

**Карут Рауда**

аспирант, лаборант

**Бондарь Оксана Викторовна**

канд. биол. наук, старший научный сотрудник

**Ыгайев Бексултан Бактыбетович**

магистрант

**Павельев Роман Сергеевич**

канд. хим. наук, старший научный сотрудник

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

**Штырлин Юрий Григорьевич**

д-р хим. наук, ведущий научный сотрудник, директор

Научно-образовательный центр фармацевтики

ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет»

г. Казань, Республика Татарстан

DOI 10.31483/r-102531

## **ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ НОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ДОКСОРУБИЦИНА, СОДЕРЖАЩИХ ФРАГМЕНТ ПИРИДОКСИНА**

***Аннотация:** изучена противоопухолевая активность двух новых пиридоксин-содержащих производных доксорубицина. Модифицированные соединения, в отличие от исходного доксорубицина, не проникают в ядра опухолевых клеток и уступают доксорубицину по цитотоксичности. Однако одно из исследуемых соединений обладает высокой селективностью по отношению к клеткам эстроген-позитивной аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, индекс селективности превышает 36, в то время как у исходного доксорубицина он составляет 5.4.*

***Ключевые слова:** производные доксорубицина, пиридоксин, противоопухолевая активность, клетки аденокарциномы молочной железы человека MCF-7.*

*Исследование выполнено при поддержке субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету на выполнение государственного задания в сфере научной деятельности, проект №0671-2020-0053.*

Антрациклиновые антибиотики (даунорубицин, доксорубицин, эпирубицин и т. д.) представляют собой класс препаратов, которые обладают не только противомикробной, но и противоопухолевой активностью. Доксорубицин (DOX) является одним из самых эффективных его представителей, однако, характеризуется высокой кардиотоксичностью и способствует развитию множественной лекарственной устойчивости [2].

Некоторые ограничения терапевтического использования доксорубицина связаны с его гидрофильной природой и коротким периодом полувыведения, что сопровождается быстрым распределением, экскрецией и низкой биодоступностью. Для осуществления эффективной химиотерапии рака необходимо достаточно высокое накопление DOX в опухолевой ткани, однако накопление DOX в нормальной ткани сопровождается кумулятивной кардиотоксичностью и миелосупрессией. В связи с этим поиск новых соединений, обладающих более высокой селективностью и безопасностью является актуальной задачей современного здравоохранения.

Различные подходы были предложены для устранения недостатков DOX посредством химической модификации его структуры [1; 2]. Наиболее оптимальным направлением для функционализации доксорубицина является модификация молекулы по аминогруппе аминосахаридного фрагмента [5]. Данный подход, как правило, сохраняет цитостатический эффект молекулы.

Поскольку пиридоксин (витамин В6) участвует в работе более 100 ферментов в прокариотических и эукариотических клетках, перспективным подходом в разработке более эффективных и безопасных ЛС является его использование в качестве транспортной системы для эффективной доставки фармакофорных групп в живые клетки и ткани. Для пиридоксина в живых системах имеются собственные системы активного транспорта [3; 4]. Как следствие, наличие в составе лекарственной молекулы распознаваемого фрагмента пиридоксина способно

обеспечить лучшее проникновение лекарственного средства через различные биологические барьеры.

В нашей исследовательской группе было получено 10 различных пиридоксинсодержащих производных доксорубина (шестичленные ацетали (кетали) пиридоксина, алкенилпроизводные пиридоксина). Однако необходимой для биологических исследований растворимостью в воде обладали только два соединения – DOX-1 и DOX-2, структуры которых представлены на рисунке 1. Эти два вещества и исследовали далее на предмет их эффективности, безопасности и механизма действия на опухолевые клетки человека.

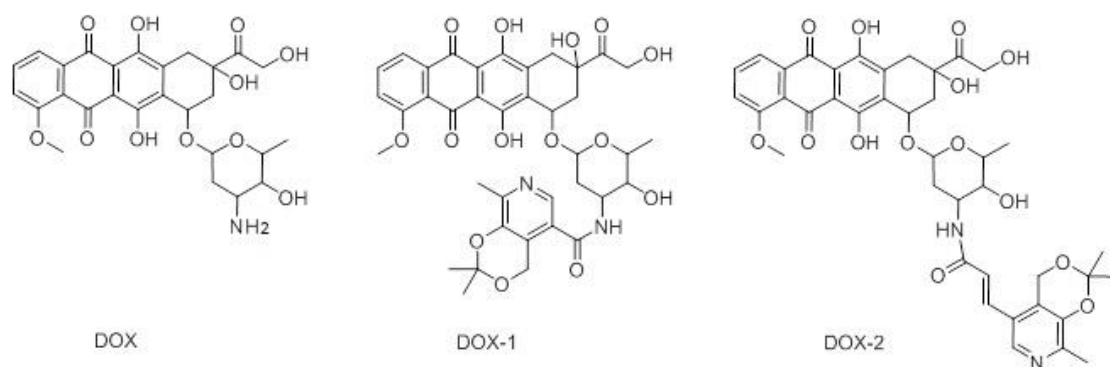


Рис. 1. Структура доксорубина (DOX) и его пиридоксин-содержащих лидерных производных – DOX-1 и DOX-2

Результаты исследования цитотоксичности синтезированных соединений по отношению к опухолевым клеткам, а также по отношению к условно-нормальным фибробластам кожи человека HSF и условно-нормальным мультипотентным стволовым клеткам MSC с помощью МТТ-теста приведены в таблице 1.

В процессе скрининга противоопухолевой активности установлено, что DOX-1 обладает выраженной цитотоксичностью в отношении как опухолевых, так и условно-нормальных клеток, IC<sub>50</sub> находится в диапазоне от 2.06 до 5.4  $\mu$ M. В целом DOX-1 уступает доксорубину по цитотоксическому действию в 4.5–17 раз. Производное DOX-1, как и доксорубин, не обладает селективностью действия. Напротив, производное доксорубина DOX-2, в структуре которого присутствует алкенильный фрагмент, обладает выраженным цитостатическим действием исключительно в отношении клеток эстроген-позитивной

аденокарциномы молочной железы человека MCF-7, IC50 составляет 1.89  $\mu$ M. При этом, в отношении условно-нормальных клеток величина IC50 этого соединения значительно превышает значения для доксорубина. Мы полагаем, что столь высокая селективность DOX-2 обусловлена наличием в молекуле дополнительного алкенильного фрагмента, также присутствующего в структуре лекарственного препарата Тамоксифена, широко используемого в таргетной терапии эстроген-позитивного рака молочной железы.

Таблица 1

Цитотоксические концентрации полумаксимального ингибирования пролиферации клеток IC50 ( $\mu$ M) пиридоксин-содержащих производных доксорубина – DOX-1 и DOX-2 в отношении опухолевых и условно-нормальных клеток

| Соединения | Цитотоксические концентрации IC50 (μM) |             |             |             |              |                           |             | IC50 HSF / IC50 MCF-7 |
|------------|--|-------------|-------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|-----------------------|
|            | Опухолевые клетки                      |             |             |             |              | Условно-нормальные клетки |             |                       |
|            | PC-3                                   | MDA-MB231   | HCT-116     | MCF-7       | SF-539       | HSF                       | MSC         |                       |
| DOX        | 1.2 ± 0.04                             | 0.8 ± 0.54  | 0.95 ± 0.33 | 0.13 ± 0.07 | 0.34 ± 0.198 | 0.7 ± 0.09                | 0.89 ± 0.01 | 5.4                   |
| DOX-1      | 5.4 ± 0.24                             | 4.13 ± 0.39 | 4.27 ± 0.32 | 2.25 ± 0.5  | 2.06 ± 0.26  | 5.87 ± 0.76               | 3.87 ± 0.04 | 2.6                   |
| DOX-2      | >70                                    | >70         | >70         | 1.89 ± 0.15 | >70          | >70                       | >70         | >36                   |

PC-3 – аденокарцинома простаты;

MDA-MB231 – эстроген негативная аденокарцинома молочной железы;

MCF-7 – эстроген-позитивная аденокарцинома молочной железы;

SF-539 – глиосаркома головного мозга;

HCT-116 – карцинома толстого кишечника;

HSF – фибробласты кожи условно-здорового донора;

MSC – мультипотентные стволовые клетки, выделенные из подкожной жировой ткани условно-здорового донора.

Поскольку пиридоксинсодержащие производные доксорубина DOX-1, DOX-2 и немодифицированный доксорубин флуоресцируют в красной

области спектра, для определения внутриклеточного распределения этих соединений представлялось целесообразным использовать конфокальную микроскопию.

На рисунке 2 представлены микрофотографии клеток аденокарциномы толстого кишечника HCT-116, обработанные DOX-1 и DOX-2 в течение суток, а также красителем Hoechst 33342 для визуализации ядер клеток. Как видно на микрофотографии DOX-1 и DOX-2 эффективно проникают через барьер цитоплазматической мембраны и накапливаются в цитоплазме клеток, но дальнейшего проникновения их в ядра клеток практически не наблюдается. В то же время немодифицированный доксорубин эффективно проникает и накапливается в ядрах клеток, окрашивая хроматин. Таким образом, с помощью конфокальной микроскопии установлено, что модифицированные производные доксорубина DOX-1 и DOX-2 практически не проникают в ядра клеток, их взаимодействие с основной мишенью действия DOX – молекулами ДНК затруднено. Это свидетельствует об отличном от доксорубина механизме действия новых соединений и объясняет уменьшение их цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток.

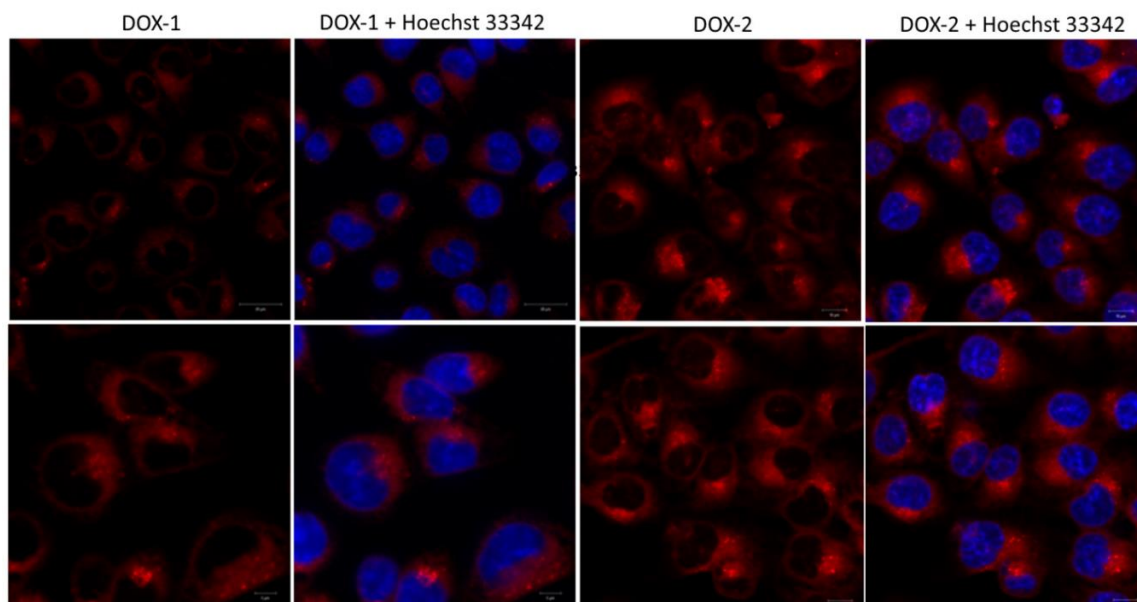


Рис. 2. Микрофотографии опухолевых клеток HCT-116, обработанных производными доксорубина DOX-1 и DOX-2 (концентрация 5  $\mu$ M,

время обработки 24 часа), а также красителем Hoechst 33342

для визуализации ядер

Также представляло интерес оценить развитие приобретенной лекарственной устойчивости у клеток MCF-7 к производному доксорубина DOX-2. Для осуществления эксперимента клетки MCF-7 культивировали в течение 13 недель в присутствии субтоксических концентраций DOX-2, начиная с IC10 и постепенно увеличивая концентрации до IC30. В течение периода культивирования чувствительность клеток к тестируемым препаратам оценивали каждые 2 недели с использованием МТТ-теста. Клетки, культивируемые без препаратов, использовали в качестве контроля. В таблице 2 показаны изменения цитотоксических концентраций IC50 тестируемого соединения в течение 13-недельного периода культивирования клеток с препаратом. Цитотоксические концентрации IC50 контрольных клеток принимали за 100%.

Таблица 2

Изменение цитотоксических концентраций IC50 производного доксорубина DOX-2 в течение тринадцати недель культивирования клеток MCF-7 на возрастающих концентрациях DOX-2

| Недели культивирования | 0          | 2           | 4         | 6           | 8          | 10         | 11          | 13          |
|------------------------|------------|-------------|-----------|-------------|------------|------------|-------------|-------------|
| IC50 (μM)              | 0.97 ± 0.2 | 0.75 ± 0.13 | 1.9 ± 0.2 | 1.33 ± 0.07 | 1.82 ± 0.1 | 1.33 ± 0.1 | 3.28 ± 0.33 | 2.17 ± 0.28 |
| % увеличения IC50      | -          | 0           | 94        | 36          | 86         | 36         | 238         | 124         |

Полученные данные показывают, что после двух недель культивирования с соединением DOX-2 резистентность не развивается, через четыре недели величина IC50 производного доксорубина увеличивается на 94%, а на тринадцатую неделю культивирования клетки становятся более устойчивыми на 124%. Таким образом, можно заключить, что к соединению DOX-2 у клеток MCF-7 в процессе культивирования на субтоксических концентрациях вырабатывается умеренная резистентность. Следует отметить, что как известно из литературных данных, к самому доксорубину резистентность вырабатывается также очень медленно,

многочисленные попытки, в том числе и наши, получить устойчивую к доксорубину клеточную линию часто были обречены на провал по причине гибели клеток даже при очень незначительных увеличениях концентрации доксорубина.

В результате исследований противоопухолевой активности производных доксорубина выявлено два перспективных соединения. Производное DOX-1 обладает широким спектром цитотоксической активности, но, как и доксорубин, не проявляет селективности. Напротив, производное DOX-2 обладает высокой селективностью по отношению к клеткам эстроген-позитивной аденокарциномы молочной железы MCF-7 и низкой токсичностью в отношении условно-нормальных клеток, что представляет несомненный интерес. Установлено, что в отличие от доксорубина, его пиридоксинсодержащие производные не проникают в ядра опухолевых клеток и накапливаются в цитоплазме. При длительном 13-недельном культивировании на субтоксических концентрациях DOX-2 клетки MCF-7 вырабатывают умеренную резистентность (IC<sub>50</sub> увеличивается всего лишь в 2.2 раза). Можно предположить, что после проведения полного цикла доклинических исследований соединение DOX-2 станет кандидатом в лекарственное средство для лечения эстрогензависимой опухоли молочной железы.

### *Список литературы*

1. Choi J.-S., Doh K.-O., Kim B.-K., Seu Y.-B. Synthesis of cholesteryl doxorubicin and its anti-cancer activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 2017 Feb 15; 27(4): 723–8.
2. Minotti G., Menna P., Salvatorelli E., Cairo G., Gianni L. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol Rev*. 2004 Jun 1; 56(2): 185–229. 3. doi; 10.1124/pr.56.2.6.
3. Parra M., Stahl S., Hellmann H. Vitamin B<sub>6</sub> and Its Role in Cell Metabolism and Physiology. *Cells*. 2018 Jul 22; 7(7): 84. doi: 10.3390/cells7070084.
4. Szydlowski N., Bürkle L., Pourcel L., Moulin M., Stolz J., Fitzpatrick T.B. Recycling of pyridoxine (vitamin B<sub>6</sub>) by PUP1 in Arabidopsis. *Plant J*. 2013 Jul; 75(1): 40–52. doi: 10.1111/tpj.12195.

5. Tacar O., Sriamornsak P., Dass C.R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. J Pharm Pharmacol. 2013 Feb; 65(2): 157–70. doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01567.