

ОРИГИНАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

УДК 616.89-092:547.415.5

ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПОЛИАМИНОВ, ДЕКАРБОКСИЛИРОВАННОГО ОРНИТИНА И S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА НА СКОРОСТЬ СИНТЕЗА ПОЛИАМИНОВ В ТЕСТ-СИСТЕМАХ ИЗ ТКАНЕЙ С ПОВЫШЕННОЙ ПРОЛИФЕРАЦИЕЙ

**С.П. Сяткин, Т.Т. Березов, Т.В. Федорончук,
Н.Я. Гридина, Е.А. Неборак, Н.А. Шевкун,
Н.А. Сокуева, Е.В. Устинова, Р.И. Сокуев**

Российский университет дружбы народов,
ул. Миклухо-Маклая, 8; Москва, Россия, 117198
syata@mail.ru (495) 420-23-69

Исследовали влияние алифатических amino- и оксипроизводных полиаминов на скорость образования путресцина, спермидина и спермина в бесклеточных тест-системах из ткани регенерирующей печени и гепатомы крысы. Использование известных ингибиторов синтеза полиаминов подтвердило, что данные бесклеточные модельные системы функционируют адекватно поставленным задачам. Эффективность антипролиферативного действия химических соединений оценивали по степени торможения синтеза путресцина и полиаминов, а также дополнительно рассчитывали коэффициент молярного отношения спермидина к спермину и величину суммарного пула полиаминов, после одного часа инкубации. Из числа исследуемых соединений этим требованиям в большей степени удовлетворяют 1-аминокси-3-аминопропан (I), S-(5-дезоксаденозил)-S-метил- β -тиоэтилгидроксиламин (IV) и этилендиамин (V).

Ключевые слова: полиамины, путресцин, спермидин, спермин, окислительное дезаминирование, диформетилорнитин, орнитиндекарбоксилаза.

В экспериментах с экстрактами из L-1210 клеток [1] показано ингибирующее действие α -диформетилорнитина (ДФМО) на активность орнитиндекарбоксилазы (ОДК) и отсутствие такого эффекта у N¹,N⁸-бис(этил)спермидина. Однако оба эти вещества одинаково ингибируют рост L-клеток и тормозят биосинтез белка, РНК и ДНК. Это позволяет рассматривать использование аналогов этих веществ в качестве регуляторов активности ОДК как альтернативный путь в поисках антипролиферативных средств, действующих на биосинтез ПА без прямого ингибирования ОДК. Это определило специфику данного этапа работы.

Целью работы стало исследование влияния химических аналогов полиаминов, декарбоксилированного орнитина и S-аденозилметионина на скорость образования путресцина и полиаминов в тест-системах из тканей с усиленной клеточной пролиферацией.

Материалы и методы. О-замещенные гидроксилмины (I—IV, табл. 1), аналоги продуктов ферментативного декарбоксилирования орнитина и S-аденозилметионина, были синтезированы в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН. Химические соединения (V—X, табл. 1), химические аналоги ПА, были синтезированы в Институте физической химии РАН.

Таблица 1

Алифатические amino- и оксипроизводные полиаминов

| Химические аналоги декарбоксилированного орнитина и S-аденозилметионина | | |
|-------------------------------------------------------------------------|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| название | индекс | структура |
| α -диформетилорнитин | ДФМО | $\begin{array}{c} \text{CHF}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$ |
| 1-аминоокси-3-аминопропан | I | $2\text{HCl}\cdot\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ |
| 1,2-диаминооксиэтан | II | $2\text{HCl}\cdot\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{ONH}_2$ |
| S-(5'-дезоксаденозил)-S-тиоэтилгидроксилмин | III | $\text{H}_2\text{SO}_4\cdot\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{SAde}$ |
| S-(5'-дезоксаденозил)-S-метил- β -тиоэтилгидроксилмин | IV | $\begin{array}{c} 2\text{H}_2\text{SO}_4\cdot\text{NH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}^+\text{Ade} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$ |
| Химические аналоги полиаминов | | |
| название | индекс | структура |
| Этилендиамин | V | $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ |
| 1,3-диаминопропан | VI | $\text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$ |
| 1,5-диамино-3-азапентан | VII | $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)\text{NH}_2$ |
| 1,9-диамино-3,6-диазанонан | VIII | $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ |
| 1,9-диамино-3,7-диазанонан | IX | $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_3\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$ |
| Метилглиоксаль-бис(гуанилгидразон) | МГБГ | $\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{N}-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{HC}=\text{N}-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH} \end{array}$ |

Для определения скорости синтеза путресцина и полиаминов в биологических пробах использовали модифицированный нами метод [2].

В экспериментах использовали белых беспородных крыс-самцов массой 100—130 г, содержащихся на стандартном рационе вивария РУДН со свободным доступом к воде.

Парциальную гепатэктомию (около 70% ткани) выполняли по методике Higgs, Anderson [3] под эфирной анестезией. Для получения регенерирующей ткани печени животных забивали путем декапитации через 12 часов после операции и извлекали малые дольки печени.

Штамм гепатомы Г-27 получили из Онкологического научного центра РАМН и пассировали на беспородных белых крысах, как было описано ранее Швембергер [4].

Бесклеточные тест-системы представляли собой цитозольную фракцию (20 000 g \times 20 мин при 4 °C) 33%-го гомогената регенерирующей печени или ткани гепатомы с добавлением необходимых компонентов для проявления актив-

ности ОДК. Количество белка в пробах исследуемых тканей определяли по методу Lowry (1951) в модификации С.П. Сяткина (1981) [5].

Достоверность различия средних значений по экспериментальным группам полученных результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента (Афифи, Эйзен, 1982) [6].

Результаты. Сравнивали эффективность и характер действия указанных в таблице химических соединений на процесс образования исследуемых аминов. Первую группу составили оксиаминоаналоги декарбоксилированного орнитина и S-аденозилметионина. Вторую группу сформировали из алифатических гомологов путресцина (Пут), спермидина (Сд) и спермина (См). Результаты этих исследований представлены в табл. 2 и 3.

Таблица 2

Скорость образования путресцина и ПА на фоне действия синтетических аналогов субстратов и продуктов реакции декарбоксилирования орнитина и S-аденозилметионина в бесклеточной тест-системе из регенерирующей печени крыс

| Вещество | ОДК | Эффект, % | Синтез спермидина | Эффект, % | Синтез спермина | Эффект, % |
|----------|------------|-----------|-------------------|-----------|-----------------|-----------|
| — | 2,7 ± 0,1 | 0 | 1,29 ± 0,04 | 0 | 0,48 ± 0,01 | 0 |
| ДФМО | 1,7 ± 0,1* | 37 | 0,87 ± 0,02* | 33 | 0,21 ± 0,01* | 56 |
| МГБГ | 2,7 ± 0,1 | 0 | 0,9 ± 0,02* | 26 | 0,31 ± 0,01* | 35 |
| I | 1,1 ± 0,1* | 59 | 0,57 ± 0,01* | 56 | 0,1 ± 0,01* | 79 |
| II | 2,2 ± 0,1* | 19 | 0,88 ± 0,06* | 32 | 0,25 ± 0,08* | 48 |
| III | 3,7 ± 0,2* | +37a | 0,92 ± 0,03* | 29 | 0,24 ± 0,07* | 50 |
| IV | 1,7 ± 0,1* | 37 | 0,63 ± 0,02* | 51 | 0,26 ± 0,07* | 46 |
| V | 2,3 ± 0,1* | 15 | 0,98 ± 0,02* | 24 | 0,32 ± 0,09 | 33 |
| VI | 2,8 ± 0,1 | +4 | 1,0 ± 0,02* | 22 | 0,19 ± 0,04* | 60 |
| VII | 2,5 ± 0,1 | 7 | 0,74 ± 0,02* | 43 | 0,2 ± 0,05* | 58 |
| VIII | 2,4 ± 0,1 | 11 | 0,78 ± 0,04* | 40 | 0,18 ± 0,04* | 62 |
| IX | 2,5 ± 0,1 | 7 | 0,63 ± 0,02* | 50 | 0,28 ± 0,06* | 42 |
| X | 1,7 ± 0,1* | 37 | 0,9 ± 0,2* | 22 | 0,5 ± 0,06 | +4 |

Примечание. Скорость биосинтеза путресцина и ПА представлена в мккат/кг белка. Результаты даны в виде $M \pm m$ для 6 параллельных измерений. * — достоверные отличия от контроля, $p \leq 0,05$; знак «+» обозначает увеличение скорости биосинтеза путресцина и ПА.

Таблица 3

Скорость образования путресцина и ПА на фоне действия синтетических аналогов субстратов и продуктов реакции декарбоксилирования орнитина и S-аденозилметионина в бесклеточной тест-системе из гепатомы Г-27 крыс

| Вещество | ОДК | Эффект, % | Синтез спермидина | Эффект, % | Синтез спермина | Эффект, % |
|----------|------------|-----------|-------------------|-----------|-----------------|-----------|
| — | 2,6 ± 0,2 | 0 | 1,1 ± 0,04 | 0 | 0,4 ± 0,01 | 0 |
| ДФМО | 2,0 ± 0,1* | 23 | 1,1 ± 0,1 | 0 | 0,2 ± 0,01* | 50 |
| МГБГ | 2,7 ± 0,2 | 4 | 0,97 ± 0,02* | 22 | 0,35 ± 0,02* | 25 |
| I | 2,0 ± 0,1* | 23 | 1,2 ± 0,04 | +9a | 0,35 ± 0,02* | 25 |
| II | 2,3 ± 0,3 | 12 | 1,0 ± 0,2 | 9 | 0,4 ± 0,01* | 0 |
| III | 2,4 ± 0,3* | 8 | 0,9 ± 0,1 | 18 | 0,3 ± 0,04* | 25 |
| IV | 1,5 ± 0,1* | 42 | 0,8 ± 0,01* | 27 | 0,4 ± 0,01* | 0 |
| V | 1,6 ± 0,1* | 38 | 0,45 ± 0,01* | 59 | 0,2 ± 0,03* | 50 |
| VI | 4,3 ± 0,5* | +65 | 0,6 ± 0,02* | 45 | 0,16 ± 0,02* | 17 |
| VII | 4,8 ± 0,4* | +85 | 1,0 ± 0,2 | 9 | 0,2 ± 0,02* | 50 |
| VIII | 3,3 ± 0,2* | +27 | 0,8 ± 0,1* | 27 | 0,4 ± 0,02 | 0 |
| IX | 3,5 ± 0,1* | +35 | 1,2 ± 0,1 | +9 | 0,45 ± 0,03 | +12 |
| X | 3,4 ± 0,2* | +31 | 0,9 ± 0,1 | 18 | 0,2 ± 0,05* | 50 |

Примечание. Скорость биосинтеза путресцина и ПА представлена в мккат/кг белка. Результаты даны в виде $M \pm m$ для 6 параллельных измерений. * — достоверные отличия от контроля, $p \leq 0,05$; знак «+» обозначает увеличение скорости биосинтеза путресцина и ПА.

Эффективность антипролиферативного действия химических соединений оценивали по степени торможения синтеза Пут и ПА, а также дополнительно рассчитывали коэффициент молярного отношения спермидина к спермину (Сд/См) и величину суммарного пула ПА (Σ ПА) после одного часа инкубации. Показатель Сд/См положительно коррелирует со скоростью пролиферации как нормальной, так и опухолевой ткани [7].

В первой группе тестируемых веществ наиболее активными оказались соединения I и IV. Они не уступали по эффективности действия, а по некоторым показателям даже превосходили ДФМО и МГБГ (см. табл. 2 и 3).

Соединения второй группы ингибировали синтез ПА в обеих системах с разной степенью эффективности. В опухолевой модели это приводило к резкому, почти двукратному, возрастанию фракции Пут. Исключение составил этилендиамин (V). Он проявил сильные антипролиферативные свойства по всем выбранным показателям (Сд/См, Σ ПА и уровень Сд), в особенности по отношению к опухолевой ткани.

Обсуждение. Ситуацию, когда вещества, структурно похожие на полиамины или содержащие спермидиновую цепь, продуцируют противоположные эффекты, по-видимому, можно объяснить двойственным характером действия и самих полиаминов. Так, в зависимости от концентрации, последние оказывают или стимулирующее, или угнетающее воздействие на различные биохимические и физиологические процессы.

Практически одинаковые исходные уровни синтеза Пут и ПА в двух используемых модельных системах облегчили проведение сравнительного анализа регуляторных свойств исследуемых соединений. ДФМО и МГБГ были выбраны как известные ингибиторы ОДК и аденозилметиониндекарбоксилазы (АМДК) для оценки чувствительности тест-систем к регуляторному воздействию химических веществ на процесс синтеза Пут и ПА. Оба известные ингибитора проявили существенное и специфическое действие (см. табл. 2 и 3) с заранее предполагаемой направленностью как в опытах с опухолевой, так и с регенерирующей тканью. Это свидетельствует о том, что данные бесклеточные модельные системы функционируют адекватно поставленным задачам.

Различная эффективность и избирательность характера действия тестируемых веществ на скорость образования путресцина и ПА в системах из регенерирующей и опухолевой ткани указывают на разбалансированность в опухолевой ткани процесса поэтапного синтеза ПА и на изменения в структуре и каталитических свойствах ферментов, синтезирующих ПА.

Соединения первой и второй групп различались по химической структуре и возможному механизму действия. Реакционная способность аминоксигруппы соединений I и IV обусловлена реакцией образования оксимов пиридоксаль-5'-фосфата [8]. Гомологическая серия веществ второй группы варьировала в длине углеводородной цепи, разделяемой различным местоположением иминогруппы на ди- и триметиленовые фрагменты. Как химические аналоги Пут и ПА они, вероятно, могли бы действовать по типу ретроингибирования или по конкурентному механизму.

Направленность действия всех 12 исследованных веществ в основном совпадала в обеих системах. Однако глубина торможения процесса биосинтеза ПА в модели из регенерирующей ткани была больше. Это свидетельствует о большей чувствительности данной системы в целом и, в частности, полиаминсинтезирующих ферментов к химическому воздействию. Поскольку при действии канцерогенов образуются множественные формы ОДК, это может быть связано с существованием различных по структурно-функциональным свойствам форм ОДК и АМДК в трансформированной и нетрансформированной тканях, а также с разбалансированностью в опухолевой ткани поэтапного процесса биосинтеза ПА. Более резкие изменения в скорости синтеза ПА в модели из регенерирующей ткани печени могут быть связаны также с одновременным протеканием процесса окислительного дезаминирования, поскольку активность оксидаз Пут и ПА сохраняется в этой ткани почти на нормальном уровне, а в опухолевой практически равна нулю. Отсутствие синхронизации в действии ОДК и АМДК в опухолевой ткани и наличие высокого исходного уровня Пут и декарбоксилированного S-аденозилметионина указывает на необходимость сочетанного применения ингибиторов этих двух ферментов и активаторов процесса окислительного дезаминирования ПА.

Сравнительный анализ степени эффективности возможного регуляторного действия двух групп тестируемых соединений, проведенный на двух модельных бесклеточных системах с различными биологическими, но с одинаково высокими пролиферативными свойствами, показал, что потенциально сильные антипролиферативные агенты должны одновременно существенно снижать ΣПА, отношение Сд/См и уровень Сд до критического значения (70%). Из числа исследуемых соединений этим требованиям в большей степени удовлетворяют 1-аминоокси-3-аминопропан (I), S-(5'-дезоксаденозил)-S-метил-β-тиоэтилгидроксиламин (IV) и этилендиамин (V).

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Porter C.W., Sufrin J.R. Interference with polyamine biosynthesis and/or function by analogs of polyamines or methionine as a potential anticancer chemotherapeutic strategy // *Anticancer Res.* — 1986. — V. 6. — P. 525—542.
- [2] Сяткин С.П., Березов Т.Т., Грдина Н.Я. и др. Полиамины как биохимические маркеры антипролиферативного действия ингибиторов ферментов биосинтеза полиаминов и путресцина в культуре L-клеток // *Вопр. мед. химии.* — 1991. — Т. 37. — № 6. — С. 77—81.
- [3] Higgins G.M., Anderson R.M. Experimental pathology of liver: restoration of liver of white rat following partial surgical removal // *Arch. Path.* — 1931. — V. 12. — P. 186—202.
- [4] Швембергер И.Н. Перевиваемый штамм гепатомы крысы Г-27 // *Цитология.* — 1970. — Т. 12. — С. 1057—1059.
- [5] 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.
- [6] Афифи А., Эйзен С. Статистический анализ. Подход с использованием ЭВМ. — М.: Мир, 1982. — 488 с.

- [7] *Morgan DM.* Polyamines. An overview // *Mol. Biotechnol.* — 1999. — V. 11. — N 3. — P. 229—250.
- [8] *Холутов А.Р., Холутов Р.М.* Синтез аминоксианалогов путресцина и спермидина // *Биоорг. Химии.* — 1989. — Т. 15. — № 5. — С. 698—703.

**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**

**S.P. Siatkin, T.T. Berezov, T.V. Fedoronchuk,
N.Ya. Gridina, E.A. Neborakh, N.A. Shevkhun,
N.A. Sokueva, E.V. Ustinova, R.I. Sokuev**

Russian Peoples' Friendship University
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198
syata@mail.ru, +7(495)420-23-69

The aliphatic (amino)- and (oxy)-derivatives of polyamines effect on the rate of polyamines (Putrescine, Spermidine and Spermine) synthesis in cell-free test-systems from rat's regenerating liver and Hepatoma tissues was examined. The common known inhibitors of polyamines synthesis were also used for the analysis. The research data confirm that cell-free model systems function adequately to applied tests. The effectiveness of anti-proliferate action of chemical compounds was valued by the inhibition degree of Putrescine and polyamines synthesis. In addition, the coefficient of ratio Spermidine (moles)/Spermine (moles) and the value of total Polyamines pool after 1 h of test-systems incubation with chemical compound were calculated. From the tested compounds 1-aminooxy-3-aminopropan (**I**), S-(5'-desoxyadenosile)-S-methyl- β -thioethyl-hydroxylamine (**IV**) and ethylenediamine (**V**) did satisfied the requirements to a considerable degree.

Key words: polyamines, Putrescine, Spermidine, Spermine, oxidative deamination, Difluoromethylornithine, Ornithine decarboxylase.