

Влияние производных анилина на скорость синтеза путресцина и полиаминов в ткани с усиленной пролиферацией

**Неборак Екатерина Владиславовна, кандидат биологических наук,
главный специалист**

ФГБУ «Информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения» Росздравнадзора (г. Москва)

Сяткин Сергей Павлович, доктор биологических наук, профессор
Российский университет дружбы народов (г. Москва)

Хомяков Юрий Юрьевич, начальник отдела контроля качества
ЗАО «Пептек» (г. Москва)

**Шевкун Наталья Александровна, кандидат биологических наук,
проектный менеджер**
ООО «НИАРМЕДИК» (г. Москва)

Цель: исследовать влияние анилиновых производных полиаминов и их медных комплексов на скорость синтеза путресцина и полиаминов в бесклеточных тест-системах. Методы: парциальная гепатэктомия, препаративные общепатологические методы, ВЭЖХ. Результат: Все лиганды вызывают торможение синтеза путресцина и полиаминов. Медные комплексы лигандов с электроноакцепторными заместителями в основном ингибируют синтез аминов, хотя менее выражено. Медные комплексы лигандов с электронодонорными заместителями резко активируют синтез аминов. Выводы: вещества группы А могут обладать потенциальным противоопухолевым действием. Комплексообразование с медью эти свойства частично нивелирует.

Ключевые слова: полиамины; путресцин; спермидин; спермин; орнитиндекарбоксилаза; спермидинсинтаза; сперминсинтаза.

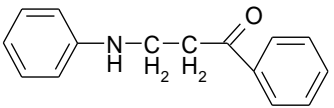
Система обмена полиаминов — путресцина, спермидина и спермина — активно вовлечена процессы клеточной дифференцировки и пролиферации. Так, известно, что уровень их концентраций внутри клетки повышается при клеточном делении и пролиферации, при дифференцировке же, наоборот, снижается. В опухолевых тканях наблюдаются отклонения в регулировке синтеза и распада полиаминов по сравнению с нормальными тканями. В связи с этим обмен полиаминов уже на протяжении ряда лет используется исследователями как мишень для отбора потенциальных противоопухолевых агентов [8, с. 15]. Направленный поиск таких соединений ведется в первую очередь среди химических аналогов полиаминов — алифатических производных, соединений с ароматическими заместителя-

ми, а также координационных соединений производных полиаминов [5, с. 400].

Целью работы стало сравнительное изучение влияния химических аналогов полиаминов и их медных комплексов, на скорость образования путресцина и полиаминов в бесклеточных тест-системах из тканей с усиленной клеточной пролиферацией.

Материалы и методы. Соединения группы А (Табл. 1) были синтезированы по описанной в литературе методике [2, с. 554]. В основе всех соединений — 3-анилино-1-фенилпропанон-1, содержащий электронодонорные (алкильные) или электроноакцепторные (галогены) заместители в анилиновом фрагменте. Формулы тестируемых соединений группы А приведены в таблице 1.

Таблица 1. Соединения группы А

		Структурное ядро — 3-анилино-1-фенилпропанон-1	
		Шифр	Название
Шифр	Название	A6	3-(2-фторанилино)-1-фенилпропанон-1
A1	3-анилино-1-фенилпропанон-1	A7	3-(2-трифторметиланилино)-1-фенилпропанон-1
A2	1-фенил-3-(4-толуидино)-пропанон-1	A8	3-(3-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1
A3	3-(4-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1	A9	3-(3-нитроанилино)-1-фенилпропанон-1
A4	3-(4-броманилино)-1-фенилпропанон-1	A10	3-(2-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1-гидразон
A5	3-(4-йоданилино)-1-фенилпропанон-1	A11	3-(4-этиланилино)-1-фенилпропанон-1

Посредством прямой реакции комплексообразования с медью (II) нами были получены соединения группы В, представляющие собой медные комплексы производных анилина. Исследовалась также структура и индивидуальность полученных соединений (неопубликованные данные).

Основными измеряемыми показателями были: активность орнитиндекарбоксилазы (ОДК), а также скорость синтеза спермидина и спермина, осуществляемого с уча-

стием ферментов АдоМет-декарбоксилазы (АдоМетДК), спермидинсинтазы и сперминсинтазы. Для определения концентраций путресцина и полиаминов в биологических объектах использовался модифицированный метод с N,N-1-диметиламинонафталин-5-сульфохлоридом в качестве дериватизирующего агента, дающего устойчивые флуоресцирующие продукты с первичными и вторичными аминами [6, с. 46, 3, с. 77].

В экспериментах использовались белые беспородные крысы-самцы массой 100—130 г, содержащихся на стандартном рационе вивария РУДН со свободным доступом к воде. Парциальную гепатэктомию (около 70% ткани) выполняли по методике Higgins, Anderson [7, с. 186] под эфирной анестезией. Бесклеточные тест-системы представляли собой цитозольную фракцию (20 000 г 20 мин при 4°C) 33%-го гомогената регенерирующей печени с добавлением необходимых компонентов для проявления активности ОДК. Количество белка в пробах исследуемых тканей определяли по методу Lowry (1951) в модификации

С.П. Сяткина (1981)[3, с. 136].

Статистическая обработка результатов исследования была проведена с использованием пакета Statistica 7.0 (StatSoft, США). Различия между опытными и контрольными данными считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [1, с. 354].

Результаты. Сравнивали эффективность и характер действия указанных химических соединений на процесс образования исследуемых аминов. Результаты этих исследований представлены в табл. 2 и 3.

Таблица 2. Синтез путресцина и ПА на фоне действия веществ группы А

Шифр вещества	Активность ОДК, мккатал/кг	Эффект, %	Синтез спермидина, мккатал/кг	Эффект, %	Синтез спермина, мккатал/кг	Эффект, %
К инк	2,71±0,06		1,3±0,01		0,46±0,01*	
A1	1,19±0,02*	44	0,63±0,01*	48	0,33±0,01*	72
A2	1,20±0,02*	44	0,42±0,02*	32	0,26±0,02*	56
A3	2,33±0,05*	86	0,71±0,02*	55	0,42±0,02*	92
A4	1,53±0,05*	56	0,58±0,01*	45	0,31±0,02*	68
A5	1,50±0,04*	55	0,48±0,02*	37	0,27±0,01*	59
A6	0,92±0,05*	34	0,38±0,03*	30	0,26±0,05*	56
A7	2,03±0,05*	75	0,80±0,05*	62	0,41±0,01*	90
A8	1,54±0,01*	57	0,59±0,05*	46	0,33±0,05*	71
A9	1,30±0,01*	48	0,61±0,03*	47	0,32±0,05*	70
A10	1,12±0,17*	41	0,48±0,06*	37	0,29±0,05*	62
A11	1,10±0,02*	41	0,40±0,03*	31	0,25±0,05*	54

Примечания. Результаты представлены в виде среднего $M \pm m$ для 4 параллельных измерений. *) Отличие от контроля статистически достоверно ($p < 0,05$).

Таблица 3. Синтез путресцина и ПА на фоне действия веществ группы В

Шифр вещества	Активность ОДК, мккатал/кг	Эффект, %	Синтез спермидина, мккатал/кг	Эффект, %	Синтез спермина, мккатал/кг	Эффект, %
К инк	2,70±0,01		1,29±0,01		0,49±0,01	
B1	1,29±0,05*	48	0,47±0,01*	36	0,29±0,01*	59
B2	3,35±0,18*	124	2,12±0,02*	164	1,99±0,01*	405
B3	2,36±0,07*	87	1,13±0,03*	88	0,44±0,08*	89
B4	1,58±0,13*	59	0,73±0,01*	57	0,35±0,01*	71
B5	1,33±0,07*	49	0,64±0,01*	49	0,32±0,02*	64
B6	1,50±0,03*	56	0,67±0,03*	52	0,32±0,01*	66
B7	1,17±0,09*	43	0,44±0,03*	34	0,24±0,01*	50
B8	1,88±0,02*	70	0,65±0,02*	50	0,32±0,01*	66
B9	1,54±0,02*	57	0,69±0,01*	53	0,37±0,02*	75
B10	2,65±0,06*	98	1,28±0,01	99	0,58±0,02*	118
B11	3,35±0,08*	124	2,17±0,01*	168	1,74±0,02*	355

Примечания. Результаты представлены в виде среднего $M \pm m$ для 4 параллельных измерений. *) Отличие от контроля статистически достоверно ($p < 0,05$).

Все соединения группы А оказывали ингибирующее действие на синтез путресцина и полиаминов. Максимальное снижение скорости образования путресцина и спермидина наблюдалось в случае вещества А6 (*o*-фторзамещенное производное), скорости образования спермидина — в случае А11 (*p*-этилзамещенное соединение). В случае синтеза спермина максимальное торможение наблюдалось при действии вещества А11 — уровень синтеза составил 54% по сравнению с контролем. Вещества А2 и А11 — с электронодонорными заместителями (см. табл. 1) вызывали торможение синтеза до 56% от контроля. Для соединений группы В наблюдается следующая закономерность. Структуры В2 и В11 — медные комплексы с алкилзамещенными лигандами — вызывали резкое повышение синтеза путресцина и полиаминов, особенно

спермина — до 405 и 355% по сравнению с контролем соответственно. Соединения с электроноакцепторными заместителями, за исключением В10 (производное гидразина) вызывали заметное торможение синтеза аминов.

Обсуждение. ОДК является регуляторно экспрессируемым ферментом, активность которого может меняться за счет прямого взаимодействия тестируемого соединения с активным центром, аллостерически, за счет изменения уровня экспрессии, а также опосредованно через взаимодействие с антагонизмом ОДК. В данном случае ввиду сравнительно малого периода инкубации возможность реализации механизма изменения активности фермента за счет влияния на уровень его экспрессии следует исключить. Для более наглядного сравнения действия исходных соединений и их медных комплексов на процессы биосинтеза

путресцина и полиаминов нами были построены диаграммы (Рис. 1) процентного выражения эффекта действия тестируемых соединений. Из рисунка видно, что в целом степень торможения процессов биосинтеза всех трех аминов комплексами меньше по сравнению с индивидуальными галогензамещенными лигандами. Заметное исключение составляет соединение А7: ингибирование синтеза аминов в присутствии исходной структуры меньше, чем

в присутствии медного комплекса.

Таким образом, комплексы с алкилзамещенными лигандами – В2 и В11 – вызывают резкое усиление синтеза аминов. Структуры группы А могут обладать потенциальными антипролиферативными свойствами. Для более детального выяснения механизма действия тестируемых структур необходимы дальнейшие исследования.

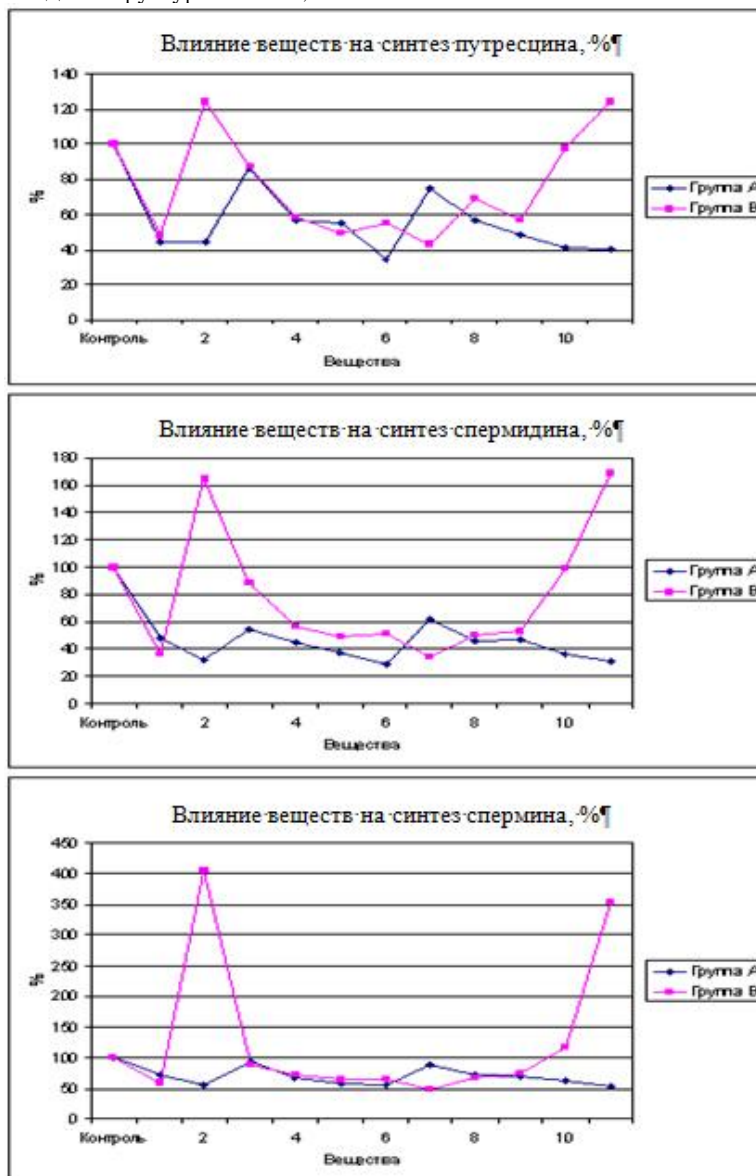


Рис. 1. Сравнительное действие соединений группы А (лигандов) и группы В (их медных комплексов) на скорость синтеза путресцина и полиаминов

Литература:

1. Афифи А., Эйзен С. Статистический анализ. Подход с использованием ЭВМ. — М.: Мир, 1982. — 488 с.
2. Волков С.В., Кутяков С.В., Левов А.Н., Полякова Е.И., Ань Ле Туан, Солдатова С.А., Терентьев П.Б., Солдатенков А.Т. Превращение 3-бензоил-1-метил-4-фенил- γ -пиперидола под действием ариламинов и арилгидразинов. Синтез 3-ариламино-1-оксо-1-фенилпропанов и 1,3-диарилпиразолов и их фрагментация под электронным ударом // ХГС – 2007. — № 4 — с. 544-554.
3. 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.
4. Сяткин С.П., Березов Т.Т., Гридина 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—8.
5. Arthi P., Haleel A., Srinivasan P., Prabhu D, Arulvasu C., Kalilur Rahiman A. Antibacterial, DNA interaction and cytotoxic activities of pendant-armed polyamine macrocyclic dinuclear nickel(II) and copper(II) complexes. // Spectroch. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc. 2014 Aug 14;129, - P. 400-414.



6. Ducros V., Ruffieux D., Belva-Besnet H., de Fraipont F., Berger F., Favier A. Determination of dansylated polyamines in red blood cells by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Analytical Biochemistry* 2009.-Nov.390 .-P. 46–51.
7. 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.
8. Nowotarski S. L., Woster P.M., Casero R.A. Jr. Polyamines and cancer: implications for chemotherapy and chemoprevention. // *Expert. Rev. Mol. Med.* 2013 Feb 22; p.15 - 29.