

*На правах
рукописи*

Неборак Екатерина Владиславовна

Синтез, строение и биологические свойства комплексных соединений меди с азотсодержащими органическими лигандами.

03.01.04 – биохимия

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени кандидата
биологических наук**

Москва – 2012

Работа выполнена на кафедре биохимии медицинского факультета
Российского университета дружбы народов.

Научные руководители: доктор биологических наук, профессор
Сяткин Сергей Павлович
доктор медицинских наук, профессор
Трещалина Елена Михайловна

Официальные оппоненты: Член-корреспондент РАМН,
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой биохимии
лечебного факультета
ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова
Министерства здравоохранения России
Терентьев Александр Александрович
доктор биологических наук, профессор
Институт детской онкологии
Онкологического научного центра РАМН,
г. Москва, Министерства здравоохранения,
руководитель отделения
Байкова Валентина Николаевна

Ведущая организация: Институт Биохимии им. А.Н. Баха РАН.

Защита состоится «21» декабря 2012 г. в «___» ч. на заседании диссертационного
совета Д 212.203.13 при Российском университете дружбы народов по адресу:
117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.8, медицинский факультет.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Российского
университета дружбы народов по адресу: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д.
6.

Автореферат разослан « » ноября 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
Доктор биологических наук, профессор



Е.В.Лукашева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Проблема изучения и выработки подходов к направленному влиянию на механизмы регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки остается актуальной для фундаментальных и прикладных исследований в биологии и медицине, несмотря на ряд важных открытий и внедрений. В соответствии с гипотезой о способности аналогов полиаминов (ПА) замещать эндогенные ПА в клетке в участках связывания был предложен механизм нарушения их внутриклеточных функций [Porter C. W., Bergeron R. J., 1988]. Поскольку метаболизм ПА является одним из эссенциальных процессов клеточного роста и дифференцировки [Seiler N., 2003], этот путь считается удобной и надежной мишенью для поиска и конструирования биологически активных агентов – регуляторов активности ключевых ферментов обмена ПА. В этой связи наиболее перспективен ряд азотсодержащих гетероциклических соединений, в частности, бис-уридилных [Syatkin S.P., Fedorontchuk T.V., Lidack M.Yu., et al., 1994], пуриновых алкалоидов [Beninati S., Lentini A., 1998], азафлуореновых и бензимидазольных производных [Сяткин С.П., Березов Т.Т., Фролов В.А., и соавт., 2007]. Эти вещества объединены тем, что в их структуре содержатся полиаминовые фрагменты.

В последние годы большое внимание уделяется также поиску биологически активных структур среди комплексных соединений d-металлов с органическими лигандами и, особенно, азотсодержащими. Обнаружены комплексы металлов с лигандами (структурные аналоги ПА), проявляющие антипролиферативные свойства [Casero R. A., Woster P. M., 2009; Tisato F., 2010; Wallace H. M. 2009].

Все вышесказанное подтверждает актуальность получения и биохимической оценки свойств комплексных соединений металлов с азотсодержащими органическими лигандами в плане создания нового класса биологически активных соединений с оригинальным механизмом действия.

Цель работы – синтез и исследование химических, биохимических и биологических свойств комплексных соединений меди с азотсодержащими органическими лигандами, модулирующими метаболизм полиаминов в экспериментальных, биологических системах с усиленной клеточной и опухолевой пролиферацией.

Задачи:

1. Провести скрининг производных 3-анилино-1-фенил-пропанона-1 и диоксaborининопиридина в стандартной бесклеточной тест-системе для количественной оценки влияния этих соединений на обмен полиаминов.
2. Модифицировать структуры, проявившие наибольшую биохимическую активность, путем координирования с металлом-комплексообразователем - медью (II) и охарактеризовать химические свойства полученных комплексов.
3. Провести количественную оценку способности полученных комплексов влиять на показатели обмена полиаминов в стандартной бесклеточной тест-системе из регенерирующей печени крыс.
4. Оценить цитотоксические свойства исследуемых соединений на сигнальных культурах опухолевых клеток
5. Определить возможность влияния на экспрессию маркеров готовности к запуску апоптоза клетки для соединений, проявивших наибольшую цитотоксическую активность.

Положения, выносимые на защиту:

1. Соединения 1-фенил-3-(4-толуидино)-пропанон-1, 3-(4-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(4-броманилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(4-йоданилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(2-

фторанилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(3-нитроанилино)-1-фенилпропанон-1 повышают активность аминоксидаз.

2. Производные 3-анилино-1-фенил-пропанона-1 ингибируют активность орнитиндекарбоксилазы.

3. Производные диоксаборининопиридина ингибируют активность аминоксидаз.

4. Производные диоксаборининопиридина, в основном, повышают активность орнитиндекарбоксилазы.

5. Комплексные соединения меди (II) с 3-(2-фторанилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(3-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(3-нитроанилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(2-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1-гидразоном и 3-(4-этиланилино)-1-фенилпропанон-1 повышают активность аминоксидаз.

6. Комплексные соединения меди (II) с 3-анилино-1-фенилпропанон-1, 1-фенил-3-(4-толуидино)-пропанон-1, 3-(4-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(4-броманилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(4-йоданилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(2-фторанилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(3-три-фторметиланилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(3-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(3-нитроанилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(2-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1-гидразоном ингибируют активность орнитиндекарбоксилазы.

7. Комплексные соединения меди (II) с 1-фенил-3-(4-толуидино)-пропанон-1, 3-(2-фторанилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(3-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1, 3-(2-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1-гидразоном обладают значимой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток.

8. Комплексные соединения меди (II) с 1-фенил-3-(4-толуидино)-пропанон-1, 3-(2-фторанилино)-1-фенилпропанон-1 и 3-(2-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1-гидразоном вызывают повышение уровня экспрессии маркера готовности клетки к апоптозу CD95 у мононуклеарных лейкоцитов здорового человека.

Научно-практическая значимость

Модифицирована и адаптирована методика количественного определения дансильных производных полиаминов методом ВЭЖХ для прибора высокоэффективного жидкостного хроматографа с флуоресцентной детекцией на базе платформы Agilent 1200.

Результаты исследований формируют базу данных для разработки программного обеспечения расчетов количественных корреляций связи «структура-активность» (ККСА, или QSAR) при компьютерном моделировании химических структур с заданными биологическими свойствами, в частности с антиопухолевой и антипролиферативной активностью. Данные о новых синтетических соединениях, содержащих полиаминовые фрагменты, могут быть использованы для синтеза веществ с улучшенными терапевтическими свойствами.

Апробирован алгоритм первичного тестирования новых синтетических соединений на наличие, биохимической и биологической активности.

Внедрение в практику

Адаптированная методика количественного определения полиаминов в биологических тканях методом ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией внедрена в работу ЦКП НОЦ РУДН.

Результаты работы используются в лекции «Обмен полиаминов как терапевтическая мишень» в курсе «Медицинской энзимологии» для студентов по специальности «Лечебное дело».

Научная новизна

Впервые выявлены активирующие распад и/или ингибирующие синтез ПА производные 3-фениламино-1-фенилпропанона-1.

Впервые синтезированы и охарактеризованы по химическим и физико-химическим свойствам 11 комплексных соединений двухвалентной меди с производными 3-фениламино-1-фенилпропанона-1.

Впервые *in vitro* провели определение и количественно оценили влияние производных диоксaborининопиридина и 3-фениламино-1-фенил-пропанола-1, а также медных комплексов с последними на 3-х сигнальных культурах клеток опухолей человека (беспигментной меланоме MEL7, эстрогензависимого рака молочной железы MCF7 и гормонозависимого рака предстательной железы PC3). Установлено отсутствие цитотоксичности у лигандов и появление цитотоксичности комплексов.

Впервые *in vitro* на клетках мононуклеарных лейкоцитов человека выявлено повышение экспрессии маркеров готовности к апоптозу на фоне действия 3 медных комплексов с производными 3-фениламино-1-фенил-пропанола-1.

Связь исследований с научной программой

Работа выполнялась в рамках Государственных контрактов № 2.1.1./ 5939 и № 2.1.1./ 11377 «Исследование технологий по созданию новых классов противоопухолевых средств на базе обмена полиаминов как системы опосредованной регуляции химическими веществами процессов клеточной и опухолевой пролиферации и дифференцировки» аналитической ведомственной целевой программы “Развитие научного потенциала высшей школы (2009-2011 годы)”

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы доложены и обсуждены на итоговой конференции студенческого научного общества медицинского факультета РУДН «Клинические и теоретические аспекты современной медицины», 24 – 27 апреля 2007 г. Москва; XV международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии. и экологии», 31 мая-10 июня, 2007 г., Гурзуф; 10th International Congress On Amino Acids And Proteins (ICAAP). 21 - 26 August 2007. - Kallithea, Chalkidiki, Greece; Сателлитный симпозиум «Экология и здоровье» Съезда физиологического общества им. И.П.Павлова, 9 – 10 июня 2007 г.; International Polyamine Conference. Gotemba, Shizuoka, Japan, June 14 – June 18, 2010; Международной конференции «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии» Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, с 31 мая по 9 июня 2010 г.; Международной научно-практической конференции. «Экология и медицина»: современное состояние, проблемы и перспективы. Москва, 2 – 3 ноября, 2010 г.; 2a International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases, Rome, Italy, December 1-6, 2010; VII Международная научно-практической конференция Актуальные научные достижения, 17-25 июня 2011 г. София, Болгария; 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins. Beijing, China, August 1–5, 2011; XX Юбилейная международная конференция и дискуссионный научный клуб. Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 5 – 15 июня 2012 г.; IV Международная научная конференция Science4Health 2012. Клинические и теоретические аспекты современной медицины. 18–21 апреля 2012г., РУДН, Москва; 2012Congress on polyamines. Polyamines: biological and clinical perspectives. Istanbul, 2 – 7 September, 2012; XIV Всемирный конгресс «Здоровье и образование в XXI веке» 14-17 Ноября 2012 года, РУДН, г. Москва.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 24 печатные работы, в том числе 3 научные статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 167 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов, глав с описанием результатов собственных исследований, обсуждения результатов и выводов. Список литературы включает 271 источника, из них 242 зарубежных и 29 отечественных. Работа иллюстрирована 61 рисунком и 22 таблицами.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В ходе эксперимента были проведены исследования, химических, биохимических и биологических свойств соединений оригинального синтеза: А – производные анилина (таблица 1), Б – производные диоксaborининопиридина (таблица 2), В – комплексные соединения меди с производными 3-анилино-1-фенил-пропанона-1.

Исследуемые вещества группы А были синтезированы по стандартной методике [Волков С.В., Кутяков С.В, 2007], группы Б – получены в лаборатории синтеза гетероциклических соединений кафедры органической химии РУДН (зав. кафедрой - профессор Варламов А.В.), а группы В – синтезированы из соединений группы А.

Таблица 1. *Производные 3-анилино-1-фенил-пропанона-1 (группа А).*

Шифр вещества	Химическое название	Шифр вещества	Химическое название
А1	3-анилино-1-фенил-пропанон-1	А7	3-(3-трифторметиланилино)-1-фенилпропанон-1
А2	1-Фенил-3-(4-толуидино)-пропанон-1	А8	3-(3-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1
А3	3-(4-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1	А9	3-(3-нитроанилино)-1-фенилпропанон-1
А4	3-(4-броманилино)-1-фенилпропанон-1	А10	3-(2-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1-гидразоном
А5	3-(4-йоданилино)-1-фенилпропанон-1	А11	3-(4-этиланилино)-1-фенилпропанон-1
А6	3-(2-фторанилино)-1-фенилпропанон-1		

Таблица 2. *Производные диоксaborининопиридина (группа Б).*

Шифр вещества	Химическое название
Б1	6-Метил-2-(2-молил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксaborинино[5,4-с]пиридин
Б2	6-Метил-2-(4-метоксифенил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксaborинино-[5,4-с]пиридин
Б3	6-Метил-2-(2,4,6-триметилфенил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксaborинино [5,4-с]пиридин
Б4	6-Метил-2-(3-трифторметилфенил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксaborинино[5,4-с]пиридин
Б5	6-Метил-2-(2-тиенил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксaborинино[5,4-с]пиридин
Б6	6-Метил-2,4,8а-трифенилпергидро[1,3,2]-диоксaborинино[5,4-с]пиридин
Б7	6-Метил-2-(3-фтор-4-хлорфенил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксaborинино[5,4-с]пиридин
Б8	6-Метил-2-(3-толил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксaborинино[5,4-с]пиридин
Б9	6-Метил-2-(4-толил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксaborинино[5,4-с]пиридин

1. Синтез и химические свойства тестируемых соединений.

Методом спектрофотометрического титрования были определены константы ионизации соединений группы А.

Вещества группы В синтезировали по стандартной методике смешиванием этанольных растворов органического лиганда и хлорида дигидрата меди (II) ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) в эквимольных соотношениях ($\text{Me:L}=1:1$) при перемешивании и нагревании. После кристаллизации осадка полученную смесь центрифугировали, надосадочную жидкость декантировали, а осадок высушивали над гидроксидом калия. Полученные комплексы были охарактеризованы с помощью методов элементного, рентгенофазового, термогравиметрического, титриметрического и ИК-спектроскопического анализа.

2. Биологическое тестирование проводилось на двух уровнях: бесклеточном (полиаминовый тест) и клеточном (культуры клеток опухолей человека и мононуклеарные лейкоциты (МЛ) здорового человека). В качестве растворителя во всех экспериментах использовался ДМСО.

Количественный анализ основных показателей обмена ПА в бесклеточных тест-системах. В экспериментах использовали белых беспородных крыс - самцов массой 100 – 130 г, содержащихся на стандартном рационе вивария РУДН со свободным доступом к воде. В качестве моделей для исследований использовалась регенерирующая печень крыс, полученная путем частичной гепатэктомии [Higgins, Anderson, 1931] – быстро пролиферирующая ткань с усиленным синтезом ПА за счет повышения активности ОДК и с нормальной активностью аминоксидаз (ДАО и ПАО). Бесклеточные тест-системы представляли собой цитозольную фракцию (20 000 g x 20 мин при 4°C) 33%-ного гомогената ткани печени с добавлением необходимых компонентов. Полученный супернатант использовался для экспериментов по определению активности аминоксидаз [С. П. Сяткин, 1981], ОДК и уровня ПА методом ВЭЖХ с флуоресцентной детекцией с предварительным дансилированием.

Оценка цитотоксичности тестируемых веществ in vitro. Клетки меланомы человека MEL-7, рака молочной железы MCF-7 и рака простаты РС-3 размещались в специальных инкубаторах и культивировались в стандартных условиях. Через 24 ч после посадки клеток в питательную среду к клеткам добавлялись растворы исследуемых веществ с заданной конечной концентрацией и инкубировались в течение 24, 48 и 72 часов. В контрольные лунки добавляли ДМСО до концентрации 0,5%. Уменьшение флуоресценции в присутствии тестируемого вещества пропорционально количеству живых клеток и используется для измерения цитотоксичности. Для оценки цитотоксичности веществ подсчитывалось количество клеток в присутствии красителя Аламар Блю, после превращения его во флуоресцирующий продукт в метаболически активных клетках, и вычислялось по формуле:

Уровень пролиферации (%) = $100 \times (\text{ТЕСТ-МИН}) / (\text{МАКС-МИН})$, где ТЕСТ – средний сигнал (n=2) для изучаемого вещества, МИН – средний сигнал (n=6) для лунок без клеток, МАКС – средний сигнал (n=6) для лунок с клетками, но без обработки веществами.

Оценка возможности проапоптотического действия наиболее цитотоксически активных соединений. Тестирование проводилось путем исследования влияния соединений на экспрессию маркеров готовности клетки к апоптозу CD95 на МЛ человека. После инкубации с тестируемыми веществами проводилось окрашивание клеток флуорохромами, мечеными FITC-антителами к CD95, а затем с помощью метода проточной цитометрии и статистической обработки полученных данных определялся уровень повышения экспрессии CD95 на МЛ.

Количественный анализ белка. Количество белка в пробах из исследуемых тканей для расчета удельной активности ПАО, ДАО и ОДК определялось фармакопейным методом [Государственная Фармакопея СССР, XI, 1998] по Лоури (1951) в модификации С.П. Сяткина (1981).

Статистический анализ данных. Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью t-критерия Стьюдента [Афифи, Эйзен, 1982] с использованием пакета программ STATISTICA7. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты.

1. Синтез и свойства тестируемых соединений.

В результате неорганического синтеза было получено 11 новых индивидуальных соединений – продуктов взаимодействия веществ группы А с хлоридом меди (II) – в виде мелкокристаллических порошков от коричневого до темно-коричневого и черного цвета. Выход составил 35 % - 70%.

Изучение кислотно-основных свойств тестируемых соединений группы А. Константы ионизации соединений группы А представлены в Таблице 3.

Основные свойства соединений этого ряда выражены сильнее у структур с σ -электронодонорными заместителями (A2 и A11).

Изучение строения и химических свойств полученных медных комплексов группы В. Элементный состав полученных соединений подтверждался элементным анализом, а индивидуальность полученных соединений доказывалась методом рентгенофазового анализа.

Таблица 2. Константы ионизации соединений группы А.

Шифр вещества	Химическое название соединения	pK _a
A1	3-анилино-1-фенил-пропанон-1	4,68±0,14
A2	1-фенил-3-(4-толуидино)-пропанон-1	5,21±0,06
A3	3-(4-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1	4,11±0,13
A4	3-(4-броманилино)-1-фенилпропанон-1	4,03±0,49
A5	3-(4-йоданилино)-1-фенилпропанон-1	4,07±0,22
A6	3-(2-фторанилино)-1-фенилпропанон-1	3,21±0,13
A7	3-(3-трифторметиланилино)-1-фенилпропанон-1	3,83±0,33
A8	3-(3-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1	3,93±0,40
A9	3-(3-нитроанилино)-1-фенилпропанон-1	3,29±0,19
A10	3-(2-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1-гидразон	4,15±0,15
A11	3-(4-этиланилино)-1-фенилпропанон-1	5,32±0,20

Качественные реакции, элементный и термогравиметрический анализы позволяют предположительно судить о строении полученных комплексных соединений и написать их общую формулу в виде $Cu(A_i)_2Cl_2 \cdot 2H_2O$. Отрицательный результат качественной реакции на хлорид-ионы, проведенной без предварительного разрушения комплексных соединений свидетельствует о вхождении их во внутреннюю координационную сферу комплекса. Термогравиметрический анализ показывает, что молекулы воды, удаляющиеся в диапазоне 105-190°C, являются кристаллизационными и не входят во внутреннюю сферу комплекса. Результаты РФА для соединений А3 и В3 представлены на рисунках 1 и 2. Расчет межплоскостных расстояний и относительной интенсивности отраженного излучения проводился по формуле $d = (n\lambda)/2\sin\theta$, $I = (h_i/h_{max}) \cdot 100\%$. Различный набор межплоскостных расстояний исходных и полученных соединений позволяет заключить об их различном строении.

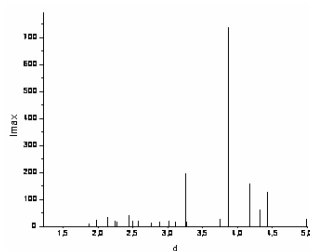


Рис.1 Штрих-рентгенограмма для А3

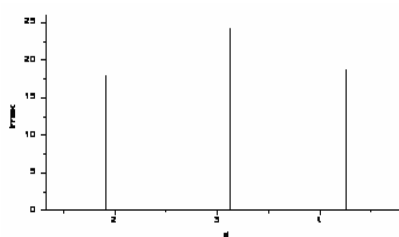


Рис.2 Штрих-рентгенограмма для В3

Из ИК-спектров лигандов (группа А) и их комплексов (группа В) видно смещение для всех комплексных соединений частоты колебания аминогруппы в высокочастотную область не менее чем на 25 см^{-1} , что указывает на взаимодействие неподеленной пары электронов атома азота с катионом металла. Критерием координации молекулы по карбонильной группе является смещение частоты ее колебания $\nu(\text{CO})$ в низкочастотную область, тогда как критерием координации по вторичной аминогруппе является смещение частоты ее колебания $\nu(\text{NH})$ в высокочастотную область. Следовательно, атом азота лигандов участвует в координации. Незначительное смещение карбонильной группы можно объяснить двумя факторами (менее 20 см^{-1}): 1) карбонильная группа не участвует в координации, а смещение связано с характером водородных связей; 2) карбонильная группа участвует в образовании слабой координационной связи, достраивая координационную сферу Cu^{2+} до 5 или 6 в качестве аксиального лиганда с увеличенным расстоянием $\text{Cu}-\text{O}$. В качестве примера ИК-спектров приведены спектры для соединений А1 и В1 на рисунках.

2. Биологическое тестирование.

Бесклеточный уровень. ПА-тест служил первичным этапом отбора соединений с потенциальной антипролиферативной активностью. Количественная оценка прямого влияния синтетических аналогов ПА из исследуемых групп на обмен ПА интерпретировалась как указывающая на их потенциальные антипролиферативные свойства

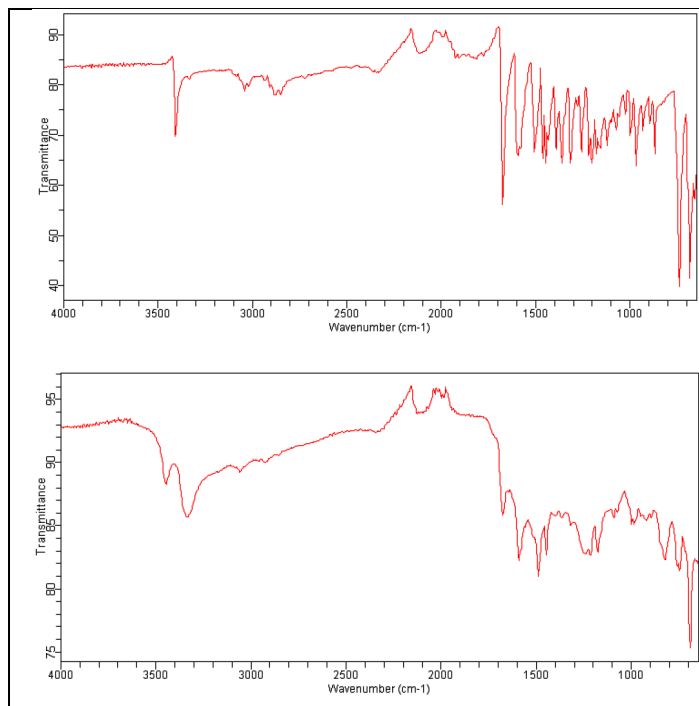


Рисунок 3. ИК-спектры соединений A1 и B1.

в случае активации ферментов распада и/или ингибирования синтеза ПА. Полученные экспериментальные данные по влиянию тестируемых исходных соединений на аминоксидазную активность ферментов обмена ПА представлены на рисунках 4 и 5 в виде диаграмм.

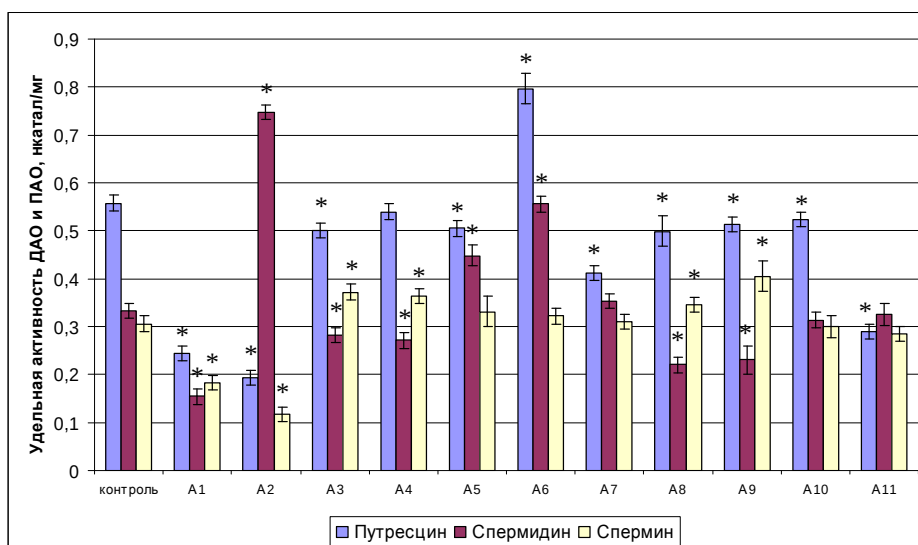


Рисунок 4. Влияние производных 3-анилино-1-фенил-пропанона-1 (группа А) на скорость окислительного дезаминирования путресцина, спермидина и спермина в бесклеточной тест – системе из регенерирующей печени крыс.

Примечание. Результаты представлены в виде $M \pm m$ для 5 параллельных измерений. (*) - Отличия от контроля статистически достоверны ($p < 0,05$).

Активация окислительного дезаминирования путресцина (на 43%) происходила на фоне действия вещества А6. Для спермидина активация распада установлена при действии соединений А2 (на 124%), А5 и А6. Окислительное дезаминирование спермина достоверно, хотя незначительно, повышалось при действии веществ А3, А4, А8 и А9. Величина аминоксидазной активности на фоне действия соединений этой группы коррелирует с их константами ионизации в случае путресцина ($-0,85$, $p=0,002$) и спермина ($-0,72$, $p=0,019$), т. е. чем больше основность данных соединений, тем больше степень ингибирования аминоксидаз.

Все тестируемые вещества группы Б вызвали значительное статистически достоверное ингибирование активности окислительного дезаминирования путресцина и спермидина. Процесс окислительного дезаминирования путресцина значительно ингибировался всеми тестируемыми веществами этой группы. Скорость окислительного дезаминирования спермидина уменьшалась примерно в 2 раза. Распад спермина ингибировался незначительно или оставался неизменным (при действии Б2 и Б3). Это позволяет предположить наличие у всех исследуемых веществ данной группы канцерогенных свойств.

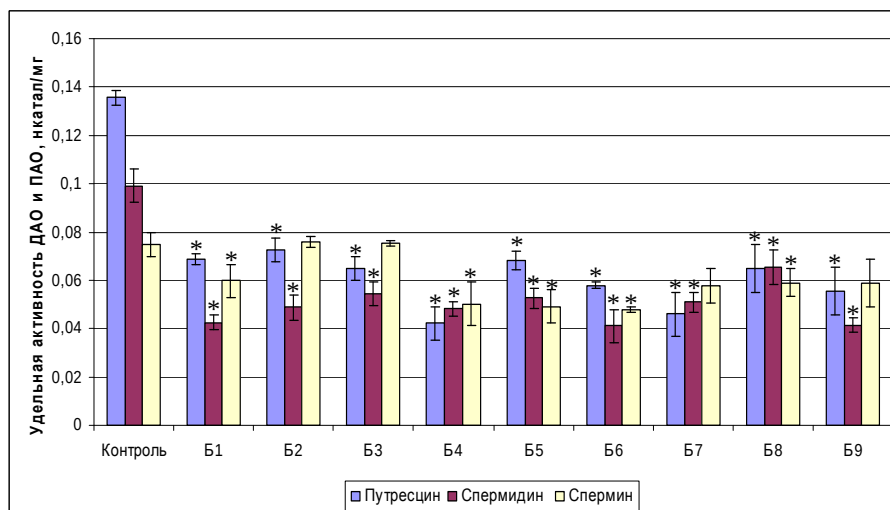


Рисунок 5. Влияние производных диоксaborининопиридина (группа Б) на скорость окислительного дезаминирования путресцина, спермидина и спермина в бесклеточной тест – системе из регенерирующей печени крыс. Примечание. Результаты представлены в виде $M \pm m$ для 5 параллельных измерений. (*) - Отличия от контроля статистически достоверны ($p < 0,05$).

Таким образом, первичный скрининг по этому показателю обмена ПА делает предпочтительными с точки зрения потенциальной противоопухолевой активности соединения анилинового ряда по сравнению с производными диоксaborининопиридина.

Результаты исследования влияния испытуемых веществ на активность ОДК проиллюстрированы диаграммами на рисунках 6 и 7.

Из диаграммы видно, что все соединения группы А вызывают достоверное снижение активности ОДК, что характерно для канцеростатиков.

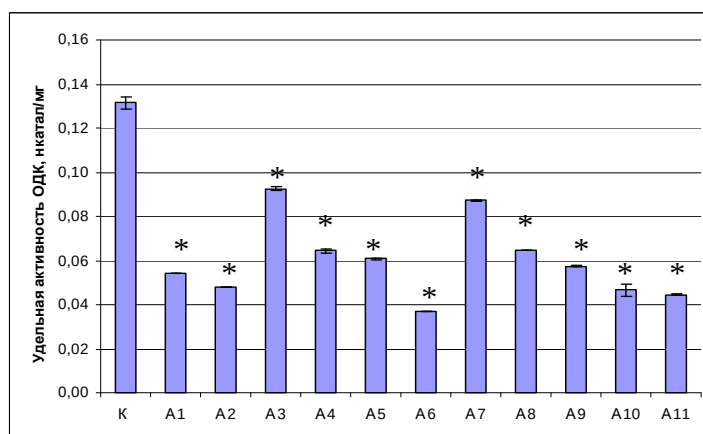


Рисунок 6. Влияние производных 3-анилино-1-фенил-пропанона-1 (группа А) на активность ОДК в бесклеточной тест – системе из регенерирующей печени крыс.

Примечание. Результаты представлены в виде $M \pm m$ для 4 параллельных измерений. (*) - Отличия от контроля статистически достоверны ($p < 0,05$).

Все соединения ряда группы Б, за исключением Б7 и Б8, вызывали достоверное повышение активности ОДК.

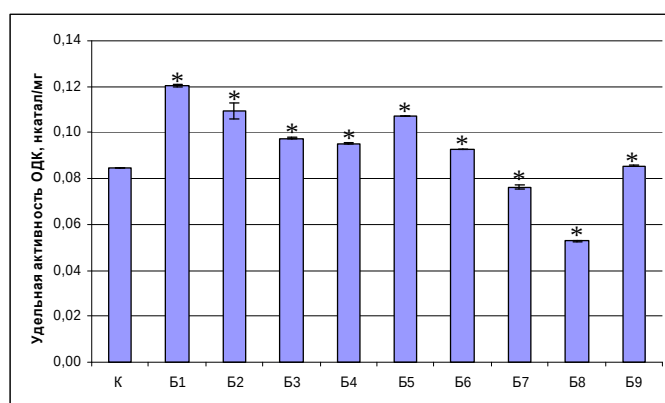


Рисунок 7. Влияние производных диоксaborининопиридина (группа Б) на активность ОДК в бесклеточной тест – системе из регенерирующей печени крыс.

Примечание. Результаты представлены в виде $M \pm m$ для 4 параллельных измерений. (*) - Отличия от контроля статистически достоверны ($p < 0,05$).

На основании результатов тестирования на бесклеточном уровне по критерию активации ферментов распада и/или ингибирования синтеза ПА были отобраны все лиганды группы А для синтеза комплексных соединений меди (II), которые в свою очередь также были протестированы на способность модулировать полиаминовый обмен. Результаты этих экспериментов представлены на рисунках 8 и 9.

Достоверная активация окислительного дезаминирования по субстрату Пут наблюдалась для соединений В9 и В10, по субстрату Сд – В4, В6, В8 и В11, по субстрату См – В6 и В11. Наиболее значительная активация наблюдалась для путресцина на фоне действия вещества В10 (более 60%).

В отношении влияния на ОДК для полученных комплексов, в отличие от лигандов, не наблюдается единообразия. Значительное ингибирование показано для соединений В1, В4 – В9. Активация ОДК наблюдалась на фоне действия В11.

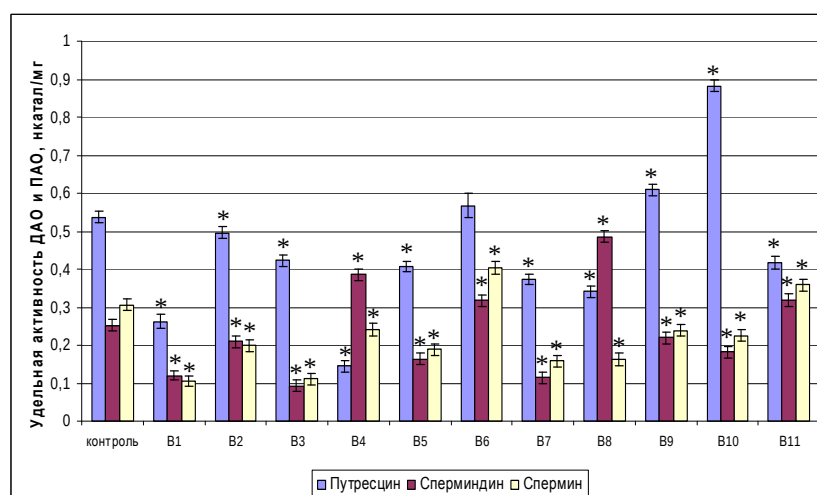


Рисунок 8. Влияние комплексов меди (II) и производных 3-анилино-1-фенил-пропанона-1 (группа В) на скорость окислительного дезаминирования путресцина, спермидина и спермина в бесклеточной тест – системе из регенерирующей печени крыс.

Примечание. Результаты представлены в виде $M \pm m$ для 5 параллельных измерений. (*) - Отличия от контроля статистически достоверны ($p < 0,05$).

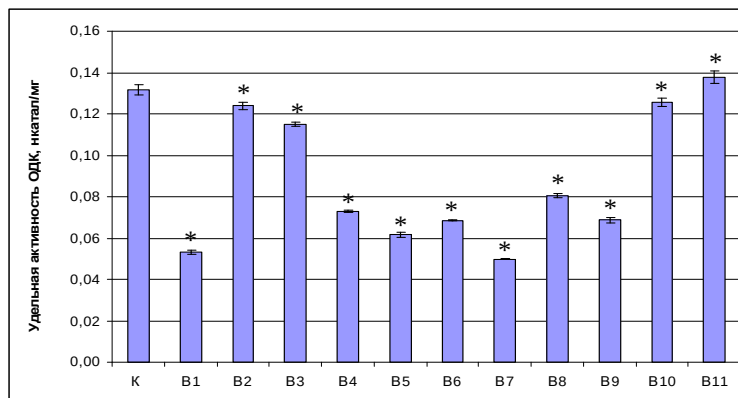


Рисунок 9. Влияние комплексов меди (II) с производными 3-анилино-1-фенилпропана-1 (группа В) на активность ОДК в бесклеточной тест – системе из регенерирующей печени крыс.

Примечание. Результаты представлены в виде $M \pm m$ для 4 параллельных измерений. (*) - Отличия от контроля статистически достоверны ($p < 0,05$)

Клеточный уровень. Результаты исследования влияния на пролиферативную активность тестируемых веществ представлены на диаграммах на рисунках 10-12. Видно, что значимая ($IK_{50} \leq 10^{-4} M$) цитотоксическая активность показана для соединений группы В – В2, В6, В8 и В10. Наблюдается тенденция усиления цитотоксических свойств для комплексов по сравнению с их лигандами. Наиболее чувствительными к действию данных соединений оказались клетки рака простаты РС3.

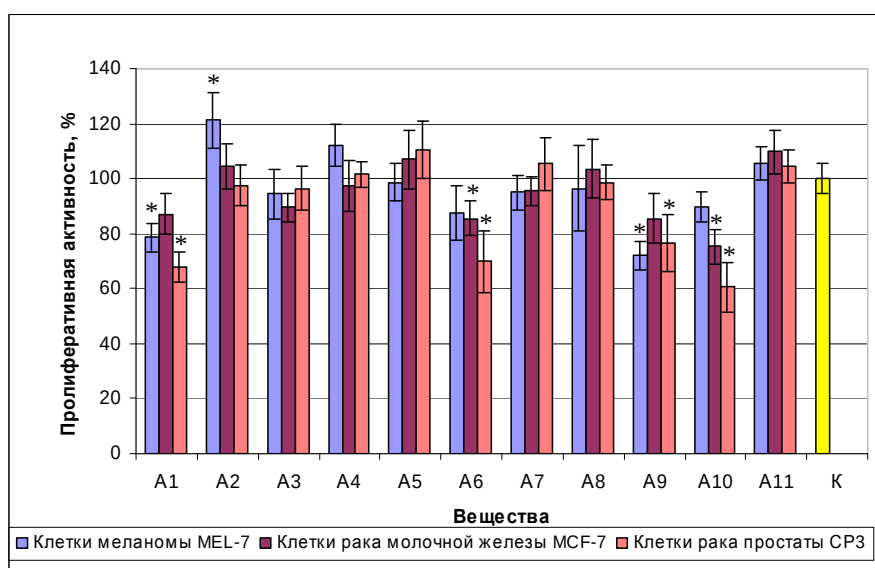


Рисунок 10. Влияние производных анилина (группа А) в концентрации 200 мкМ на пролиферацию клеток меланомы MEL-7, рака молочной железы MCF-7 и рака простаты человека РС3.

Примечание. Результаты представлены в виде $M \pm m$ для 3 параллельных измерений. (*) - Отличия от контроля статистически достоверны ($p < 0,05$)

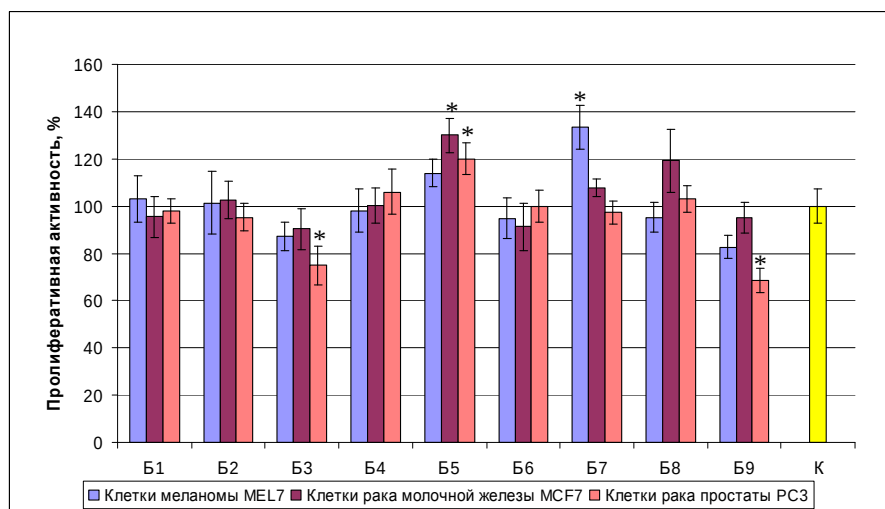


Рисунок 11. Влияние производных диоксaborинопиридина (группа Б) в концентрации 200 мкМ на пролиферацию клеток меланомы MEL-7, рака молочной железы MCF-7 и рака простаты человека PC3.

Примечание. Результаты представлены в виде $M \pm m$ для 3 параллельных измерений. (*) - Отличия от контроля статистически достоверны ($p < 0,05$)

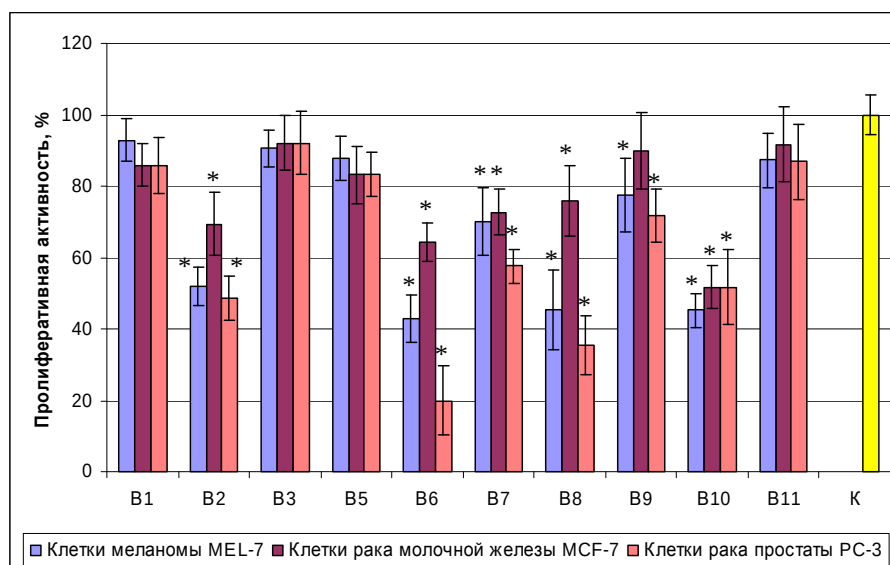


Рисунок 12. Влияние медных комплексов производных 3-анилино-1-фенил-пропанона-1 (группа В) в концентрации 200 мкМ на пролиферацию клеток меланомы MEL-7, рака молочной железы MCF-7 и рака простаты человека PC3.

Примечание. Результаты представлены в виде $M \pm m$ для 3 параллельных измерений. (*) - Отличия от контроля статистически достоверны ($p < 0,05$)

Результаты оценки наиболее цитотоксически активных координационных соединений по способности влиять на уровень экспрессии маркера готовности к запуску активационного апоптоза CD95 показаны на рисунке 13 и в таблице 3. Параллельно проводилось изучение их цитотоксического действия на тех же клетках. Установлена корреляция между этими показателями ($R=0,812$, $\alpha=0,10$), что дает основание предположить возможность реализации цитотоксического действия этих соединений в том числе посредством запуска механизма программированной клеточной гибели.

При сопоставлении результатов теста *in vitro* с данными поламинового теста показано, что прямое действие конкретной структуры на ферменты обмена полиаминов (усиление их распада и торможение их синтеза), интерпретируемое как потенциально

антипролиферативное, не во всех случаях соответствует ее прямому цитотоксическому действию. Это говорит о необходимости изучения также опосредованного – через аппарат генетической регуляции активности ферментов клетки – влияния их на показатели обмена полиаминов.

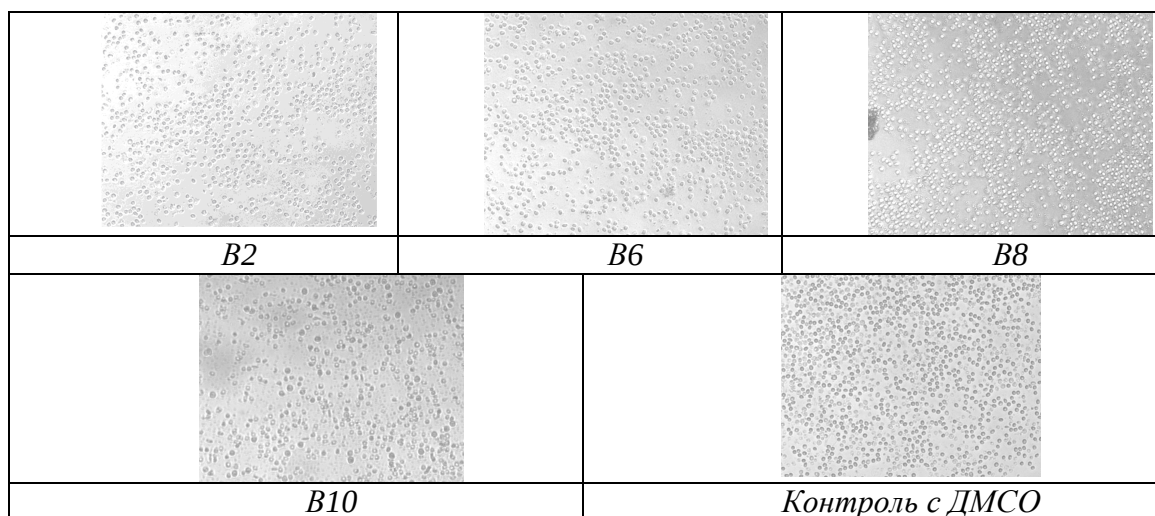


Рисунок 13. МЛ человека после коинкубации с тестируемыми соединениями B2, B6, B8 и B10 в сравнении с интактным контролем. Окраска МТТ. Увеличение в 200 раз.

Таблица 3. Индекс цитотоксичности (%) тестируемых соединений для мононуклеарных лейкоцитов крови человека и уровень экспрессии CD45+CD95+ лейкоцитов (%) после коинкубации с растворами соединений B2, B6, B8 и B10.

Шифр вещества	Медиана индекса цитотокс.	Размах значений индекса цитотокс.	Отн. кол-во CD45+CD95+МЛ	p < 0,05	↑CD95 на МЛ, %
B2	24	22-24	91,24±30,2	0,0005	18,5
B6	17	15-17	88,13±33,16	0,00001	15,34
B8	-1	-35-4	75,04±31,29	0,018	2,25
B10	23	18-24	95,9±27,35	0,000011	23,1
Контроль (ДМСО)	-	-	72,79±39,14	-	-

Примечание. Результаты представлены в виде $M \pm m$ для 3 параллельных измерений

Выводы

1. Результаты анализа прямого действия производных 3-анилино-1-фенил-пропанона-1 и диоксaborининопиридина на ключевые показатели обмена полиаминов позволяют сделать предположение о наличии канцеростатических и канцерогенных свойств у первой и второй групп соединений соответственно.
2. Величина аминоксидазной активности на фоне действия соединений из группы производных анилина коррелирует с их константами ионизации в случае путресцина (-0,85, $p=0,002$) и спермина (-0,72, $p=0,019$), т. е. чем больше основность данных соединений, тем больше степень ингибирования аминоксидаз.
3. Результаты анализа прямого действия полученных комплексных соединений на ключевые ферменты синтеза и распада полиаминов в стандартной бесклеточной тест-системе показывают на усиление эффекта в сравнении с исходными лигандами.
4. Комплексы меди (II) B2, B6, B8 и B10, проявившие существенную активность при действии на ключевые показатели обмена полиаминов в бесклеточных тест-системах, в МТТ-тесте на культурах клеток опухолей человека проявляют значимую цитотоксичность в максимально значимой концентрации $IC_{50} \leq 10^{-4} M$.

5. Выраж маркеров готовности к апоптозу CD95 **дает основание предполагать**, что одним из возможных путей реализации цитотоксической активности соединений группы В **является** программированная клеточная гибель.

Список опубликованных работ по материалам диссертации
Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК для размещения материалов
диссертации:

1. Сяткин С.П., Федорончук Т.В., Гридина Н.Я., Неборак Е.А., Шевкун Н.А., Сокуева Н.А., Устинова Е.В., Сокуев Р.И. Влияние химических аналогов полиаминов, декарбоксилированного орнитина и S-аденозилметионина на скорость синтеза полиаминов в тест-системах из тканей с повышенной пролиферацией. // Вестник РУДН. Серия МЕДИЦИНА. – 2010. - №3, С. 9-14.
2. Сяткин С.П., Федорончук Т.В., Гридина Н.Я. Неборак Е.А., Шевкун Н.А., Сокуева Н.А., Устинова Е.В., Сокуев Р.И. Влияние химических аналогов декарбоксилированного орнитина и S-аденозилметионина на рост L-клеток в культуре ткани // Вестник РУДН. Серия МЕДИЦИНА. – 2010. - №4, С. 26-31.
3. С. П. Сяткин, Т. Т. Березов, К. В. Неборак, Т. В. Федорончук, Н. А. Шевкун, А.Н.Левов, Р. И. Сокуев, Н. А. Сокуева. Прогнозирование антипролиферативных свойств производных анилинового ряда и диоксаборининопиридина путем оценки их влияния на скорость окислительного дезаминирования путресцина и полиаминов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2011. - № 10. – С. 53- 56.

Материалы конференций:

4. Сяткин С.П., Фролов В.А., Голомазова К.А., Левов А.Н., Федорончук Т.В., Свиначев В.И., Шевченко А.А., Неборак К.В., Натрошвили Н.Г. Применение окислительного дезаминирования полиаминов и путресцина при мониторинге канцерогенных и противоопухолевых свойств производных бензимидазола и азафлуорена // Материалы XV международной конф. «Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии. и экологии», 31 мая-10 июня, 2007, Гурзуф. Научно-практический жур. Открытое образование. - 2007. - С. 92-94.
5. Svinarev V.I., Syatkin S.P., Frolov V.A., Golomazova K.A., Zaletok S.P., Fedoronchuk T.V., Neborak K., Natroshvili N. Role polyamines in etiopathogenesis of schizophrenia // Springer Wien New York. - Amino Acids, Vol. 33. - 2007 – P. XLIII-XLIV.
6. Syatkin S.P., Berezov T.N., Golomazova K.A, Levov A.N., Fedoronchuk T.V., Svinarev V.I., Shevchenko A., Natroshvili N., Neborak K. Prediction of antiproliferative and carcinogenic properties of synthetic structural analogs of polyamines // Springer Wien New York. - Amino Acids, Vol. 33. - 2007 – P. XLIII.
7. Натрошвили Н. Г., Неборак Е. В., Шевченко А.А. Влияние производных диоксаборининопиридина на скорость окислительного дезаминирования полиаминов. // Итоговая конференция студенческого научного общества медицинского факультета РУДН «Клинические и теоретические аспекты современной медицины», 24 – 27 апреля 2007 г./ Материалы конференции. – М.: РУДН, 2007. – с. 97.
8. Неборак Е.В., Натрошвили Н. Г. Шевченко А. А. Окислительное дезаминирование путресцина, спермидина и спермина на фоне действия аналогов полиаминов анилинового ряда //Итоговая конференция студенческого научного общества медицинского факультета РУДН «Клинические и теоретические аспекты современной медицины», 24 – 27 апреля 2007 г./ Материалы конференции. – М.: РУДН, 2007. – с. 98.
9. Сяткин С.П., Левов А.Н., Голомазова К.А., Натрошвили Н.Г., Неборак Е.В., Федорончук Т.В. Прогнозирование канцерогенных и канцеростатических свойств производных бензимидазола, азафлуорена, анилинового ряда и диоксаборининопиридина путем оценки их влияния на скорость окислительного дезаминирования путресцина и полиаминов // Сателлитный симпозиум «Экология и здоровье» Съезда физиологического общества им. И.П.Павлова, 9 – 10 июня 2007 г. Материалы Съезда. – М.: РУДН. – 2007. – С. 168-170.

10. Syatkin S. P., Fedoronchuk T. V., Gridina N. Ya., Neborakh E. A., Shevkhun N. A., Sokueva N. A., Ustinova E. V., Sokuev R. I. The influence of chemical analogs of decarboxylated ornithine and S-(adenosyl)-methionine on the growth of L-cell tissue culture // 2010 International Polyamine Conference. Gotemba, Shizuoka, Japan, June 14 – June 18, 2010. P. 104-105.
11. Syatkin S.P., Fedoronchuk T.V., Gridina N.Ya., Neborakh E.A., Shevkhun N.A., Sokueva N.A., Ustinova E.V., Sokuev R.I. The influence of chemical polyamines analogs, decarboxylated ornithine and S-(adenosyl)-methionine on the polyamine synthesis velocity in test-systems from tissues with high proliferation // 2010 International Polyamine Conference. Gotemba, Shizuoka, Japan, June 14 – June 18, 2010. P. 102-103.
12. Сяткин С.П., Левов А.Н., Федорончук Т.В., Неборак К.В., Шевкун Н.А., Устинова Е.В., Сокуев Р.И., Сокуева Н.А. Прогноз канцерогенных и антипролиферативных свойств производных диоксaborининопиридина и анилина // Труды XVIII международной конференции и дискуссионного научного клуба. Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. ТОМ 1. 2010. Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 31 мая – 9 июня 2010 года. New Information Technology in Medicine, Pharmacology, Biology and Ecology. С. 60-61.
13. Неборак Е. В., Натрошвили Н. Г., Сяткин С. П., Левов А. Н. Прогнозирование канцерогенных и канцеростатических свойств производных диоксaborининопиридина и анилина путем оценки их влияния на скорость окислительного дезаминирования путресцина и полиаминов. //Экология и медицина: современное состояние, проблемы и перспективы. Материалы международной научно-практической конференции 2-3 ноября 2010г.: Москва, 2010 – с. 26 - 29.
14. Syatkin S, Shevkun N, Fedoronchuk T, Neborak E, Sokueva N, Sokuev R, Ustinova E. Activators of polyamine oxidative deamination as the potential antitumor agents.//a International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases, Tivoli (Rome), Italy, December 1 – 6, 2010. P. 213-214.
15. Syatkin S, Shevkun N, Levov A, Golomazova K, Neborak E, Sokueva N, Sokuev R, Fedoronchuk T, Ustinova E. Prediction of carcinogenic and antiproliferative properties of benzimidazole, azofluorene, dioxaborinopyridine and aniline derivatives by their effects on the polyamine oxidative deamination.//2a International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases, Tivoli (Rome), Italy, December 1 – 6, 2010. P. 209-210 .
16. Сяткин С.П., Неборак Е.В., Натрошвили Н.Г., Кутяков С.В. Изучение канцерогенных и канцеростатических свойств производных анилина на основе их влияния на скорость катаболизма путресцина и полиаминов и цитотоксичности// За VII международна научна практична конференция «найновите постижения на европейската наука - 2011» 17 - 25-ти юни 2011 Т. 30 Лекарство. - София «Бял ГРАД-БГ» ООД 2011, с. 100-102.
17. Syatkin S, Shevkun N, Levov A, Golomazova K, Neborak E, Sokueva N, Sokuev R, Fedoronchuk T, and Ustinova E. Prediction of biological properties of some groups of heterocyclic derivatives by their effects on the polyamine oxidative deamination. Addendum to Abstracts presented at the 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins. // Amino Acids (2011) 41:997–1008. Beijing, China August 1–5, 2011.
18. Шевкун Н., Неборак Е., Сокуева Н., Сокуев Р., Голомазова К., Федорончук Т. Скрининг N-гетероциклических и анилиновых производных по влиянию на аминоксидазы in vitro. // IV Международная научная конференция SCIENCE4HEALTH 2012 18 – 21 апреля 2012, Москва, Россия. Материалы конференции. – с. 53 – 54.
19. Шевкун Н., Федорончук Т., Неборак Е., Сокуева Н., Сокуев Р. Катаболизм полиаминов при карциногенезе печени как мишень для поиска новых противораковых соединений. // IV Международная научная конференция SCIENCE4HEALTH 2012, 18 – 21 апреля 2012, Москва, Россия. Материалы конференции. – с. 54 – 55.
20. Сунграпова Е. Ю., Урбан М.Н., Комиссарова Е.Ю., Неборак Е.В., Шевкун Н.А. Психотропные препараты как потенциальные противоопухолевые средства. // IV

Международная научная конференция SCIENCE4HEALTH 2012, 18 – 21 апреля 2012, Москва, Россия. Материалы конференции. – с. 74 – 75.

21. Комиссарова Е.Ю., Урбан М.Н., Сунграпова Е. Ю., Неборак Е.В., Шевкун Н.А. Влияние производных бензимидазола и азафлуорена на обмен полиаминов в ткани регенерирующей печени. // IV Международная научная конференция SCIENCE4HEALTH 2012, 18 – 21 апреля 2012, Москва, Россия. Материалы конференции. – с. 75.
22. Сяткин С. П., Федорончук Т. В., Шевкун Н. А., Неборак Е. В., Сокуев Р. И., Сокуева Н. А. Противоопухолевая активность активаторов окислительного дезаминирования полиаминов. // XX Юбилейная международная конференция и дискуссионный научный клуб. Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии. Украина, Крым, Ялта-Гурзуф, 5 – 15 июня 2012 г. – с.
23. Syatkin S., Fedoronchuk T., Neborak E., Sokueva N., Sokuev R., Shevkun N. Antitumor activity of activators of polyamine oxidative deamination during hepatocarcinogenesis. //International congress on polyamines: biological and clinical perspectives. Istanbul, 2-7 September 2012. Abstract book. – p.225 – 226.
24. Сяткин С.П., Федорончук Т.В., Шевкун Н.А., Неборак К.В., Сокуев Р.И., Сокуева Н.А. Активаторы окислительного дезаминирования полиаминов как потенциальные противоопухолевые агенты // Материалы XIV Всемирного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке». 14-17 ноября 2012 года, РУДН, г. Москва.

Список сокращений

ПА – полиамины

ДАО – диаминооксидаза

ПАО – полиаминооксидаза

ОДК – орнитиндекарбоксилаза

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

Благодарности

1. Левову А. Н. (к. х. н.) – синтезировал и любезно предоставил соединения группы производных диоксаборининопиридина.
2. Анисимовой Н. Ю. (к. м. н.) за помощь в проведении экспериментов по изучению возможного проапоптотического действия тестируемых соединений.
3. Плетеневой Т. В. (д. х. н.) за помощь в обсуждении результатов работы.

Неборак Екатерина Владиславовна

Синтез, строение и биологические свойства комплексных соединений меди (II) с азотсодержащими органическими лигандами.

Данная работа посвящена изучению химических, биохимических и биологических свойств комплексных соединений меди с азотсодержащими органическими лигандами. Исследование проводилось на бесклеточных тест-системах, полученных из регенерирующей печени крыс, клеточных опухолевых культурах человека линий MEL-7, MCF-7, и PC-3, а также мононуклеарных лейкоцитах здорового человека. В ходе исследования было оценено влияние тестируемых соединений на активность аминоксидаз, орнитиндекарбоксилазы, опухолевую пролиферацию и экспрессию маркеров апоптоза.

Neborak Ekaterina Vladislavovna

Synthesis, structure and biological properties of copper (II) coordinate compounds with nitrogen-containing organic ligands.

This paper studies chemical, bio chemical and biological properties of copper (II) coordinate compounds with nitrogen-containing organic ligands. The study was conducted on cell-free assay systems derived from regenerating rat liver cell cultures of human tumor lines MEL-7, MCF-7 and PC-3, and mononuclear leukocytes of healthy humans. The study evaluated the effect of test compounds on the aminoxidase and ornithine decarboxylase activity, tumor proliferation and expression of apoptosis markers.