

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ, ЦИКЛИЧЕСКИХ И АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ОКИСЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЗАМИНИРОВАНИЕ ПОЛИАМИНОВ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЕ

С.П.Сяткин, М.Л.Благонравов, А.Хиляль, К.Ю.Сунграпова,
Р.И.Сокуев, И.А.Корзун, В.А.Горячев

*Кафедра общей патологии и патологической физиологии имени В.А.Фролова
Медицинского института РУДН, Москва, РФ*

Исследовано действие некоторых азотсодержащих, гетероциклических и циклических веществ на скорость окислительного распада полиаминов и путресцина в ткани с высокой скоростью пролиферации. Оценивали активности ключевых ферментов окислительного дезаминирования полиаминов — сперминоксидазы (СМО), полиаминоксидазы (ПАО) и диаминоксидазы (ДАО) — с использованием бесклеточной тест-системы на основе ткани регенерирующей печени крыс. Соединения метил-2-(5-формилфуран-2-ил) бензоат и 2,7-бис-[2-(диэтиламино)этокс]-9Н-флуорен-9-он (и в виде дигидрохлорида) проявили в основном активирующий эффект в отношении окислительного распада путресцина, спермидина и спермина, что косвенно указывает на их антипролиферативное действие. Безазотистые соединения ингибировали данный процесс, проявляя таким образом потенциальные канцерогенные свойства. Корреляционные зависимости были рассчитаны для активности ДАО, ПАО и СМО с пятью топологическими индексами: Винера (W), Руврэ (R), Балабана (J) в модификации Тринайстича, обхода (Ip) и электропии (Ie). Наиболее высокая зависимость была отмечена для ДАО и индекса Балабана ($R=-0.55$), для ПАО и индекса обхода ($R=0.78$), для СМО и индекса электропии ($R=0.53$). Остальные зависимости проявили корреляцию незначительной силы.

Ключевые слова: полиамины; диаминоксидаза; полиаминоксидаза; сперминоксидаза; гетероциклические соединения

Данные литературы свидетельствуют о наличии корреляционной связи между уровнем полиаминов и изменениями митотической активности пролиферирующих тканей [1]. Физиологические процессы, связанные с усиленным делением клеток (эмбриональное развитие, регенерация), сопровождаются повышением содержания полиаминов [2]. Изменение концентрации полиаминов в клетках характерно и для ряда патологических состояний, включая опухолевый рост

[3]. Влияние различных химических агентов на пролиферативную активность клеток может быть оценено по активности метаболизма полиаминов [4]. В частности, установлено резкое снижение интенсивности (вплоть до нулевого значения) окислительного дезаминирования полиаминов под действием диаминоксидазы (ДАО) и полиаминоксидазы (ПАО) в мышечных гепатомах Гельштейна 27, 22а, 60, 61, 46, 48, а также в первичных гепатомах, вызванных воздействием диэтилнитрозамина. Синтез полиаминов при этом увеличивается незначительно. В противоположность этому скорость синтеза

полиаминов в регенерирующей печени крыс существенно превышает скорость их распада путём окислительного дезаминирования [5]. Данное наблюдение позволяет допустить, что повышение концентрации полиаминов в тканях с нормальной и патологически усиленной пролиферацией клеток обусловлено разными механизмами. Таким образом, можно предположить, что химические соединения, стимулирующие синтез полиаминов и угнетающие их распад, способны оказывать канцерогенный эффект. Напротив, вещества, ингибирующие образование полиаминов и активирующие их распад, предположительно, могут обладать противоопухолевой активностью. Соединения, усиливающие синтез полиаминов и не оказывающие влияния на их окислительное дезаминирование, вероятно, будут способствовать более активной пролиферации.

Одним из перспективных направлений в разработке новых методов фармакотерапии злокачественных опухолей является применение химических аналогов полиаминов. Некоторые из них способны подавлять активность атипичных клеток, нарушая обмен их собственных полиаминов [4,6]. Появление новых гетероциклических и азотсодержащих органических соединений диктует необходимость исследования их антипролиферативного эффекта, основанного на оценке способности влиять на обмен полиаминов.

Химические соединения, блокирующие синтез путресцина и полиаминов и активирующие процесс их окислительного распада, могут выступать в качестве потенциальных противоопухолевых средств. Проллиферативными свойствами будут обладать химические вещества, активирующие синтез и не влияющие на скорость окислительного распада полиаминов.

Целью данной работы являлось исследование влияния некоторых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на окислительное дезаминирование полиаминов в бесклеточной тест-системе.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование одобрено комитетом по этике медицинского института РУДН (Протокол № 13 от 15 декабря 2022 г.) и выполнено в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.).

Тестируемые вещества. Исследуемые вещества синтезированы по стандартной методике [7] в лаборатории синтеза гетероцикличес-

ких соединений кафедры органической химии РУДН (табл. 1). В качестве растворителя для веществ использовали ДМСО.

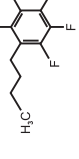
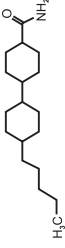
Получение бесклеточной тест-системы. Обширный скрининг тестируемых соединений проводили для количественной оценки их влияния на скорость окислительного дезаминирования полиаминов. В экспериментах использовали белых беспородных крыс-самцов ($n=85$) с массой 250–350 г. Животные получали стандартный рацион вивария РУДН, доступ к пище и воде был свободным. Контрольная и опытные группы содержали по 5 крыс. Каждое из 16 тестируемых веществ соответствовало одной опытной группе. Частичную гепатэктомию для получения ткани регенерирующей печени проводили по стандартной методике [8]. Ткань печени механически гомогенизировали с помощью гомогенизатора Omni MultiMix200 (Omni, Inc.). Бесклеточная тест-система представляла собой цитозольную фракцию (20 000g, 20 мин, 4°C, ультрацентрифуга Beckman 75) 33% гомогената ткани печени с добавлением необходимых компонентов. Полученный супернатант использовали для определения активности аминоксидаз по методике в модификации [5].

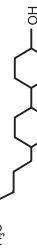
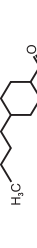

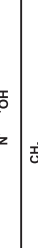

Анализ удельной активности аминоксидаз в бесклеточной тест-системе. Для оценки активности аминоксидаз пробы из образцов ткани инкубировали с одним из субстратов (путресцин, спермидин или спермин) и одним из тестируемых соединений по методике [5]. Источником аминоксидаз служил супернатант микросомальной фракции 33% гомогената регенерирующей печени крыс. Концентрация тестируемых веществ в пробе составляла 0.1 мМ. Реакцию проводили в 96-луночном планшете. Оптическая плотность измерялась на спектрофотометре SpectraMax (Molecular Devices). Удельную активность фермента выражали в нкатал на 1 мг белка.

Реактивы, использованные в эксперименте: пероксидаза хрена (Merck), о-дианизидин (Acros, 97%), путресцина гидрохлорид (Sigma, 99.5%), спермидина гидрохлорид (Sigma, 99.5%), спермина гидрохлорид (Sigma, 99.5%), пиридоксаль-фосфат (Reanal), дитиотреитол (Serva), натрия гидрокарбонат (чда), трис(гидроксиметил)аминометан (Acros, 97%), калия фосфат (чда), калия гидрофосфат (чда) ("Марбиофарм"), соляная кислота 9.8N (чда).

Количественный анализ белка. Для расчёта удельной активности аминоксидаз в каждой пробе содержание белка определяли по методу Лоури в модификации [9].

Таблица 1. Названия, формулы структурного ядра и индекс тестируемых новых синтезированных химических веществ

Индекс	Название соединения	Формула соединения
A1	Диэтил-2-(4-(4-пентилейклоксифенил)-4,5-дигидро-1H-1,2,4-оксазол-5-ил)-4,5-дикарбоксилат	
A2	5,5-Диметилпиперазидин-2,4-дион	
A3	Метил-2-(5-формилфуран-2-ил) бензоат	
A4	2-Октилпропан-1,3-диол	
A5	4-Бутил-2,3,5,6-тетрафторбензойная кислота	
A6	3-Метил-1-фенилпирридин-2(1H)-он	
A7	Этил 4-гидроксибензоат	
A8	4-(4-Пентилциклогексил)бензамид	
A9	4'-Пентил-1,1'-би(циклогексил)-4-карбоксамид	
A10	1,3,7-Триметил-3,7-дигидро-1H-пурин-2,6-дион	
A11	4-Бром-4-(4-бутилциклогексил)-1,1-бифенил	

Индекс	Название соединения	Формула соединения
A12	4'-Пентил[1,1'-би(циклогексан)]-4-ол	
A13	4-Бутилциклогексан-1-карбоксамид	
A14	3-Метилпиридин-2-ол	
A15	Метил-2-[(3-оксо-3-фенилпропил)амино]бензоат	
A16	2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9Н-флуорен-9-он (и в виде дигидрохлорида)	

Количественные корреляции "структура—активность" (ККСА). Для определения ККСА использовали компьютерные программы ChemicDescript (свид. № 2003612305), ChemicPen (Cetramax). Предварительно рассчитывали пять топологических индексов: Винера (W), Руврэ (R), Балабана (J) в модификации Тринайстича, индексы обхода и электропии по структуре молекулы. Индекс Винера (Wiener index): $W = \sum D_{ii} + \frac{1}{2} \sum D_{ij}$, $i > j$, где D_{ii} — диагональные, D_{ij} — недиагональные элементы матрицы расстояний. Индекс Балабана (Balaban index): $J = q / (\mu + 1) \sum [(S_i S_j)^{-1/2}]$, где S_i и S_j — суммы расстояний вершин i и j в матрице расстояний; q — число связей; μ — число циклов. Индекс обхода (Detour index): $\omega = \frac{1}{2} \sum \sum (\Delta)_{ij}$, где Δ_{ij} — элемент в матрице обхода. Индекс Руврэ (Rouvray index): $R = \sum d_{ii} + \sum d_{ij}$ ($i > j$), где d_{ii} — диагональные, d_{ij} — недиагональные элементы матрицы расстояний. Индекс электропии: $I_e = \log_2(N! / \prod N_i!)$, где N — общее число атомов в молекуле; N_i — число атомов одного вида [10].

Статистический анализ. Полученные результаты обрабатывали в программе MS Excel 2010 (Microsoft, Corp.). Данные представлены в виде среднего значения (M) и стандартной ошибки среднего (SEM). Поскольку данные не относились к гауссовой модели распределения, применялись непараметрические методы. Достоверность отличий полученных данных от контрольных значений определяли по t критерию Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты скрининга тестируемых веществ на бесклеточной тест-системе представлены в таблице 2.

Статистически значимого ингибирования ДАО не показало ни одно из исследованных соединений. Активность ПАО значимо снижалась только под влиянием вещества A14. Активность сперминоксидазы (СМО) — под действием агентов A6, A7, A8, A9, A10, A11, A12, A13, A14 и A15. Полученные данные позволяют предположить наличие канцерогенных свойств у тестируемых соединений.

Во всех остальных случаях наблюдалась преимущественно значимая активация ДАО, ПАО и СМО. Каждому веществу был присвоен ранг в порядке убывания степени активации катаболизма того или иного полиамина, затем ранги, относящиеся к одному веществу, но к разным полиаминам, были суммированы. Для

Таблица 2. Активность ферментов распада полиаминов в бесклеточной тест-системе из регенерирующей печени крыс в контроле и при воздействии тестируемых соединений ($M \pm m$)

Индекс вещества	ДАО, нкатал/мг белка	Δ , %	ПАО, нкатал/мг белка	Δ , %	СМО, нкатал/мг белка	Δ , %
Контроль	0.023±0.001	0	0.0070±0.0005	0	0.0060±0.0005	0
A1	0.027±0.001*	117.4	0.0130±0.0004*	185.7	0.0180±0.0004*	257.1
A2	0.023±0.001	100.0	0.0090±0.0004*	128.6	0.0180±0.0004*	257.1
A3	0.028±0.001*	121.7	0.0150±0.0007*	214.3	0.0200±0.0005*	285.7
A4	0.018±0.0004	78.3	0.0080±0.0011	114.3	0.0150±0.0005*	214.3
A5	0.022±0.001	95.7	0.0090±0.0002*	128.6	0.012±0.001*	171.4
A6	0.034±0.001*	147.8	0.0190±0.0004*	237.5	0.00020±0.00001*	3.8
A7	0.022±0.001	95.7	0.0130±0.0007*	162.5	0.003±0.0001*	66.0
A8	0.0300±0.0002*	130.4	0.0100±0.0004*	125.0	0.0005±0.0001*	9.0
A9	0.035±0.001*	152.2	0.0170±0.0005*	212.5	0.00020±0.00003*	3.3
A10	0.029±0.001*	126.1	0.0140±0.0012*	175.0	0.0003±0.0001*	5.2
A11	0.0250±0.0004*	108.7	0.0140±0.0004*	175.0	0.00010±0.00001*	1.9
A12	0.0290±0.0001*	126.1	0.0100±0.0014*	142.9	0.0040±0.0012*	78.4
A13	0.026±0.001*	113.0	0.0110±0.0008*	157.1	0.0024±0.0003*	47.0
A14	0.026±0.002	113.0	0.0060±0.0003*	85.7	0.00014±0.00010*	2.8
A15	0.026±0.002	113.0	0.0080±0.0009	114.3	0.0080±0.0001*	16.0
A16	0.030±0.001*	130.4	0.0250±0.0003*	357.1	0.0270±0.0005*	549.9

Примечание. Результаты представлены для 10 параллельных измерений удельной активности ферментов в каждой из 5 проб. Δ , % — удельная активность, измеренная от контроля, принятого за 100% (>100% — активация, <100% — ингибирование). * $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем.

тестируемых веществ можно выстроить ряды в порядке снижения активирующего действия на катаболизм полиаминов: наиболее активные $A3=A16 \gg A1 \gg A2 > A5$. Эти результаты хорошо согласуются с полученными ранее данными в экспериментах с производными азафлуорена [11,12].

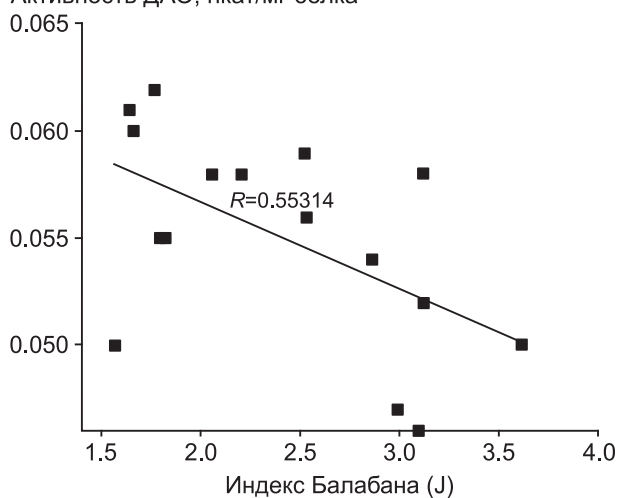
Применение методов ККСА позволяет существенно снизить затраты материальных, трудовых и временных ресурсов при разработке новых лекарственных средств за счёт значительного снижения числа тестируемых веществ и максимального сужения диапазона нежелательных эффектов [13]. Успешный отбор веществ-кандидатов с помощью программы ChemicDescript возможен только в случае правильного выбора дескриптора, отражающего наиболее существенный параметр для данного типа соединений и для определённой активности — топологию, геометрию, распределение заряда и т.д.

Для активности ДАО, ПАО и СМО были рассчитаны корреляционные зависимости с пятью специально отобранными топологическими индексами: Винера (W), Руврэ (R), Балабана (J) в модификации Тринайстича, обхода (Ip) и электропии (Ie). Индекс W в основном отражает размеры и сложность молекулы — наличие функциональных групп, количество связей и атомов, в то время как индекс Балабана учиты-

вает число циклов и сопряжений. Индексы W, R и J основаны на матрице расстояний, индекс Ip — на матрице обхода. Индексы W и R также являются вершинными и рёберно-вершинными графами, так как они учитывают тип атомов (вершин графа) и химических связей (рёбер графа). В индексе электропии указывается разноеобразие атомов в структуре молекулы.

Зависимость для индекса Балабана и активности ДАО оказалась равной -0.55 (рисунк), для ПАО и индекса обхода — 0.78, для

Активность ДАО, нкат/мг белка



Количественные корреляции активности ДАО с индексом Балабана (J).

СМО и индекса электропии — 0.53. Остальные зависимости проявили незначительную силу корреляции.

Анализ имеющихся в настоящее время данных позволяет утверждать, что метаболизм полиаминов занимает особое место в жизнедеятельности активно пролиферирующих клеток как в норме, так и в условиях патологии. Ранее описано влияние определённых азотсодержащих гетероциклических соединений на активность аминоксидаз клеток печени, а также установлены их противоопухолевые свойства на линиях L-клеток [11]. Формирование группы тестируемых веществ проводили с учётом полученных ранее результатов аналогичных исследований с производными азакраун-эфиров, бактериопурпурина, азафлуорена, анилина и диоксаборенинопиридина [12]. Вместе с тем синтезированы и другие вещества, принадлежащие к данному ряду, для которых подобные эффекты изучены не были. Продукты окислительного дезаминирования полиаминов — перекись водорода, иминоальдегиды и акролеин, образующийся при дезаминировании иминоальдегидов, являются цитотоксичными и могут инициировать апоптоз злокачественных клеток [14].

Дальнейшие исследования в данном направлении позволят определить новые перспективные противоопухолевые агенты и особенности их влияния на метаболизм полиаминов в тканях с усиленной пролиферацией.

Исследованные азотсодержащие, гетероциклические и циклические соединения в основном активировали катаболизм полиаминов в бесклеточной тест-системе на основе ткани регенерирующей печени, демонстрируя тем самым потенциальную противоопухолевую активность. Наиболее активными в отношении активации аминоксидаз оказались соединения A3=A16>>A1>>>A2>A5.

Количественные корреляции топологических индексов с активностью аминоксидаз для тестируемых соединений показали важность индекса Балабана для данного типа активности.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Polyamines methods and protocols* / Eds R.Alcázar, A.F.Tiburcio. Humana Press, 2018.
2. *Miller-Fleming L., Olin-Sandoval V., Campbell K., Ralser M.* Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in the cell // *J. Mol. Biol.* 2015. Vol. 427, N 21. P. 3389-3406. doi: 10.1016/j.jmb.2015.06.020
3. *Sánchez-Jiménez F., Medina M.Á., Villalobos-Rueda L., Urdiales J.L.* Polyamines in mammalian pathophysiology // *Cell. Mol. Life Sci.* 2019. Vol. 76, N 20. P. 3987-4008. doi: 10.1007/s00018-019-03196-0
4. *Murray-Stewart T.R., Woster P.M., Casero R.A.Jr.* Targeting polyamine metabolism for cancer therapy and prevention // *Biochem. J.* 2016. Vol. 473, N 19. P. 2937-2953. doi: 10.1042/BCJ20160383
5. *Сяткин С.П., Березов Т.Т.* Обмен полиаминов в злокачественных опухолях // *Вестник АМН СССР.* 1982. № 3. С. 10-21.
6. *Li M., Wang Y., Ge C., Chang L., Wang C., Tian Z., Wang S., Dai F., Zhao L., Xie S.* Synthesis and biological evaluation of novel alkylated polyamine analogues as potential anticancer agents // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. Vol. 143. P. 1732-1743. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.10.069
7. *Волков С.В., Кутяков С.В., Левов А.Н., Полякова Е.И., Ань Ле Туан, Солдатова С.А., Терентьев П.Б., Солдатенков А.Т.* Превращение 3-бензоил-1-метил-4-фенил-γ-пиперидола под действием ариламинов и арилгидразинов. Синтез 3-ариламино-1-оксо-1-фенилпропанов и 1,3-диарилпиразолов и их фрагментация под электронным ударом // *Химия гетероциклических соединений.* 2007. № 4. С. 544–554.
8. *Michalopoulos G.K.* Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas // *Am. J. Pathol.* 2010. Vol. 176, N 1. P. 2-13. doi: 10.2353/ajpath.2010.090675
9. *Сяткин С.П.* Модифицированный метод определения белка в пробах с повышенным содержанием липо- и гликопротеидов // *Вопр. мед. химии.* 1981. Т. 27, № 1. С. 136-138.
10. *Hu Q.N., Liang Y.Z., Fang K.T.* The matrix expression, topological index and atomic attribute of molecular topological structure // *Journal of Data Science: JDS.* 2003. Vol. 1. P. 361-389. doi: 10.6339/JDS.2003.01(4).172
11. *Лисицкая К.В., Сокуева Н.А., Мальшева Ю.Г., Иванов А.В., Шишкин С.С., Сяткин С.П.* Определение функциональной активности синтетических аналогов полиаминов с помощью биотест-системы на основе быстро пролиферирующих культивируемых клеток человека // *Прикл. биохим. и микробиол.* 2013. Т. 49, № 2. С. 124–128.
12. *Syatkin S.P., Neborak E.V., Khlebnikov A.I., Komarova M.V., Shevkun N.A., Kravtsov E.G., Blagonravov M.L., Agostinelli E.* The investigation of structure-activity relationship of polyamine-targeted synthetic compounds from different chemical groups // *Amino Acids.* 2020. Vol. 52, N 2. P. 199-211. doi: 10.1007/s00726-019-02778-3

13. *Khlebnikov A.I., Schepetkin I.A., Kirpotina L.N., Quinn M.T.* Computational structure-activity relationship analysis of non-peptide inducers of macrophage tumor necrosis factor-alpha production // *Bioorg. Med. Chem.* 2008. Vol. 16, N 20. P. 9302-9012. doi: 10.1016/j.bmc.2008.08.078
14. *Cervelli M., Salvi D., Polticelli F., Amendola R., Mariottini P.* Structure-function relationships in the evolutionary framework of spermine oxidase // *J. Mol. Evol.* 2013. Vol. 76, N 6. P. 365-370. doi: 10.1007/s00239-013-9570-3

Получено 20.10.23

