

©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 5-ОКСИПИРИМИДИНА НА РОСТ ОПУХОЛИ И СОДЕРЖАНИЕ ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ САМОК МЫШЕЙ ЛИНИИ СВА С РАКОМ ШЕЙКИ МАТКИ (РШМ-5)

Л.П. Коваленко, К.В. Коржова, Л.Ф. Зайнуллина, С.В. Никитин, Е.А. Иванова, Р.В. Журиков*

НИИ фармакологии имени В.В. Закусова,
125315, Москва, Балтийская ул. 8; *эл. почта: zhurikovrv@gmail.com

На мышках-самках линии СВА с РШМ-5 изучено противоопухолевое действие 2 производных 5-оксиимидина: 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксиимидина (СНК-411) и хлоргидрат-2-изобутил-4,6-диметил-5-оксиимидина (СНК-578). Соединения вводили внутривентриально ежедневно со 2 по 15 день после трансплантации опухоли: СНК-411 — в разовой дозе 25 мг/кг (суммарная доза 350 мг/кг), СНК-578 — в разовой дозе 10 мг/кг (суммарно 140 мг/кг). Оценка противоопухолевого эффекта проведена однократно по критерию торможения роста опухоли (ТРО \geq 50%), определённого по массе в опытных и контрольной группах (n=10) на 7 сутки после окончания лечения (то есть на 21 сутки роста опухоли). В группе контроля роста опухоли без лечения (n=10) на этот срок средняя масса опухоли (М ср.) составила 1255 мг. Показано, что СНК-578 вызывает выраженное ингибирование роста опухоли (ТРО=87%), СНК-411 был не столь эффективен (ТРО=47%). На 21 сутки роста опухоли концентрации цитокинов IL-6, IL-10, IL-17A в сыворотке крови мышей с опухолью были выше по сравнению с интактным контролем на 229%, 40% и 62% соответственно. На этом фоне высокоактивный СНК-578 подавлял содержание проонкогенных IL-10 и IL-17A и провоспалительного IL-6 на 61%, 70% и 29% по сравнению с активным контролем с опухолью, а СНК-411 подавлял IL-10 и IL-17A на 48% и 60% и не влиял на концентрацию IL-6. Учитывая роль IL-6 в аутоиммунном ответе организма, можно предположить участие иммунного контроля в развитии противоопухолевого эффекта СНК-578.

Ключевые слова: 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксиимидин; хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксиимидина; рак шейки матки (РШМ-5); цитокины

DOI: 10.18097/PBMC20216702158

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время определена опухолеобразующая роль хронического воспаления, в частности около 20-25% различных типов рака вызвано хроническим воспалением [1, 2]. В связи с этим актуален поиск новых противоопухолевых соединений с противовоспалительной активностью, участвующих в регуляции оппозиционных групп Th₁ и Th₂ цитокинов.

В НИИ фармакологии имени В.В. Закусова запатентованы 2 соединения с противоопухолевой активностью: СНК-411 (2-изобутил-4,6-диметил-5-оксиимидин) — патент RU2518889 (10.06.2014) и СНК-578 (хлоргидрат 2-изобутил-4,6-диметил-5-оксиимидина) — патент RU 2686672 (30.04.2019).

В ранее проведённых экспериментах *in vivo* и *in vitro* нами были выявлены противоопухолевые, антимастистические и противовоспалительные свойства СНК-411 и СНК-578 [3-5]. При курсовом введении СНК-411 в дозах 25 мг/кг и 50 мг/кг определено выраженное подавление содержания провоспалительного цитокина IL-6 и плейотропного цитокина IL-4 в сыворотках крови мышей C57BL/6 с эпидермоидной карциномой лёгкого Lewis (LLC) [6].

Целью настоящей работы было исследование влияния курсового введения производных 5-оксиимидина — СНК-411 и СНК-578 — на рост опухоли и содержание цитокинов в сыворотке крови животных-опухоленосителей РШМ-5.

МЕТОДИКА

Соединения СНК-411 и СНК-578, разработанные в НИИ фармакологии имени В.В. Закусова, использованы в настоящей работе в виде фармацевтических субстанций.

Эксперименты выполнены на 40 самках мышей линии СВА массой 18-20 г (по 10 животных в каждой группе), полученных из питомника “Столбовая”. Животных содержали при 12-часовом световом режиме на стандартном сбалансированном брикетированном корме со свободным доступом к пище и воде при естественном освещении и температуре воздуха 20-21°C.

Штаммы опухолевых клеток рака шейки матки РШМ-5 получены из банка клеточных культур НИИ Экспериментальной Диагностики и Терапии Опухолей Научного Медицинского Исследовательского Центра Онкологии имени Н.Н. Блохина. Взвесь опухолевых клеток (30 мг в 0,3 мл раствора Хэнкса на мышью) РШМ-5 имплантировали животным подкожно. Стандартная прививочная доза составляла не менее 3 \times 10⁶ клеток/мышью. День подкожной прививки клеток опухолевого штамма считали нулевым днем развития опухоли.

Производные 5-оксиимидина вводили внутривентриально (в/б) со 2 по 15 день после трансплантации опухоли РШМ-5, СНК-411 — в разовой дозе 25 мг/кг (суммарная доза 350 мг/кг), а СНК-578 — в разовой дозе 10 мг/кг (суммарная

доза 140 мг/кг). Животных рандомизировали в следующие группы: 1 — интактный контроль; 2 — активный контроль, РШМ-5; 3 — РШМ-5 и СНК-411, 25 мг/кг; 4 — РШМ-5 и СНК-578, 10 мг/кг. Дозы были выбраны по результатам предшествующих исследований [3-5].

Оценка противоопухолевого эффекта проведена однократно по критерию торможения роста опухоли (ТРО \geq 50%), определённого по массе в опытных и контрольной группах (n=10) на 7 сутки после окончания лечения (то есть на 21 сутки роста опухоли). Перевиваемая опухоль РШМ-5 является плоскоклеточной, её высота при диаметре 30 мм не всегда достигает 2 мм, в связи с чем измерение её объема даёт необъективные результаты. На 7 сутки после окончания двухнедельного введения исследуемых веществ животных выводили из эксперимента методом декапитации с помощью гильотины (НПК “Открытая наука”, Россия), собирали кровь, извлекали опухоль и взвешивали на аналитических весах. Сыворотку крови получали центрифугированием при 2500 об/мин 30 мин на центрифуге Eppendorf Centrifuge 5804 R (“Eppendorf”, Германия). Противоопухолевый эффект регистрировали по массе опухоли на момент выведения из эксперимента. Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле: $\text{ТРО}\% = (\text{М}_{\text{контроля}} - \text{М}_{\text{опыта}}) / \text{М}_{\text{контроля}} \times 100\%$, где $\text{М}_{\text{контроля}}$ — среднее значение массы опухоли в контрольных группах, $\text{М}_{\text{опыта}}$ — среднее значение массы опухоли в группах, получавших препараты. Влияние 14-дневного введения СНК-411, СНК-578 на концентрацию цитокинов IL-2, IFN- γ , IL-17A, IL-17F, IL-6, IL-4, IL-5, IL-10, IL-11, IL-13 в сыворотке крови самок мышей линии СВА с РШМ-5 проводили на проточном цитометре BD FACSCanto II методом мультиплексного определения флуоресцентных частиц (LEGENDplex Custom Mouse 10-plex Panel, “BioLegend”, США) согласно протоколу производителя. Анализ данных проводили в программе LEGENDplex v 8.0 и выражали в пг/мл.

Статистический анализ данных проводили с помощью программы Statistica 10.0. Проверку выборки на нормальность распределения осуществляли по критерию Шапиро-Уилка, гомогенность дисперсий — по Левену. Так как в группах отсутствовало нормальное распределение, дальнейшую обработку данных проводили с помощью критерия Манна-Уитни и дисперсионного анализа с последующим критерием по Ньюману-Кейслу. Различия считали статистически значимыми при вероятности ошибки I рода меньшей или равной 0,05 ($p \leq 0,05$). Полученные в ходе исследования данные представлены как медиана (Me), верхний и нижний квартили (Q1-Q4).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице приведены результаты, характеризующие торможение роста первичного опухолевого узла и содержание цитокинов после 14-дневного в/бр введения соединений СНК-411 и СНК-578.

Через 7 дней после окончания введения производных 5-оксипиримидина в группе активного контроля (рост опухоли без лечения) на этот срок средняя масса опухоли (М ср.) составила 1255 мг. СНК-578 в 7,4 раза ингибировал рост массы опухоли, у которого ТРО составило 87% (М ср.= 169).

Через 7 дней после окончания введения изучаемых соединений концентрация цитокинов IL-6, IL-10 и IL-17A значимо увеличилась у животных с перевитой опухолью по сравнению с интактным контролем; концентрации цитокинов IL-6, IL-10 и IL-17A у контрольных мышей с опухолью были выше против интактного контроля на 229%, 40% и 62%, на уровень Th $_1$ -цитокина IFN- γ производные 5-оксипиримидинов подавляющего действия не оказывали. Остальные цитокины были обнаружены в единичных и незначительных количествах в каждой из опытных групп. На этом фоне высокоактивный СНК-578 подавлял

Таблица. Влияние производных 5-оксипиримидина на массу опухоли РШМ-5 и концентрацию цитокинов у самок мышей-опухоленосителей линии СВА

Показатели опухолеобразования: масса опухоли, ТРО и содержание цитокинов	Группы животных (n=10)			
	Контроль без опухоли	Активный контроль с РШМ-5	РШМ-5 и СНК-578, 10 мг/кг	РШМ-5 и СНК-411, 25 мг/кг
Масса опухоли (мг) Me (Q1-Q4)	—	1255,0 (928,0-1816,0)	168,5 (0,0-281,0) ^a	718,5 (252,0-903,0) ^a
ТРО, %	—	—	86,5	42,7
IL-6 (пг/мл) Me (Q1-Q4)	18,92 (12,24-27,12)	62,38 (51,36-133,36) ^{##}	44,44 (15,88-78,76) ^a	58,48 (47,32-91,28)
IL-10 (пг/мл) Me (Q1-Q4)	89,88 (67,12-103,76)	125,84 (103,16-134,12) [#]	48,40 (14,48-64,32) ^a	65,76 (54,64-104,88) ^a
IL-17A (пг/мл) Me (Q1-Q4)	10,78 (7,24-11,92)	17,54 (13,88-20,20) ^{##}	5,20 (3,36-6,44) ^a	7,02 (5,00-8,52) ^a
IFN- γ (пг/мл) Me (Q1-Q4)	24,72 (19,36-34,12)	44,68 (27,92-84,28) [#]	36,06 (29,48-43,88)	41,24 (30,40-76,92)

Примечание: n — количество животных; a — $p < 0,05$ по сравнению с группой “контроль с опухолью”, критерий Ньюмана-Кейлса; # — $p < 0,05$ по сравнению с группой “контроль без опухоли”, критерий Манна-Уитни; ## — $p < 0,01$ по сравнению с группой “контроль без опухоли”, критерий Манна-Уитни.

содержание проонкогенных IL-10 и IL-17A и провоспалительного IL-6 на 61%, 70% и 29% по сравнению с активным контролем с опухолью, а СНК-411 подавлял IL-10 и IL-17A на 48% и 60% соответственно и не действовал на IL-6.

При изучении большинства злокачественных новообразований выявлено увеличение уровня экспрессии IL-6 в опухолях, возникающих из клеток, в норме непродуцирующих IL-6, что сопровождается неблагоприятным клиническим течением заболевания. Дисрегулируемый непрерывный синтез IL-6 вовлечён в развитие различных заболеваний, включая аутоиммунные, хронические воспалительные заболевания и рак [7]. Повышение уровня IL-6 коррелирует с прогрессией опухоли, метастазированием, неблагоприятным прогнозом для общей выживаемости при раке шейки матки, молочной железы, почки, кишечника, поджелудочной железы [8]. В частности, есть убедительные данные, что IL-6 является связующим звеном сигнального пути JAK/STAT3 между воспалением и стимуляцией пролиферации раковых клеток и метастазированием многих видов рака [8, 9]. В настоящее время разрабатываются терапевтические стратегии, действующие на сигнальные пути цитокинов семейства IL-6, для успешного лечения аутоиммунных заболеваний и рака [9]. Учитывая роль IL-6 в аутоиммунном ответе организма, можно предположить участие иммунного контроля в развитии противоопухолевого эффекта СНК-578.

При начальном изучении влияния цитокинов на разных стадиях хронического воспаления в организме человека и экспериментальных животных выводы об их действии часто бывают противоречивыми, однако с накоплением экспериментальных и клинических данных формируется общее представление о механизмах их действия [10]. По данным литературы, Th₁₇-клетки и их цитокины (IL-17A и IL-17F) ассоциированы с различными аутоиммунными и воспалительными заболеваниями, такими как ревматоидный артрит, системная красная волчанка, рассеянный склероз, псориаз [11]. Проонкогенное действие IL-17 наблюдается во многих раковых образованиях; IL-17 и IL-17A участвуют в ангиогенезе у мышей с меланомой B-16 и с раком мочевого пузыря (MB49 bladder carcinoma), стимулируют синтез IL-6 и активируют сигнальный путь JAK/STAT3 [12]. По мнению ряда авторов [13], иммунотерапия, нацеленная на иммуномодулирующие цитокины при немелкоклеточном раке лёгкого (НМРЛ), в том числе в пределах оси IL-17-Th₁/Th₁₇, имеет перспективы для разработки эффективного лечения НМРЛ. В доклинических исследованиях у мышей, нокаутных по IL-17, наблюдалась повышенная устойчивость к росту опухоли, что также указывает на то, что IL-17 способствует развитию злокачественных новообразований [14]. IL-17A активирует различные клетки, имеющие важное значение для формирования микроокружения опухолей, стимулирует продукцию провоспалительных цитокинов и хемокинов; участие Th₁₇-лимфоцитов и

IL-17 в усилении роста опухоли даёт основание рассматривать их как возможные мишени для терапии рака [10].

Согласно полученным данным, одним из возможных механизмов действия СНК-578 является влияние на сигнальный путь JAK/STAT3, учитывая подавление уровней IL-17A и IL-6 и проонкогенное действие этих цитокинов через JAK/STAT3.

Интерлейкин-10, вырабатываемый различными иммунными и опухолевыми клетками, способен ингибировать действие Th₁-хелперов, необходимых для борьбы с опухолями. Экспрессия IL-10 в клетках Т-клеточной лимфомы (LSA) у сингенных мышей C57BL/6 значительно увеличивала размер опухоли LSA. Подавление вырабатываемого Т-клеточной лимфомой IL-10 может иметь значительный потенциал при её лечении [15]. В клинических исследованиях тканей лёгкого человека с НМРЛ и культур опухолевых клеточных линий была обнаружена положительная корреляция между экспрессией IL-10 и его рецепторов IL-10R в лёгких с опухолью. IL-10 противодействовал действию IFN-γ на путь PD1/PDL1, что приводило к устойчивости опухоли к иммунотерапии анти-PD1/PDL1 [16]. Высокие уровни IL-10 в TAM (tumor associated macrophages) коррелировали со стадией, размером опухоли и метастазами в лимфатические узлы, что могло играть важную роль в прогрессировании НМРЛ [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Таким образом, в настоящем исследовании на модели РШМ-5 были подтверждены ранее полученные результаты о выраженной противоопухолевой активности СНК-578 и его влиянии на цитокины с провоспалительной и проонкогенной активностью. Полученные данные указывают на перспективность дальнейшего изучения и разработки СНК-578 в качестве противоопухолевого средства.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания по теме № 0521-2019-0004.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты с животными проводили в соответствии с международными правилами (Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22 сентября 2010 г. По охране животных, используемых в научных целях) и правилами работы с животными, утвержденными этической комиссией НИИ фармакологии имени В.В. Закусова.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fishbein A., Hammock B.D., Serhan C.N., Panigraphy D. (2021) *Pharmacol. Ther.*, **218**, 107670. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2020.107670
2. Galdiero M.R., Marone G., Mantovani A. (2018) *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, **10**(8), a028662. DOI: 10.1101/cshperspect.a028662
3. Коваленко Л.П., Никитин С.В., Сорокина А.В., Мирошкина И.А., Иванова Е.А., Кузнецова О.С., Коржова К.В., Дурнев А.Д. (2020) Экспериментальная и клиническая фармакология, **83**(1), 24-27. [Kovalenko L.P., Nikitin S.V., Sorokina A.V., Miroshkina I.A., Ivanova E.A., Kuznetsova O.S., Korzhova K.V., Durnev A.D. (2020) *Experimental and Clinical Pharmacology*, **83**(1), 24-27.]
4. Никитин С.В., Коваленко Л.П., Ребеко А.Г., Журиков Р.В., Иванова Е.А., Дурнев А.Д. (2019) Химико-фармацевтический журнал, **53**(8), 20-23. [Nikitin S.V., Kovalenko L.P., Rebeko A.G., Zhurikov R.V., Ivanova E.A., Durnev A.D. (2019) *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **53**(8), 697-700.]
5. Коржова К.В., Коваленко Л.П., Иванова Е.А., Никитин С.В., Дурнев А.Д. (2020) Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, **169**(2), 226-229. [Korzhova K.V., Kovalenko L.P., Ivanova E.A., Nikitin S.V., Durnev A.D. (2020) *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **169**(2), 262-265.]
6. Кузнецова О.С., Таллерова А.В., Никитин С.В., Коваленко Л.П. (2015) Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, **160**(10), 488-491. [Kuznetsova O.S., Tallerova A.V., Nikitin S.V., Kovalenko L.P. (2016) *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, **160**(4), 483-485.]
7. Tanaka T., Kishimoto T. (2014) *Cancer Immunol. Res.*, **2**(4), 288-294.
8. Taniguchi K., Karin M. (2014) *Seminars Immunology*, **154**(26), 492-496.
9. Jones S.A., Jenkins B.J. (2018) *Nature Revs. Immunol.*, **18**(12), 773-789.
10. Бережная Н.М. (2009) Онкология, **11**(1), 6-17. [Berezhnaya N.M. (2009) *Onkologiya*, **11**(1), 6-17.]
11. Waitel J.C., Skokos D. (2012) *Int. J. Inflammation*, **2012**, 232-242.
12. Wang L., Kortylewski M., Pardoll D.M. (2009) *J. Exp. Med.*, **206**(7), 1457-1464.
13. Joerger M., Finn S., Cuffec S., Byrne A., Gray S. (2016) *Expert Opinion Therapeutic Targets*, **20**(11), 1339-1356.
14. Wakita D., Sumida K., Iwakura Y., Nishikawa H., Ohkuri T., Chamoto K., Kitamura H., Nishimura T. (2010) *Eur. J. Immunol.*, **40**(7), 1927-1937.
15. Hassuneh M.R., Nagarkatti M., Nagarkatti P.S. (2013) *Leukemia Lymphoma*, **54**(4), 827-834.
16. Vahl J.M., Friedrich J., Mittler S., Trump S., Heim L., Kachler K., Balabko L., Fuhrich N., Geppert C., Trufa D., Sopol N., Sirbu H., Finotto S. (2017) *Br. J. Cancer*, **117**, 1644-1655.
17. Wang R., Meng L., Zhang J. (2011) *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **30**(1), 62-70.

Поступила в редакцию: 30. 12. 2021.
После доработки: 11. 03. 2021.
Принята к печати: 15. 03. 2021.

EFFECT OF 5-HYDROXYPYRIMIDINE DERIVATIVES ON TUMOR GROWTH AND CYTOKINE CONCENTRATION IN BLOOD SERUM OF FEMALE CBA MICE WITH CERVICAL CANCER (RSHM-5)

L.P. Kovalenko, K.V. Korzhova, L.F. Zainullina, S.V. Nikitin, E.A. Ivanova, R.V. Zhurikov*

Zakusov Institute of Pharmacology,
8 Baltiyskaya str., Moscow, 125315 Russia; *e-mail: zhurikovrv@gmail.com

The effects of intraperitoneal administration of SNK-411 (2-isobutyl-4,6-dimethyl-5-hydroxypyrimidine) in a dose of 25 mg/kg (the total dose of 350 mg/kg) and SNK-578 (hydrochloride of 2-isobutyl-4,6-dimethyl-5-hydroxypyrimidine) in a dose of 10 mg/kg (the total dose of 140 mg/kg) on tumor growth and concentration of cytokines in the blood serum were studied in female CBA mice. Substances were administrated from the 2nd to 15th days of tumor development. Tumor growth inhibition (TGI) and serum cytokine level were studied on the 7th day after the end of compounds administration (21st day of tumor growth). In intact control group (n=10) median tumor mass was 1255 mg. TGI in the group of animals treated with SNK-411 was 47%; in the group of mice treated with SNK-578 TGI was 87%, tumor mass demonstrated 7.4-fold reduction. Serum concentrations of cytokines (IL-6, IL-10, IL-17A and IFN- γ) in tumor-bearing group of mice were higher versus the intact control group by 229%, 40%, 60% and 81%, respectively. Highly active SNK-578 decreased concentrations of prooncogenic IL-10, IL-17A and proinflammatory IL-6, by 61%, 70% and 29% as compared to tumor-bearing control group. SNK-411 decreased concentrations of prooncogenic IL-10 and IL-17A by 48% and 60%, respectively, and did not affect concentration of IL-6. Taking into consideration that IL-6 participates in autoimmune reactions, we can assume that the immune control is one of the crucial mechanisms of antitumor effect of SNK-578. All results are statistically significant.

Key words: 2-isobutyl-4,6-dimethyl-5-hydroxypyrimidine; hydrochloride of 2-isobutyl-4,6-dimethyl-5-hydroxypyrimidine; cervical cancer (RShM-5); cytokines

Funding. The work was performed in the framework of a state task on topic No 0521-2019-0004.

Received: 30.12.2020, revised: 11.03.2021, accepted: 15.03.2021.