

# Молекулярно-биологические проблемы создания лекарственных средств и изучение механизма их действия

© Коллектив авторов, 2010

Г. И. Хватова, А. В. Семейкин

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ КАПЕЦИТАБИНА И КСЕЛОДЫ В ОТНОШЕНИИ КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР MCF-7, HT-12 И ТИМОЦИТОВ КРЫСЫ

Российский государственный медицинский университет, Москва, Россия

Изучена цитостатическая активность лекарственных препаратов капецитабина и кселоды, содержащих в качестве активной субстанции капецитабин, на клеточных культурах рака молочной железы человека MCF-7 и толстого кишечника HT-12, тимоцитов крысы. Полученные результаты свидетельствуют об идентичном действии 2 различных лекарственных форм капецитабина: кселоды и капецитабина производства лаборатории ТЮТОР С.А.С.И.Ф.И.А, Аргентина, на жизнеспособность изучаемых опухолевых культур и нормальных тимоцитов. Оба препарата проявили высокую избирательную цитотоксическую активность в отношении клеток опухолей молочной железы и толстого кишечника. По чувствительности к ним исследуемые культуры можно расположить по возрастанию в следующем ряду: тимоциты < HT-12 < MCF-7.

**Ключевые слова:** капецитабин, цитостатическая активность, MCF-7, HT-12, тимоциты.

В последние годы для сравнения цитотоксической активности различных противоопухолевых средств все чаще используются клеточные технологии, позволяющие получать убедительные результаты без опытов на лабораторных животных [1].

В проведенном исследовании для оценки цитостатического действия капецитабина в 2 лекарственных формах, капецитабина и кселоды, использованы альтернативные модели — клеточные культуры рака молочной железы человека MCF-7 и толстого кишечника HT-12. Эти культуры были выбраны вследствие того, что капецитабин показан для моно- или комбинированной терапии местнораспространенного или метастазирующего рака молочной железы, в том числе резистентного к паклитакселу и антрациклинам (или при наличии противопоказаний к последним), а также терапии первой линии метастазирующего рака толстой кишки [2].

Для сравнительной оценки токсичности использовали нормальные клетки — тимоциты крысы.

### Экспериментальная часть

Культура клеток MCF-7 (рак молочной железы человека) и HT-12 были получены из банка клеток НИИ вирусологии им. Д. И. Ивановского. Их культивирование проводили на среде DMEM, содержащей 40 мкг/мл гентамицина и 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, при 37 °С и 100 % влажности. После образования клеточного монослоя проводилась трипсинизация и в 96 луночные планшеты (Costar) вносили в виде суспензии половину от количества культивируемых в 50 см<sup>2</sup> флаконе клеток по 200 мкл/луночка.

Тимоциты получали после декапитации животного (беспородные крысы массой 180 – 200 г) под эфирным наркозом.

После измельчения тимуса в слабопритертом гомогенизаторе клетки дважды отмывали в среде DMEM центрифугированием на холоду с последующим ресуспендированием и определением их концентрации в камере Горяева. Суспензию клеток 20 млн/мл инкубировали в 96 луночных планшетах по 200 мкл/луночка в сутки с исследуемыми образцами в среде DMEM, содержащей 20 % эмбриональной телячьей сыворотки. Исследовано 2 образца фармакопейных капецитабина, кселоды из фирменных блистеров.

Капецитабин Лаборатории ТЮТОР С.А.С.И.Ф.И.А., Аргентина, произведен Лабораторией Кравери — С.А.И.С., Аргентина, серия L: LP002 Vto: 03 – 2011 таблетки, покрытые водорастворимой розовой оболочкой, содержащие 500 мг активного вещества капецитабина — 5'-дезоксид-5-фтор-N-[(пентилокси)карбонил]-цитидин. Вспомогательные вещества, мг в таблетке: USP лактоза 31,5, кукурузный крахмал NF 12,4, USP целлюлоза микрокристаллическая 12,4, кроскармеллоза 27,8, USP повидон 18,5, USP кремния диоксид коллоидный 4,6, USP магния стеарат 10,8, USP опадрай II 18,5.

В качестве препарата сравнения использованы таблетки кселода, содержащие 500 мг капецитабина. Вспомогательные вещества: лактоза безводная, натрия кроскармеллоза; гипромеллоза (3 мПа · с); МКЦ; магния стеарат. Оболочка — опадри персик Ys-1-17255-A (гипромеллоза 6 мПа · с); тальк; титана диоксид; железа оксид желтый; железа оксид красный, производи-

## Жизнеспособность клеток MCF-7 в присутствии капецитабина и кселоды (% от контроля)

Образец	Концентрация исследуемого образца				
	5,0 мг/мл	2,5 мг/мл	1,25 мг/мл	0,61 мг/мл	0,3 мг/мл
Кселода	11,6 ± 2,1*	50,6 ± 10,5*	53,1 ± 11,0*	67,5 ± 9,8*	78,3 ± 12,0
Капецитабин	12,1 ± 3,5*	20,1 ± 5,2*	35,6 ± 4,1*	54,0 ± 8,0*	76,5 ± 13,5

**Примечание:** Здесь и в табл. 2, 3: контроль — 100 % жизнеспособности; \* — достоверные отличия от контроля при  $p = 0,05$ .

тель Hoffmann La-Roche Inc. (США), серия EXP 2011U9232MFD 10 2008.

Растворы на стерильной среде DMEM готовили из таблеток, путем их растворения при комнатной температуре в течение 1 сут, предварительно удаляя с поверхности водорастворимый краситель, исходный раствор содержал 25 мг/мл образца в надосадочной жидкости. Образцы вносили в лунки до конечных концентраций 0,3 – 5 мг/мл на питательной среде DMEM, жизнеспособность клеток рассчитывалась относительно внутреннего контроля каждой серии (вносили эквивалентный объем полной питательной среды).

Инкубировали планшеты в течение 72 ч. По окончании инкубации воздействие препаратов на клеточный рост определяли микроколориметрическим методом — МТТ-тестом [1, 3, 4]. Метод основан на восстановлении тетразолового кольца 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромидом (МТТ) дегидрогеназами митохондрий живых пролиферирующих клеток с образованием нерастворимых фиолетовых кристаллов формазана и является стандартным для оценки токсичности соединений в культуре [1].

Раствор МТТ 10 мг/мл на питательной среде вносили по 10 мкл в лунки планшета с клетками. Среду удаляли через 4 ч инкубации, фиолетовые кристаллы формазана, выпавшие на дне лунок, растворяли в лунках планшета диметилсульфоксидом и измеряли оптическую плотность на планшетном фотометре «Униплан» (Россия, «Пикон») при 530 нм. Полученные результаты представляли в виде средних значений 4 измерений оптической плотности (в условных единицах), с помощью стандартного математического обеспечения EXEL. Также вычисляли % жизнеспособности культур от соответствующего контроля (клетки с питательной средой), принимаемого за 100 %.

Статистическую оценку проводили с использованием непараметрических критериев Вилкоксона и Манна-Уитни,  $p < 0,05$ .

В качестве сравнительного показателя цитотоксичности рассчитывали индекс цитотоксичности  $IC_{50}$  — концентрацию, угнетающую жизнеспособность клеток на 50 % [1] при помощи статистического пакета PRISM.

### Результаты и их обсуждение

#### Влияние кселоды и капецитабина на клетки MCF-7.

Установлено, что при 72 ч инкубации кселода и капецитабин достоверно снижают жизнеспособность

клеток MCF-7 в концентрациях 0,61 – 5 мг/мл до 75,3 – 54,0 % соответственно и достоверно не влияют на их жизнеспособность в концентрации 0,3 мг/мл (табл. 1).

$IC_{50}$  представленных препаратов достоверно не отличались и составили  $1,2 \pm 0,3$  для кселоды и  $0,85 \pm 0,2$  мг/мл для капецитабина. В максимальной и минимальной использованных дозах (5,0 и 0,3 мг/мл) цитотоксическое действие капецитабина и кселоды достоверно не различалось.

#### Влияние кселоды и капецитабина на клетки HT-12

Учитывая широкое использование противоопухолевых средств для терапии рака ЖКТ, в качестве объекта дальнейших исследований была выбрана культура клеток рака толстого кишечника HT-12, применяемая для оценки противоопухолевых средств.

Инкубация клеток с исследуемыми препаратами проводилась в течение 72 ч. Результаты измерений в процентах от контроля представлены в табл. 2.

Установлено, что жизнеспособность клеток HT-12 достоверно снижается под действием исследуемых средств, начиная с концентрации 0,61 мг/мл (на 24 %). Максимальный ингибирующий эффект наблюдается при концентрации исследуемых соединений, равной 5 мг/мл, снижение жизнеспособности составляет в среднем 99 %. Жизнеспособность клеток MCF-7 снижалась в данной концентрации на 90 %. Достоверное ингибирование жизнеспособности клеток HT-12 наблюдается в минимальной концентрации 1,25 мг/мл. Таким образом, показано, что клетки HT-12 менее чувствительны к действию исследуемых соединений, чем MCF-7. Достоверных различий в действии кселоды и капецитабина в максимальных 5 мг/мл и минимальных действующих 1,25 мг/мл концентрациях не выявлено.  $IC_{50}$  образцов достоверно не отличались и составили  $1,1 \pm 0,2$  и  $1,4 \pm 0,15$  мг/мл соответственно.

Проведенные исследования подтвердили наличие цитостатического действия капецитабина на культуру клеток HT-12 рака толстой кишки, ранее показанное на линиях клеток рака толстой кишки HT29, HCT116 и COLO205 [2].

#### Сравнительная оценка токсичности кселоды и капецитабина на тимоцитах крысы

Кселода является пролекарством, действующее начало которого (капецитабин) избирательно превращается в цитотоксическое соединение 5-фторурацил (5-ФУ). Образование 5-ФУ происходит в ткани опухоли под влиянием опухолевого ангиогенного фактора — ти-

**Жизнеспособность клеток HT-12 (рак толстого кишечника человека) в присутствии капецитабина и кселоды (в % от контроля)**

Образец	Концентрация исследуемого образца				
	5,0 мг/мл	2,5 мг/мл	1,25 мг/мл	0,61 мг/мл	0,3 мг/мл
Кселода	0,2 ± 0,15*	27,6 ± 9,4*	58,3 ± 14,0*	86,0 ± 6,2	88,0 ± 12,7
Капецитабин	0,3 ± 0,1*	29,4 ± 10,1*	75,3 ± 24,1*	85,6 ± 21,3	89 ± 7,5

**Жизнеспособность тимоцитов крысы в присутствии капецитабина и кселоды (в % от контроля)**

Образец	Концентрация исследуемого образца				
	5 мг/мл	2,5 мг/мл	1,25 мг/мл	0,61 мг/мл	0,3 мг/мл
Кселода	44,8 ± 6,9*	60,6 ± 10,1*	65,5 ± 8,7*	100,0 ± 12,3	96,5 ± 9,8
Капецитабин	47,1 ± 9,2*	54,3 ± 7,5*	66,0 ± 6,5*	100,9 ± 8,1	102,3 ± 11,2

мидинфосфорилазы, вследствие чего системное воздействие 5-ФУ на здоровые ткани организма минимально. Последовательный ферментный метаболизм в 5-ФУ создает в опухолевых клетках высокие концентрации последнего (активность тимидинфосфорилазы в первичной опухоли в 4 раза выше, чем в здоровой ткани) [5].

Учитывая, что капецитабин является пролекарством с относительной селективностью действия в отношении опухолевых клеток, представляла несомненный интерес оценка токсичности его лекарственных форм в отношении нормальных клеток. В качестве объекта исследования были выбраны тимоциты, так как незрелые лимфоидные клетки являются высокочувствительными к действию цитостатических средств. Среди побочных эффектов капецитабина наблюдается нейтропения, лимфоцитопения, гранулоцитопения [2]. Результаты представлены в табл. 3.

Установлено, что исследуемые соединения проявляли сходную цитотоксичность в отношении тимоцитов крысы, достоверно угнетая их жизнеспособность в диапазоне концентраций 5 – 1,25 мг/мл на 30 – 50 %.

IC<sub>50</sub> образцов достоверно не отличались и составили 3,6 ± 0,4 и 3,1 ± 0,25 мг/мл соответственно.

Степень угнетения тимоцитов была значительно менее выражена (на 80 – 90 % в максимальной кон-

центрации) по сравнению с действием капецитабина на клетки опухолей MCF-7 и HT-12, что свидетельствует об избирательном цитотоксическом действии исследованных образцов в отношении опухолевых клеток.

Полученные результаты свидетельствуют об идентичном действии 2 различных лекарственных форм капецитабина — кселоды и капецитабина — лаборатории ТЮТОР С. А. С. И. Ф. И. А на жизнеспособность изучаемых опухолевых культур и нормальных тимоцитов. Оба средства проявили высокую избирательную цитотоксическую активность в отношении клеток опухолей молочной железы и толстого кишечника.

**ЛИТЕРАТУРА**

1. *Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ*, Минздрав РФ, ЗАО ИИА "Ремедиум", Москва (2000), сс. 18 – 25.
2. C. M. Walko, C. Lindley, *Clin Ther.*, **27**, 23 – 44(2005).
3. O. H. Temmink, H. J. Prins, van E. Gelderop, et al, *Brit. J. Cancer.*, **15**, 61 – 66 (2007).
4. T. Mossman., *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55 – 63 (1983).
5. N. Alami, J. Paterson, S. Belanger, et al., *J. Chemother.*, **19**, 546 – 553 (2007).

Поступила 17.03.10

**COMPARATIVE CYTOTOXICITY OF CAPECITABINE AND XELODA ON CULTURED MCF-7, HT-12 AND RAT THYMOCYTES**

G. I. Khvatova and A. V. Semeikin

State Medical University, Moscow., Russia

The comparative cytotoxicity of capecitabine (Lab Tutour, Argentina) and xeloda (Roche) has been studied with respect to MCF-7 (human breast cancer cell line), HT-12 (colon cancer), and rat thymocytes by MTT test. The cytotoxic activity of both drugs was the same. Sensitivity of cells to cytostatics increased in the following order: thymocytes < HT-12 < MCF-7.

**Key words:** Capecitabine, cytotoxic activity, MCF-7, HT-12, thymocytes