

УДК 577.1+547.7+616-006

ВЗАИМОСВЯЗЬ ИНГИБИТОРНОЙ АКТИВНОСТИ N-, S-СОДЕРЖАЩИХ ГЕТЕРОЦИКЛОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К NO-СИНТАЗАМ С ИХ РАДИОПРОТЕКТОРНЫМИ И АНТИЛЕЙКЕМИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

М.А. Орлова^{1,2*}, Т.П. Трофимова^{1,2}, С.В. Никулин², А.П. Орлов¹

¹кафедра радиохимии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова;
²Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева; *e-mail: orlova.radiochem@mail.ru)

Рассмотрено воздействие активатора и ингибиторов NO-синтазы (NOS) на клеточные лейкемические линии HL-60, K-562, MOLT-4 и на клетки костного мозга нелеченых пациентов с диагнозом острый В-лимфобластный лейкоз в сравнении с лимфоцитами здоровых доноров. Полученные данные о взаимосвязи радиопротекторных, NOS-ингибиторных и цитотоксических свойств ряда производных тиазина, тиазолина и тиомочевины свидетельствуют об условиях их потенциальной возможности использования в комплексной радиолучевой и химиотерапии.

Ключевые слова: острый лейкоз; производные тиазина, тиазолина, тиомочевины; ингибиторы NO-синтазы; радиопротекторы.

Процессы развития спонтанного и радиационно-индуцированного рака во многом схожи как по механизму развития, так и по клиническим проявлениям. Как правило, этот механизм включает усиление оксидативного стресса и перекисного окисления липидов, нарушение отклика p53 и процессов фосфорилирования, повреждение и/или истощение возможностей антиоксидантных систем, нарушение экспрессии транскрипционных факторов, активацию NF-κB и др. В ряде случаев одним из факторов является повышение экспрессии индуцибельной NO-синтазы и уровня NO. Безусловно, причины возникновения различных видов рака могут иметь специфическую инициацию (включая полиморфизм) и линии их усиления, однако все вышперечисленное присутствует в процессе их развития. Поскольку наиболее радиочувствительным процессом в организме является кроветворение, то воздействие радиации способствует прежде всего развитию различных лейкозов, т.е. нарушению пролиферации и дифференциации клеток крови. Высокая чувствительность гемопоэтических клеток к радиационным, про-оксидантным и другим лейкозогенным воздействиям связана с их морфологическими и энергетическими особенностями. При этом оксидативный стресс является необходимым условием для возникновения и развития лейкозогенеза, а способность лейкозных клеток продолжить прерванную в них дифференцировку объясняется возможностью дифференцировочных агентов прямо или косвенно влиять на уровень активных форм кислорода (АФК, ROS) и изменять

ROS-зависимую транскрипцию генов дифференцировки. Возможности антиоксидантной терапии отчасти подтверждают перекисно-кислородную концепцию лейкозогенеза [1].

В свою очередь, оксид азота являясь одной из важнейших сигнальных молекул, включен в систему активных оксидативных агентов. Кроме того, NO способен образовывать с супероксидрадикал-анионом пероксинитрит – один из наиболее сильных цитотоксических продуктов. Предполагается [2], что NO наряду с другими сигнальными молекулами может являться важным регулятором гомеостаза ранних предшественников кроветворения. Экспрессия различных изоформ NOS (индуцибельной (iNOS), эндотелиальной (eNOS) и нейрональной (nNOS)) обнаружена в костном мозге и клеточных элементах крови человека [3, 4]. Повышенная активность NO на начальном этапе кроветворения способствует появлению раковых стволовых клеток и возникновению канцерогенеза, что происходит при облучении организма ионизирующим излучением. Молекулы iNOS и NO включены в острый радиационный ответ [5], последствием которого является развитие лейкемии. Гиперэкспрессия iNOS наблюдается у пациентов с диагнозом острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) [6], а при ламинарном гемодинамическом ударе происходит активация eNOS (и ядерного фактора NF-κB – участника лейкозогенеза). Пероксид водорода (активный продукт радиолиза воды и оксидативный агент) также является посредником повышенной экспрессии eNOS [7]. На лимфоцитах

крови здоровых пациентов показано *in vitro* [8], что повышение уровня NO приводит к геномной нестабильности и увеличению риска развития рака и метастазирования.

Однако NO имеет двойственные про- и анти-апоптотические функции, проявление каждой из которых определяется его концентрацией и рядом биохимических процессов, связанных с изменением (нарушением) количества NO. Взаимосвязь этих функций пока не до конца понятна. В канцерогенезе видна серьезная роль повышенной регуляции транскрипционных факторов, связанных с уровнем экспрессии *iNOS*.

Очевидно, что если радиация вызывает повышение уровня NO (экспрессии NOS), то ингибиторы фермента должны являться радиопротекторами. Действительно, для ряда гетероциклических ингибиторов, содержащих атомы серы и азота, ранее была продемонстрирована ингибиторная активность к различным изоформам NOS [9]. Некоторые представители этих классов проявляли антиопухолевую и другую биологическую активность.

Возникает вопрос, существует ли взаимосвязь в цепочке ингибирование NOS – выживаемость лейкоэмических клеток разных типов – радиопротекторные свойства веществ. Если такая взаимосвязь существует, то как ее можно прогнозировать. Мы рассмотрели этот вопрос на примере гетероциклических производных тиомочевины, которая является алифатическим предшественником пяти и шестичленных гетероциклов, содержащих атомы азота и серы.

Материалы и методы

В настоящей работе синтезированы производные 2-амино-5,6-дигидро-4Н-1,3-тиазина (I), 2-амино-2-тиазолина (II) и тиомочевины (III) (рис. 1, табл. 1). Методы синтеза описаны ранее [10–13]. Состав и структуру препаратов проверяли методами элементного анализа, а также ЯМР ¹H и ¹³C. Выбор препаратов обусловлен различной NOS-ингибирующей активностью [14], чтобы

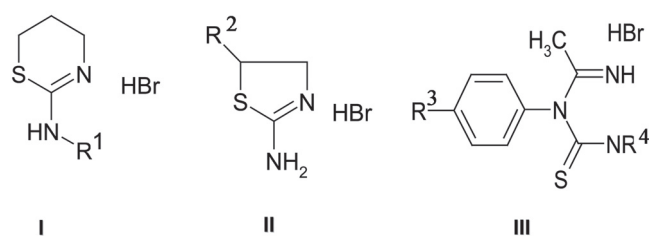


Рис. 1. Производные гидробромидов 2-амино-5,6-4Н-1,3-тиазина (I), 2-амино-2-тиазолина (II) и тиомочевины (III)

создать цепочку разного уровня ингибирования фермента (активатор NOS – инертный препарат (по *iNOS*) – ингибиторы NOS) с увеличивающейся степенью ингибирования.

В настоящей работе использовали клеточные линии HL-60 (человеческие промиелоцитарные лейкозные клетки), K-562 (линия хронического миелоидного лейкоза) и MOLT-4 (клеточная линия человеческого острого Т-лимфобластного лейкоза), культивируемые стандартным способом, а также клетки костного мозга пациентов (в возрасте 4–16 лет) до начала химиотерапии при поставленном диагнозе острый В-лимфобластный лейкоз (далее В-ОЛЛ). Забор крови доноров и подготовку клеточного материала проводили согласно описанной ранее методике [15]. Для контроля использовали лимфоциты здоровых доноров того же возрастного диапазона. Во всех случаях гематологическое исследование показывало содержание бластных клеток в мононуклеарной фракции >80%.

Определение выживаемости клеток проводили методом МТТ в модификации [16]. Выборка составляла не менее 10 образцов для каждого случая. Результаты обрабатывали методом U-теста Манна–Уитни ($p < 0,05$). Значение LC₅₀ оценивали по медиане и *t*-статистике Стьюдента.

Значения ингибирующей активности соединений *in vitro* взяты из литературных данных [9]. Эксперименты *in vivo* проводили по методике Ванина, используя метод спектроскопии ЭПР со спиновой ловушкой [17], в качестве которой применяли Fe²⁺-диэтилдитиокарбаматный комплекс (Fe²⁺(DETC)₂). Спектры ЭПР регистрировали при 77 К на приборе фирмы «Bruker» (модель ESP-300E). Результаты измерений содержания NO в печени выражались как отношение амплитуды ЭПР-сигнала комплекса NO–Fe²⁺–(DETC)₂ в образцах печени мышей, подвергшихся воздействию липополисахаридов (LPS)+вещество, к амплитуде сигнала в образцах печени мышей, обработанных только LPS. Таким образом, измеряемая величина NO *in vivo* относится к остаточной (после ингибирования) продукции общего пула NOS, т.е. всех изоформ фермента.

Результаты и их обсуждение

В табл. 1 приведены данные по выживаемости различных типов лейкоэмических клеток по сравнению с клетками здоровых доноров под действием эффикторов NOS в ряду уменьшения силы вводимого ингибитора. Взаимосвязь NOS-активности (*in vivo*) соединений и выживаемости клеток пациентов с В-ОЛЛ представлена на рис. 2. Видно, что существует зависимость

Т а б л и ц а 1

Зависимость выживания клеток (LC_{50}) в зависимости от ингибиторной активности по отношению к NO-синтазам вводимых соединений (*in vitro* и *in vivo*)

Номер соединения	Соединение	Ингибиторная активность, %		здоровые доноры	LC_{50} , мкмоль/мл			
		<i>in vitro</i> * (лит. данные)	<i>in vivo</i> **, остаточный NO		В-ОЛЛ	НЛ-60	К-562	МOLT-4
1	III ($R^3 = iC_3H_7$; $R^4 = C_5H_{10}$)	слабый активатор	активатор, 170±10	0,5±0,2	0,05±0,02	0,11±0,03	0,14±0,05	0,10±0,03
2	I ($R^1 = C_6H_4F$)	–	80±20	2,6±0,9	1,5±0,3	0,5±0,2	0,8±0,3	1,1±0,3
3	II, III ($R^3 = CH_3$; $R^4 = C_4H_8$)	<i>i</i> NOS: 0 <i>n</i> NOS: 0	20±4	2,0±0,4	1,5±0,3	1,0±0,2	3,2±0,5	2,0±0,6
4	I ($R^1 = C_{12}H_{25}$)	<i>i</i> NOS: 3±1 <i>n</i> NOS: 58±4	15±4	0,04±0,01	0,004±0,001	0,33±0,09	2,50±0,5	1,5±0,4
5	I, II ($R^2 = CH_2OH$)	–	11±3	8,0±2,1	4,5±0,9	0,4±0,1	11±4	5,0±1,5
6	II, III ($R^3 = iC_3H_7$; $R^4 = C_2H_6$)	<i>i</i> NOS: 2,0±0,5 <i>n</i> NOS: 25±5	10±3	3,0±0,5	0,3±0,1	–	–	–
7	I ($R^1 = H$, пропивонон – Sal)	–	6±2	10±2	2,4±0,5	0,5±0,2	1,6±0,2	1,3±0,3
8	II ($R^2 = CH_3$)	<i>i</i> NOS: 90±5	5±2	15±3	1,9±0,5	1,1±0,4	2,2±0,7	2,0±0,5
9	I ($R^1 = H$)	<i>i</i> NOS: 68±7 <i>n</i> NOS: 66±6	3±1	13±3	4,3±0,5	1,0±0,2	15,5±5,5	2,8±0,2
10	I ($R^1 = COC_6H_5$)	<i>i</i> NOS: 92±9 <i>n</i> NOS: 88±7	3±1	10,6±2,3	0,9±0,3	0,5±0,2	1,0±0,3	1,2±0,4

*А (фермент нативный) – А (фермент в присутствии препарата); ** по отношению к NO в печени контрольных мышей (%); при дозе препарата 10 мкмоль/кг, Sal – салицилат-ион.

между ингибированием NO-продукции и выживаемостью лейкоэмических клеток, различная для разных типов лейкозов.

Наибольшей цитотоксичностью обладает активатор NOS, при этом цитотоксичность по отношению к лейкоэмическим клеткам выше в 4–10 раз для всех изученных. Самая высокая цитотоксичность и терапевтический индекс $TI = LC_{50}$ (для здоровых клеток) / LC_{50} (для лейкоэмических клеток) наблюдались для клеток В-ОЛЛ.

Кривая зависимости выживаемости (LC_{50}) клеток здоровых доноров от уровня ингибирования NOS *in vivo* (рис. 2) имеет повышение при переходе от активатора к ингибиторам и не меняется примерно до уровня ингибирования 80% (LC_{50} на уровне ~2 мкмоль/мл). Дальнейшее понижение количества NO (на уровне ингибирования NOS от 80 до 90%) вызывает резкий рост выживаемости. Далее величина LC_{50} практически не меняется (в пределах ошибки) на новом более высоком уровне (~10 мкмоль/мл). Наблюдаются два исключения – соединения 4 и 6. Соединение 4 имеет длинный гидрофобный «хвост» и, как показало исследование методом динамического рассеяния, образует в растворе наночастицы от 10 до 100 нм, которые циклически меняют свой размер в зависимости от времени стояния

раствора. Включение этого соединения в рассматриваемую зависимость невозможно из-за значительно большей токсичности по отношению к здоровым клеткам. Соединение 6 имеет две особенности: 1) очень низкий процент ингибирования *iNOS in vitro*, что свидетельствует о его более высокой ингибирующей способности по отношению к *eNOS (in vivo)*; 2) является радиосенсибилизатором (табл. 2), т.е. оказывает противоположное влияние на продукты оксидативного стресса (или это влияние отсутствует).

При строго определенном уменьшении количества NO (~85–89% ингибирования *iNOS*) происходит резкая (триггерная) смена механизма его воздействия на здоровые клетки, поведение которых после скачка мало зависит от концентрации NO (в пределах ошибки измерения) на новом более высоком уровне выживаемости. Таким образом, здоровые клетки имеют систему ответа на увеличение и уменьшение концентрации NO. Эту систему ответа можно сравнить с буферной системой, при «отказе» которой при строго определенной концентрации NO выживаемость клеток «перескакивает» на новый более высокий уровень.

В случае клеток пациентов с В-ОЛЛ кривая их выживаемости качественно совпадает с зависимостью, наблюдаемой для здоровых клеток, до

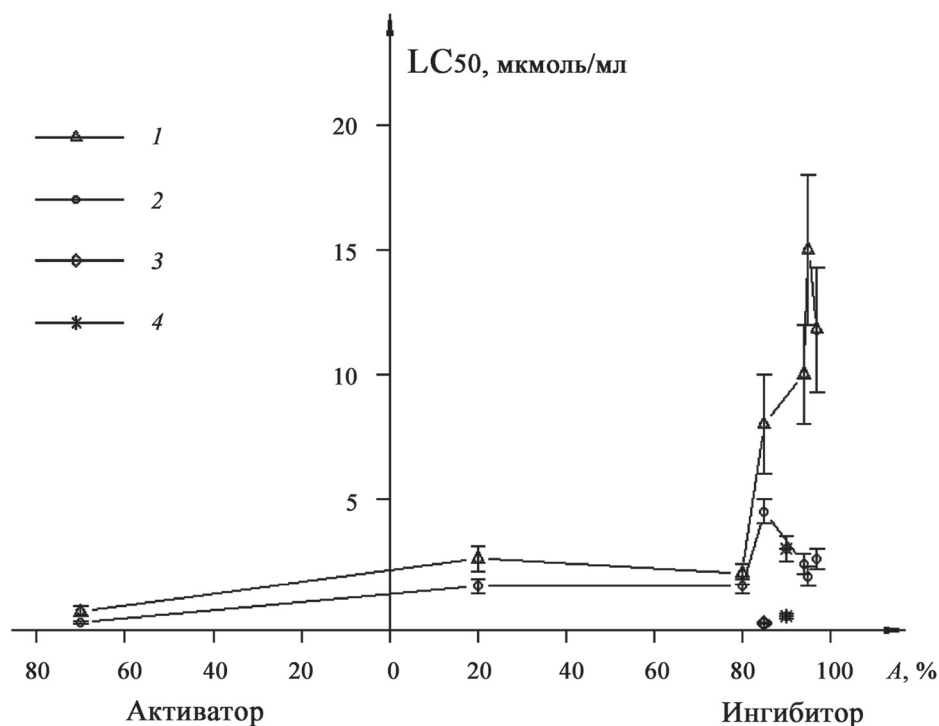


Рис. 2. Зависимость выживаемости (LC_{50}) здоровых (1) и лейкоэмических (2) клеток от NOS-ингибиторной активности вводимых соединений. Активатор – слева, а ингибиторы – справа от вертикальной оси; 3 – соединение 4 (образует наночастицы), 4 – соединение 6 (радиосенсибилизатор)

Т а б л и ц а 2

Корреляция радиопротекторных, цитотоксических и NOS-ингибиторных свойств на примере представителей изученных классов соединений

Номер соединения	ФИД	Ингибиторная активность к <i>i</i> NOS, <i>in vitro</i> % (лит. данные) / <i>in vivo</i> (ко всем NOS)	ТИ* = LC ₅₀ (здоровые доноры) / LC ₅₀ (лейкемические клетки, В-ОЛЛ)
6	~0,8	2/90	3,0/0,3 = 10
3	1,0	0/80	2,0/1,5 = 1,3
9	1,3 [21]	68/97	13/4,3 = 3
8	1,3 [21]	90/95	15/1,9 = 7,9
10	1,5	92/97	10,6/0,9 = 11,8

О б о з н а ч е н и я. ТИ – терапевтический индекс, ФИД – фактор изменения дозы.

80%-го уровня ингибирования NOS, однако количественно цитотоксичность по отношению к лейкоцидным клеткам немного выше (примерно в 1,5–2,0 раза). Далее, как и для здоровых клеток, наблюдается скачок роста выживаемости, но с последующим возвращением на предыдущий уровень, когда NOS-ингибирование становится выше 90%. Аналогичная закономерность, близкая и количественно, наблюдается для клеточной линии MOLT-4 (Т-ОЛЛ). В то же время для клеточной линии хронического миелолейкоза К-562 явной зависимости выживаемости от ингибирования NOS не наблюдается, более того, ряд веществ вызывает значительный рост выживаемости этих лейкоцидных клеток.

Сила ингибиторов NOS практически не оказывает влияния на клеточную линию HL-60 (за исключением активатора NOS), однако терапевтические индексы в этом случае были наиболее высокими и достигали 20. Известно, что действие цитокинов как провоспалительных стимулов на производство NO для клеток HL-60 отличается от действия в случае К-562 и MOLT-4 [18].

Аспирин, салицилаты и их производные в последнее время активно испытывают в качестве антилейкемических препаратов, в частности, и в детской онкологии [19, 20]. Однако замена в противоопухольевой гидробромида на салицилат (соединение 7) не показала увеличения цитотоксичности. Использование салицилатов требует отдельного изучения.

Сравнение NOS-ингибиторных и антилейкемических (к клеткам В-ОЛЛ) свойств соединений с их радиомодифицирующим действием (табл. 2) показало некоторую корреляцию ТИ с увеличением радиопротекторной активности. В том случае, когда величины ФИД были равны (соединения 8

и 9), ТИ увеличивался с ростом ингибирования *i*NOS. Радиосенсибилизатор (соединение 6) и соединение 3 (не являющееся радиомодификатором) одинаково воздействуют на здоровые клетки, но ТИ для них различается в 10 раз за счет большей цитотоксичности радиосенсибилизатора к клеткам В-ОЛЛ.

Вызывают некоторое удивление данные для соединения 5 (89% NOS-ингибирования). В этом случае для всех клеток, исключая клетки здоровых доноров и клеточную линию HL-60, наблюдался рост (пик различной величины) LC₅₀. Это можно объяснить специфическими свойствами данного препарата, действие которого для лейкоцидных клеток является более сильным, чем влияние NO. Однако кажется более вероятным, что именно в этой области величин уровня ингибирования, т.е. при созданной ингибитором строго определенной концентрации NO, происходит пересечение (перехлест) противоположных механизмов воздействия NO (про- и антиапоптотических), и это может приводить к нестабильности результатов, которые начинают зависеть от специфических свойств соединений, воздействующих на лейкозные клетки.

Таким образом, увеличение силы радиопротектора, как и рост активности NOS-ингибитора, способствуют повышению ТИ при действии на раковые клетки пациентов с В-ОЛЛ. Это значит, что роль оксидативного стресса, являющегося одной из основных мишеней радиопротекторов, и ER-стресса, возникающего вследствие воздействия NO (NOS), может корректироваться представителями классов тиазин-тиазолинов и тиомочевин с различными параметрами ФИД и NOS-ингибирующей активности. Эти вещества могут быть полезными в комплексной терапии при радиолучевой и химиотерапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лю Б.Н. // Успехи современной биологии. 2003. Т. 123. № 2. С. 147
2. Lara-Padilla E., Caceres-Cortes J.R. // Curr. Stem Cell Res. Therapy. 2012. Vol. 7. N 1. P. 26.
3. Титова И.В., Сергеев В.Г., Ярилин А.А., Актаев И.Г. // Бюл. эксп. биол. мед. 2002. Т. 134. С. 407.
4. Wallerath T., Gath I., Aulizky W.E. // Thromb. Haemost. 1997. Vol. 77. P. 163.
5. Chi C., Ozawa T., Anzai K. // Biol. Pharm. Bull. 2006. Vol. 29. N 2. P. 348.
6. Brandao M.M., Soares E., Salles T., Saad S. // Acta Haematol. 2000. Vol. 106. P. 95.
7. Cai H., McNally J.S., Weber M., Harrison D.G. // J. Mol. Cell Cardiol. 2004. Vol. 37. P. 121.
8. Михайленко В.М., Демина Е.А., Мусалов И.И., Геращенко В.И. // Экспер. онкология. 2013. Т. 35. № 1. С. 58.
9. Конопляников А.Г., Проскуряков С.Я., Штейн Н.В., Кучеренко Н.Г., Скворцов В.Г., Иванников А.И., Конопляников М.А., Верховский Ю.Г. // Бюл. эксп. биол. мед. 1999. Т. 127. С. 590.
10. Proshin A.N., Trofimova T.P., Bachurin S.O. // Russ. Chem. Bull. 2011. Vol. 60. P. 2432.
11. Schoberl A., Magosch K.H. // Liebigs Ann. Chem. 1970. Vol. 742. P. 74.
12. Trofimova T.P., Zefirova O.N., Mandrugina A.A., Fedoseev V.M., Peregud D.I., Onufriev M.N., Gulyaeva N.V., Proskuryakov S.Ya. // Mosc. Univ. Chem. Bull. 2008. Vol. 63. P. 274.
13. Трофимова Т.П., Пушин А.Н., Сташ А.И., Мандругин А.А., Федосеев В.М., Проскуряков С.Я. // Химия гетероциклич. соед. 2007. Т. 43. № 3. С. 370.
14. Levtsova A.A., Chupakhin V.I., Proshin A.N., Pushin A.N., Trofimova T.P., Zefirova O.N. // Mosc. Univ. Chem. Bull. 2007. Vol. 62. N 5. P. 243.
15. Orlova M.A., Osipova E.Yu., Roumiantsev S.A. // Br. J. Med. Med. Res. 2012. Vol. 2. N 1. P. 21.
16. Veerman A.J., Pieters R. // Br. J. Haematol. 1990. Vol. 74. P. 381.
17. Stone J.R., Sands R.H., Dunham W.R., Marletta M.A. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1995. Vol. 207. P. 575.
18. Siripin D., Fucharoen S., Tanyong D.I. // Asian Pac. J. Allergy Immunol. 2011. Vol. 29. P. 102.
19. Rana K., Reinhart-King C.A., King M.R. // Mol. Pharm. 2012. Vol. 9. P. 2219.
20. Morgan G. // Med. Hypotheses. 2005. Vol. 64. P. 661
21. Куна П. // Химическая радиозащита. М., 1989.

Поступила в редакцию 01.12.15

THE RELATIONSHIP BETWEEN NO-SYNTHASE INHIBITORY ACTIVITY OF N-, S- CONTAINING HETEROCYCLES WITH THEIR RADIOPROTECTIVE AND ANTILEUKEMIC PROPERTIES

M.A. Orlova^{1,2*}, T.P. Trofimova^{1,2}, S.V. Nikulin², A.P. Orlov¹

¹*M.V. Lomonosov Moscow State University, Department of Chemistry, Division of Radiochemistry;* ²*D. Rogachev Federal Scientific Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; *e-mail: orlova.radiochem@mail.ru*

The impact of NO-synthase (NOS) inhibitors, and activator for leukemic cell line HL-60, K-562, MOLT-4 and bone marrow cells of untreated patients diagnosed with acute B-lymphoblastic leukemia, compared with lymphocytes from healthy donors was examined. The data about the relationship of radioprotective, NOS-inhibitory and cytotoxic properties of a number of derivatives of thiazine, thiazoline and thiourea testify about the possibility of their potential use as agents for complex radio- and chemotherapy.

Key words: acute leukemia; derivatives of thiazoline, thiazine and thiourea; NO-synthase inhibitors, radioprotectors.

Сведения об авторах: Орлова Марина Алексеевна – вед. науч. сотр. кафедры радиохимии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, зав. отделением биохимии и фармакологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава РФ, докт. хим. наук (*orlova.radiochem@mail.ru*); Трофимова Татьяна Петровна – ст. науч. сотр. кафедры радиохимии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, ст. науч. сотр. лаборатории биохимии и энзимологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава РФ, канд. хим. наук (*trptrof@mail.ru*); Никулин Сергей Вячеславович – аспирант Московского физико-технического института, лаборант лаборатории биохимии и энзимологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева Минздрава РФ (*brazor@inbox.ru*); Орлов Алексей Павлович – ст. науч. сотр. Федерального научного центра экспертиз средств медицинского применения Минздрава РФ, мл. науч. сотр. кафедры радиохимии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (*vinnu_@mail.ru*).