



УДК 615.2+661.12+616.006

Н. І. Шарикіна, О. О. Хавич, А. М. Демченко, О. В. Паршиков,  
О. Є. Ядловський, А. Г. Радівоєвич, М. А. Мунько, В. В. Рогозін

## ПОРІВНЯЛЬНЕ ВИВЧЕННЯ ЦИТОСТАТИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ТА МЕХАНІЗМІВ ДІЇ ВІДОМИХ ПОХІДНИХ ХІНАЗОЛІНУ (ДОКСАЗОЗИН, ПРАЗОЗИН) ТА ЕРЛОТИНІБУ

ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України», Київ, Україна

УДК 615.2+661.12+616.006

Н. И. Шарыкина, О. А. Хавич, А. М. Демченко, А. В. Паршиков, О. Е. Ядловский, А. Г. Ради-  
воевич, М. А. Мунько, В. В. Рогозин

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОСТАТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И МЕХАНИЗМОВ ДЕЙ- СТВИЯ ИЗВЕСТНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИНАЗОЛИНА (ДОКСАЗОЗИН, ПРАЗОЗИН) И ЭРЛО- ТИНИБА

ГУ «Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины», Киев, Украина

Производные хиназолина Доксазозин, Празозин и Эрлотиниб имеют близкий характер влия-  
ния на опухолевый рост, способность угнетать рост линии немелкоклеточного рака легких чело-  
века с экспрессированным рецептором эпидермального фактора роста (EGFR). Именно этот  
эффект обуславливает основной механизм действия этих препаратов как таргетных средств с  
противоопухолевым действием. При этом эффект Доксазозина почти на порядок выше, чем у  
Эрлотиниба,  $\log IC_{50}$ , соответственно, -5,34 и -4,4.

Возможно, это повышение связано с блокадой  $\alpha_1$ -адренорецепторов, которые имеют спо-  
собность стимулировать активность EGFR. Полученные данные противоопухолевой активности  
Доксазозина на немелкоклеточном раке легких человека (A549) могут обосновать расширение  
клинических показаний препарата при этой форме опухолевой болезни.

**Ключевые слова:**  $\alpha_1$ -адреноблокаторы, Доксазозин, Празозин, немелкоклеточный рак лег-  
ких человека, противоопухолевое действие.

UDC 615.2+661.12+616.006

N. I. Sharykina, O. O. Khavich, A. M. Demchenko, O. V. Parshikov, O. Ye. Yadlovskyy, A. G. Radi-  
vovovich, M. A. Munko, V. V. Rogosin

## THE COMPARATIVE STUDY OF THE CYTOSTATIC ACTIVITY AND MECHANISMS OF ACTION OF THE QUINAZOLINE KNOWN DERIVATIVES AND ERLOTINIB (DOXAZOSIN, PRAZOSIN)

State Institution "The Institute of Pharmacology and Toxicology of NAMS of Ukraine", Kyiv, Ukraine

Quinazoline derivatives Doxazosin, Prazosin, and Erlotinib have a similar effect on tumor growth,  
the ability to inhibit the growth of the non-small cell lung cancer of a human with the expressed epi-  
dermal growth factor receptor (EGFR). And it is this effect that determines the main mechanism of  
action of mentioned medicines as targeted agents with antitumor effect. And, this effect of doxazosin  
is almost above of that level of Erlotinib antitumor effect ( $\log IC_{50}$ , respectively, -5.34 and -4.4).  
Perhaps this increase of the effect is connected with blockade of alpha-adrenoceptors, which have  
the ability to stimulate EGFR activity. The data of doxazosin antitumor activity study obtained on non-  
small cell lung cancer (A549) model could ground the expansion of clinical indications of the drug in  
this form of tumor disease.

**Key words:**  $\alpha_1$ -adrenoblockers, Doxazosin, Prazosin, non-small cell lung cancer, antitumor effect.



Як відомо, традиційні засоби для лікування злоякісних новоутворень мають низку суттєвих недоліків: низька вибірковість протипухлинної дії, значна токсичність щодо нормальних тканин організму та ін. У зв'язку з цим нагальним є створення ліків, для яких їхня дія була б специфічно спрямованою саме на пухлинну клітину. Таким вимогам відповідають «таргетні» (молекулярно спрямовані) препарати, ефективність яких базується на принципах цільового впливу на фундаментальні молекулярні механізми, що лежать в основі пухлинного росту [1].

Однією з найбільш багатобіцуючих молекулярних мішеней для протипухлинної терапії є рецептор епідермального фактора росту (EGFR). Він експресується на поверхні багатьох нормальних клітин організму. Результатом його активації є запуск каскаду сигнальних реакцій, що призводять до синтезу ДНК, і, як наслідок, проліферації, активації міграції та інвазії клітин, пригнічення апоптозу [2]. Мутації, що призводять до надмірної експресії EGFR, асоційовані з багатьма злоякісними новоутвореннями, як-то: рак легенів, молочної залози, товстої кишки, простати тощо [3].

У 2002 р. в Японії для лікування недрібноклітинного раку легенів було застосовано перший інгібітор тирозинкінази EGFR — Гефітиніб. Він та наступний препарат цієї групи Ерлотиніб при оральному застосуванні поглинаються пухлинними клітинами і зворотно конкурують за приєднання аденозинтрифосфату до АТФ-зв'язувального сайту внутрішньоклітинного домену EGFR. Тим самим пригнічується трансдукція мітогенного сигналу всередину клітини.

Гефітиніб та Ерлотиніб за своєю структурою належать до 4-амінохіназолінів. У 1995 р. в ДУ «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» була вперше показана протипухлинна дія гіпотензивного препарату Празозину — похідного хіназоліну [4].

Результати численних досліджень останніх років свідчать про те, що інші заміщені хіназолінового ряду, які застосовуються в клінічній практиці як гіпотензивні засоби, селективні блокатори  $\alpha_1$ -адренорецепторів Празозин, Доксазозин та ін., також здатні викликати апоптоз у пухлинних клітинах при раку простати [5].

**Мета** нашої роботи — порівняльне вивчення протипухлинної активності та механізмів дії відомих гіпотензивних препаратів — похідних хіназоліну Празозину та Доксазозину з препаратом-стандартом хіназолінової структури Ерлотинібом, який є провідним у світі в лікуванні недрібноклітинного раку легенів людини.

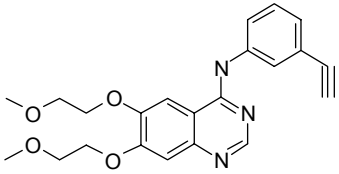
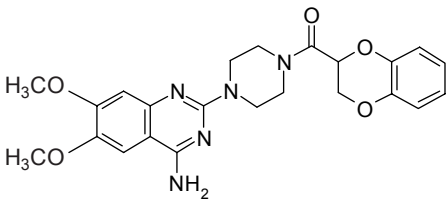
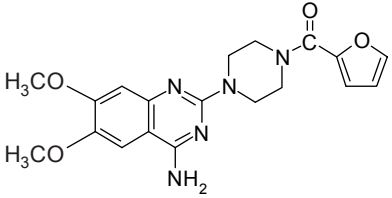
## Матеріали та методи дослідження

У дослідженні використані відомі гіпотензивні препарати хіназолінового ряду —  $\alpha_1$ -адреноблокатори Празозин, Доксазозин і похідне хіназоліну Ерлотиніб, що слугував препаратом-стандартом (табл. 1). Усі ліки були одержані з аптечної мережі.

Для порівняння інтенсивності можливої взаємодії хімічних структур препаратів з тирозинкіназами рецептора EGFR використаний докінг-аналіз. Для визначення зв'язування EGFR з інгібіторами його кінази в АТФ-акцепторній кишені вибрані кристалічні структури макромолекул 1M17, 2ITU, 2GS2 із бази даних білків. Підготовку лігандів і рецептора для докінгу, візуалізацію результатів докінгу було проведено за допомогою програми "MGL Tools". Хімічна структура вважалась активною при енергії міжмолекулярного комплексу "EGFR-інгібітор" за абсолютною величиною > 20 ккал/моль ( $\Delta E$ ).

Таблиця 1

### Структурні формули та хімічні назви похідних хіназоліну

Препарат	Препарат	Хімічна назва
Ерлотиніб		6,7-біс(2-метоксиетокси)хіназолін-4-іл)-(3-етинілфеніл)амін
Доксазозин		( <i>RS</i> )-2-[4-(2,3-Дигідро-1,4-бензодіоксин-2-карбоніл)піперазин-1-іл]-6,7-диметоксихіназолін-4-амін
Празозин		2-[4-(2-фуранілкарбоніл)-1-піперазиніл]-6,7-диметокси-4-хіназолінамін



**Результати молекулярного докінгу —  
енергії міжмолекулярного комплексу «EGFR-інгібітор».  
Похідні хіназоліну**

Інгібітор	DeltaG_1M17	DeltaG_2GS2	DeltaG_2ITY
Ерлотиніб	-39,677	-27,282	-24,651
Празозин	-3,924	-28,363	-39,677
Доксазозин	-36,299	-7,635	-9,387

Для дослідження цитотоксичної активності *in vitro* була обрана лінія недрібноклітинного раку легенів людини з експресією активності рецептора EGFR [6]. Культивування пухлинних клітин недрібноклітинного раку легенів людини проводили у живильному середовищі RPMI-1690 (HyClone, США) з додаванням 10 % ембріональної сироватки телят (FBS) (HyClone, США) у зволоженій атмосфері з 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % повітря. По досягненні рівня конфлюентності моношару 80–90 % старе живильне середовище видаляли, додавали 1 мл 0,25 % трипсину (HyClone, США) та культивували 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 живильного середовища та висівали у 96-ямковий планшет у концентрації 10 000 клітин на ямку і культивували за стандартних умов протягом 3 діб. Препарати розчиняли у диметилсульфоксиді до отримання концентрації 0,01 ммоль/л та додавали по 50 мкл отриманих розчинів до 245 мкл живильного середовища, що вже містилося у ямці з клітинами.

Оцінка цитотоксичності препаратів *in vitro* проводилася за допомогою МТТ-тесту [7]. Оптичну густину забарвлених клітин вимірювали на спектрофотометрі для мікропланшета (АКИЦ-О1, Росія) при довжині хвилі збудження 490 нм. Ступінь пригнічення росту клітин у дослідних ямках визначали по відношенню до контрольних ямок.

Цитотоксичну й антипроліферативну активність визнача-

ли за допомогою показника «Інгібуюча концентрація 50» (IC<sub>50</sub> — концентрація досліджуваної речовини, при якій кількість живих клітин зменшується на 50 % порівняно з контролем), що вираховувався за програмою (Origin LabCo, США). Препарат вважається активним при log IC<sub>50</sub> за відносною величиною < -4.

В онкофармакологічних дослідженнях *in vivo* для трансплантації використовували епідермоїдну карциному легенів Льюїс у відповідності до прийнятих методичних підходів [8]. Параметром ефекту слугував відсоток гальмування росту пухлини за об'ємом.

Наявність і вираженість у препаратів α<sub>1</sub>-адреноблокуючої дії оцінювали за впливом на скорочення ізольованих фрагментів судин — торакальний відділ аорти (ТА), мезентеріальна артерія (МА) та ворітна вена (ВВ) щурів-самців лінії Вістар [9].

Дослідження на антигіпертензивну активність проводили на білих нелінійних статевозрілих нормотензивних щурах. Неінвазивне вимірювання артеріального тиску виконували за допомогою комплексу Sphygmomanometer S-2 (HSE, Німеччина).

**Результати дослідження  
та їх обговорення**

Величини енергії міжмолекулярного комплексу «EGFR-інгібітор» свідчать (табл. 2), що їхній рівень відрізняється за-

лежно від структури похідних хіназоліну. Ерлотиніб на трьох моделях має показники, за абсолютною величиною вищі за значеного критерію значущості (> 20 ккал/моль). У Празозину DeltaG2GS2 аналогічний Ерлотинібу, а показник DeltaG2ITY перевищує такий у Ерлотинібу.

Доксазозин за DeltaG1M17 знаходиться близько до Ерлотинібу та має значно нижчі показники, ніж Ерлотиніб. Одержані дані свідчать про можливість похідних хіназоліну порізнному зв'язуватися тирозинкіназами за рахунок різних енергетичних рівнів комплексів EGFR з інгібіторами.

Нами визначена цитотоксична й антипроліферативна активність препаратів на лінії недрібноклітинного раку легенів людини за показником «інгібуюча концентрація 50». Критерій активності — IC<sub>50</sub> ≤ 10<sup>-4</sup> М (log IC<sub>50</sub> ≤ -4). Одержані результати надані в табл. 3.

Активність Доксазозину та Празозину значно перевищує таку в Ерлотинібу на лінії недрібноклітинного раку легенів, що може становити інтерес

Таблиця 3  
**Цитостатична активність  
похідних хіназоліну  
на клітинах недрібноклітинного  
раку легенів людини (A549)**

Препарат	IC <sub>50</sub> , моль/л	Log (IC <sub>50</sub> )
Ерлотиніб	3,8·10 <sup>-5</sup>	-4,4
Празозин	1,5·10 <sup>-5</sup>	-4,8
Доксазозин	4,56·10 <sup>-6</sup>	-5,34



щодо можливих аналогічних результатів при даній формі злоякісного росту в умовах клініки. Особливо це стосується Доксазозину, який випускається та використовується за показаннями артеріальна гіпертензія та доброякісна гіперплазія передміхурової залози в Україні, і можна поширити його клінічні показання без додаткових доклінічних фармакологічних і токсикологічних досліджень.

Вивчення протипухлинної дії препаратів *in vivo* проведено на експериментальній моделі пухлин тварин, на якій вивчаються традиційні цитостатики (епідермоїдна карцинома легенів Льюїс). Препарати вводили в дозах, аналогічних клінічним, із зворотною екстраполяцією їхньої величин з людини на тварин.

Для препаратів характерна наявність протипухлинної дії, вищої за критерій значущості до 5-ї доби з моменту трансплантації пухлин. При цьому найбільш високий результат зафіксований у Доксазозину

(85,89 % гальмування росту пухлин; Празозин — 66,80 %; Ерлотиніб — 55,4 %). Однак певний ефект гальмування пухлинного росту протягом курсу введення препаратів значно знижується, що не дозволяє говорити про стійкий ефект. Це підтверджує значущість впливу препаратів саме за наявності цілеспрямованої дії на експресований рецептор EGFR, що не відбувається на епідермоїдній карциномі легенів Льюїс.

Як відомо, похідні хіназоліну Празозин і Доксазозин є блокаторами  $\alpha_1$ -адренорецепторів, що зумовлює їхню гіпотензивну дію і може давати певний ефект щодо пухлинного росту за рахунок здатності похідних хіназоліну блокувати активність рецептора EGFR і підсилювати цю дію за рахунок блокади трансактивації EGFR, яка має місце під впливом  $\alpha_1$ -адренорецепторів надсистем GPCR [10].

Ми порівняли вплив Доксазозину та Празозину на скоротливі реакції ізольованих судин щурів. На рис. 1 та 2 відоб-

ражені особливості відповіді ізольованих судин щурів на фенілефрин щодо Доксазозину. Слід відмітити, що Доксазозин і Празозин за параметрами відповіді судин (розслаблення в присутності блокатора) близькі,  $IC_{50}$  (мкг/мл) Празозину: MA —  $1,0 \cdot 10^{-3}$ ; TA —  $3,0 \cdot 10^{-3}$ ; BB —  $2,0 \cdot 10^{-2}$ ;  $IC_{50}$  Доксазозину: MA —  $5,0 \cdot 10^{-3}$ ; TA —  $2,0 \cdot 10^{-2}$ ; BB —  $3,0 \cdot 10^{-2}$ , що вказує на їхній чіткий  $\alpha_1$ -адреноблокуючий ефект.

Уперше встановлено, що Ерлотиніб впливає на судинний тонус, але за параметрами пригнічення скоротливої активності судин значно поступається Празозину та Доксазозину як за величиною середньої ефективності діючої концентрації, так і за максимальним ефектом:  $IC_{50}$  MA — 9,54; TA — 7,82; BB — 5,53.

Вивчення впливу похідних хіназоліну Доксазозину та Празозину на артеріальний тиск щурів у дозах, адекватних клінічним (зворотна екстраполяція величин доз із людини на

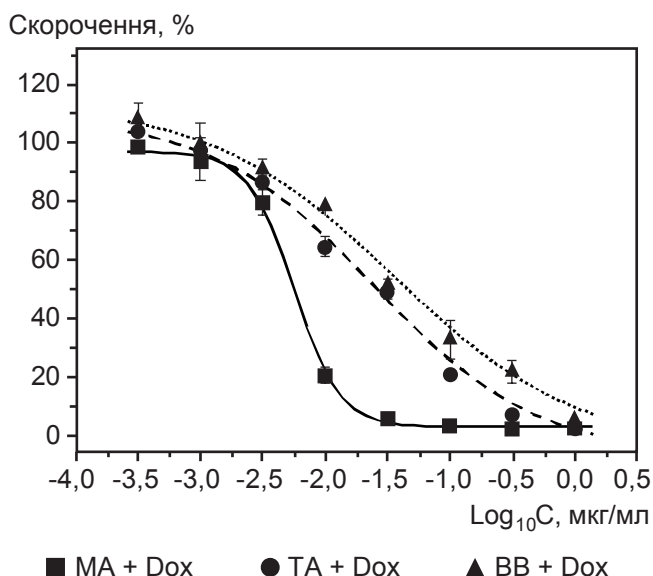


Рис. 1. Дозозалежний ефект Доксазозину (Dox) на скоротливі реакції фрагментів ізольованих судин щурів. Скорочення кілець мезентеріальної артерії, аорти і смужок ворітної вени стимулювали фенілефрином ( $3 \cdot 10^{-6}$  М) окремо (контроль) та в присутності блокатора (n=2–4, зміни амплітуди скорочення представлені у відсотках від контролю)

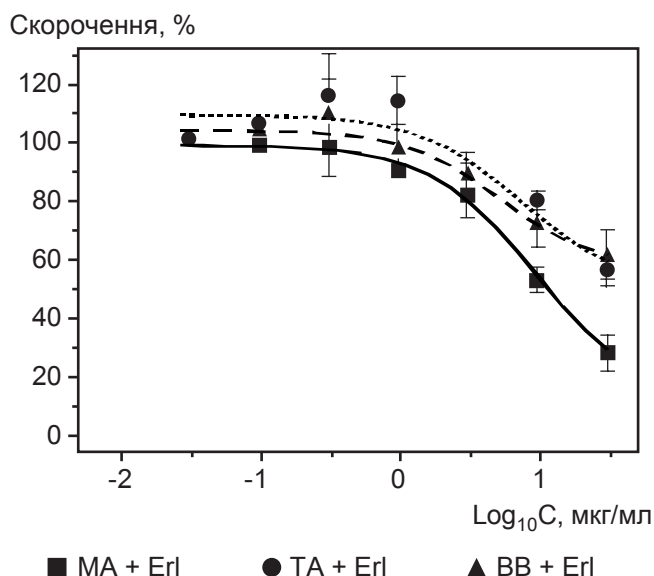


Рис. 2. Дозозалежний ефект Ерлотинібу (Erl) на скоротливі реакції фрагментів ізольованих судин щурів. Скорочення кілець мезентеріальної артерії, аорти і смужок ворітної вени стимулювали фенілефрином ( $3 \cdot 10^{-6}$  М) окремо (контроль) та в присутності блокатора (n=8–16, зміни амплітуди скорочення представлені у відсотках від контролю)

тварин), проведено через 2 та 3 год після перорального введення препаратів. Показано, що Празозин і Доксазозин мають гіпотензивну дію, що відповідає такій у клінічній практиці. Уперше показано, що таргетний протипухлинний препарат хіназолінового ряду Ерлотиніб також проявляє гіпотензивну дію у нормотензивних щурів при значному зниженні  $\alpha_1$ -адреноблокуючої дії.

## Висновки

Похідні хіназоліну Доксазозин, Празозин, Ерлотиніб мають близький характер дії на пухлинний ріст, здатність пригнічувати ріст лінії недрібноклітинного раку легенів людини з експресованим рецептором епідермального фактора росту. Саме цей ефект зумовлює основний механізм дії цих препаратів як таргетних засобів з протипухлинною дією. При цьому ефект Доксазозину майже на порядок вищий, ніж Ерлотинібу ( $\log IC_{50}$  відповідно -5,34 та -4,4). Можливо, це підвищення пов'язане з блокадою  $\alpha_1$ -адренорецепторів, які мають властивості стимулювати активність EGFR. Одержані дані щодо активності Доксазозину на недрібноклітинному раку легенів людини (A549) можуть обґрунтувати поширення клінічних показань препарату щодо недрібноклітинного раку легенів людини.

**Ключові слова:**  $\alpha_1$ -адреноблокатори, Доксазозин, Празозин, недрібноклітинний рак легенів людини, протипухлинна дія.

## ЛІТЕРАТУРА

1. Трансдукція мітогенних сигналів як основа створення протипухлинних таргетних препаратів (частина I) / Н. І. Шарикіна та ін. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2014. № 4/5. С. 3–10.
2. Xiaomin Liu, Wang Ping, Zhang Caiyan, Ma Zhongliang. Epidermal

growth factor receptor (EGFR): A rising star in the era of precision medicine of lung cancer. *Oncotarget*. 2017. Vol. 8, № 30. P. 50209–50220.

3. Sigismund S., Avanzato D., Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular Oncology*. 2018. № 12. P. 3–20.

4. Шарикіна Н. І., Овруцький В. М., Громов Л. О. Вплив стану нейромедіаторних систем на пухлинний ріст і ефективність протипухлинних та антиметастатичних засобів. Державний комітет України з питань науки і технологій, Державний фонд фундаментальних досліджень. Конкурсні проекти науково-дослідних робіт 1994–1995 рр. Анотація. Київ, 1995. Розділ 5 (5.3/313 «Біологія»).

5. Мешкова Н. А., Мищенко О. В., Шарыкина Н. И. Противоопухолева активность  $\alpha$ -адреноблокаторов — производных хиназолина. *Экспериментальная та клінічна медицина*. 2015. № 3. С. 26–28.

6. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors / D. J. Giard et al. *J Nat. Cancer Inst.* 1973. Vol. 51, № 5. P. 1417–1423.

7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 1983. Vol. 1/2, № 65. P. 55–63.

8. Доклінічні дослідження лікарських засобів: метод рекомендації / за ред. О. В. Стефанова. Київ: Авіценна, 2001. 527 с.

9. Lopor H., Tang R., Shapiro E. The alpha-adrenoreceptor subtype mediating the tension of human prostatic smooth muscle. *Prostate*. 1993. Vol. 22. P. 301–307.

10 Wang Z. Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor by G Protein-Coupled Receptors: Recent Progress, Challenges and Future Research. *Int. J. Mol. Sci.* 2016. Vol. 17, № 1. P. 95.

## REFERENCES

1. Sharykina N.I., Meshkova N.A., Mischenko O.V. et al. Transduction of mitogenic signals as a basis for the creation of anticancer targeted agents (part I). *Pharmakologiya ta likarska toksikologiya* 2014; 4/5: 3-10.
2. Xiaomin Liu, Ping Wang, Caiyan Zhang, Zhongliang Ma. Epidermal growth factor receptor (EGFR): A rising star in the era of precision medicine of lung cancer. *Oncotarget* 2017; 8 (30): 50209-50220.

3. Sigismund S., Avanzato D., Lanzetti L. Emerging functions of the EGFR in cancer. *Molecular Oncology* 2018; 12: 3-20.

4. Sharikina N.I., Ovrutsky V.M., Gromov L.O. Influence of the state of neurotransmitter systems on tumor growth and the effectiveness of antitumor and anti-metastatic agents. *State Committee of Ukraine for Science and Technology, State Fund for Fundamental Research. Competitive projects of research works 1994-1995. Annotation*, Kyiv, 1995, section 5 (5.3/313 "Biology").

5. Meshkova N.A., Mischenko O.V., Pendeluk S.I. et al. Anticancer activity of quinazoline-derived  $\alpha$ -adrenoreceptor antagonists. *Exsperimentalna ta klinichna medicina* 2015; 3: 26-28.

6. Giard D.J., Aaronson S.A., Tondaro G.J. et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Nat. Cancer Inst.* 1973; 51 (5): 1417-1423.

7. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 1983; 1/2 (65): 55-63.

8. Stefanova O. V. Doklinichni doslidzennya likarskich zasobiv. Metodichni rekomendatsii [Preclinical research of medicinal products: Methodical recommendations]. Kyiv, Avicenna, 2001. 527 p.

9. Lopor H., Tang R., Shapiro E. The alpha-adrenoreceptor subtype mediating the tension of human prostatic smooth muscle. *Prostate* 1993; 22: 301-307.

10. Wang Z. Transactivation of Epidermal Growth Factor Receptor by G Protein-Coupled Receptors: Recent Progress, Challenges and Future Research. *Int. J. Mol. Sci.* 2016; 17 (1): 95

Надійшла до редакції 16.11.2018  
Рецензент д-р мед. наук,  
проф. П. Б. Антоненко,  
дата рецензії 23.11.2018

