

Н. О. Мешкова<sup>1</sup>, О. В. Міщенко<sup>1</sup>, В. Л. Олійник<sup>1</sup>,  
Г. М. Олійник<sup>2</sup>, Н. І. Шарикіна<sup>1</sup>

## Дослідження цитостатичної дії похідних хіназоліну

<sup>1</sup>Державна установа «Інститут фармакології та токсикології Національної академії  
медичних наук України», м. Київ

<sup>2</sup>Державна установа «Науково-практичний центр ендovasкулярної нейроортопедії  
Національної академії медичних наук України», м. Київ

**Ключові слова:** похідні хіназоліну, Ерлотиніб, Теразозин, сполука 3105, трансдукція мітогенного сигналу EGFR, EGF, сурамін, тирфостин, цитостатична дія

Нашими попередніми дослідженнями була показана здатність  $\alpha_1$ -адреноблокаторів – похідних хіназоліну проявляти цитостатичну дію на лінії недрібноклітинного раку легенів людини та штамах експериментальних пухлин [1, 2], яка дорівнювала чи перевищувала активність препарату-стандарту Ерлотинібу, що є одним з провідних протипухлинних засобів для лікування недрібноклітинного раку легенів людини та низки інших форм пухлинної хвороби [3]. Найактивнішими серед похідних хіназоліну були Теразозин та сполука 3105.

**Мета дослідження** – вивчення окремих ланок цитостатичної дії Ерлотинібу, Теразозину та сполуки 3105 у трансдукції мітогенних сигналів каскаду епідермального фактора росту (EGF) та його рецептора (EGFR).

**Матеріали та методи.** *Культивування пухлинних клітин.* А549 – клітинна лінія недрібноклітинного раку легенів, отримана в 1972 році D. J. Giard та ін. шляхом культивування експлантів карциноматозної тканини легені 58-річного чоловіка [1].

Клітинну лінію недрібноклітинного раку легенів людини А549 культивували у повному поживному середовищі RPMI 1640 (HyClone, США) з додаванням 10 % ембріональної сироватки теляти (FBS) (HyClone, США) у зволоженої атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % повітря (стандартні умови). По досягненню

рівня конфлюентності моношару 80–90 % старе поживне середовище видаляли, додавали 1 мл 0,25 % трипсину (HyClone, США) та культивували за стандартних умов протягом 10 хв до відокремлення клітин від стінки флакона. Після інактивації трипсину 100 мкл FBS концентрацію клітин підраховували за допомогою камери Горяєва, розбавляли клітинну суспензію необхідною кількістю свіжого повного поживного середовища та висівали в 96-лунковий планшет у концентрації 10 000 клітин на 1 лунку і культивували за стандартних умов протягом 3 діб.

*Оцінка цитотоксичності сполук in vitro за допомогою МТТ-тесту.* EGF вносили в лунки в концентрації 100 нг/мл, решту досліджуваних сполук – у концентрації 100 мкмоль/л (n = 4). У планшеті залишали лунки з інтактними клітинами – контроль життєздатності клітин (n = 8). Оцінку цитотоксичної активності речовин на клітинах недрібноклітинного раку легенів людини А549 проводили в колориметричному тесті з використанням жовтого барвника (3-(4,5-диметилтіазол-2-іл)-2,5-дифенілтетразоліум бромід (МТТ) (Applіchem, Німеччина), що в живих клітинах перетворюється на пурпуровий формаза [4]. Після закінчення експозиції досліджуваних сполук з лунок видаляли культуральне середовище та вносили по 10 мкл розчину МТТ з 100 мкл свіжого поживного середовища та інкубували протягом 4 год у темряві за стандартних умов. Після цього вміст лунок видаляли й розчиняли МТТ-формаза нові кристали додаванням 50 мкл ДМСО у кожен лунку. Оптичну густину забарвлених клітин вимірювали

на спектрофотометрі для мікропланшет (АКИЦ-01, Росія) за довжини хвилі 490 нм. Ступінь пригнічення росту клітин у дослідних лунках визначали відносно контрольних лунок.

Статистичну обробку та графічне оформлення результатів здійснювали за допомогою MS Excel 2007 (Microsoft Office, США) з використанням t-критерію Стьюдента. Зміни вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

**Результати та їх обговорення.** Проведено вивчення впливів на ланки передачі мітогенного сигналу в каскаді епідермального фактора росту на лінії недрібноклітинного раку легенів з експресованою активністю рецептора епідермального фактора росту [1], екзогенного епідермального фактора росту, сураміну, який, за даними авторів, може переривати передачу мітогенного сигналу від епідермального фактора росту [7], протеази тирфостину, що інактивує фосфотирозин рецептора [8].

Додавання до клітин А549 екзогенного EGF практично не змінювало кількість живих клітин порівняно з контролем (клітини без додавання БАР) (оптична густина відповідно  $(0,82 \pm 0,12)$  та  $(0,68 \pm 0,11)$ ).

Тирфостин значно зменшує кількість живих клітин (оптична густина  $(0,12 \pm 0,01)$  порівняно з контролем  $(0,64 \pm 0,03)$ ). Тирфостин зменшує кількість живих клітин на фоні додавання EGF  $(0,15 \pm 0,01)$ .

Ерлотиніб має здатність значно знижувати кількість живих клітин лінії недрібноклітинного раку легенів люди-

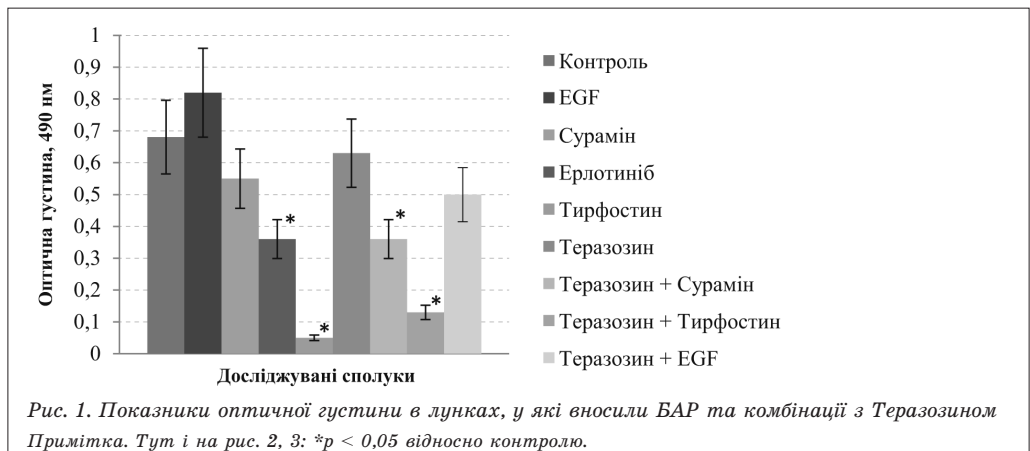
ни (А549) (показник оптичної густини  $(0,48 \pm 0,01)$  порівняно з контролем –  $(0,64 \pm 0,03)$ ).

При екзогенному введенні EGF + Ерлотиніб цей показник оптичної густини практично не змінюється  $(0,45 \pm 0,02)$ . Різде зниження живих клітин при введенні тирфостину  $(0,15 \pm 0,01)$  підсилюється введенням Ерлотинібу  $(0,10 \pm 0,01)$ .

Таким чином, у дії Ерлотинібу мають місце механізми, які здатні послаблювати дію EGF: пригнічуюча дія на активність рецептора епідермального фактора росту та пригнічення трансактивації рецепторів GPCR та EGFR.

Результати дослідження впливу на пухлинні клітини лінії недрібноклітинного раку легенів людини (А549) похідних хіназоліну – Теразозину та сполуки 3105, які були зазначені в попередніх дослідженнях як перспективні, відображено на рисунках 1–3. Препарат-стандарт – Ерлотиніб.

Теразозин незначно зменшує кількість живих клітин у культурі порівняно з контролем (оптична густина відповідно  $(0,63 \pm 0,05)$ ,  $(0,69 \pm 0,11)$ ), поступається Ерлотинібу  $(0,36 \pm 0,03)$ . Сурамін зменшує кількість живих клітин у культурі до  $(0,55 \pm 0,02)$ . При додаванні Теразозину показник становить  $(0,35 \pm 0,03)$ . Сполука 3105 при дії на культуру недрібноклітинного раку легенів людини знижує кількість живих клітин з  $(0,69 \pm 0,11)$  у контролі до  $(0,24 \pm 0,01)$ , що за ефективністю вище, ніж у Ерлотинібу  $(0,36 \pm 0,03)$  та значно перевищує Теразозин  $(0,63 \pm 0,05)$ .



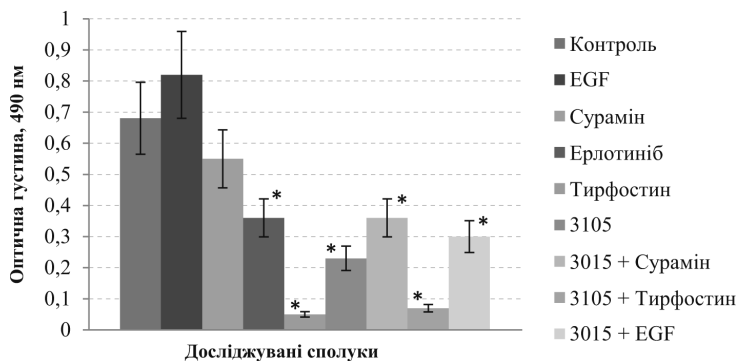


Рис. 2. Показники оптичної густини в лунках, у які вносили БАР та комбінації зі сполукою 3105.

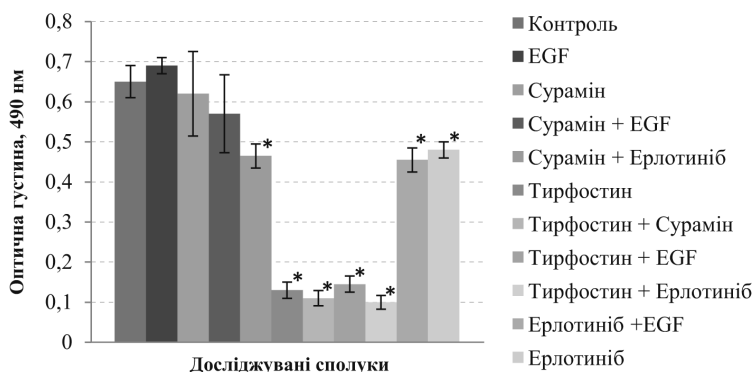


Рис. 3. Показники оптичної густини в лунках, у які вносили БАР та комбінації з Ерлотинібом.

У цілому, дослідження показали, що на лінії недрібноклітинного раку легенів людини (A549) здатність зменшувати кількість живих клітин найвираженіша в сполуки 3105. Її ефект перевищує такий у препарату-стандарту Ерлотинібу (показники оптичної густини  $(0,24 \pm 0,01)$  та  $(0,36 \pm 0,03)$  відповідно). Теразозин практично не виявив активність на цій моделі (показник

оптичної густини –  $(0,63 \pm 0,05)$ , контроль –  $(0,69 \pm 0,11)$ .

### Висновок

Показано, що за цитостатичною активністю серед досліджуваних похідних хіназоліну найвищий ефект має сполука 3105, дія якої перевищувала таку відомого таргетного препарату Ерлотинібу.

1. *In vitro* cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors / Giard D. J., Aaronson S. A., Todaro G. J. [et al.] // J. Natl. Cancer Inst. – 1973. – V. 51, № 5. – P. 1417– 1423.
2. Цитостатична дія  $\alpha_1$ -адреноблокаторів – похідних хіназоліну / Мешкова Н. О., Міщенко О. В., Захаренко В. В., Шарикіна Н. І. // Фармакологія та лікарська токсикологія. – 2015. – № 4– 5 (45) – С. 65– 68.
3. D'Arcangelo M. Erlotinib in the first-line treatment of non-small -cell lung cancer / D'Arcangelo M., Cappuzzo F. // Expert Rev. Anticancer Ther. – 2013. – V. 13, № 5. – P. 523– 533.
4. 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.
5. Analysis of deletions of the carboxyl terminus of the epidermal growth factor receptor reveals self-phosphorylations at tyrosine 992 and enhanced *in vivo* tyrosine phosphorylation of cell substrates / Walton G.M., Chen W.S., Rosenfeld M.G. [et al.] // J. Biol. Chem. – 1990. – V. 265. – P. 1750–1754.
6. Hongxiang Hui // The  $\alpha_1$ -adrenergic receptor antagonist doxazosin inhibits EGFR and NF- $\kappa$ B signaling to induce breast cancer cell apoptosis / Hongxiang Hui, M. A. Fernando, A. P. Heaney // European Journal of Cancer. – 2008. – V. 44, №1. – P. 160–166.

- 
7. Mechanisms of growth stimulation by suramin in non-small-cell lung cancer cell lines / Lokshin A., Peng X., Campbell P.G. [et al.] // Cancer Chemother Pharmacol. – 1999. – V. 43, № 4. – P. 341– 347.
  8. Weyergang A. Photodynamic targeting of EGFR does not predict the treatment outcome in combination with the EGFR tyrosine kinase inhibitor Tyrophostin AG1478 / Weyergang A., Kaalhus O., Berg K. // Photochem Photobiol Sci. – 2008 – V. 7, № 9. – P. 1032–1040.

**Н. О. Мешкова, О. В. Мищенко, В. Л. Олійник, Г. М. Олійник, Н. І. Шарикіна**  
**Дослідження цитотоксичної дії похідних хіназоліну**

На лінії недрібноклітинного раку легенів людини A549 було досліджено вплив похідних хіназоліну, а також EGF, сураміну і тирфостину на передачу мітогенного сигналу в каскаді епідермального фактора росту. За допомогою МТТ-тесту показано, що серед похідних хіназоліну цитотоксична дія найбільша в сполуку 3105. Протипухлинна активність останньої перевищує таку препарату-стандарту Ерлотинібу.

*Ключові слова:* похідні хіназоліну, Ерлотиніб, Теразозин, сполука 3105, трансдукція мітогенного сигналу EGFR, EGF, сурамін, тирфостин, цитостатична дія

**Н. О. Мешкова, О. В. Мищенко, В. Л. Олейник, Г. М. Олейник, Н. И. Шарыкина**  
**Исследование цитотоксического действия производных хиназолина**

На линии немелкоклеточного рака легких человека A549 изучено влияние производных хиназолина, а также EGF, сурамина и тирфостина, на передачу митогенного сигнала в каскаде эпидермального фактора роста. С помощью МТТ-теста показано, что среди производных хиназолина цитотоксическое действия наиболее выражено у вещества 3105. Противоопухолевая активность последнего превышает активность препарата-стандарта Эрлотиниба.

*Ключевые слова:* производные хиназолина, Эрлотиниб, Теразозин, вещество 3105, трансдукция митогенного сигнала EGFR, EGF, сурамин, тирфостин, цитостатическое действие

**Н. О. Meshkova, O. V. Mishchenko, V. L. Oliynyk, G. M. Oliynyk, N. I. Sharykina**  
**The investigation of cytostatic action of quinazoline derivatives**

On the non-small-cell lung cancer cell line A549 there was studied the influence of quinazoline derivatives, EGF, suramin and tyrophostin on mitogen signal transmission in EGF signaling pathway. With the use of MTT assay it was shown that among all quinazoline derivatives studied in this paper substance 3105 has the highest cytotoxic activity. Its antitumor activity exceeds such activity of standart drug Erlotinib.

*Key words:* quinazoline derivatives, Erlotinib, Terazosin, substance 3105, transduction of mitogenic signal EGFR: EGF, suramin, tyrophostin, cytostatic action

---

Надійшла: 4 грудня 2015 р.

**Контактна особа:** Мешкова Наталія Олександрівна, молодший науковий співробітник, відділ онкофармакології, ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», буд. 14, вул. Ежена Потье, м. Київ, 03680. Тел.: + 38 0 44 456 83 22. Електронна пошта: sharykina-39@ukr.net