

УДК 615.277.3:57.085.023

Л. В. ПОЗДНЯК<sup>1</sup>, А. Н. ЧЕРНОВ<sup>1</sup>, В. Н. КАЛЮНОВ<sup>1</sup>, С. Г. ПАШКЕВИЧ<sup>1</sup>, А. В. КЛЕЦКОВ<sup>2</sup>,  
С. К. ПЕТКЕВИЧ<sup>2</sup>, В. И. ПОТКИН<sup>2</sup>

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ  
4,5-ДИХЛОРИЗОТИАЗОЛ-3-КАРБОНОВОЙ КИСЛОТЫ, ЦИСПЛАТИНА  
И ИХ КОМБИНАЦИИ НА КЛЕТКИ АСЦИТНОЙ КАРЦИНОМЫ ЭРЛИХА**

<sup>1</sup>Институт физиологии НАН Беларуси, Минск,

<sup>2</sup>Институт физико-органической химии НАН Беларуси, Минск

(Поступила в редакцию 25.11.2013)

**Введение.** Выполнение настоящего исследования обусловлено двумя обстоятельствами. Одно из них исходит из признания того, что строго гармонизированные и жестко контролируемые в пространстве, времени, а также по амплитуде внешнесредовые влияния эндогенных ростовых факторов на базовые клеточные процессы (рост, развитие, пролиферация, дифференцировка, миграция, метаболизм, естественное отмирание, генная экспрессия) в злокачественных неоплазиях подвергаются дисрегуляции, служа одной из причин онкогенеза [5, 13, 30].

Чрезмерное образование ростовых факторов и их специализированных рецепторов, точечные мутации, хромосомные реаранжировки (делеции, дупликации, инверсии, транслокации и пр.), как и аберрантное сплайсирование рецепторов, приводят к созданию перманентной ауторегляторной петли обратной связи, благодаря чему трансформированные клетки становятся самодостаточными и независимыми от экстрацеллюлярных «директив», указывающих, как им поступить в данный момент, исходя из интересов целостного организма. В результате, ускользая из-под контроля в норме лимитирующих влияний, неопластические клетки приобретают присущие им черты: безудержность деления, иммортализованность, инвазивность, склонность к метастазированию, стремление к созданию собственной васкулярной системы [8, 9, 11, 22, 25].

Ключевая роль в данном процессе принадлежит тирозинкиназным рецепторам ростовых факторов. Именно постоянное самопроизвольное фосфорилирование тирозиновых или серинтреониновых остатков в интрацеллюлярных доменах с помощью АТФ даже в отсутствие лигандов способствует триггерированию нижележащих сигнальных каскадов, в результате чего трансформированные клетки приобретают витальность [24].

Поэтому сегодня ингибирование этого инициального пускового звена стало предметом активного исследования как натуральных [4], так и искусственно создаваемых аналогов [5, 23], отличных по природе и точкам непосредственного приложения. За последнее 10-летие фармакоиндустрия изготовила 11 уже одобренных Департаментом питания и лекарственных средств (FDA, США) тирозинкиназных ингибиторов, применяемых при терапии пациентов с разными типами опухолей, а 30 находятся в фазе клинических испытаний (в дальнейшем они могут быть использованы либо в качестве самостоятельных медикаментов, либо в сочетании с традиционными химиотерапевтическими схемами) [5, 23].

Среди них особенно успешными оказались селективные низкомолекулярные энзиматические супрессоры типа иматиниба (Imatinib, Gleevec), эрлатиниба (Erlatinib, Tarceva), gefитиниба (Gefitinib, Iressa), Az623 (Astra Zeneca) и др. [12, 15, 16, 28, 31], а также моноклональные антитела, перекрывающие взаимодействие ростовых факторов со своими высокоаффинными сайтами: герцептин (Herceptin, Trastuzumab), ритуксимаб (Rituximab, Retuxan), цетуксимаб (Cetuximab, Erbitux) и пр. [5, 23].

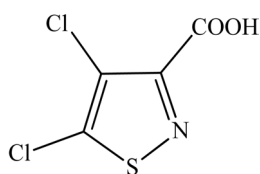


Рис. 1. Структурная формула 4,5-дихлоризотиазол-3-карбоновой кислоты – ИТКК  
(молекулярная масса 198,03, г/моль)

Недавно было установлено, что гетероциклические соединения ряда изотиазола являются ингибиторами киназ и способны гасить активность тирозинкиназных рецепторов фактора роста эндотелия сосудов 1 и 2 (VEGFR-1, VEGFR-2) [6], а одно из производных мочевины с изотиазоловым фрагментом (препарат CP-547.632) сейчас проходит клинические испытания [7].

Исследования, проведенные коллективом ИФОХ НАН Беларуси, были направлены на конструирование новых 5-замещенных 1,2-тиазол-3-ил карбамидов и их гетероциклических 1-2-оксазол-3-ил карбамид замещенных изомеров [3]. Некоторые из них продемонстрировали способность существенно усиливать цитотоксические эффекты в культуре клеток нейроэпителиальных опухолей человека [14].

Вторым поводом к проведению данной работы послужило то обстоятельство, что в последнее время был получен очередной реагент – 4,5-дихлоризотиазол-3-карбоновая кислота – ИТКК (рис. 1), антиопухолевые эффекты которого необходимо было изучить как при индивидуальном, так и при совместном с цитостатиками применении.

Цель работы – изучить цитотоксическое влияние 4,5-дихлоризотиазол-3-карбоновой кислоты на культивируемые клетки асцитной карциномы Эрлиха (АКЭ) и их поведение в организме животных при персональной и комбинированной аппликации со сниженной дозой цисплатина.

**Материалы и методы исследования.** Объектом исследования служили клетки АКЭ, как культивируемые, так и имплантированные половозрелым мышам (массой 23–25 г) обоего пола Af линии. Животные находились в стандартных условиях вивария Института физиологии НАН Беларуси, а все манипуляции с ними выполняли в соответствии с правилами, регламентированными Европейской конвенцией о гуманном обращении с животными, используемыми для экспериментальных и научных целей (Страсбург, 1986).

**Режим культивирования.** Исходные клеточные элементы для работы *in vitro* получали из асцитной жидкости мышей-опухоленосителей ( $n = 3$ ) и в количестве 800 тыс/мл помещали в 35-миллиметровые пластиковые чашки Петри (Nunc, Дания) со средой Игла в модификации Дульбекко (DMEM, Sigma-Aldrich, США), в которую затем добавляли 15 %-ную телячью эмбриональную сыворотку (Sigma-Aldrich, США) и  $10^{-4}$  г/мл раствора сульфата гентамицина («Белмедпрепараты», Беларусь). Посевы инкубировали в течение 2 сут в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе (Triple-Trak, Instruments, Великобритания) с 5 %-ным содержанием углекислоты при температуре 37 °С и 95 %-ной влажности [20].

**Протокол испытания реагентов.** По прошествии 24 ч от момента высевания, когда клеточная конфлюентность достигала 50–60 %-ного уровня, в питательную среду вносили либо ИТКК в концентрациях 0,1; 1 и 10 мкг/мл, либо цисплатин (ООО «ЛЭНС-Фарм», Россия) в дозе 1 мкг/мл, либо их комбинацию при 10-кратно сниженной концентрации цитостатика и максимальной ИТКК для верификации итогов их возможного взаимодействия. Экспонирование с ними длилось 1–2 сут, после чего оценивали индекс пролиферации и степень гибели клеток по сравнению с контрольными образцами, не подвергавшимися их влиянию.

Для определения митотического индекса из чашек Петри удаляли питательную среду. Оставшиеся клетки дважды промывали ЭДТА («Диалек», Беларусь) и на 2–3 мин погружали в раствор 0,25 %-ного трипсина и 0,02 %-ного ЭДТА (Sigma-Aldrich, США) при 37 °С. Затем их пипетировали и в объеме 20 мкл вносили в гематометр («Минимед», Россия), где производили количественный подсчет по всей площади камеры Горяева при разведении средой Дульбекко 1:100 по формуле

$$X = [N_n/N_0] \cdot 100,$$

где  $X$  – индекс пролиферации;  $N_n, N_0$  – соответственно численность клеток, подвергавшихся и не подвергавшихся обработке испытываемыми веществами.

Чувствительность неопластических клеток к тестируемым реагентам детектировали в гематометре по их витальности после предварительного (2–3 мин) пребывания в 0,2 %-ном растворе трипанового синего (Alta Aesar, Германия). Для этого средовое окружение заменяли 1 мл 0,25 %-ного раствора трипсина с ЭДТА, где образцы выдерживали 5 мин при 37 °С. Далее клетки пипетировали, окрашивали и переносили в камеру Горяева. Подсчитывали количество мертвых (поглотивших краситель) и живых (прозрачных) элементов в 15 больших квадратах по диагонали и устанавливали их соотношение [1].

Дополнительно к описанным процедурам с целью исключения возможных побочных влияний компонентов средового окружения (трипсин с версеном, трипановый синий и др.) на финальные результаты проводили анализ цифровых изображений при витальной фотосъемке культур с помощью цифровой камеры Altra 20 (Olympus, Япония), снабженной программным обеспечением Analysis getIT, и инвертированного микроскопа НУ-2Е (Carl Zeiss, Германия), используя программу Image J (версия 1.38r). С каждой чашки Петри ( $n = 60$ ) делали по 5 снимков в зоне аппликации агентов. Всего обследовано 65 посевов.

*Эксперименты in vivo.* По истечении двухнедельного карантина в подлопаточную область спины мышей ( $n = 80$ ) подкожно трансплантировали по 6 млн разведенных в растворе Хэнкса клеток АКЭ, полученных от предшествующей генерации мышей-опухоленосителей, в объеме 0,2 мл. В асептических условиях из брюшной полости убитых мышей извлекали асцитную жидкость и после разведения ее в растворе Хэнкса согласно общепринятой методике [2] подсчитывали количество в ней трансформированных клеток.

*Порядок испытания реагентов.* Тестируемые вещества вводили внутрибрюшинно на 8-е сутки после процедуры прививания АКЭ. Каждое из них инъецировали раз в день на протяжении 3 сут: ИТКК в концентрации 10 мг/мл (сообразно данным *in vitro*) – в объеме 0,2 мл ( $n = 19$ ), цисплатин – в дозе 0,5 мг/мл при пересчете на площадь поверхности тела мышей в объеме 0,1 мл ( $n = 22$ ), а их сочетание в том же режиме: сначала (инициально) – цитостатик (1/10 дозы), затем (контрлатерально) – ИТКК ( $n = 19$ ). Контролем служила группа животных ( $n = 20$ ), получавших эквивалентное количество физиологического раствора.

По прошествии 26-суточного постпрививочного периода у половины мышей определяли массу подкожно выросших новообразований ( $n = 40$ ). Мышей умерщвляли мгновенной дислокацией шейных позвонков в кранио-цервикальном направлении. Опухоли извлекали из области их локализации и взвешивали на электронных весах ARO640 (Ohaus Corp. Pine Brook, NJ, США).

Половину особей ( $n = 40$ ) обследовали на предмет установления увеличения продолжительности их жизни (УПЖ) как после обработки испытываемыми веществами ( $n = 30$ ), так и без нее ( $n = 10$ ). Увеличение этого показателя в процентах к контролю служило индикатором эффективности терапевтического применения тестируемых агентов. Она определялась по формуле

$$\text{УПЖ} = [(\text{СПЖ}_{\text{опыта}} - \text{СПЖ}_{\text{контроля}}) / \text{СПЖ}_{\text{контроля}}] \cdot 100 \%,$$

где СПЖ – средняя продолжительность жизни.

Статистический анализ результатов выполняли, используя программный пакет Statistica (версия 6.0). При сопоставлении двух групп по выраженности количественных признаков применяли тест Манна–Уитни для непараметрических выборок и  $t$ -критерий Стьюдента для совокупностей попарно связанных вариантов. Отличия относили к категории статистически значимых при  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Итоги анализа влияния ИТКК, цисплатина и их сочетания на митогенную активность и витальность клеток *in vitro* при одно- и двухсуточном экспонировании представлены в таблице и на рис. 2.

Из таблицы и рис. 2 видно, что ИТКК в различных разведениях практически независимо от времени экспонирования демонстрировала заметное подавление и митотической активности, и клеточной витальности. Однако ее эффекты по степени выраженности явно уступали таковым цисплатина как при одно-, так и при двухсуточной обработке культуральных объектов, а при одновременном внесении ее в питательную среду (10 мг/мл) ослаблялось индивидуальное влияние цитостатика на оба тестируемые показателя.

**Изменение индекса пролиферации и выживаемости клеток АКЭ при действии ИТКК, цисплатина и их сочетания на первые и вторые сутки экспонирования**

Серия опыта	Количество посевов	Концентрация реагентов, мг/мл	Индекс пролиферации	Гибель клеток, %
<i>Первые сутки</i>				
Контроль	5	–	$7,4 \pm 0,8$	$11,0 \pm 1,3$
Цисплатин	5	1,0	$1,2 \pm 0,1^*$	$82,6 \pm 13,3^*$
ИТКК	5	0,1	$1,7 \pm 0,4^*$	$28,7 \pm 6,7$
ИТКК	5	1,0	$4,4 \pm 0,9^*$	$19,1 \pm 4,6$
ИТКК	5	10,0	$3,5 \pm 0,8^*$	$54,4 \pm 8,7^*$
Цисплатин + ИТКК	5	0,1+10,0	$2,7 \pm 0,5^{*+}$	$68,0 \pm 7,9^*$
<i>Вторые сутки</i>				
Контроль	5	–	$4,9 \pm 0,3$	$18,2 \pm 1,6$
Цисплатин	5	1,0	$1,0 \pm 0,1^*$	$90,8 \pm 11,3^*$
ИТКК	5	0,1	$1,3 \pm 0,4$	$49,0 \pm 6,2$
ИТКК	5	1,0	$1,4 \pm 0,2^*$	$47,6 \pm 7,2^*$
ИТКК	5	10,0	$1,4 \pm 0,5^*$	$53,7 \pm 9,2^*$
Цисплатин + ИТКК	5	0,1+10,0	$2,6 \pm 0,3^{*+}$	$71,0 \pm 4,9^{*+}$

Примечание. \* – достоверные отличия от контроля; + – аналогичные отличия эффектов комбинационного воздействия от таковых при индивидуальном применении цитостатика.

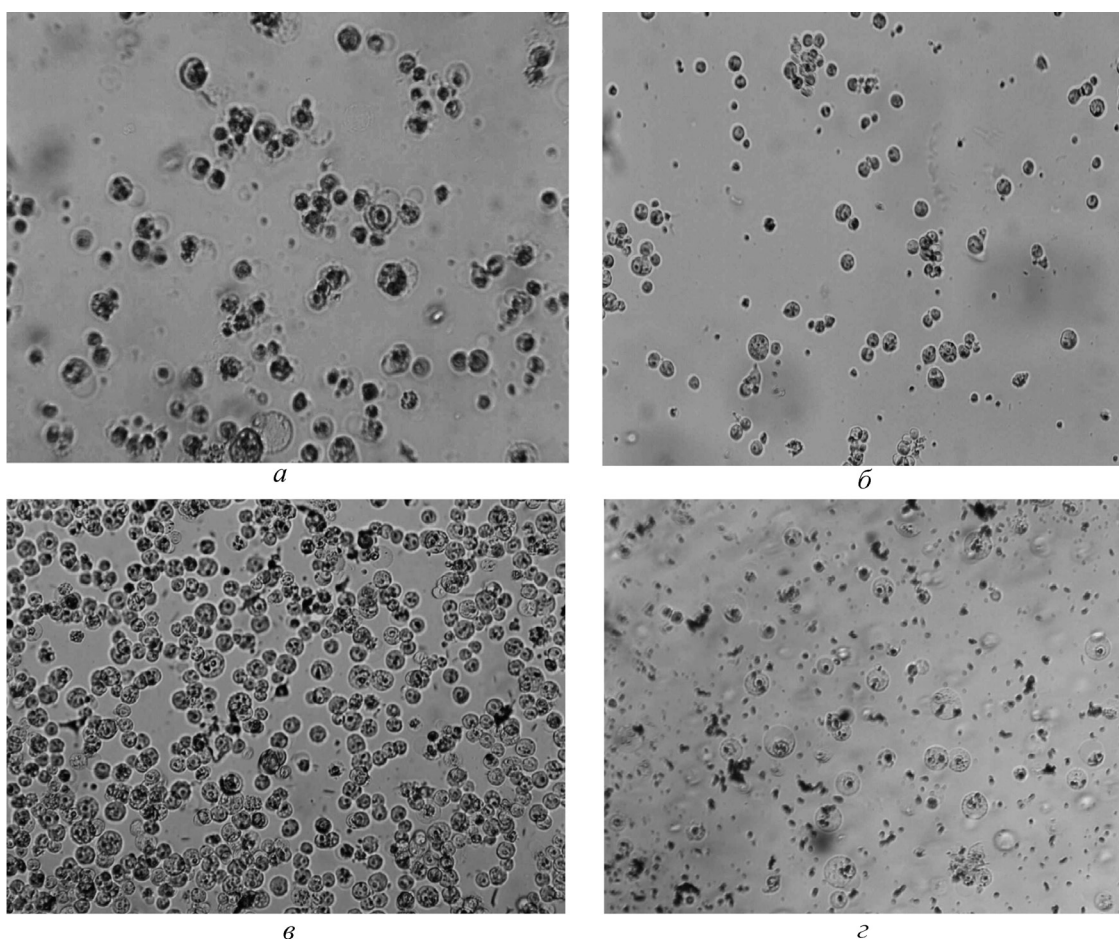


Рис. 2. Визуальная оценка численности клеток АКЭ к исходу первых суток их культивирования в контроле (в), при аппликации ИТКК (а), цисплатина (г) и их сочетания (б)



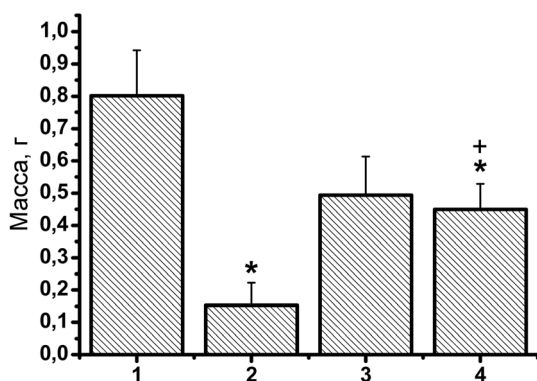


Рис. 3. Масса опухолей у мышей спустя 26 сут после имплантации им клеток АКЭ: 1 – контроль; 2, 3, 4 – по завершении 3-суточной обработки животных цисплатином, ИТКК и их комбинацией соответственно. Статистически значимые отличия: \* – от контроля, + – между группами животных 2 и 4

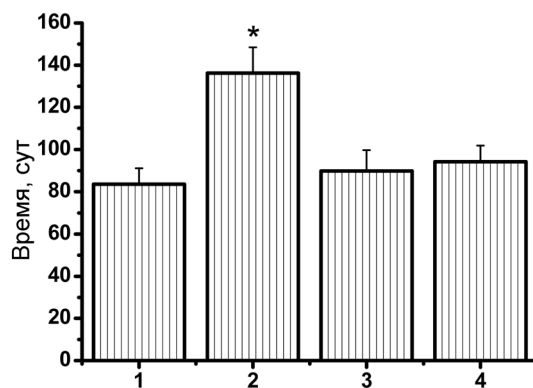


Рис. 4. Продолжительность жизни мышей после имплантации им клеток АКЭ: 1 – контроль; 2, 3, 4 – по завершении 3-суточной обработки животных цисплатином, ИТКК и их комбинацией соответственно. \* – статистически значимые отличия от контроля

Таким образом, ИТКК обладает умеренным (отчасти зависимым от дозы и времени экспонирования) ингибирующим влиянием на выживаемость и митоз клеток АКЭ. Однако при совмещении с цисплатином в 10-кратно сниженной концентрации она не в состоянии сохранить максимальный эффект химиопрепарата на эти показатели в дозировке, адекватной используемой в клинических условиях.

На втором этапе наблюдений сопоставительной оценке подвергалось индивидуальное и совмещенное противоопухолевое воздействие испытуемых реагентов на массу АКЭ и продолжительность жизни животных – ее носителей. Результаты этих исследований отражены на рис. 3, 4.

Наблюдается выраженное падение массы опухолей (с  $0,802 \pm 0,14$  г в контроле до  $0,494 \pm 0,12$  г), составившее у особей, получавших ИТКК, 38,4 %. Однако оно не достигло уровня статистической значимости (рис. 3, 3). Вместе с тем цисплатин инициировал максимальное снижение (на 80,9 %) веса новообразований (см. рис. 2, 3), а его сочетание с гетероциклом приводило к явному ослаблению ( $p < 0,05$ ) эффекта химиопрепарата, хотя полученные величины продолжали удерживаться в рамках доверительного интервала (рис. 3, 4). В этом варианте масса опухолей ( $0,449 \pm 0,08$  г) редуцировалась всего на 44,0 % ( $p < 0,05$ ) и лишь на 6 % превосходила показатели у мышей, обработанных ИТКК.

Следовательно, ИТКК обладает невысокой противоопухолевой активностью. Подтверждением тому служит отсутствие влияния последней на продолжительность жизни животных (рис. 4). Его использование знаменовалось лишь 7,5 %-ным приростом ( $p > 0,05$ ) продолжительности жизни (до  $89,8 \pm 9,9$  сут) относительно контрольной группы ( $83,5 \pm 7,6$  сут) (рис. 3, 4), тогда как цисплатин увеличивал этот показатель на 63,1 % (при  $p < 0,05$ ), доводя его до  $136,2 \pm 12,3$  сут (см. рис. 2, 4). Одновременная инъекция реагентов (рис. 4, 4) увеличивала выживаемость только на 12,8 % ( $p > 0,05$ ), т. е. в среднем повышала ее на 10 сут сравнительно с контролем и недостоверно ( $p > 0,05$ ) на 5–6 сут относительно показателя у особей, обработанных только гетероциклом (рис. 3, 4).

По действию иных аналогов гетероциклов *in vitro* и *in vivo* на разные типы новообразований представленные фактические материалы отчасти согласуются с имеющимися в литературе [4, 7, 10, 14, 15, 17–19, 21, 26, 27, 29, 32–34]. Однако анализ публикаций однозначно свидетельствует о том, что испытуемое соединение уступает им по противоопухолевой активности.

## Выводы

1. Судя по степени снижения индекса пролиферации и витальности культивируемых клеток АКЭ, ИТКК обладает умеренным цитотоксическим влиянием на них и проявляет слабое антиканцерное действие как на рост указанных опухолей при их имплантации мышам, так и на продолжительность жизни последних.

2. В отличие от гетероцикла, цисплатин в стандартных дозах инициирует выраженный противоопухолевый эффект как *in vitro*, так и *in vivo*, резко подавляя митоз и выживаемость клеток в посевах, а также развитие новообразований в организме животных, что существенно пролонгирует срок жизни мышей.

3. Комбинация тестируемых агентов либо ослабляет цитотоксическую действенность исследуемого соединения (*in vitro*), либо полностью нивелирует ее (*in vivo*).

## Литература

1. Божкова В. П., Брежестовский П. Д., Буравлев В. П. и др. Руководство по культивированию нервной ткани. М., 1988.
2. Меньшикова В. В. (ред.) Лабораторные методы исследования в клинике: справочник. М., 1987. – 368 с.
3. Поткин В. И., Петкевич С. К., Зубенко Ю. С. и др. // Биологически активные вещества: фундаментальные и прикладные вопросы получения и применения: материалы науч. конф. Новый Свет (Украина), 2011. С. 155.
4. Alsina F. C., Ledda K., Paraticha G. // J. Neurochem. 2012. Vol. 123. P. 652–661.
5. Bavcar S., Argyle D. J. // Veterinary and Comparative Oncol. 2012. Vol. 10, N 3. P. 163–173.
6. Beebe J. S., Jani J. P., Knauth E. // Cancer Res. 2003. Vol. 63. P. 7301–7309.
7. Chakravarti A., Wang M., Robins H. I. et al. // Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 2012. Vol. S0360–3016, N 12. P. 03658–03659.
8. Dolle L., El Yazidi-Belkoura I., Adriaenssens E. et al. // Oncogene. 2003. Vol. 22. P. 5592–5601.
9. Furnari F. B., Fenton T., Bachoo R. M. et al. // Genes. Dev. 2007. Vol. 21. P. 2683–2710.
10. Grynberg N., Santos A. C., Echevarria A. // Anticancer Drugs. 1997. Vol. 8, N 1. P. 88–91.
11. Hanohan D., Weinberg R. A. // Cell. 2000. Vol. 100. P. 57–70.
12. Klein D. E., Nappin V. M., Reeves G. T. et al. // Nature. 2004. Vol. 430. P. 1040–1043.
13. Krüttgen A., Schneider I., Weis J. // Brain Pathol. 2006. Vol. 16, N 4. P. 304–310.
14. Kulchitsky V. A., Potkin V. I., Zubenko Y. S. et al. // Med. Chem. 2012. Vol. 8. P. 22–32.
15. Ledda F., Bieraugel O., Fard S. S. et al. // J. Neurosci. 2008. Vol. 28. P. 39–49.
16. MacDonald T. J., Brown K. E., La Fleur B. et al. // Nat. Gent. 2003. Vol. 29. P. 143–152.
17. MacNeill C. M., Wailes E. M., Levi-Polyachenko N. H. // J. Nanosci. Nanotechnol. 2013. Vol. 13, N 6. P. 3784–3791.
18. Mahboobi S., Sellmer A., Höcher H. et al. // J. Med. Chem. 2006. Vol. 49, N 19. P. 5769–5776.
19. Muralikrishna A., Venkatesh B. C., Padmavathi V. et al. // Eur. J. Med. Chem. 2012. Vol. 54. P. 605–614.
20. Ohira Y., Inoue N. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. Vol. 1243. P. 367–372.
21. Purohit M. N., Chandrashekhar V. M., Mayur Y. C. // Med. Chem. 2012. Vol. 18. P. 220–243.
22. Ramnarain D. B., Park S., Lee D. Y. et al. // Cancer Res. 2006. Vol. 66. P. 867–874.
23. Robertson P. L. // Am. Soc. Exper. Neuro Therapeutic Ins. 2006. Vol. 3. P. 276–291.
24. Ruggeri B. A., Miknyezki B. J., Singh J. et al. // Curr. Med. Chem. 1999. Vol. 6. P. 845–857.
25. Schemelinin I., Sefc L., Necas E. // Folia Biologica (Praha). 2006. Vol. 52. P. 81–100.
26. Shi F., Zeng X. N., Cao X. D. et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2012. Vol. 22, N 1. P. 743–746.
27. Tosi G., Constantino L., Ruozi B. et al. // Exp. Opin. Drug. Deliv. 2008. Vol. 5. P. 155–174.
28. Tremont-Laicas I. W., Gilbert M. B. // Cancer Control. 2003. Vol. 10. P. 125–137.
29. Viale M., Anzaldi M., Aiello C. et al. // Pharmacol. Rep. 2013. Vol. 65, N 3. P. 717–723.
30. Wen P. Y., Kesari S. // N. Engl. J. Med. 2008. Vol. 359. P. 492–507.
31. Wang M., Tan W., Zhou J. et al. // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283. P. 18678–18684.
32. Yaman E., Buyukberber S., Uner A. et al. // Tumori. 2008. Vol. 94. P. 674–680.
33. Yan X., Gemeinhart R. A. // J. Control. Release. 2005. Vol. 106. P. 198–208.
34. Yoshida N., Kiyohara T., Fukui M. et al. // Cancer Res. 1980. Vol. 40, N 10. P. 3810–3814.

L. V. POZDNIAK, M. V. CHERNOV, V. N. KALUNOV, S. G. PASHKEVICH,  
A. V. KLETSKOV, S. K. PETKEVICH, V. I. POTKIN

### COMPARATIVE EVALUATION OF THE CYTOTOXIC EFFECTS OF 4,5-DICHLORIZOTHIAZOL-3-CARBOXYLIC ACID, CISPLATIN, AND THEIR COMBINATIONS ON EHRlich'S ASCITIC CARCINOMA CELLS

## Summary

In experiments on Ehrlich's ascitic carcinoma cell culture in mice tumor-bearers, the cytotoxic action of 4,5-dichlorizothiazol-3-carboxylic acid (DTCA), cisplatin, and their combination on the mitogenic activity, the cell death (*in vitro*), the tumor mass, and the life span of animals (*in vivo*) has been studied. It is established that DTCA has a minor (*in vitro*) and mild (*in vivo*) antitumoral effect. The combination of a heterocyclic compound and a chemotherapeutic agent in a ten-fold decreased dose diminishes the expressed cytostatic effects in the concentrations adequate to the clinical ones but does not intensify them.