

На правах рукописи

Шевкун Наталия Александровна

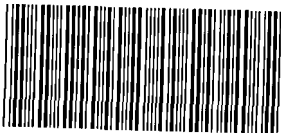
**СКРИНИНГ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ
СОЕДИНЕНИЙ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МОДУЛЯТОРОВ ОБМЕНА
ПОЛИАМИНОВ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

21 НОЯ 2013



005539016

Москва – 2013

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Сяткин Сергей Павлович

Официальные оппоненты:

член-корреспондент РАМН,
доктор медицинских наук, профессор,
заведующий кафедрой биохимии
лечебного факультета
ГБОУ ВПО РНИМУ им. Н.И.Пирогова
Минздравсоцразвития России

Терентьев Александр Александрович

доктор биологических наук, профессор
Институт детской онкологии
Онкологического научного центра РАМН,
г. Москва, Минздравсоцразвития,
руководитель отделения

Байкова Валентина Николаевна

Ведущая организация: Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова,
факультет фундаментальной медицины

Защита диссертации состоится « ___ » _____ 2013 г. в _____ часов на заседании
диссертационного совета Д. 212.203.13 при Российском университете дружбы народов
по адресу: 117198, 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 « ___ » _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета Д. 212.203.13
кандидат фармацевтических наук, доцент

Максимова Т.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

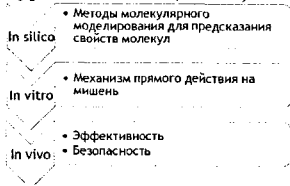
Актуальность темы

Полиамины (ПА) – это органические катионы. Они присутствуют практически во всех живых организмах и являются важнейшими регуляторами процессов клеточного роста, дифференцировки и апоптоза. Нарушения в метаболизме этих молекул, приводящие к повышению уровня ПА и ускоренной пролиферации клеток, свойственны множеству раковых заболеваний. Противоопухолевые агенты нормализуют обмен ПА в опухолевых клетках. Это доказывает важность обмена ПА как терапевтической мишени. Возрастание количества ПА в клетке при канцерогенезе происходит преимущественно за счет снижения или практического подавления катаболизма ПА путем окислительного дезаминирования, а не в результате значительного возрастания синтетической активности. Продукты окислительного дезаминирования ПА (аминоальдегиды и H_2O_2) вызывают апоптоз и проявляют противораковое и антимикробное действие, ингибируют рост некоторых видов раковых клеток, бактерий и вирусов.

Перспективной задачей в разработке противоопухолевых препаратов является направленный поиск синтетических аналогов ПА, действующих на ключевые ферменты обмена таким образом, чтобы скорость распада превышала скорость синтеза, образовывались цитотоксические агенты и, в конечном итоге, замедлялась злокачественная пролиферация.

Активные формы кислорода и свободные радикалы – основные поражающие клетку факторы катаболизма ПА – действуют в радиусе десятков нм до утраты реакционной способности. При этом наилучшей мишенью для деструкции является ядерная ДНК. Универсальность наличия ПА для всех клеток организма и локальность цитотоксической активности продуктов их распада диктуют необходимость направленной доставки терапевтических молекул в раковые клетки.

При разработке новых лекарственных препаратов необходимо предварительно оценить свойства соединений по отношению к терапевтической мишени, иметь возможность предсказать тип активности, исходя из структурных особенностей веществ, получить информацию для оптимизации заместителей и функциональных групп в рядах гетероциклических соединений. Для этих целей широко применяются технологии биоинформатики и компьютерного моделирования, такие как количественные корреляции структура-активности (ККСА) и молекулярная стыковка *in silico* (докинг).



Таким образом, поиск новых веществ-активаторов катаболизма ПА и специфическая доставка их в раковые клетки является актуальной и важной проблемой.

Цель и задачи работы

Цель – провести скрининг синтетических гетероциклических азотсодержащих соединений как потенциальных модуляторов обмена полиаминов и противоопухолевых агентов.

Для достижения этой цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. *in silico* докинг тестируемых соединений с полиаминоксидазой.
2. скрининг антипролиферативного действия тестируемых соединений на раковых клеточных линиях PC-3, MEL-7, MCF-7.
3. разработка бесклеточной модельной системы из гомогената печени крыс для скрининга влияния тестируемых соединений на активность ди- и полиаминоксидаз.
4. проведение расчета количественных корреляций структура-активность и определение наиболее значимых структурных дескрипторов.
5. тестирование системы направленной доставки лекарственных веществ в ядра опухолевых клеток с помощью векторных транспортеров *in vitro* и *in vivo*.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Ключевыми аминокислотными остатками для связывания гетероциклических азотсодержащих соединений с ПАО дрожжей, служат: His67, Tyr450, His191, Trp174, Gly487.
2. Потенциальными противоопухолевыми агентами могут быть:
3-анилино-1 фенил-пропанон-1,
3-(1-фенил-2-фторанилино)-пропанон-1,
1-амино-9-фениламино-4-азафлуорен,
7-(2-гидроксифенил)-1-(2-гидроксифенилметиленимино)-8-(4-гидроксифенил)-2-окса-6-аза-3,4-бензобифидро[3.3.11,5]нонан,
7-(2-гидроксифенил)-1-(2-гидроксифенилметиленимино)-8,9-дифенил-2-окса-6-аза-3,4-бензобифидро[3.3.11,5]нонан,
22,24-дифенил-8,11,14-триокса-25-азатетрацикло[19.3.1.02,7.015,20]пентакоза-2,4,6,15(20),16,18-гексаен-23-ол,
23-β-Пиридин-8,11,14-триокса-25-азатетрацикло [19.3.02,7.015,20] пентакоза-1(25),2,4,6,15(20),16,18,21,23-нонаен.
3. Эффективность системы направленной доставки терапевтических молекул подтверждена *in vivo* вследствие снижения вдвое скорости роста опухолей у мышей после фотодинамической терапии с применением векторных транспортеров.

Научная новизна

Впервые проведено 3D компьютерное моделирование (докинг) связывания низкомолекулярных гетероциклических соединений оригинального синтеза с ферментом полиаминоксидазой, определены 5 ключевых аминокислотных остатков фермента, необходимых для встраивания лигандов. Впервые данные об активации и/или ингибированию распада ПА получены в системе из гомогената печени крыс для соединений группы азакраун-эфиров, бактериопурпурина и комплексов меди с производными анилина. Влияние производных анилина, диоксаборенинопиридина, азафлуорена на аминоксидазную активность подтверждено экспериментами в системе из гомогената печени крыс. Впервые проведены количественные корреляции топологических индексов с цитотоксическим действием для производных диоксаборенинопиридина, азафлуорена, азакраун-эфиров, бактериопурпурина и анилина, показана важность индекса Балабана для данного типа активности. Впервые с помощью фотодинамической терапии *in vitro* и *in vivo* была протестирована система направленной доставки лекарств в ядра опухолевых клеток с помощью векторных транспортеров, показана ее эффективность.

Практическая значимость

Внедрена в практику экспериментальных исследований для скрининга и адаптирована под 96-луночный формат плашек модификация методики тестирования соединений на активность ди- и полиаминоксидазы в бесклеточной модельной системе из гомогената печени крыс со спектрофотометрической детекцией. Внедрен алгоритм проведения компьютерного докинга лигандов с ПАО дрожжей в программе Molegro Virtual Docker, по результатам которого построена модель бинарного классификационного дерева, позволяющая предсказывать свойства соединений как потенциальных активаторов и ингибиторов ПАО. Полученные результаты исследований 5 различных химических классов формируют базу данных для совершенствования программного обеспечения расчетов ККСА при компьютерном моделировании химических структур с антипролиферативной активностью. Разработанные инструкции к компьютерным программам ChemDescript и Virtual Docker внедрены как пособия в учебный процесс на медицинском факультете Российского университета дружбы народов. Выявлены новые синтетические вещества с выраженной противоопухолевой активностью, которые рекомендованы для дальнейших доклинических исследований в области онкологии. На примере фотодинамической терапии показана эффективность подхода к разработке систем направленной доставки лекарств с помощью векторных транспортеров, которая повышает эффективность консервативной

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

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 работы были представлены и обсуждены на 13 международных конгрессах и конференциях: 38-м Международным конгрессом Федерации европейских биохимических обществ (Санкт-Петербург, Россия, 2013); XX Юбилейная международная конференция и дискуссионный научный клуб. Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии (Ялта-Гурзуф, Украина, 2012); IV Международная научная конференция Science4Health 2012. Клинические и теоретические аспекты современной медицины (Москва, РУДН, Россия, 2012); Congress on polyamines. Polyamines: biological and clinical perspectives. Istanbul, 2012); XIV Всемирный конгресс «Здоровье и образование в XXI веке» (Москва, РУДН, Россия, 2012); 12-ый Международный конгресс по аминокислотам и белкам (Бейджинг, Китай, 2011); 2-ая Международная конференция по роли полиаминов и их аналогов в раковых и других заболеваниях (Рим-Тиволи, Италия, 2010); Международная конференция по полиаминам (Готемба, Япония, 2010); XVIII Международная конференция “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии” (Ялта-Гурзуф, Украина, 2010); конференция медицинского факультета РУДН “Клинические и теоретические аспекты современной медицины» (Москва, Россия, 2010); Международная научно-практическая конференция “Экология и медицина: современное состояние, проблемы и перспективы” (Москва, Россия, 2010); X Международный конгресс «Здоровье и Образование в XXI веке» (Москва, Россия, 2009); VII Международная научно-практическая конференция «Новейшие достижения европейской науки» (Болгария, 2011). На IV Международной научной конференции Science4Health (Москва, РУДН 2012) награждена дипломом за 1-е место.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 34 печатных работы: 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 учебно-методических пособия и 28 публикаций в материалах международных и российских конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 206 страницах, содержит 19 таблиц, 35 рисунков и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты исследований и их обсуждение, выводы, список литературы, включающий 11 российских и 156 зарубежных источника.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для исследования химических, биохимических и биологических свойств использованы гетероциклические азотсодержащие соединения оригинального синтеза, разделенные на группы: А – производные анилина (Таблица 1) и их комплексы с медью; В – производные диоксаторенинопиридина (Таблица 2); Г – производные азафлуорена (Таблица 3); Д – производные азкараун-офиринов (Таблица 4); Е – производные бактериопурпурина (Таблица

5). Вещества группы А были синтезированы по стандартной методике [Волков С.В., Кутяков С.В, 2007], группы В, Г и Д – получены в лаборатории синтеза гетероциклических соединений кафедры органической химии РУДН (зав. кафедрой - профессор Варламов А.В.), группы Е – синтезированы на кафедре химии и технологии биологически активных соединений имени Н.А. Преображенского МИТХТ им. М.В. Ломоносова (руководитель синтеза – д.х.н. Грин М.А.).

Таблица 1. Производные анилина (группа А).

Шифр	Химическое название	Шифр	Химическое название
В1	3-анилино-1-фенил-пропанон-1	В8	3-(1-фенил-2-фторанилино)-пропанон-1
В2	1-фенил-3-(4-толуидино)-пропанон-1	В9	3-(3-трифторметиланилино)-1-фенилпропанон-1
В3	3-(4-этиланилино)-1-фенилпропанон-1	В10	3-(3-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1
В4	3-(4-изопропилалино)-1-фенилпропанон-1	В11	3-(3-нитроанилино)-1-фенилпропанон-1
В5	3-(4-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1	В12	Этиловый эфир 4-(3-оксо-3-фенилпропиламино)бензойной кислоты
В6	3-(4-броманилино)-1-фенилпропанон-1	В13	3-(3-ацетиланилино)-1-фенилпропанон-1
В7	3-(4-иоданилино)-1-фенилпропанон-1	В14	3-(2-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1-гидразон

Таблица 2. Производные диоксаборининопиридина (группа В).

Шифр	Химическое название
СоА1	6-Метил-2-(2-молил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксаборинино[5,4-с] пиридин
СоА2	6-Метил-2-(4-метоксифенил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксаборинино[5,4-с] пиридин
СоА3	6-Метил-2-(2,4,6-триметилфенил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксаборинино[5,4-с] пиридин
СоА4	6-Метил-2-(3-трифторметилфенил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксаборинино[5,4-с] пиридин
СоА5	6-Метил-2-(2-тиенил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксаборинино[5,4-с] пиридин
СоА6	6-Метил-2,4,8а-трифенилпергидро[1,3,2]-диоксаборинино[5,4-с] пиридин
СоА7	6-Метил-2-(3-фтор-4-хлорфенил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксаборинино[5,4-с] пиридин
СоА8	6-Метил-2-(3-толил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксаборинино[5,4-с] пиридин
СоА9	6-Метил-2-(4-толил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2]-диоксаборинино[5,4-с] пиридин
СоА10	6-Метил-2-(4-циано)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2] диоксибороно[5,4-с] пиперидин
СоА11	6-Бензил-2-(4-толил)-4,8а-дифенилпергидро[1,3,2] диоксибороно[5,4-с] пиперидин
СоА12	6-Бензил-2,4,8а-трифенилпергидро[1,3,2] диоксибороно[5,4-с] пиперидин

Таблица 3. Производные азафлуорена (группа Г).

Шифр	Химическое название	Шифр	Химическое название
1	1-амино-4-азафлуоренон-9	3	1-бром-4-азафлуоренон-9
2	1-амино-9-фениламино-4-азафлуорен	4	1-амино-2-бром-4-азафлуоренон-9

Таблица 4. Производные азокраун-эфиров (группа Д).

Шифр	Химическое название	Шифр	Химическое название
X1	23-Аллил-8,11,14-триокса-25-азатетрацикло[19.3.1.0 ^{2,7} .0 ^{15,20}]пентакоза-2,4,6,15(20),16,18-гексаен-23-тион	X11	1,4-бис(-8,11,14-триокса-25-азатетрацикло[19.3.0 ^{2,7} .0 ^{15,20}]пентакоза-1(25),2,4,6,15(20),16,18,21,23-нонаен-23-ил)бензол
X2	23-Метил-8,11,14-триокса-25-азатетрацикло[19.3.1.0 ^{2,7} .0 ^{15,20}]пентакоза-2,4,6,15(20),16,18-гексаен-23-тион	X13	7-(2-гидроксифенил)-1-(2-гидроксифенилметиленимино)-8,9-дифенил-2-окса-6-аза-3,4-бензобицикло[3.3.1 ^{1,5}]нонан
X3	23-циано-8,11,14-триокса-22,24,25-триазатетрацикло[19.3.1.0 ^{2,7} .0 ^{15,20}]пентакоза-2,4,6,15(20),16,18-гексаен-23-он	X14	22,24-дифенил-8,11,14-триокса-25-азатетрацикло[19.3.1.0 ^{2,7} .0 ^{15,20}]пентакоза-2,4,6,15(20),16,18-гексаен-23-ол
X4	8,11,14-Триокса-25-азатетрацикло[19.3.1.0 ^{2,7} .0 ^{15,20}]пентакоза-2,4,6,15(20),16,18-гексаен-23-тион	X15	2,6-Ди(2-гидроксифенил)-3,5-дифенилпиперидин-4-ол
X5	23-Имино-8,11,14-триокса-25-азатетрацикло[19.3.1.0 ^{2,7} .0 ^{15,20}]пентакоза-2,4,6,16,18-гексаен	X16	2,6-Ди(4-гидроксифенил)-3,5-дифенилпиперидин-4-он
X6	23-оксо-8,11,14-триокса-22,25-диазатетрацикло[19.3.1.0 ^{2,7} .0 ^{15,20}]пентакоза-2,4,6,15(20),16,18-гексаен-24-карбоксамид	X17	23-β-Пиридин-8,11,14-триокса-25-азатетрацикло[19.3.0 ^{2,7} .0 ^{15,20}]пентакоза-1(25),2,4,6,15(20),16,18,21,23-нонаен

X7	2,6-Ди(4-гидрокси-5-нитрофенил)-3,5-дифенилпиперидин-4-он	X18	2,6-Ди(2-гидроксифенил)-3,5-дифенилпиперидин-4-он
X9	7-(2-гидроксифенил)-1-(2-гидроксифенилметиленимино)-8-(4-гидрокси)фенил-2-окса-6-аза-3,4-бензобицикло[3.3.1 ^{1,5}]нонан	X19	16,20-Имино-16Н-дибензо[<i>h</i> , <i>o</i>][1,4,7]триоксациклогексадецин-17,19-дикарбоновой кислоты-6,7,9,10,17,18,19,20-октагидро-8-оксо-диметилвый эфир
X10	(2E,25E)-11,14,17,33,36,39-гексаоксапентацикло[38.4.0.0 ⁴ {5,10}.0 ⁶ {18,23}.0 ⁸ {27,32}]тетратетраконта-1(40),2,5(10),6,8,18,19,21,25,27,28,30,41,42-тетрадекаен-4,24-дион	X20	Этил 23-оксо-8,11,14-триокса-25-азатетрациклопентакозагексаен-22-карбоксилат

Таблица 5. Производные бактериопурпурина (группа E).

Шифр	Химическое название	Шифр	Химическое название
ФС1	оксим N-гидроксибактериопурпуринамида	ФС4	О-бутилоксим-N-бутоксидбактериопурпуринамида
ФС2	О-метилоксим-N-метоксидбактериопурпуринамида	ФС5	Бактериохлорин <i>p</i>
ФС3	О-пропилоксим-N-пропоксидбактериопурпуринамида		

Молекулярный докинг (от англ. *docking* – стыковка) – метод компьютерного моделирования, позволяющий прогнозировать оптимальную с точки зрения свободной энергии пространственную конфигурацию комплекса лиганда с белком. В программе Molegro Virtual Docker (MVD) версия 4.0.2 проводили встраивание тестируемых соединений в участок связывания с субстратом в кристаллической структуре ПАО дрожжей - Fms1 (1.5.3.17), включающей также кофермент. Докинг проводился с полным конформационным поиском для лигандов, т.е. для ближайших аминокислотных остатков протеина варьировались положения боковых цепей, а основная структура и кофактор считались жестко закрепленными. Анализ подвергался только самая низкая по энергии конформация каждого соединения. С помощью опции “energy inspector” из общей оценочной функции конформации были выделены парциальные энергии взаимодействия лиганд-остаток в молекуле фермента.

Определение активности ди- и полиаминоксидаз *in vitro* проводили модифицированным спектрофотометрическим методом [Perschke and Broda (1961)] в бесклеточной тест-системе из гомогената печени крыс линии Sprague Dawley. Супернатант 10% гомогената печени в Tris-буфере (10000g 20 мин) инкубировали в 96-луночных плашках 1ч при 37°C с субстратами Пут-2НС1, Сд-3НС1 или См-4НС1 в присутствии 100 мкМ тестируемых соединений. Затем добавляли о-дианизидин и пероксидазу, инкубировали еще 30 мин и при 450 нм измеряли поглощение окрашенного продукта, который образуется при окислении о-дианизидина перекисью водорода, выделяющейся в аминоксидазной реакции.

Влияние тестируемых веществ на пролиферацию раковых клеток *in vitro* оценивали на клетках меланомы человека MEL-7, рака молочной железы MCF-7 и рака простаты РС-3, которые за 24 ч до добавления веществ были посажены в 96-луночные плашки в концентрации 4, 6 и 5 тыс. клеток на лунку, соответственно. Инкубировались 72 ч с изучаемыми веществами в среде DMEM. Контрольные лунки содержали 0,5% ДМСО. Количество живых клеток определяли после 5 ч инкубации с 50 мкМ нефлуоресцентным красителем Аламар Блю (резаруцин), который при восстановлении в метаболически-активных клетках превращается во флуоресцентный продукт резоруфин. Уменьшение флуоресценции (Ex535/Em585 нм) в присутствии тестируемого вещества пропорционально количеству живых клеток и используется для измерения цитотоксичности по формуле:

Уровень пролиферации (%) = 100 x (ТЕСТ-МИН)/ (МАКС-МИН), где ТЕСТ – средний сигнал (n=2) для одной концентрации изучаемого вещества, МИН – средний сигнал (n=6) лунки без клеток, МАКС – средний сигнал (n=6) лунки с клетками без обработки веществами.

Количественные корреляции структура-активность проводили с помощью зарегистрированных программ «ChemicDescript» (Свид. №2003612305), «ChemicPen» (Свид. №2005612073) на основе расчета по структуре молекулы пяти топологических индексов – Винера, Руврэ, Балабана в модификации Тринайстича, обхода и электропии. Далее сопоставляли полученные значения дескрипторов с данными о влиянии на пролиферацию раковых клеток. В итоге для каждой пары «топологический индекс – значение биологической активности» определяется коэффициент линейной регрессии.

Оценку мембранной проницаемости веществ проводили с помощью *in vitro* тест-системы РАМРА, которая имитирует проникновение соединения через эпителий ЖКТ. 96-луночный планшет составлен из верхней (акцепторной) и нижней (донорной) частей, которые разделяются летицин-фосфолипидным бислоем на фильтре, моделирующем клеточную мембрану. Вещество в фосфатном буфере добавляли в нижний компартмент плашки, а в верхний – чистый буфер, далее обе части совмещали и инкубировали 16 ч при комнатной температуре, чтобы соединение перераспределялось между двумя отсеками и мембраной. Рассчитывали проницаемость и фактор удерживания в липидном бислое по формулам:

$$P_s = -\frac{1.15V_D}{A(t-t_{LAG})} \cdot \log_{10} \left[1 - \left(\frac{2}{1-R} \right) \cdot \frac{C_A(t)}{C_D(0)} \right], \text{ см/с}$$

$$R = 1 - \frac{C_D(t) + C_A(t)}{C_D(0)}$$

где

$C_A(t)$ и $C_D(0)$ – пропорциональные концентрации значения оптической плотности, длину волны для расчета выбирали в соответствии с максимумом поглощения вещества. V_D – объем донорной лунки, см^3 . A – площадь поверхности фильтра, 0.3 см^2 ; t – время инкубации, с; t_{LAG} – время насыщения липидной мембраны водной фазой – равно 1200 с.

Тестирование системы направленной доставки молекул с помощью векторных транспортеров проводили для фотосенсибилизатора бактериохлорина, конъюгированного с полипептидами, имеющими лигандные модули ЭФР и α МСГ для транспорта в клетки эпидермоидной карциномы и меланомы, соответственно. Изучаемые полипептиды были получены путем индуцированной экспрессии в трансформированных клетках *E.coli*. Выделение и очистка рекомбинантных белков производилась методом аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе. Белково-хромофорные конъюгаты транспортер-ФС получали путем формирования амидных связей между карбоксильными группами ФС и аминами протеина с использованием N-гидрокси-сукцинимиды и водорастворимого карбодимиды в качестве активаторов.

Сравнение фотосенсибилизаторной активности *in vitro* проводилось на культуре клеток мышинной меланомы В16-F1 и эпидермоидной карциномы человека А-431 путем 3-20 ч прединкубации свободного бактериохлорина и его конъюгатов с транспортерами с последующим облучением клеток дозой (270 кДж/м^2) белого света с помощью проектора. Далее клетки инкубировали в среде DMEM с сывороткой в течение 48 часов, затем определяли количество выживших с помощью красителя метиленового синего.

Для определения типа гибели клеток использовали окрашивание смесью Hoechst 33342/Йодид пропидия. Апоптотические клетки идентифицировали по характерным морфологическим изменениям, выявляемым после окраски Hoechst 33342. Йодид пропидия проникает только в клетки с поврежденной плазматической мембраной и служит детектором некроза.

Для изучения процессов перекисного окисления липидов в ходе фотодинамической реакции использовали чувствительный к окислению флуоресцирующий зонд C11-BODIPY581/591. По относительному изменению флуоресценции восстановленной и окисленной форм, которую регистрировали методом конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, получали количественную оценку окислительного процесса при действии ФС и ФС-транспортер на клетки А-431.

Определение локализации векторного транспортера в клетках мышинной меланомы после его внутривенного введения мышам-опухоленосителям выполняли

иммуногистохимическим методом. На 4-ые сутки после инокуляции опухоли (0,5 млн клеток V16F1) в хвостовую вену мышей C57B16 3 раза с интервалом в 1 ч вводили по 3,4 мг/мл транспортера, через 3 ч животных перфузировали, на криостате делали срезы 10 мкм. Окрашивание срезов проводили с помощью первичных кроличьих антител против транспортера и вторичных (ослиные анти-кроличьи), меченных флуоресцентным красителем Alexa 555 и родамином. Флуоресцентный краситель To-Pro-3 использовали для детекции ядер. Распределение транспортера по опухолевой ткани выявляли при помощи конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, контрольными считали срезы опухоли, не подвергнутые обработке вторичными антителами.

Фотодинамическая терапия (ФДТ) меланомы V16-F1 у мышей C57/Black. На 4-ые сутки после инокуляции опухоли (0,5 млн клеток V16F1) мышей C57B16 разделили на 3 группы – контроль, инъекция 500 мкл 91,2 мкМ раствора бактериохлорина или аналогичной дозы бактериохлорина в составе конъюгата с транспортером. Через 3 ч мышей облучали с помощью иллюминатора с интерференционным фильтром (максимум пропускания при 761 нм) 16 мин при удельной мощности светового потока 380 мВт/см². Сеансы фотодинамической терапии проводили 5 раз, на 4, 6, 8, 11 и 13-е сутки после инокуляции меланомы. Задержку роста опухоли оценивали по разнице времени достижения опухолью размера контрольной на логарифмической фазе роста.

ФДТ эпидермоидной карциномы человека A-431 у бестимусных мышей Nude-Foxn1nu. Животным имплантировали эпидермоидную карциному человека путем инокуляции суспензии 1 млн клеток A-431, для инъекций использовали 110 мкМ раствор свободного бактериохлорина/конъюгата ФС-транспортер. Сеансы фотодинамической терапии проводили через 24 ч после подкожного или внутриопухолевого введения и через 3 ч после внутривенной инъекции. Область опухоли облучали проектором с галогеновой лампой и интерференционным фильтром в течение 15 мин при удельной мощности светового потока 100 мВт/см².

Результаты и их обсуждение

1. Прогнозирование биологической активности тестируемых соединений.

Для изучения сродства тестируемых соединений к ключевому ферменту катаболизма полиаминов и прогнозирования их активности применили метод компьютерного встраивания лигандов в активный центр ПАО (Рис.1).

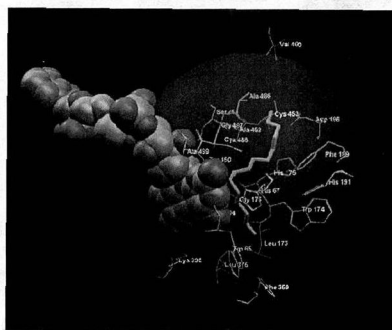


Рис.1. Область активного центра в молекуле полиаминоксидазы, использованная для докинга. Субстрат показан желтым цветом, кофактор – шаровой моделью.

На Рис.2 представлены самые выгодные по энергии конформации для соединений из каждой группы, демонстрирующие размещение молекул определенного класса внутри полости фермента. Важно, что найденные конформации с минимальной энергией находятся в той же области активного центра фермента, что и синтетический лиганд из кристаллической структуры. Дальнейшему анализу подвергались парциальные энергии (E_{Pair}) взаимодействия тестируемых соединений с аминокислотными остатками и

кофактором. В качестве дескрипторов использовали $E_{Pair} \geq 5$ ккал/моль, а также образование водородных связей с энергией 2.5 ккал/моль.

Полученные данные свидетельствуют, что ключевыми остатками для связывания лиганда в активном центре молекулы ПАО являются His67, Tyr450, His191, Phe189, Gly487, Trp174, Cys488. Причем со всеми из них могут образовываться также и водородные связи. Следующая когорта из 7 остатков формирует верхнюю часть полости активного центра, и с ними взаимодействуют большинство лигандов из групп А, В, Д и Е: His175, Gly485, Asp68, Tyr490, Ala486, Ser451, Ala452, Asp186. С Ala486 возможно образование водородной связи. Leu173, Leu375 и Trp65 образуют нижнюю часть канала полости и важны для связывания некоторых производных анилина, азакраун-эфиров и бактериопурпурина, но не участвуют в докинге производных диоксборенинопиридинов и азафлуоренов.

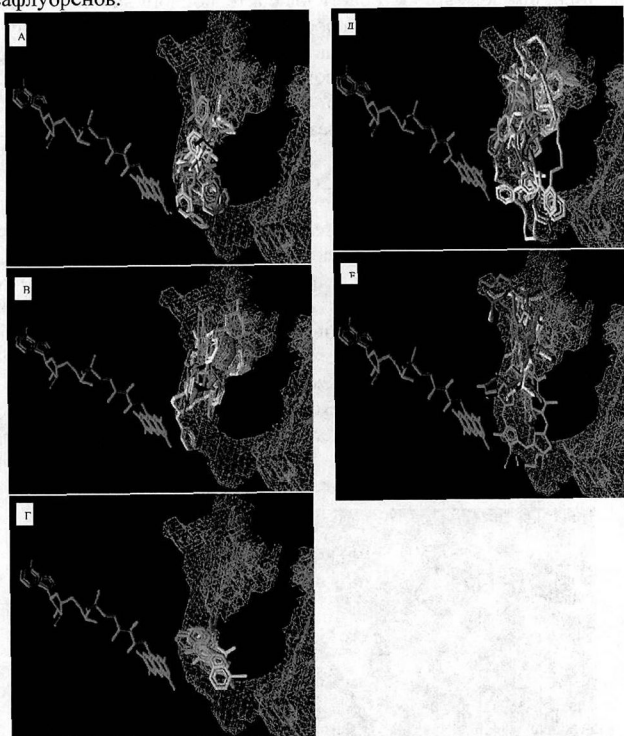


Рис.2. Совмещенные конформации соединений внутри активного центра полиаминоксидазы. Производные: А-анилина; В – диоксборенинопиридины; Г – азафлуорена; Д – азакраун-эфиров; Е – бактериопурпурина. Кофактор показан красным цветом, полость – зеленым.

Среди производных диоксборенинопиридина и азакраун-эфиров встречается взаимодействие также с Trp65, Met483 и Gly190. Притяжение между лигандом и кофактором характерно для большинства производных анилина и азафлуорена, но лишь для половины протестированных веществ из других групп.

2. Влияние тестируемых соединений на активность ди- и полиаминоксидаз.

Полученные экспериментальные данные по влиянию изучаемых веществ на активность ДАО и ПАО представлены на **Ошибка! Источник ссылки не найден.3 - Ошибка! Источник ссылки не найден.8**. Производные анилина (группа А), активизирующие окислительное дезаминирование сразу по трем субстратам (Пут, Сд, См): В4, В5, В6, В8, В9

и В14. При этом наибольший эффект получен для См – среднее превышение над контролем в 2.3 раза (Рис.3).

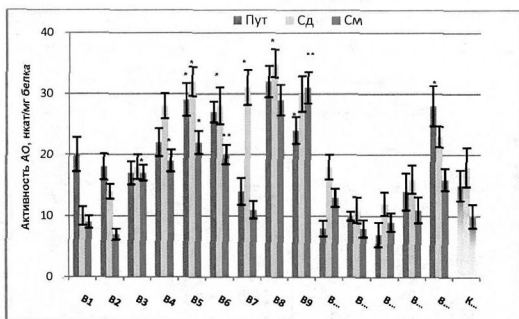


Рис.3 Влияние производных анилина (группа А) на аминоксидазную активность в бесклеточной тест-системе из печени крыс.

В присутствии свободных ионов меди (II) активность аминоксидаз относительно контроля возрастает на 20, 40 и 55% по Пут, Сд, См, соответственно. Однако, действие соединений В5, В6, В8 и В9 в составе металлокомплексов на скорость окислительных ферментов снижается (Рис.4).

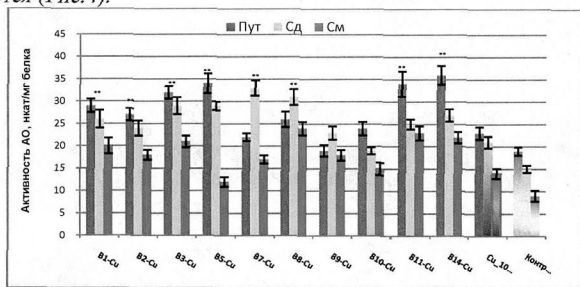


Рис.4 Влияние комплексов меди с производными анилина (группа Б) на аминоксидазную активность в бесклеточной тест-системе из печени крыс.

Производные диоксaborининопиридина (группа В) в основном действуют как ингибиторы окислительного дезаминирования и тем самым проявляют канцерогенные свойства. Наиболее выражено соединения влияют на окисление См. Однако, на фоне действия соединений СоА2, СоА3 и СоА5 усиливается процесс окислительного дезаминирования Сд.

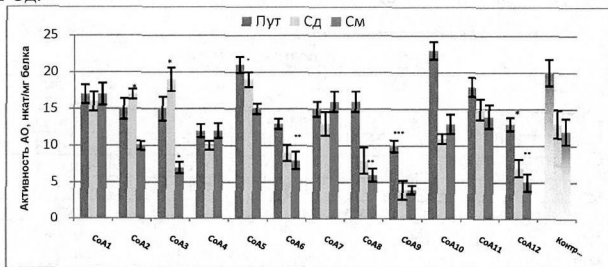


Рис.5 Влияние производных диоксaborининопиридина (группа В) на аминоксидазную активность в бесклеточной тест-системе из печени крыс.

Производные азакраун-эфиров проявили себя как активаторы и ингибиторы аминоксидазной активности. Окислительное дезаминирование увеличивается при действии X9, X13, X15, X18 и X20. При этом наибольшая активность отмечается в отношении См. Активность аминоксидаз значительно ингибируется веществами X1, X2, X4, X10, X11 (Рис.6).

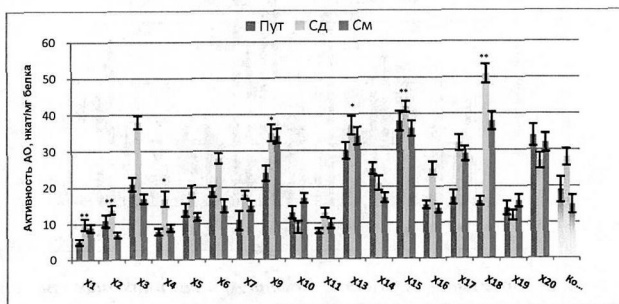


Рис.6 Влияние производных азакраун-эфиров (группа Д) на аминоксидазную активность в бесклеточной тест-системе из печени крыс.

Производные бактериопурпурина (группа Е) понижают аминоксидазную активность, а производные азафлуорена (группа Г), наоборот, усиливают в основном распад См и Сд (Рис. 7).

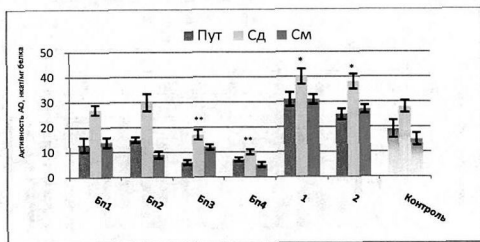


Рис.7 Влияние производных бактериопурпурина (группа Е, выборочно) и азафлуорена (группа Г) на аминоксидазную активность в бесклеточной тест-системе из печени крыс.

3. Определение мембранной проницаемости тестируемых соединений.

Для веществ, действие которых направлено на внутриклеточные мишени, а также для предсказания оральной биодоступности и фармакокинетических свойств потенциальных лекарственных препаратов очень важно иметь данные об их мембранной проницаемости. Результаты определения оценки пассивного транспорта молекул через искусственную мембрану в модели РАМРА при pH=7.4, представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Проницаемость тестируемых соединений в модели РАМРА.

Код вещества	Группа А. Производные анилина			Проницаемость
	$P_c (10^{-6}), \text{см/с}$	SD (n=2)	R	
В-1	0,15	0,028	0,30	Низкая
В-2	0,36	0,033	0,38	Низкая
В-3	0,47	0,11	0,05	Низкая
В-4	0,02	0,002	0,11	Низкая
В-5	0,67	0,022	0,12	Низкая
В-6	не детектируется		0,65	Низкая
В-7	0,07	0,008	0,06	Низкая
В-8	0,11	0,040	0,09	Низкая
В-9	2,55	0,154	0,21	Высокая
В-10	0,3	0,05	0,01	Низкая
В-11	7,00	0,548	0,27	Высокая

B-12	0,4	0,01	0,21	Низкая
B-13	0,2	0,002	0,01	Низкая
B-14	0,5	0,00	0,05	Низкая
Группа Б. Комплексы меди с производными анилина				
Код вещества	$P_e(10^{-6})$, см/с	SD (n=2)	R	Проницаемость
B1-Cu	1,9	0,40	-0,09	Высокая
B2-Cu	4,2	0,46	0,07	Высокая
B3-Cu	3,8	0,25	0,16	Высокая
B5-Cu	2,6	0,11	0,05	Высокая
B7-Cu	5,1	0,15	0,08	Высокая
B8-Cu	2,5	0,23	0,13	Высокая
B9-Cu	5,1	0,49	0,04	Высокая
B10-Cu	3,3	0,01	0,10	Высокая
B11-Cu	5,3	0,01	0,14	Высокая
B14-Cu	6,1	0,18	0,02	Высокая
Контрольные вещества				
Верапамил	13,0	3,3	0,20	Высокая
Ранитидин	0,1	0,01	-0,05	Низкая
Группа В. Производные диоксибензотиофена				
Код вещества	$P_e(10^{-6})$, см/с	SD (n=2)	R	Проницаемость
CoA1	не детектируется		0,74	Низкая
CoA2	0,2	0,003	0,69	Низкая
CoA3	не детектируется		0,92	Низкая
CoA4	0,9	0,11	0,89	Низкая
CoA5	не детектируется		0,59	Низкая
CoA6	не детектируется		0,69	Низкая
CoA7	0,7	0,21	0,75	Низкая
CoA8	0,2	0,003	0,81	Низкая
CoA9	0,3	0,02	0,77	Низкая
CoA10	0,7	0,002	0,56	Низкая
CoA11	не детектируется		0,94	Низкая
CoA12	0,1	0,03	0,59	Низкая
Группа Г. Производные азафлурена				
Код вещества	$P_e(10^{-6})$, см/с	SD (n=2)	R	Проницаемость
1	3,7	0,4	0,26	Высокая
2	0,4	0,1	0,67	Низкая
Группа Д. Производные азокраун-эфиров				
Код вещества	$P_e(10^{-6})$, см/с	SD (n=2)	R	Проницаемость
X1	0,9	0,23	0,57	Низкая
X2	1,1	0,42	0,31	Высокая
X3	1,1	0,07	0,44	Высокая
X4	1,4	0,10	0,43	Высокая
X5	1,2	0,34	0,01	Высокая
X6	1,6	0,02	0,10	Высокая
X7	0,9	0,12	0,85	Низкая
X9	0,2	0,03	0,36	Низкая
X10	0,9	0,21	0,36	Низкая
X11	не детектируется		0,92	Низкая
X13	не детектируется		0,87	Низкая
X14	0,7	0,09	0,60	Низкая
X15	0,3	0,23	0,64	Низкая
X16	0,5	0,27	0,72	Низкая
X17	2,6	0,46	0,54	Высокая
X18	0,1	0,01	0,52	Низкая
X19	5,0	1,25	0,34	Высокая
X20	2,0	0,39	0,32	Высокая
Группа Е. Производные бактериопуррина				
Код вещества	$P_e(10^{-6})$, см/с	SD (n=2)	R	Проницаемость
Бп1	4,8	1,0	0,55	Высокая
Бп2	3,7	0,4	0,74	Высокая

Бп3	1,7	0,8	0,76	Высокая
Бп4	2,7	1,0	0,87	Высокая
Контрольные вещества				
Верапамил	9,9	2,9	0,26	Высокая
Ранитидин	0,3	0,01	0,0003	Низкая

Производные анилина в большинстве своем обладают низкой пассивной проницаемостью через липидную мембрану, но достаточно гидрофильные и имеют коэффициент удерживания < 0.5 . Высокую проницаемость показали два вещества – В9 и В11, соединение В6, напротив, сильно задерживается в мембране и в акцепторных лунках не детектируется. Комплексование производных анилина с медью критическим образом влияет на мембранную проницаемость, увеличивая ее на порядок. Вещества при этом находятся в гидрофильной среде, а не в мембране. Все протестированные производные диоксаборенинопиридина имеют низкую проницаемость, очень гидрофобные и больше 50% их удерживается в мембране. Среди двух производных азафлуорена вещество 2 – высокопроницаемо, 1 – низко. Производные азраун-эфиров характеризуются различной мембранной проницаемостью и коэффициентом удерживания в липидном слое. Увеличение числа гидрофобных мотивов в структуре молекул приводит к падению проницаемости. Производные бактериопурпурина имеют хорошую проницаемость через мембрану, но при этом значительная доля вещества задерживается в липидном слое.

4. Скрининг антипролиферативной активности тестируемых соединений.

Действие веществ на рост и деление клеток опухолей человека (меланомы, рака груди и рака простаты) определяли в ходе скрининга, сравнивая количество живых клеток после 72 ч инкубации с соединениями в заданной концентрации с контрольными клетками без обработки веществами. Клетки РС-3 оказались наиболее чувствительными к действию изучаемых соединений, что согласуется со значимыми изменениями метаболизма ПА при развитии рака простаты [Arisan ED et al., 2013]. Результаты влияния веществ из групп А-Е на пролиферацию клеток рака простаты представлены на Рис. 8.

По результатам скрининга найдены ингибиторы пролиферации раковых клеток. Вещества с более чем 30%-м подавлением роста клеток рака простаты РС-3: В1, В8, В13, В14 из группы А; оба производных азафлуорена; единственное соединение СоА9 из группы В; X1, X13, X14, X19 из группы Д. Несмотря на снижение аминоксидазной активности в присутствии производных бактериопурпурина 3 и 4, это не приводит к усилению пролиферации. Без облучения светом ФС из группы Е не влияют на деление клеток. Наблюдается тенденция усиления цитотоксических свойств при комплексовании производных анилина с медью (группа Б), особенно цитотоксичны соединения В2-Сu, В8-Сu, В10-Сu и В14-Сu.

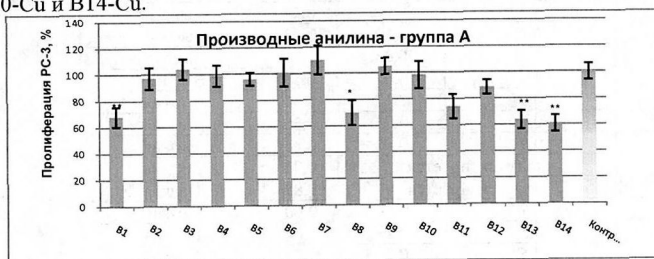


Рис.8 (начало). Влияние тестируемых соединений на пролиферацию клеток рака простаты РС-3.

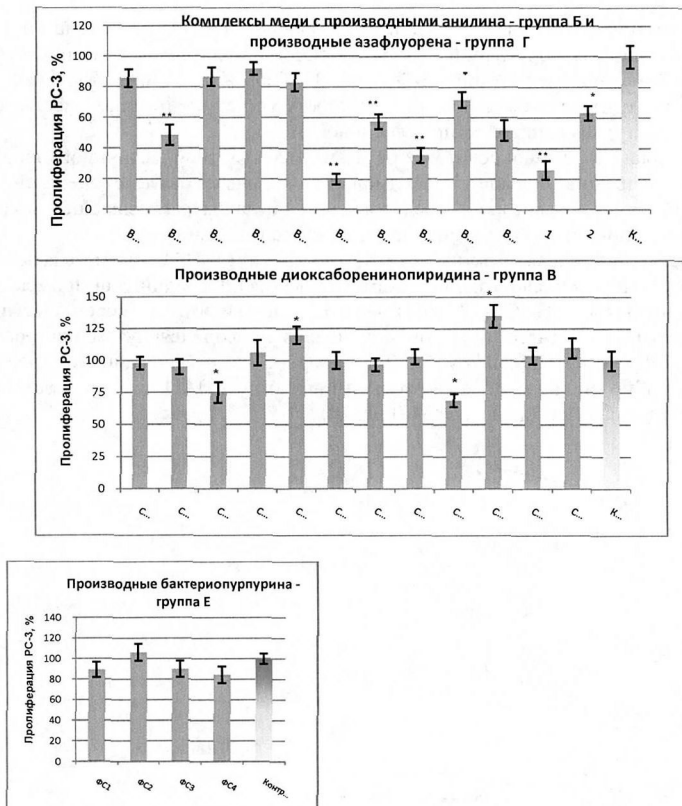


Рис.8 (продолжение). Влияние тестируемых соединений на пролиферацию клеток рака простаты РС-3.

5. Количественные корреляции структура- активность (ККСА).

Программа «ChemicDescript» позволяет проводить отбор веществ-кандидатов с потенциально возможной активностью по результатам расчета пяти топологических индексов: Винера (W), Руврэ (R), Балабана (J) в модификации Тринайстича, обхода (Ip) и электропии (Ie). Для успешного поиска корреляционных зависимостей между биологическим свойством и структурой химических соединений чрезвычайно важно выбрать дескриптор, отражающий наиболее существенный параметр для данного типа соединений и для определенной активности – топологию, геометрию, распределение заряда и др.

Результаты анализа корреляций представлены на Рис. 9. Индекс W в основном отражает размеры и сложность молекулы – наличие функциональных групп, количество связей и атомов, в то время как индекс Балабана учитывает и число циклов, и сопряжений. Индексы W, R и J основаны на матрице расстояний, индекс Ip - на матрице обхода. Индексы W и R также являются вершинно- и реберно-взвешенными графами, так как они учитывают тип атомов (вершин графа) и химических связей (ребер графа). В индексе электропии учитывается разнообразие атомов в структуре молекулы.

Индекс Балабана наиболее точно отражает зависимость цитотоксичности от структуры молекул по совокупности данных для всех изучаемых классов соединений. Это подтверждается и высоким значением коэффициента линейной регрессии ($R > 0,7$) для аналогов анилина (группы А), большинство из которых являются активаторами

окислительного дезаминирования ПА. Индексы Винера, Руврэ и обхода имеют ограниченное применение для корреляций с данным типом биологической активности и подходят только для описания соединений с $W \geq 3000$, $R \geq 6000$ и $Ip \geq 13000$. Корреляции с электропией отсутствуют, что отражает большую важность учета межатомных расстояний, чем разнородность структуры в данных группах соединений.

Дескрипторы докинга (аминокислотные остатки с абсолютной величиной энергии притяжения или отталкивания больше 5 ккал/моль; водородные связи с энергией 2.5 ккал/моль, взаимодействие с кофактором) послужили для создания распознающей модели активных соединений по принципу построения деревьев классификации.

Согласно своей биологической активности по отношению к ПАО были выделены 2 группы веществ - активаторы окислительного дезаминирования (20 соединений) и имеющие обратный эффект ингибиторы ПАО (18 соединений). Независимыми переменными в распознающей модели были дескрипторы докинга, анализ проводился путем построения классификационных деревьев [Khlebnikov 2012]. Бинарное классификационное дерево, позволяющее различить потенциальные активаторы и ингибиторы ПАО, удалось построить по 5 дескрипторам, при изначальном анализе 34 (Рис. 10).

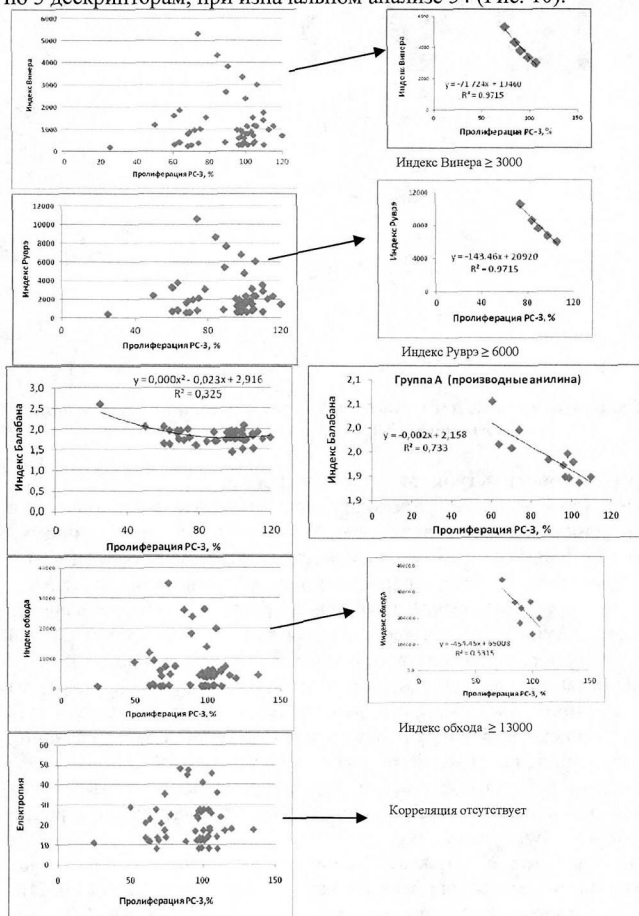


Рис. 9 КККА по 5-ти топографическим индексам в программе «ChemicDescript».

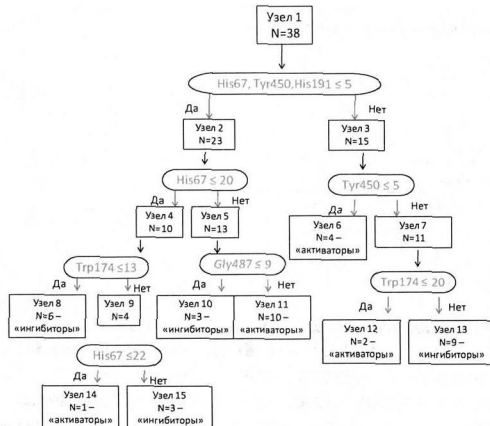


Рис.10 Классификационное дерево для различия активаторов и ингибиторов ПАО, построенное по результатам докинга.

6. Применение векторных транспортеров для доставки лекарств в ядра опухолевых клеток.

Путем индуцированной экспрессии рекомбинантных плазмид в клетках *E.coli* были выделены и очищены при помощи аффинной хроматографии два транспортера. В результате 4-х выделений получено 153,7 мг полипептида *His₆-ДТокс-НМР-СЯЛ-αМСГ* (Tr-1) с чистой выше 95% (по данным электрофореза) и 120 мг полипептида *His₆-ДТокс-НМР-СЯЛ-сн-ЭФР* (Tr-2) с чистой более 90%. Выход составил 3,2 мг и 2 мг на г бактериальной биомассы, соответственно. Синтез конъюгатов Tr с бактериохлорином имел выход 50%, молярное соотношение белок: ФС составило 1:3,2 для конъюгата с Tr-1 и 1:5 для Tr-2.

Способность Tr многократно усиливать фотоцитотоксичность бактериохлорина за счет направленной доставки в ядро была доказана в экспериментах по фотодинамическому действию на клетках мышиной меланомы V16-F1 (для Tr-1) и аденокарциномы человека A-431 (для Tr-2). Концентрация полумаксимального действия (EC_{50}), при которой наблюдали 50% выживших клеток, понизилась в 78 раз и в 91 раз после включения ФС в состав конъюгатов с Tr-1 и Tr-2, соответственно (Рис. 11).

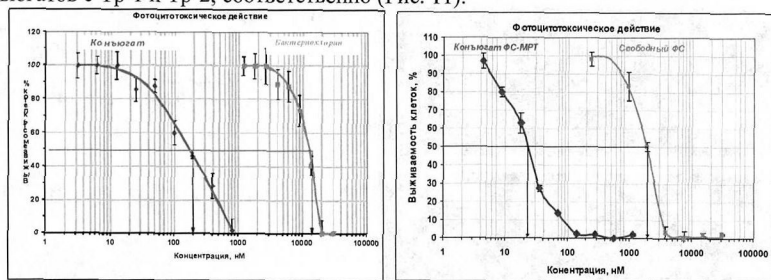


Рис.11 Концентрационные зависимости выживаемости клеток V16-F1иA-431 в результате фотоцитотоксического действия свободного бактериохлорина и конъюгатов с Tr-1 и Tr-2.

Тип гибели клеток в результате фотоцитотоксического действия ФС и его конъюгата с Tr определяли визуально с помощью флуоресцентного микроскопа после окрашивания клеток смесью Hoechst 33342 и йодида пропидия. Путем сопоставления яркочольных и флуоресцентных изображений клеток был подсчитан процент апоптоза и некроза в зависимости от концентрации ФС через 4 ч после облучения (Рис. 12).

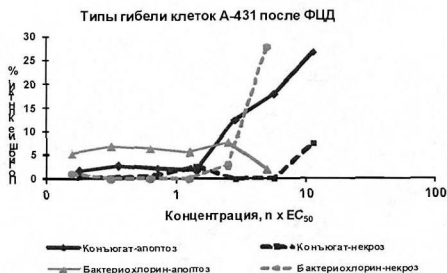


Рис. 12. Концентрационные зависимости типов гибели клеток аденокарциномы в результате фотоцитотоксического действия. EC_{50} - концентрация 50% эффекта.

В широком диапазоне концентраций конъюгата ФС с ЭФР-содержащим Тр преимущественным типом гибели клеток после фотоцитотоксического действия является апоптоз. Напротив, при действии свободного бактериохлорина доля апоптотических клеток невелика, и развивается некроз. Полученные результаты свидетельствуют, что при включении ФС в состав конъюгата с Тр изменяется механизм активности, в клетках запускается процесс апоптоза. В связи с этим, интересно было проверить, какую роль в цитотоксичности играет перекисное окисление липидов (ПОЛ).

Регистрация ПОЛ в клетках А-431 при фотоцитотоксическом действии свободного ФС и в составе ЭФР-содержащего конъюгата с помощью зонда C11-BODIPY581/591 показала, что при концентрациях $10xEC_{50}$ для свободного ФС и $450xEC_{50}$ для конъюгата уровень окисления зонда был более чем в 2 раза выше для свободного ФС по сравнению с конъюгатом (Рис.13). Столь большие концентрации ФС вызывали гибель клеток по пути некроза уже в течение 40 мин после облучения. По полученным результатам, апоптоз не сопровождается ПОЛ, что согласуется с данными о ведущей роли ПОЛ в повреждении мембран, приводящих к некрозу [Girotti, 1998]. Окисление C11-BODIPY581/591 липидными радикалами при действии конъюгата ФС с Тр можно расценивать как следствие появления в клетке продуктов протеолитической деградации полипептида, достаточно липофильных для взаимодействия с C11-BODIPY581/591, локализованном в мембранах.

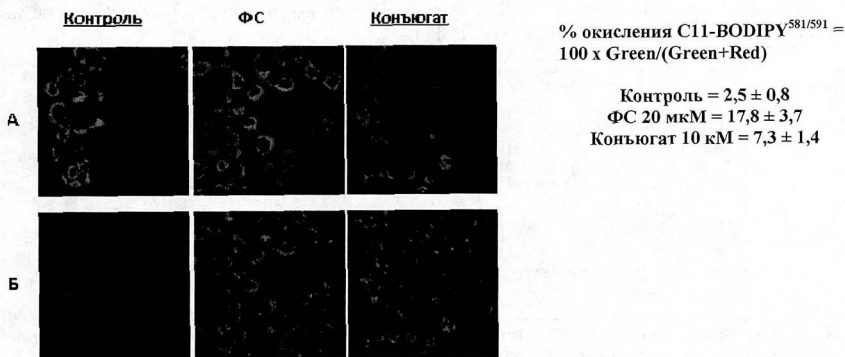


Рис. 13. Регистрация перекисного окисления липидов в клетках А-431.

Флуоресценция C11-BODIPY^{581/591}: А - восстановленного, Б - окисленного

С помощью иммуногистохимического окрашивания, конфокальной микроскопии и последующей обработки изображений удалось визуализовать распределение Тр в меланомной ткани, зафиксированной спустя 3 ч после последней из трех внутривенных инъекции раствора Тр мышам (Рис.14). Видно, что транспортер локализуется внутри клеток меланомы, преимущественно в ядрах и околоядерной области. Не все опухолевые клетки

накопили достаточно большое количество Тр, необходимое для появления сильного флуоресцентного сигнала от вторичных антител, вероятно, из-за неоднородности клеточного состава ткани и из-за разной доступности меланомных клеток для транспортера.

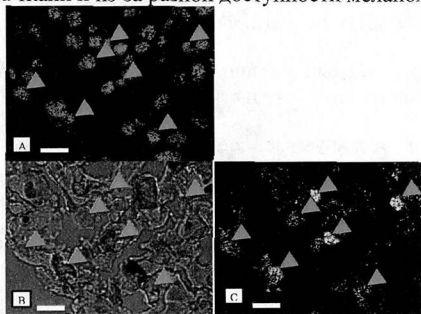
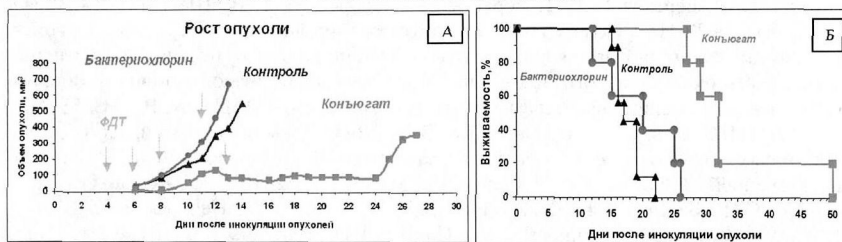
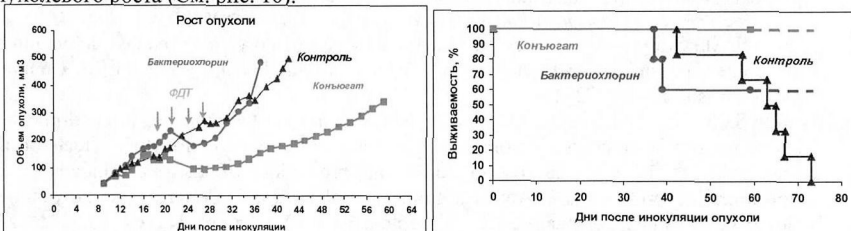


Рис.14. Конфокальные изображения срезов меланомы после внутривенного введения Тр. А - ядра, окрашенные ToPro. В - яркочеткое изображение. С - не прямое иммунофлуоресцентное окрашивание Тр. Масштабная линейка – 10 мкм.

Фотодинамическая терапия мышинной меланомы В16-F1 с применением внутривенного введения конъюгата Тр-бактериохлорин в экспериментах на мышах линии C57/Black показала, что снижение скорости роста опухоли у мышей с конъюгатом составила $18 \pm 0,6$ дней по сравнению с контрольной группой животных, а продолжительность жизни увеличилась в два раза (Рис. 15). Развитие опухолей в контроле и после ФДТ с использованием свободного ФС отличается незначительно.



Эксперименты по фотодинамической терапии эпидермоидной карциномы человека А-431 проводились на факультете Фармацевтики Университета г. Утрехт (Нидерланды) на бестимусных мышах линии Nude-Foxn1nu. Эффективность ФДТ эпидермоидной карциномы человека удалось повысить, применив внутриопухолевое введение конъюгата ФС с Tr-2. В результате, торможение роста опухоли в группе «конъюгат» составила 23 дня по сравнению с контролем, ФДТ со свободным бактериохлорином не оказала влияния на характер опухолевого роста (См. рис. 16).



ВЫВОДЫ

1. Методом докинга по взаимодействию с 5 аминокислотными остатками в активном центре ПАО построена распознающая модель активаторов-ингибиторов фермента.
2. Найдены соединения из группы производных анилина, азафлуорена и азакраунэфиров, которые подавляли рост раковых клеток в культуре.
3. По влиянию на распад полиаминов тестируемые соединения на первой стадии скрининга можно классифицировать как потенциальные канцеростатики или канцерогены.
4. Индекс Балабана J является наиболее применимым топологическим дескриптором для количественных корреляций структуры производных анилина с их цитотоксичностью.
5. Двукратное снижение скорости роста опухоли у мышей после фотодинамической терапии с применением векторных транспортеров демонстрирует эффективность применения направленной доставки препаратов в клетки опухолей *in vivo*.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, рекомендованных ВАК для размещения материалов диссертации:

1. Сяткин С. П., Березов Т. Т., Неборак К. В., Федорончук Т. В., Шевкун Н. А., Левов А.Н., Сокуев Р. И., Сокуева Н. А. 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.
2. Сяткин С.П., Шевкун Н.А., Свиарев В.И. Полиамины в аутопсийных образцах некоторых структур лимбической и ретикулярной формации мозга у больных шизофренией. // Вестник РУДН. Серия: Медицина. – М., 2010. – №1 – С. 36-41.
3. Сяткин С.П., Березов Т.Т., 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. – М., 2010. – №3 – С. 9-14.
4. Сяткин С.П., Березов Т.Т., 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. – М., 2010. – №4 – С. 26-31.

Тезисы международных конференций

(приравниваются к опубликованным работам, отражающим основные научные результаты диссертации, согласно постановлению Правительства РФ № 475 от 20.06.11)

5. Syatkin S, Shevkun N, Khlebnikov A. Structural aspects of Polyamine oxidase activation by azofluorene and aniline derivatives. FEBS Letters Supplement. 38th FEBS Congress "Mechanisms in Biology"2013.
6. Syatkin S., Neborak E., Shevkun N., Sokueva N., Sokuev R., Golmazova K., Fedoronchuk T.. Screening of N-heterocyclic compounds and aniline derivatives for their effects on the amine oxidases *in vitro* as useful tools for prediction of their carcinogenic and antiproliferative properties. // Abstracts from the International Congress on Polyamines: biological and clinical perspectives. 2nd-7th September 2012, Istanbul, Turkey. – P. 221-223.
7. Syatkin S., Fedoronchuk T., Neborak E., Sokueva N., Sokuev R., Shevkun N.. Antitumor activity of activators of polyamine oxidative deamination during hepatocarcinogenesis. //

- Abstracts from the International Congress on Polyamines: biological and clinical perspectives. 2nd-7th September 2012, Istanbul, Turkey. – P. 225-226.
8. Shevkun N., Neborak E, Sokueva N, Sokuev R, Golomazova K, Fedoronchuk T. Screening of N-heterocyclic compounds and aniline derivatives for their effects on the aminooxidases in vitro // IV International Scientific Conference Science4health, Moscow, Russia, April, 2012. P. 53.
 9. Shevkun N, Fedoronchuk T, Neborak E, Sokueva N, Sokuev R. Targeting polyamine catabolism in malignant hepatic tissue // IV International Scientific Conference Science4health, Moscow, Russia, April, 2012. P. 54.
 10. Сяткин С.П., Федорончук Т.В., Шевкун Н.А., Неборак К.В., Сокуев Р.И., Сокуева Н.А.. Противоопухолевая активность активаторов окислительного дезаминирования полиаминов. //Труды XX Международной конференции “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии”, 5-14 июня, 2012, Гурзуф, Украина. – 2012. – Т.1 – С.98-99.
 11. Шевкун Н., Неборак Е., Сокуева Н., Сокуев Р., Голомазова К., Федорончук Т.. Скрининг N-гетероциклических и анилиновых производных по влиянию на аминоксидазы in vitro. // Материалы IV Международной конференции Science4health: Клинические и теоретические аспекты современной медицины, 18-21 апреля, 2012, Москва. – М.:РУДН, 2012 – С.53-54.
 12. Шевкун Н., Федорончук Т., Неборак Е., Сокуева Н., Сокуев Р.. Катаболизм полиаминов при карциногенезе печени как мишень для поиска новых противораковых соединений. // Материалы IV Международной конференции Science4health: Клинические и теоретические аспекты современной медицины, 18-21 апреля, 2012, Москва. – М.:РУДН, 2012 – С.54-55.
 13. Сунграпова Е. Ю., Урбан М.Н., Комиссарова Е.Ю., Шевкун Н.А., Неборак Е.В.. Психотропные препараты как потенциальные противоопухолевые средства. // Материалы IV Международной конференции Science4health: Клинические и теоретические аспекты современной медицины, 18-21 апреля, 2012, Москва. – М.:РУДН, 2012 – С.74-75.
 14. 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. // Материалы IV Международной конференции Science4health: Клинические и теоретические аспекты современной медицины, 18-21 апреля, 2012, Москва. – М.:РУДН, 2012 – С.75.
 15. Сяткин С.П., Федорончук Т.В., Шевкун Н.А., Неборак Е.В., Сокуев Р.И., Сокуева Н.А. Активаторы окислительного дезаминирования полиаминов как потенциальные противоопухолевые агенты //Материалы XIV Международного конгресса «Здоровье и Образование в XXI веке», 14-17 ноября 2012, Москва. – Т2- С. 91.
 16. Сяткин С.П., Федорончук Т.В., Шевкун Н.А., Неборак К.В., Сокуев Р.И., Сокуева Н.А. Активаторы окислительного дезаминирования как потенциальные противоопухолевые агенты // Scientific and educational journal: Материалы конференции «Health and education millenium»: 2012. РУДН. Москва. – М.: РУДН. 2012. - Т. 14 [2]. С. 58.
 17. Shevkun N, Gulak P and Syatkin S. Molecular recombinant transporters for the selective delivery of photosensitizers into cancer cells. // Addendum to Abstracts presented at the 12th International Congress on Amino Acids, Peptides and Proteins, Conference, 1st-5th August 2011, Beijing, China. –Amino Acids. – 2011. – V. 41. – P. 998.
 18. 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, Conference, 1st-5th August 2011, Beijing, China. –Amino Acids. – 2011. – V. 41. – P. 1002.

19. Шевкун Н.А., Сяткин С.П. Определение типа гибели раковых клеток при действии фотосенсибилизаторов бактериохлоринового ряда. //Материалы VII Международной научно-практической конференции «Новейшие достижения европейской науки» , 17-25 июня, 2011, София, Болгария. – 2011. – Т.32 – С.76-79.
20. 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, dioxaboreninopyridine and aniline derivatives by their effects on the polyamine oxidative deamination. // Abstracts from the 2nd International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases, 1st-6th December 2010, Tivoli (Rome), Italy. – P. 209-211.
21. Syatkin S., Shevkun N., Fedoronchuk T., Neborak E., Sokueva N., Sokuev R., Ustinova E.. Activators of polyamine oxidative deamination as the potential antitumor agents. //Abstracts from the 2nd International Conference on the Role of Polyamines and their Analogs in Cancer and other Diseases, 1st-6th December 2010, Tivoli (Rome), Italy. – P. 213-214.
22. Syatkin S.P., Fedoronchuk T.V., Gridina N.Ya., Neborak E.A., Shevkun 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. //Abstracts from the International Polyamine Conference, 14th-18th June 2010, Gotemba, Japan. – P. 102-103.
23. Syatkin S.P., Fedoronchuk T.V., Gridina N.Ya., Neborak E.A., Shevkun 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. //Abstracts from the International Polyamine Conference, 14th-18th June 2010, Gotemba, Japan. – P. 104-105.
24. Шевкун Н.А., Гулак П.В., Сяткин С.П.. Модульные рекомбинантные транспортеры для селективной доставки фотосенсибилизаторов в раковые клетки. //Материалы Международной научно-практической конференции “Экология и медицина: современное состояние, проблемы и перспективы”, 2-3 ноября 2010, Москва. – М., 2010. – С.48-50.
25. 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 диоксаборенинопиридина и анилина. //Труды XVIII Международной конференции “Новые информационные технологии в медицине, биологии, фармакологии и экологии”, 31 мая-10 июня, 2010, Гурзуф, Украина. – 2010. – Т.1 – С.60-62.
26. Неборак Е. В., Сокуев Р.И., Сокуева Н.А. Устинова Е.В., Шевкун Н.А.. Определение канцерогенных и канцеростатических свойств производных анилина путем оценки их влияния на скорость окислительного дезаминирования путресцина, спермидина и спермина. //Материалы II Международной студенческой конференции с участием молодых ученых “Клинические и теоретические аспекты современной медицины», 22-23 апреля 2010, Москва. – С. 59-60.
27. Шевкун Н.А., Неборак Е.В., Сокуев Р.И., Сокуева Н.А., Устинова Е.В.. Фотодинамическая терапия злокачественных опухолей с применением модульных рекомбинантных транспортеров. //Материалы II Международной студенческой конференции с участием молодых ученых “Клинические и теоретические аспекты современной медицины», 22-23 апреля 2010, Москва. – С. 73.
28. Сокуева Н.А. Устинова Е.В., Шевкун Н.А., Сокуев Р.И.. Делеционное картирование 5'-регуляторной области гена Trithorax-like *Drosophila melanogaster*. //Материалы II Международной студенческой конференции с участием молодых ученых “Клинические и теоретические аспекты современной медицины», 22-23 апреля 2010, Москва. – С. 77-78.
29. Устинова Е.В., Шевкун Н.А., Неборак Е.В., Сокуев Р.И., Сокуева Н.А.. Разработка биотехнологического способа получения модифицированных нуклеозидов.

//Материалы II Международной студенческой конференции с участием молодых ученых “Клинические и теоретические аспекты современной медицины», 22-23 апреля 2010, Москва. – С. 81-82.

30. Сокуев Р.И., Сокуева Н.А. Устинова Е.В., Шевкун Н.А., Неборак У.В.. Синтез фторсодержащих производных (+)-усниновой кислоты. //Материалы II Международной студенческой конференции с участием молодых ученых “Клинические и теоретические аспекты современной медицины», 22-23 апреля 2010, Москва. – С. 228.
31. Сяткин С.П., Шевкун Н.А., Свиначев В.И. Полиамины в структурах лимбической и ретикулярной формации мозга у больных шизофренией. //Материалы X Международного конгресса «Здоровье и Образование в XXI веке», 9-12 декабря 2009, Москва. – С. 1216-1217.
32. Шевкун Н.А., Гулак П.В.. Увеличение эффективности фотосенсибилизаторов *in vitro* и *in vivo* с помощью конъюгации с модульным рекомбинантным транспортером. //Тезисы первого студенческого симпозиума по биоинженерии. – М.: МГУ им. М.В.Ломоносова, 2006 г. – С.36-37.

Учебно-методические пособия

33. Попов П.И., Сяткин С.П., Шевкун Н.А., Неборак Е.В., Сокуев Р.И., Федорончук Т.В. Инструкция по использованию программы «ChemicDescript» для проведения количественных корреляций «структура-активность/структура-свойство»: Учебное пособие // М.: Изд-во РУДН. – 2013. – 32 С.
34. Сяткин С.П., Шевкун Н.А., Хлебников А.И. Инструкция по использованию программы Molego Virtual Docker для проведения молекулярного докинга лиганд-белок: Учебное пособие // М.: Изд-во РУДН. – 2013. – печать.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ПА – полиамины	ФДТ - фотодинамическая терапия
Сд, SPD – спермидин	ОДК – орнитиндекарбоксилаза
Пут, PUT – путресцин	ФС - фотосенсибилизатор
См, SPM – спермин	ЭФР – эпидермальный фактор роста опухоли
ДАО – диаминооксидаза	Тр - транспортер
ПАО – полиаминооксидаза	α -МСГ – α -меланоцитстимулирующий гормон
ККСА – количественные корреляции структура-активность	
РАМРА (от англ. parallel artificial membrane permeability assay) – тест –система для изучения мембранной проницаемости	

БЛАГОДАРНОСТИ

1. проф., д.б.н. Сяткину Сергею Павловичу за четкое, последовательное и внимательное руководство научной работой
2. Гулаку П. В. (к.б.н.), Соболеву А.С. (д.б.н.) за организацию исследований по направленной доставке молекул.
3. Хлебникову А. И. (д.х.н.), Попову П.И. (к.б.н.) за помощь в проведении компьютерного моделирования и ККСА.
4. Варламову А.В. (д.х.н.), Солдатенкову А.Т. (д.х.н.), Грину М.А. (д.х.н.) Левову А. Н. (к. х. н.), Кутякову С.В. за синтез изучаемых соединений и ценные рекомендации.
5. сотрудникам:
лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта ИБГ РАН,
каф. Биохимии Медицинского ф-та РУДН,
фармацевтического ф-та университета г. Утрехт (Нидерланды)

Шевкун Наталья Александровна

СКРИНИНГ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МОДУЛЯТОРОВ ОБМЕНА ПОЛИАМИНОВ И ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ АГЕНТОВ

Работа представляет собой комплексное поэтапное исследование биологических свойств серии гетероциклических азотсодержащих соединений оригинального синтеза, направленное на выявление среди них модуляторов обмена полиаминов (ПА) с противоопухолевой активностью. Предсказание потенциальной активности производных диоксаборениопиридина, азафлуорена, азакраун-эфиров, бактериопурпурина и анилина проводилось с использованием метода компьютерного моделирования – докинга с полиаминоксидазой. Противоопухолевые свойства оценивали в ходе скрининга антипролиферативной активности на раковых клеточных линиях PC-3, MEL-7, MCF-7. На бесклеточной модельной системе из гомогената печени крыс изучали влияние соединений на ди- и полиаминоксидазы. Проведены количественные корреляции структура-активность (ККА) для определения наиболее значимых структурных дескрипторов. Выполнено тестирование *in vitro* и *in vivo* системы направленной доставки лекарственных веществ в ядра опухолевых клеток с помощью модульных белковых транспортеров. Полученные результаты позволяют рекомендовать ряд производных азафлуорена и анилина и систему модульных транспортеров для дальнейших доклинических исследований в качестве эффективных противоопухолевых средств.

Shevkun Nataliya Alexandrovna

SCREENING OF N-HETEROCYCLIC COMPOUNDS FOR POLYAMINE METABOLISM MODULATION AND ANTICANCER PROPERTIES.

Polyamines (PA) are small positively charged molecules involved in the regulation of cell proliferation, differentiation and death. Many cancer types overproduce polyamines due to abnormal regulation of polyamine metabolism results in rapid cancer progression. Hence, tissue specific drug-induced depletion of intracellular polyamine level through the activated polyamine catabolism could be useful tool for control of neoplastic growth. This study represents multistep complex research project aimed to select the modulators of PA degradation among original N-heterocyclic chemical compounds and to deliver them directly to cancer cells nuclei. Computer 3D design (*in silico* docking) with polyamine oxidase were performed to estimate the compound binding properties and visualize the topology of enzyme active site. Five critical amino-acid residues were identified. Screening of compounds for antiproliferative activity on PC-3, MEL-7 and MCF7 cancer cell lines showed the potency of azafluorene, aniline and some of azacrown-ester derivatives. QSAR analysis with ChemDiscript software showed the importance of Balaban topological index for cytotoxicity of aniline compounds. Di- and polyamine oxidase activation by test compounds were confirmed in *in vitro* assay with rat liver homogenates. Tissue specific modular recombinant transporters were tested *in vitro* and *in vivo* for targeted drug delivery directly to the nucleus of cancer cells. The number of azafluorene and aniline derivatives and modular transporters are recommended for further pre-clinical studies.

Подписано в печать 09.07.13. Формат 60x84/16.
Тираж 100 экз. Усл. печ. л. 1,25. Заказ 1038

Типография Издательства РУДН
115419, ГСП-1, г. Москва, ул. Орджоникидзе, д.3