокує фосфорилування тирозину рецептора, перериває передачу мітогенного сигналу, гальмуючи пухлинний ріст [3].

У той час з'явилися перші інгібітори активності тирозинкіназ Ерлотиніб (Тарцева), Гефитиніб [4, 5]. У подальшому кількість таких інгібіторів збільшилася до декількох десятків, і з'являються нові інгібітори тирозинкіназ, дія яких спрямована на різні форми пухлинного росту [6].

Увагу привернули відомі препарати – похідні хіназоліну, що використовуються в клінічній практиці як гіпотензивні засоби та засоби впливу на кровообіг при доброякісних пухлинах передміхурової залози [7] – Празозин та Доксазозин.

Спочатку вважалося, що такі засоби, як  $\alpha_1$ -адреноблокатори, поліпшують сечовиділення за рахунок впливу на судини передміхурової залози [8]. Натепер показано, що рецептори GPCR, до яких належать рецептори біогенних амінів, у тому

числі  $\alpha_1$ -адренорецептори, мають здатність до трансактивації з рецепторами EGFR, тобто  $\alpha_1$ -адреноблокатори можуть інгібувати активність EGFR, як це було показано для Ерлотинібу [9, 10].

У дослідженні надано матеріали порівняльного вивчення цитостатичної дії зазначених гіпотензивних засобів порівняно з Ерлотинібом.

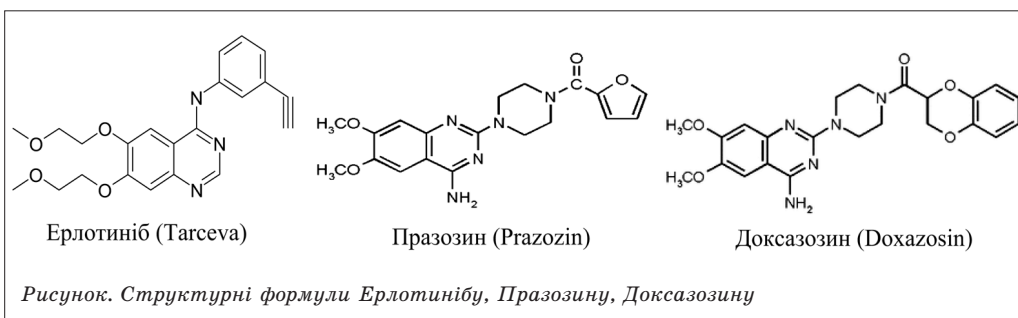
*Мета дослідження* – оцінити перспективи пошуку цитостатичних та протипухлинних засобів серед похідних хіназоліну.

**Матеріали та методи.** Цитотоксична дія похідних хіназоліну на культурі пухлинних клітин з експресованою активністю рецепторів епідермального фактора росту.

Дослідження проведені на клітинах недрібноклітинного раку легенів людини А549, що культивувалися в поживному середовищі RPMI-1640 (HyClone, США) з додаванням 10 % ембріональної сироватки теляти (HyClone, США) у зволоженої атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % повітря (стандартні умови).

Клітини висівали в 96-лунковий планшет у концентрації 2000 клітин на лунку й культивували за стандартних умов протягом 5 діб (до досягнення рівня конфлюентності 90 %).

Визначали цитотоксичну дію кожної з досліджуваних речовин у шести концентраціях. Для цього по 10 мг речовин розчиняли в ДМСО і вносили у відповідні лунки мікротитрувального планшета, що вже містили клітини й повне поживне середовище, до концентрації, при якій вміст розчинника не перевищував 0,5 %. Отримані розчини розтитровували дворазовими розведеннями та культивували протягом 24 год. У планшеті залишали лунки з інтактними клітинами як контроль життєздатності клітин.



Оцінку цитотоксичної активності речовин на клітинах недрібноклітинного раку легенів людини A549 проводили в колориметричному тесті з використанням жовтого барвника (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум броміду (MTT) (Applichem, Німеччина), що в живих клітинах перетворюється на пурпурний формазан. Після закінчення експозиції досліджуваних сполук з лунок видаляли культуральне середовище, вносили по 20 мкл розчину MTT із 100 мкл свіжого поживного середовища та інкубували протягом 4 год у темряві за стандартних умов. Після цього вміст лунок видаляли й розчиняли MTT-формазанові кристали додаванням 50 мкл ДМСО у кожен лунку. Оптичну густина забарвлених клітин вимірювали на спектрофотометрі для мікропланшета (АКИЦ-01, Росія) при довжині хвилі збудження 490 нм [11].

Статистичну обробку та графічне оформлення результатів здійснювали за допомогою MS Excel 2007 (Microsoft Office, США).

Цитотоксичну та антипроліферативну активність визначали за показником «інгібуюча концентрація 50» ( $IC_{50}$  – концентрація досліджуваної речовини, за якої гине 50 % клітин), що вираховували за програмою Origin 6.1, (OriginLab Co, США).

Згідно з наведеним методом, вивчено активність відомих препаратів – похід-

них хіназоліну (Празозин, Доксазозин) порівняно з Ерлотинібом (рисунок).

**Результати та їх обговорення.** Результати дослідження цитостатичної дії похідних хіназоліну (модель – лінія недрібноклітинного раку легенів людини A-549) наведено в таблиці.

Речовина вважається цитостатично активною в разі  $IC_{50} \leq 10^{-4}$  М ( $\log IC_{50} \leq -4$ ) [12].

Вивчені препарати мають  $\log (IC_{50}) \leq -4$ , що вказує на їхню високу цитостатичну активність, вищу, ніж у тест-стандарту Ерлотинібу.

$\alpha_1$ -Адреноблокатори – похідні хіназоліну, що блокують  $\alpha_1$ -адренорецептори (Празозин, Доксазозин), перевищують чи близькі за рівнем цитостатичної дії до похідного хіназоліну Ерлотинібу, для якого встановлена здатність блокувати активність EGFR, що дозволяє припустити їх однаковий характер дії за рахунок впливу на трансактивацію сигнальних шляхів (GPCR, EGFR).

#### Висновок

Одержані дані дають підстави вважати, що після додаткових доклінічних досліджень серед відомих  $\alpha_1$ -адреноблокаторів виявлено сполуку-лідера як засіб, для якого можна буде поширити показання для застосування при злоякісних новоутвореннях певного гістотипу та локалізації.

Таблиця

**Показники  $IC_{50}$  досліджувальних препаратів на клітинній лінії недрібноклітинного раку легенів людини (A-549)**

Сполука	$IC_{50}$ моль/л	$\log (IC_{50})$
Ерлотиніб	$3,8 \cdot 10^{-5}$	- 4,4
Празозин	$1,5 \cdot 10^{-5}$	- 4,8
Доксазозин	$4,56 \cdot 10^{-6}$	- 5,34

1. *Giaccone G.* / Targeted Therapies in oncology / Giuseppe Giaccone, Jean-Charles Soria . – CRC Press, 2007. – 424 p.
2. *John D. Haley* EGFR Signaling Networks in Cancer Therapy / John D. Haley, William John Gullick. – New York : Humana Press, 2009. – 395 p.
3. The epidermal growth factor receptor family as a central element for cellular signal transduction and diversification / Prenzel N., Fischer O.M., Streit S. [et al.] // *Endocr. Relat. Cancer.* – 2001. – V. 8, № 1. – P. 11–31.
4. *Steins M.* Erlotinib / Steins M., Thomas M., Geißler M. // *Recent Results Cancer Res.* – 2014. – V. 201. – P. 109–123.
5. *Rahman A. F.* Gefitinib / Rahman A. F., Korashy H. M., Kassem M. G. // *Profiles Drug Subst. Excip. Relat. Methodol.* – 2014. – № 39. – P. 239–264.
6. Tyrosine kinase inhibitors / Natoli C., Perrucci B., Perrotti F. [et al.] // *Curr. Cancer Drug Targets.* – 2010. – V. 10, № 5. – P. 462–483.
7. *Garg G.* Management of benign prostate hyperplasia: an overview of alpha-adrenergic antagonist / Garg G., Singh D., Saraf S. // *Biol. Pharm. Bull.* – 2006. – V. 29, № 8. – P. 1554–1158.
8. *Kumar V. L.* Alpha adrenergic blockers in the treatment of benign hyperplasia of the prostate / Kumar V. L., Dewan S. // *Int. Urol. Nephrol.* – 2000.–V. 32, № 1. – P. 67–71.
9. *Liebmann C.* EGF receptor activation by GPCRs: an universal pathway reveals different version / Liebmann C. // *Mol. Cell Endocrinol.* – 2011.–V. 331, № 2. – P. 222–231.
10. *Bhola N. E.* Crosstalk between G-protein-coupled receptors and epidermal growth factor receptor in cancer / Bhola N. E., Grandis J. R. // *Front. Biosci.* – 2008.–V. 1, № 13. – P. 1857–1865.
11. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / Mosmann T. // *Journal of Immunological Methods.* – 1983. – V. 1–2, № 65. – P. 55–63.
12. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ / Трещалина Е. М., Жукова О. С., Герасимова Г. К. [и др.] // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. Хабриева. – 2 изд., перераб. и доп. – Москва : Медицина, 2005. – С. 637–651.

### **Н. О. Мешкова, О. В. Мищенко, В. В. Захаренко, Н. І. Шарикіна** **Цитостатична дія $\alpha_1$ -адреноблокаторів – похідних хіназоліну**

$\alpha_1$ -Адреноблокатори хіназолінового ряду увійшли в клінічну практику як гіпотензивні засоби та засоби, що полегшують сечовипускання в разі доброякісних новоутворень передміхурової залози. Надалі було виявлено їхній вплив на певні форми пухлинного росту.

*Мета дослідження* – оцінити перспективи пошуку цитостатичних засобів серед похідних хіназоліну.

Проведено дослідження цитостатичної дії препаратів хіназолінового ряду (Празозин, Доксазозин), блокаторів  $\alpha_1$ -адренорецепторів (родина GPCR) порівняно з відомим блокатором активності сигнального шляху EGFR хіназолінового ряду Ерлотинібом.

Дослідження було проведено на клітинах недрібноклітинного раку легенів людини A549, що культивували в поживному середовищі RPMI-1640 (HyClone, США). Клітини висівали в 96-луночковий планшет у концентрації 2000 клітин на одну лунку. Термін культивування з препаратами (10 мг) – 5 діб. Оцінку цитотоксичної активності препаратів проводили в колориметричному тесті з використанням жовтого барвника (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразолію броміду (MTT) (Applichem, Німеччина).

Показано, що вивчені препарати Празозин та Доксазозин за цитотоксичною дією ( $\log(\text{IC}_{50}) \leq -4$ ) на лінії недрібноклітинного раку легенів людини (A-549) перевищують чи близькі до Ерлотинібу: – 4,8, – 5,34, – 4,4 відповідно.

Належність досліджених препаратів і препарату стандарту Ерлотинібу до похідних хіназоліну, близькість їхньої цитостатичної дії вказує на аналогічні механізми дії на сигнальні шляхи рецепторів сімейства GPCR і EGFR та шляхи впливу на їхню трансактивацію.

*Ключові слова:* похідні хіназоліну, цитостатична дія, лінія недрібноклітинного раку легенів A-549, тест-стандарт Ерлотиніб

### **Н. А. Мешкова, О. В. Мищенко, В. В. Захаренко, Н. И. Шарыкина** **Цитостатическое действие $\alpha_1$ -адреноблокаторов – производных хиназолина**

$\alpha_1$ -Адреноблокаторы хиназолинового ряда вошли в клиническую практику как гипотензивные средства и средства, облегчающие мочеиспускание при доброкачественных новообразованиях предстательной железы. В дальнейшем было обнаружено их влияние на определенные формы опухолевого роста.

*Цель исследования* – оценить перспективы поиска цитостатических средств среди производных хиназолина.

Проведено исследование цитостатического действия известных препаратов хиназолинового ряда (Празозин, Доксазозин), блокаторов  $\alpha_1$ -адренорецепторов (семейство GPCR) по сравнению с известным блокатором активности сигнального пути EGFR хиназолинового ряда Эрлотинибом.

---

Исследования были проведены на клетках немелкоклеточного рака легких человека A549, которые культивировались в питательной среде RPMI-1640 (HyClone, США). Клетки были высеваны в 96-луночный планшет в концентрации 2000 клеток на одну лунку. Срок культивации с препаратами (10 мг) – 5 суток. Оценку цитотоксической активности препаратов проводили колориметрически с использованием желтого красителя 3-(4,5 диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромидом (МТТ) (Applichem, Германия).

Показано, что изученные препараты, Празозин и Доксазозин, по цитотоксическому действию ( $\log(\text{IC}_{50}) \leq -4$ ) на линии немелкоклеточного рака легких человека (А-549) превышают или близки к Эрлотинибу: – 4.8, – 5.34, – 4,4 соответственно.

Принадлежность изученных препаратов и препарата стандарта Эрлотиниба к производным хиназолина, сопоставимость их цитостатического действия указывает на аналогичные механизмы действия на сигнальные пути рецепторов семейства GPCR и EGFR и пути влияния на их трансактивацию.

*Ключевые слова: производные хиназолина, цитостатическая активность, линия немелкоклеточного рака легких А-549, тест-стандарт Эрлотиниб*

**N. Meshkova, O. Mischenko, V. Zakharenko, N. Sharykina**

### **Cytostatic activity of quinazoline-derived $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists**

Quinazoline-derived  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists were approved for clinical use as anti-hypertensive agents and for the treatment of lower urinary tract symptoms associated with benign prostate hyperplasia. They were further revealed to impact on some types of tumors.

*The aim of the study* – to assess prospects of research cytotoxic and anticancer agents among quinazoline derivatives.

This article represents results of the investigation of cytostatic activity of quinazoline derivatives (Prazosin, Doxazosin) with ability to block the activity of  $\alpha_1$ -adrenoceptor (GPCR family) in comparison with a well-known quinazoline-derived EGFR inhibitor Erlotinib.

Study was conducted using human lung cancer cell line A549, which were cultivated in the nutrient medium RPMI-1640 (HyClone, USA). The cells seeded into standard cell culture 96-well plates at a concentration of 2000 cells per well. Term of drugs exposition (10 mg) – 5 days. Evaluation of the cytotoxic activity of drugs was carried out in colorimetric test using yellow dye (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (MTT) (Applichem, Germany).

Investigated drugs Prazosin and Doxazosin showed higher or similar cytostatic activity ( $\log(\text{IC}_{50}) \leq -4$ ) than reference drug Erlotinib against A549 human lung cancer cell line: – 4.8, – 5.34, – 4,4.

The studied  $\alpha_1$ -adrenoceptor antagonists and reference drug Erlotinib belong to quinazoline-based compounds and possess high cytostatic activity, that indicate the analogous mechanisms of their action on the GPCR and EGFR signaling pathways and the effects on their transactivation.

*Key words: quinazoline derivatives, cytostatic activity, human lung cancer cell line A549, reference drug Erlotinib*

*Надійшла: 03.05.2015 р.*

---

**Контактна особа:** Мешкова Наталія Олександрівна, аспірант, відділ онкофармакології, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 94 65. Електронна пошта: mischenkov1b@yandex.ua