

СРАВНЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ДВУХ АНТРАЦИКЛИНОВЫХ АНТИБИОТИКОВ В ОТНОШЕНИИ НОРМАЛЬНЫХ И ОПУХОЛЕВЫХ ЛИНИЙ КЛЕТОК

Аникина Л. В., Семаков А. В., Пухов С. А., Афанасьева С. В., Клочков С. Г.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Черноголовка, Россия (142432, Черноголовка, Северный проезд, 1, ИФАВ РАН), e-mail: klochkov@ipac.ac.ru

Было проведено сравнение цитотоксичности антрациклиновых антибиотиков даунорубицина и доксорубицина в отношении опухолевых и нормальных линий клеток. Оба препарата проявили сильно выраженный противоопухолевый эффект. В отношении карциномы легкого A549 и карциномы кишечника HCT116 даунорубицин и доксорубицин действуют аналогично. Линии клеток рабдомиосаркомы RD, аденокарциномы молочной железы MCF7 и нормального эмбрионального эпителия почки собаки MDCK-M в 2–5 раз менее чувствительны к действию даунорубицина. Существует разница в чувствительности к исследуемым антрациклинам нормальных клеток. Токсичность антрациклинов в отношении линии MDCK-M выше, чем токсичность к опухолевым линиям клеток. Линия клеток нормального эмбрионального эпителия почки человека HEK293 мало чувствительна к действию антрациклиновых антибиотиков. Токсичность доксорубицина в отношении линии HEK293 в 13,5 раз меньше токсичности даунорубицина. Таким образом, токсикологический профиль доксорубицина и даунорубицина *in vitro* повторяет клинический профиль данных препаратов. Разница в токсичности антрациклинов по отношению к нормальным и опухолевым клеткам очевидна, однако требует дополнительных экспериментов с клетками разных типов тканей и видов млекопитающих.

Ключевые слова: антрациклиновые антибиотики, даунорубицин, доксорубицин, МТТ-тест, цитотоксичность.

COMPARISON OF CYTOTOXICITY OF TWO ANTHRACYCLINE ANTIBIOTICS AGAINST TUMOR AND NORMAL CELL LINES

Anikina L. V., Semakov A. V., Pukhov S. A., Afanaseva S. V., Klochkov S. G.

Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, Russia (142432, Chernogolovka, Severniy proyezd, 1), e-mail: klochkov@ipac.ac.ru

Comparison of cytotoxicity of the anthracycline antibiotics daunorubicin and doxorubicin for tumor and normal cell lines was performed. With regard to the cell lines A549 lung carcinoma and colon carcinoma HCT116 daunorubicin and doxorubicin act similarly. Rhabdomyosarcoma RD, breast adenocarcinoma MCF7 and normal embryonic kidney epithelial of dog MDCK-M cell lines in 2-5 times less sensitive to daunorubicin. There is a difference in sensitivity to investigated anthracyclines in normal cells. Anthracyclines toxicity against MDCK-M cell line is higher than the toxicity to the tumor cell lines. Normal human embryonic epithelial kidney HEK293 cell line is little sensitive to anthracycline antibiotics. Doxorubicin toxicity against line HEK293 is 13.5 times less than the toxicity of daunorubicin. Thus, toxicological profile of doxorubicin and daunorubicin *in vitro* repeat clinical profile of these drugs. The difference in the toxicity of anthracyclines relative to normal and tumor cells is obvious however this require additional experiments with cells of different tissues types and mammalian species.

Keywords: anthracycline antibiotics, daunorubicin, doxorubicin, MTT-test, cytotoxicity.

Антрациклиновые антибиотики даунорубицин и доксорубицин были введены в клиническую практику более 40 лет назад для лечения широкого спектра онкологических заболеваний, таких как острая миелоидная лейкемия и, в случае с доксорубицином, многие солидные опухоли. Сами по себе и в комбинации с другими препаратами антрациклины являются компонентами основного, вспомогательного и паллиативного лечения [1].

Несмотря на интенсивное клиническое применение антрациклинов, их механизмы действия являются объектом для дискуссий вследствие использования различных концентраций и условий эксперимента. Однако некоторые данные не подлежат сомнению. Во-первых, в терапевтических дозах и при внутривенном способе введения механизм действия антрациклиновых антибиотиков обусловлен взаимодействием с топоизомеразой II путем стабилизации тройного комплекса ДНК-топоизомераза II-антрациклин [11]. Во-вторых, ограничивающим фактором приема антрациклиновых антибиотиков является кумулятивная кардиотоксичность и развитие резистентности опухолей [8].

Кардиотоксичность, которую вызывают антрациклиновые антибиотики, ограничивает их клиническое применение. Пациенты, принимающие антрациклины, страдают от аритмии, гипотензии, угнетения сократимости сердца, возможно возникновение миокардитов. В кардиомиоцитах антрациклины являются причиной сосудистой дегенерации, митохондриальных включений, миофибриллярных мерцаний и трепетаний, увеличения количества лизосом и некроза. Максимальная рекомендованная доза для даунорубицина составляет 500 мг, а для доксорубицина – 450-600 мг на весь курс лечения. Это доза представляет собой сумму доз, которые принял пациент, даже если между циклами приема были промежутки в месяцы и годы. При превышении рекомендованных доз развивается дилатационная кардиомиопатия и сердечная недостаточность [7]. Кроме кардиотоксичности частым осложнением после терапии антрациклиновыми антибиотиками является токсическое действие на другие паренхиматозные органы, например нефротоксичность [2].

Развитие резистентности опухолевых клеток снижает эффективность противоопухолевой терапии и требует увеличения доз препарата, что в случае антрациклиновых антибиотиков недопустимо. Развитие резистентности опухолей связывают со взаимодействием между антрациклинами и транспортными белками Р-гликопротеином и белком множественной лекарственной резистентности MRP через N3' атом даунозамина. Сверхэкспрессия транспортных систем в опухолевых тканях играет ключевую роль в удалении антрациклинов из клеток и уменьшению взаимодействия лекарство-мишень [3].

Клиническая востребованность даунорубицина и доксорубицина стимулировала интенсивный синтез аналогов и структурно близких соединений [4, 5, 10]. Несмотря на доклинические исследования огромного количества соединений данного класса, только малая часть антрациклинов и других интеркалирующих агентов доступна для клинического использования. Даунорубицин остается одним из наиболее эффективных агентов для лечения острых лимфоидных и миелоидных лейкозидов, но его активность в отношении солидных опухолей мала. Доксорубицин является наиболее активным препаратом для

лечения сближенных опухолей, особенно при раке молочной железы, мелкоклеточном раке легкого и раке яичников [6].

В связи с тем, что скрининговые исследования на противоопухолевые свойства новых соединений в настоящее время проводятся в основном в тестах *in vitro*, сравнение цитотоксичности эталонных препаратов сравнения на различных опухолевых линиях клеток является интересным. Кроме того, дальнейшее сравнение с данными по цитотоксичности, полученными на культурах нормальных клеток, представляется перспективным для прогнозирования токсикологического профиля веществ в опытах *in vivo*. Целью данной работы является сравнение цитотоксичности антрациклиновых антибиотиков даунорубицина и доксорубицина в отношении опухолевых и нормальных линий клеток.

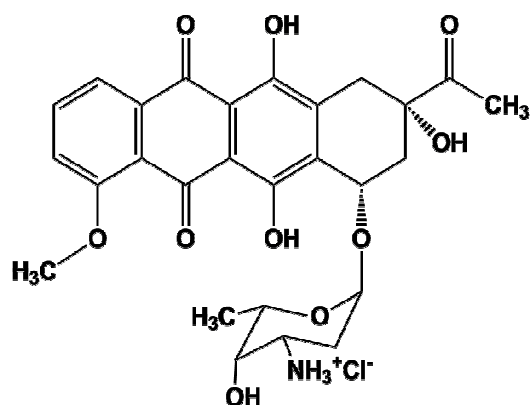
Материалы и методы

В работе использовано оборудование Центра коллективного пользования научным оборудованием для создания генно-модифицированных линий животных и изучения эффективности соединений на оригинальных клеточных и трансгенных моделях нейродегенеративных заболеваний человека (соглашение 14.621.21.0008, идентификатор RFMEFI62114X0008).

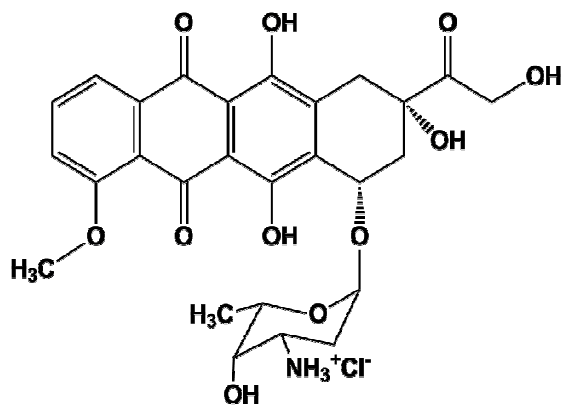
Исследуемые соединения

Исследуемые соединения даунорубицин (DNR) и доксорубицин (DOX) были синтезированы на ОАО «Омутнинская научная опытно-производственная база» (п. Восточный, Кировская область). Формулы представлены на рисунке.

Скелет антрацилина состоит из тетрациклической системы с сопряженным хинон-гидрохиноновыми кольцами, аминсахара даунозамина, связанного гликозидной связью с C7 и короткой боковой цепи с карбонильной группой при C13. Относительно малые изменения в этом скелете приводят к большим изменениям в спектре противоопухолевой активности. Антрациклины с первичным спиртом на конце боковой цепи (DOX и эпирубицин) показывают активность как к сближенным, так и гематологическим опухолям. Антрациклины с метильной группой (DNR и идарубицин) в основном используются для лечения острой миелобластной лейкемии и связанной со СПИДом саркомой Капоши.



Даунорубицин



Доксорубицин

Культуры клеток

В эксперименте были использованы культуры опухолевых клеток человека A549 (карцинома легкого, ATCC® CCL-185™), HCT116 (карцинома кишечника, ATCC® CCL-247™), MCF7 (аденокарцинома молочной железы, ATCC® HTB-22™), RD (рабдомиосаркома, ATCC® CCL-136™), а также культуры нормальных клеток эмбрионального почечного эпителия человека HEK293 (ATCC® CRL-1573™) и собаки MDCK-M (ATCC® CCL-34™).

Культуры клеток A549, HCT116, RD и HEK293 выращивались в среде DMEM, культура клеток MCF7 выращивалась в среде EMEM, культура клеток MDCK-M – в среде DMEM/F12 (все среды произведены в ООО НПП «ПанЭко»). В культуральные среды были добавлены 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone®, Thermo Scientific), 2мМ L-глутамин (ООО НПП «ПанЭко») и 1% гентамицина (ОАО Биохимик) в качестве антибиотика. Культивирование происходило при 37°C и 5 % CO₂ во влажной атмосфере.

Определение цитотоксичности МТТ-тестом

Цитотоксичность даунорубицина и доксорубицина была определена с помощью МТТ-теста [9]. Клетки были посеяны в концентрации $1 \cdot 10^4$ клеток/200 мкл в 96-луночный планшет и культивировались при 37 °С во влажной атмосфере с 5 % CO₂. После 24 часов инкубации к культурам клеток были добавлены различные концентрации тестируемых соединений (от 100 до 1,56 мкМ/л), и далее клетки культивировались в тех же условиях 72 часа. Каждая концентрация веществ была выполнена в трех повторностях. Все вещества были растворены в ДМСО (Panreac Química S.L.U), конечная концентрация ДМСО в лунке не превышала 0,1 % и не была токсична для клеток. Контрольными лунками выступали лунки, в которые добавляли растворитель в конечной концентрации 0,1 %. После инкубации в каждую лунку было добавлено 20 мкл МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенил тетразолия бромид, 5 мг/мл, Sigma-Aldrich), и планшеты инкубировались еще 2 часа. Далее из планшетов была удалена среда и в каждую лунку добавлено 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся

кристаллов формазана. С помощью планшетного анализатора (Victor3, PerkinElmer) определяли оптическую плотность при 530 нм за вычетом измеренного фонового поглощения при 620 нм. Значение концентрации, вызывающее 50 % ингибирование роста популяции клеток (IC_{50}), было определено на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 9.0.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования цитотоксического эффекта антрациклиновых антибиотиков приведены в таблице. Оба препарата проявляют сильно выраженный противоопухолевый эффект. Очевидно, что в отношении ряда культур – карциномы легкого A549 и кишечника HCT116 – даунорубин и доксорубин действуют аналогично. Линии клеток рабдомиосаркомы RD, аденокарциномы молочной железы MCF7 и нормального эмбрионального эпителия почки собаки MDCK-M менее чувствительны к действию даунорубина. Дозы, при которых проявляется эффект даунорубина, на этих линиях клеток в 2–5 раз выше, чем дозы доксорубина.

Цитотоксичность даунорубина и доксорубина в МТТ-тесте

Соединение	IC_{50} , мкМ					
	A549	HCT116	RD	MCF7	HEK293	MDCK-M
DNR	0,51±0,01	0,21±0,00	2,45±0,07	1,44±0,31	11,17±0,19	0,32±0,00
DOX	0,53±0,02	0,19±0,01	0,53±0,03	0,56±0,03	151,68±13,82	0,19±0,00

Несмотря на то, что применение доксорубина не показано для лечения рака прямой кишки и тонкого кишечника, цитотоксичность его по отношению к клеточной линии HCT116 в нашем эксперименте получилась выше, чем по отношению к клеточным линиям, более близким по клиническим показаниям для данного препарата (A549 и MCF7). Даунорубин, который в клинической практике не применяется для лечения рака легкого и кишечника, в нашем эксперименте проявил высокую цитотоксичность по отношению к клеткам A549 и HCT116.

Интересна разница в чувствительности к исследуемым антрациклинам нормальных клеток, принадлежащих к одной ткани, но разному виду млекопитающих. В качестве представителей нормальных клеток были выбраны клетки нормального эмбрионального эпителия почки собаки и человека, так как одним из побочных эффектов антрациклинов является нефротоксичность.

Линия клеток нормального эмбрионального эпителия почки собаки MDCK-M обнаружила повышенную чувствительность к действию и даунорубина, и доксорубина, причем токсичность этих антрациклинов в отношении данной линии выше, чем токсичность к опухолевым линиям клеток. В противоположность этому, линия клеток нормального

эмбрионального эпителия почки человека НЕК293 менее чувствительна к действию антрациклиновых антибиотиков. Причем, если IC_{50} даунорубицина в отношении этой линии только в 5–50 раз выше, чем в отношении опухолевых культур клеток, то IC_{50} доксорубицина в 270–800 раз выше, чем в отношении опухолевых культур. Токсичность доксорубицина в отношении линии НЕК293 в 13,5 раз меньше токсичности даунорубицина.

Разница в чувствительности клеток нормального почечного эпителия двух разных видов не может быть объяснена с точки зрения разной скорости пролиферации двух культур, так как обе культуры являются быстро пролиферирующими.

Таким образом, исследование показало, что токсикологический профиль антрациклиновых антибиотиков доксорубицина и даунорубицина *in vitro* в целом повторяет клинический профиль данных препаратов. Дальнейший интерес представляет исследование цитотоксичности других представителей антрациклиновых антибиотиков – идарубицина и эпирубицина, а также сравнительное исследование цитотоксичности пар клеточных линий одного генеза, но двух разных типов – опухолевого и нормального. Разница в токсичности антрациклинов по отношению к нормальным и опухолевым клеткам очевидна, однако требует дополнительных экспериментов с клетками разных типов тканей и видов млекопитающих.

Работа выполнена при поддержке Гранта РФФИ №15-04-0394015.

Список литературы

1. Arcamone F. Doxorubicin, Anticancer Antibiotics // In: Medicinal Chemistry, a Series of Monographs, vol. 17. – Academic Press, New York, 1981.
2. Beretta G. L., Zunino F. Molecular mechanisms of anthracycline activity // Top. Curr. Chem. – 2008. – 283. – P.1-19.
3. Chaires J. B., Leng F. et al. Structure-based design of a new bisintercalating anthracycline antibiotic // J. Med. Chem. – 1997. – 40. – P.261-266.
4. Chu L. L., Pandey R. P. et al. Synthetic analog of anticancer drug daunorubicin from daunorubicinone using one-pot enzymatic UDP-recycling glycosylation // J. Mol. Catalysis B: Enzymatyc. – 2016. – 124. – P. 1-10.
5. Czyz M., Szulawska A. et al. Effects of anthracycline derivatives on human leukemia K562 cell growth and differentiation // Biochem. Pharmacol. – 2005. – 70. – P. 1431-1442.
6. Karsten Krohn. Anthracycline Chemistry and Biology II: Mode of Action, Clinical Aspects and New Drugs // Springer-Verlag Berlin Heidelberg. – 2008.

7. Menna P., Salvatorelli E. et al. Anthracycline cardiotoxicity // *Top. Curr. Chem.* – 2008. – 283. – P.21-44.
8. Monneret C. Recent developments in the field of antitumour anthracyclines // *Eur. J. Med. Chem.* – 2001. – 36. – P. 483-493.
9. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay // *J. Immunol. Meth.* – 1983. – 65(1-2). – P. 55-63.
10. Rodrigues P. C. A., Roth T. et al. Correlation of the acid-sensitivity of polyethylene glycol daunorubicin conjugates with their in vitro antiproliferative activity // *Bioorganic & Medicinal Chemistry.* – 2006. – 14. – P. 4110-4117.
11. Tewey K. M., Rowe T. C., Yang L., Halligan B. D., Liu L. F. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II // *Science.* – 1984. – 226. – P. 466-468.