
22-23 СЕНТЯБРЯ 1997 ГОДА В НОВОСИБИРСКЕ
СОСТОЯЛАСЬ ОБЪЕДИНЕННАЯ НАУЧНАЯ 11
(XXXIV) СЕССИЯ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ И
ОТДЕЛЕНИЯ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ МЕДИЦИНСКИХ НАУК
“ПРОБЛЕМЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ И
БИОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ”.

НА 4 ЗАСЕДАНИЯХ БЫЛИ ОБСУЖДЕНЫ
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ НОРМАЛЬНОЙ
ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ И ПАТОЛОГИИ,
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ
БИОЛОГИИ, БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ В
СОЗДАНИИ НОВЫХ МЕДИЦИНСКИХ ПРЕПАРАТОВ
И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, А ТАКЖЕ
ПРОБЛЕМЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ.

*В ПРЕДЛАГАЕМОМ ВАШЕМУ ВНИМАНИЮ НОМЕРЕ
ЖУРНАЛА ПРЕДСТАВЛЕНЫ СООБЩЕНИЯ, ЗАЯВЛЕННЫЕ
АВТОРАМИ ДЛЯ ДОКЛАДА НА СЕССИИ.*

©Т.Т. Березов, Т.В. Федорончук
УДК 615. 255. 577. 172. 11. 017.615. 27731. 074.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСНОВЫ ПРИМЕНЕНИЯ АНАЛОГОВ ПОЛИАМИНОВ – ИНГИБИТОРОВ ФЕРМЕНТОВ СИНТЕЗА ПОЛИАМИНОВ

Т.Т. БЕРЕЗОВ, Т.В. ФЕДОРОНЧУК

Российский Университет дружбы народов, Институт общей и клинической патологии при РУДН, Москва
117198 ул. Миклухо-Маклая 8

В работе представлены физиологические особенности метаболизма полиаминов и современные достижения научных исследований, касающихся молекулярных основ применения ингибиторов биосинтеза полиаминов, как потенциальных терапевтических средств при лечении разнообразных болезней, связанных с нарушением клеточной пролиферации, включая раковые поражения.

Ключевые слова: метаболизм полиаминов, ингибиторы биосинтеза полиаминов, орнитиндекарбоксилаза, полиаминоксидаза.

Важная биологическая роль природных полиаминов – путресцина, спермидина и спермина в процессах клеточного роста в норме и в развитии патологии является предметом пристального внимания и основой интенсивного исследования метаболизма полиаминов [22,23]. Несмотря на многочисленные, опубликованные в научной литературе данные по указанной проблеме, тонкие молекулярные механизмы, лежащие в основе функционирования полиаминов в клеточной физиологии, все еще остаются до конца невыясненными. Тем не менее, система биосинтеза полиаминов на сегодня является привлекательной мишенью и служит основой для конструирования синтетических аналогов полиаминов и ингибиторов полиамин-синтезирующих ферментов, наделенных антипролиферативным и противопаразитарным действием [10,22,25].

В данной работе представлены физиологические особенности метаболизма полиаминов и современные достижения научных исследований, касающихся молекулярных основ применения ингибиторов биосинтеза полиаминов как потенциальных терапевтических средств при лечении разнообразных болезней, связанных с нарушением клеточной пролиферации, включая раковые поражения.

I НЕКОТОРЫЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ОСОБЕННОСТИ МЕТАБОЛИЗМА ПОЛИАМИНОВ.

Полиамины (рис.1) – широко распространены в живой природе и обнаружены во всех клетках млекопитающих, в том числе и в клетках опухолей. Они жизненно необходимы для роста и деления клетки, и выполняют важные физиологические функции. Однако избыток их накопления оказывается токсичным для самой клетки. Поэтому, механизм их биосинтеза, как и регуляция функционирования системы синтеза полиаминов (рис.2) существенно отличаются от ряда других механизмов клеточных систем синтеза низкомолекулярных веществ.

Поликатионный характер молекул полиаминов обеспечивает их агрегацию с элементами клеточных структур (мембраны, рибосомы, нуклеиновые кислоты), что также являясь одним из механизмов регуляции обмена полиаминов, соответственно ингибирования их синтеза по типу обратной связи [15,28].



Рис.1 Химическая структура природных полиаминов

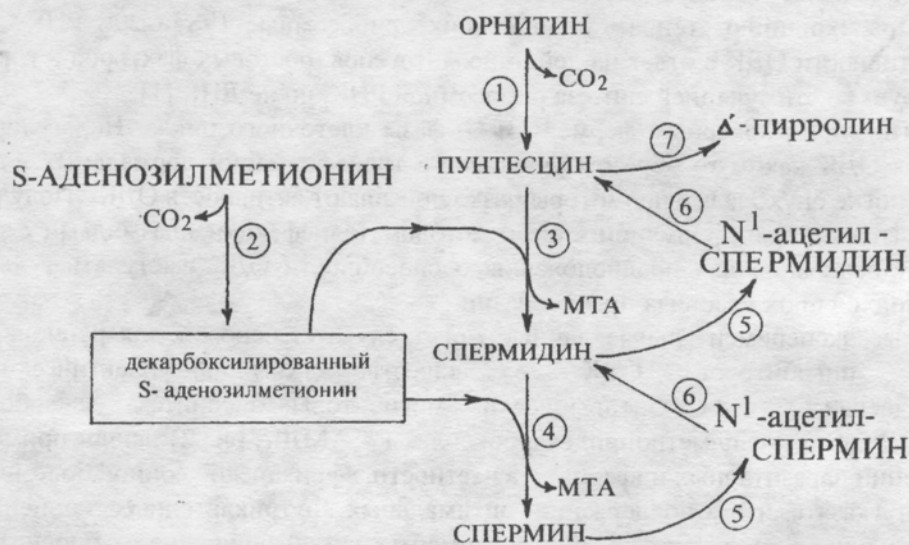


Рис 2 Система синтеза и катаболизма полиаминов. Цифрами обозначены ферменты: 1- орнитиндекарбоксилаза, 2- аденозилметиониндекарбоксилаза, 3-спермидинсинтаза, 4-сперминсинтаза 5-спермидин / спермин-1-ацетилтрансфераза /ПАО/, 6-полиаминоксидаза /ПАО/, 7- диаминоксидаза.

Условные сокращения: МТА - метилтиоаденозин

Внутриклеточные биологические функции полиаминов весьма разнообразны: они обеспечивают стабилизацию плазматических мембран и суперспиральной структуры ДНК, защиту ДНК от действия нуклеаз, стабилизацию репликативной вилки ДНК, стимуляцию транскрипции, метилирование РНК и связывание ее с рибосомами, активацию ДНК-лигаз, эндонуклеаз, протеинкиназ, угнетение Na,K-АТФазы, и многие другие клеточные процессы[23,25].

Усиленный синтез полиаминов, наблюдаемый в процессе нормальной пролиферации, деления и роста клетки, а также в клетках с патологическим ростом, и оказываемый ими

токсический эффект требуют тонкого контроля за накоплением полиаминов и избавлением от их избытка. Полученные в последнее время данные о существовании специфической мембранной системы транспорта полиаминов [9] дают основание предполагать о наличии специфического тонкого механизма регуляции внутриклеточного уровня полиаминов.

Одним из подробно изученных катализаторов обмена полиаминов является орнитиндекарбоксилаза (ОДК), считающаяся ключевым ферментом синтеза полиаминов. Активность фермента подвержена специфической регуляции на уровне как транскрипции, так и пост-транскрипции в соответствии со стадиями роста клетки и концентрацией внутриклеточных полиаминов. ОДК является индуцибельным ферментом с коротким периодом (10 – 20 минут) полужизни.

Еще в ранних исследованиях было показано, что продукт реакции декарбоксилирования орнитина – путресцин является сильным ингибитором активности фермента [11]. В настоящее время получены доказательства, что механизм угнетающего действия путресцина на фермент основан на индукции синтеза белка-ингибитора с молекулярной массой 26000, названного антиферментом ОДК – "антизимом". Антизим наделен высоким сродством к ферменту и прочно связывается с ОДК, вызывая ее инактивацию. Этот белок оказался протеинкиназой, вызывающей фосфорилирование ОДК. Комплекс ОДК-антизим обладает высоким сродством к рибосомной ДНК ядрышка и стимулирует транскрипцию генов, кодирующих рибосомные 19S и 29S РНК [1,22]. Повышение активности ОДК в ответ на действие митогенов, ростовых факторов и гормонов тесно коррелирует со стимуляцией синтеза рибосомной РНК, но не ДНК [1].

ОДК относят к маркерным ферментам G₁-фазы клеточного цикла. Нерегулируемая сверхпродукция ОДК каким-то образом участвует в трансформации нормальных клеток в опухолевые. Многие опухолевые промоторы резко повышают активность ОДК. Полученные результаты опытов по трансформации клеток методом трансфекции плазмидами с генами ОДК [26] дают основание для предположения о способности ОДК выступать в качестве онкогена при подходящих условиях пренеоплазии.

Подобные экспериментальные данные могут служить основой для рационального использования ингибиторов ОДК в качестве химиопрофилактических и антинеопластических агентов. Специфические ингибиторы биосинтеза декарбоксилаз полиаминов (ОДК и аденозилметиониндекарбоксилазы – АМДК, рис.2) нашли применение также при лечении паразитарных инфекций, в частности, африканской сонной болезни [20].

Следует указать, что в поддержании оптимальных внутриклеточных концентраций полиаминов большую роль играют не только ферменты, катализирующие их биосинтез, но и ферменты катаболизма: спермидин/спермин-N-ацетилтрансфераза (САТ), диаминооксидаза (ДАО) и полиаминооксидаза (ПАО) [24]. Однако, здесь есть некоторые особенности.

Супериндукция САТ, фермента с коротким временем полужизни, сопровождается быстрым ответом клетки на широкий ряд трофных и стрессовых агентов, а также на действие избыточных концентраций полиаминов [13,16]. Ацетилированные полиамины затем окисляются флаavin-зависимым ферментом – полиаминооксидазой (ПАО) с образованием соответствующих полиаминов (Рис.2) и продуктов окисления H₂O₂ и ацетамидопропаналя [23].

В отличие от ключевых ферментов биосинтеза полиаминов экспрессия ПАО, фермента с широкой субстратной специфичностью, в нормальных клетках выражена в постоянно высоком внутриклеточном уровне [8]. Имеющиеся по этим ферментам данные свидетельствуют о том, что в разных видах неоплазий активности ферментов резко различаются. Многие линии опухолевых клеток человека (например, MCF7 – рак молочной железы; HeLa – цервикальный рак; Sultan – миелома) лишены активности ПАО полностью; другие линии опухолевых клеток (D54 – глиобластома; A549 – рак легких; C8146C – меланома), напротив, сохраняют активность ПАО на достаточно высоких уровнях,

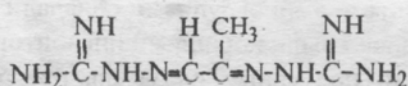
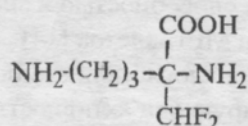
несмотря на большую потребность опухолевых клеток в полиаминах [12,18]. Подобные изменения в катаболизме полиаминов связаны, вероятнее всего, с особенностями самого процесса злокачественной трансформации клеток.

Многочисленные данные литературы [24,29] указывают на необходимость применения ингибиторов ПАО с целью подавления пролиферации опухолей в тех случаях, когда отмечается высокая экспрессия ПАО в опухолевых клетках; с другой стороны, оправданы попытки применения ингибиторов синтеза полиаминов, способных активировать ПАО, если экспрессия этого фермента угнетена. Об успешном применении ингибиторов ПАО как с целью подавления опухолевого роста, так и лечения ряда паразитарных болезней (например, малярии) свидетельствуют результаты, полученные Bitonti и сотр. [7,8].

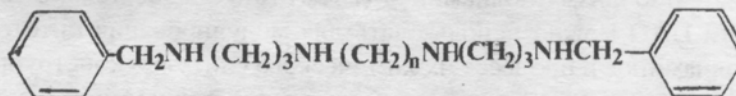
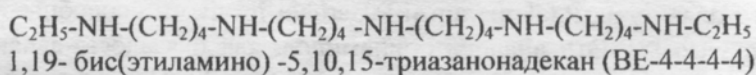
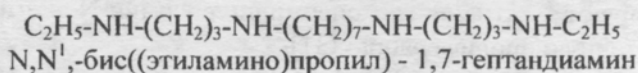
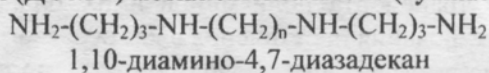
II АНАЛОГИ ПОЛИАМИНОВ КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ АГЕНТЫ

К настоящему времени изучен достаточно широкий ряд химически синтезированных ингибиторов биосинтеза полиаминов. Среди них в последнее время повышенный интерес вызывают аналоги полиаминов, поглощаемые клеткой посредством активной системы транспорта полиаминов [19,23,25].

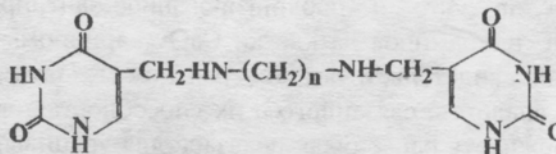
В отличие от классических ингибиторов синтеза полиаминов α -дифторметилорнитина (ДФМО) и метилглиоксаль-бис (гуанилгидразона) (МГБГ) (рис.3),



α -дифторметилорнитин (ДФМО) метилглиоксаль-бис (гуанилгидразон) (МГБГ)



бис (бензол)- аналоги полиаминов



бис ((урацилин) метилен)-диамины

Рис 3. Некоторые ингибиторы и аналоги полиаминов, как ингибиторы биосинтеза полиаминов

только ингибируют ферменты биосинтеза полиаминов, но еще и конкурируют с природными полиаминами за специфические участки связывания с последующим взаимодействием с белковой макромолекулой [6]. Для аналогов, отдаленно напоминающих структуру полиаминов, существует огромное множество дополнительных участков их связывания, иногда не имеющих отношения к природным полиаминам [5]. Замещая полиамины в участках связывания, аналоги полиаминов могут взаимодействовать с макромолекулами (ДНК, РНК) и, таким образом, влиять на функции макромолекул, что впоследствии может привести к ингибированию клеточной пролиферации [23].

Изучение различных аналогов, способных выполнять специфические функции полиаминов, выявило существование определенных закономерностей связи между структурой и функцией [10].

Терминальные аминогруппы аналогов необходимы для попадания их в клетку посредством системы транспорта полиаминов и проявления ими свойств природных полиаминов [27]. Следовательно, аналоги полиаминов с модифицированными терминальными аминогруппами могут вызывать значительное снижение пула клеточных полиаминов и активности ферментов биосинтеза полиаминов с последующим ингибированием клеточного роста, так как подобные аналоги полиаминов не способны выполнять необходимые функции природных полиаминов для процесса клеточной пролиферации. В частности, аналоги со свободными терминальными аминогруппами (различные поликатионы) оказывали индуцирующее влияние на синтез гемоглобина в клетках MEL эритролейкемии грызунов. В то же время, аналоги полиаминов с этилированными терминальными аминогруппами обладали подобной способностью в значительно меньшей степени, однако были хорошими ингибиторами роста MEL-клеток [14].

В ряде исследований получены доказательства того, что аналоги полиаминов с модификациями терминальных аминогрупп наделены антипролиферирующей активностью и являются потенциальными противоопухолевыми агентами. Они попадают в клетку посредством системы транспорта полиаминов и их терапевтический эффект не требует предварительного блокирования поступления в клетку экзогенных полиаминов [20].

Различные бис(этил)-аналоги полиаминов с противоопухолевыми свойствами (Рис.3) индуцируют активность спермидин/спермин-N-ацетилтрансферазы (САТ) и ингибируют клеточную пролиферацию [31].

Обнаружено, что бис(бензил)-аналоги полиаминов (Рис.3) ингибируют рост малярийного плазмодия *P.falciparum* и *P.Berqhei* *in vivo* и способны тормозить рост клеток гепатомы *in vitro* [7]. Эти аналоги полиаминов, как оказалось, являются субстратами для полиаминоксидазы катаболизма полиаминов (ПАО) [8]. Следовательно, знания о субстратной специфичности ПАО можно использовать для модулирования цитотоксической активности аналогов полиаминов в процессе их химического синтеза и конструирования [24].

В нашей лаборатории изучались аналоги полиаминов, модифицированные азотистыми основаниями (Рис.3). Выявлено их ингибирующее действие на синтез полиаминов в опытах *in vitro* и пролонгированное антипролиферативное действие бис(урацилил)-аналогов полиаминов на клетки СаОv карциномы яичника человека [3,43]. Результаты исследования свидетельствуют о вероятном механизме антипролиферативного действия испытанных аналогов, связанного с их способностью взаимодействовать с ДНК генома. Подобная возможность ранее была показана для урацильных производных сходной структуры и отмечено их противоопухолевое действие [23].

Результаты исследований влияния аналогов полиаминов на рост и пролиферацию опухолевых клеток в культуре приводят к выводу, что аналоги полиаминов с высоким сродством к ДНК могут иметь определенные антипролиферативные свойства [53]. Такие аналоги составили новый класс ингибиторов пролиферации опухолевых клеток с особым

Таблица №1

Значение изучения особенностей метаболизма полиаминов для практических целей

Фактор	Свойство	Практическое применение
ОДК	Главный ключевой фермент биосинтеза полиаминов; онкоген при подходящих пренеопластических условиях	Ингибиторы ОДК как противоопухолевые средства; Ингибиторы ОДК как химиопрофилактические агенты, например дифлюорометилорнитин
ПАО	Регулятор уровня полиаминов; экспрессия ПАО в некоторых типах опухолей	Моделирование цитотоксичности аналогов и гомологов полиаминов с терапевтическими целями
Аналоги полиаминов	Пролонгированное действие	Сопутствующее терапевтическое средство при лучевой терапии
	Модифицированы терминальные амино-группы	Малотоксичные антипролиферативные агенты; противоопухолевые агенты; агенты для лечения паразитарных заболеваний
	Моделирование алифатического скелета молекулы полиамина (поликатионы)	Выяснение функций полиаминов в процессах роста и дифференцировки клеток
	Нуклеотидные и нуклеотидные производные полиаминов	Изучение взаимодействий полиаминов с нуклеиновыми кислотами; влияния на геном Программирование гибели опухолевых клеток (апоптоз)

механизмом действия. Попадая в клетку посредством транспортной системы полиаминов и замещая природные полиамины в участках их связывания с ДНК, эти аналоги полиаминов были неспособны выполнять физиологические функции полиаминов и вызывали остановку роста опухолевых клеток. Так, 1,19-бис(этиламино)-5,10,15-триазанонадекан (ВЕ-4-4-4-4) имеет сродство к ДНК в 3 раза выше, чем спермин; ингибирует синтез полиаминов эффективнее, чем ДФМО; и тормозит пролиферацию опухолевых клеток даже при высоких уровнях внутриклеточных полиаминов [6].

Недавно получены новые данные о том, что наряду с подавлением клеточного роста опухолевых клеток, аналоги полиаминов способны индуцировать программу гибели клеток (апоптоз) [21]. В частности, аналог ВЕ-4-4-4-4 (см. рис.3) защищал клетки рака легких человека от действия мощного ингибитора топоизомеразы II [30]. Наследования цитотоксического и цитостатического эффектов этого аналога показали полезность его

применения в качестве сопутствующего терапевтического средства при лучевой терапии быстрорастущих опухолей шеи и головы человека [17].

Успехи в тестировании новых агентов с противоопухолевыми и антипролиферативными активностями среди ингибиторов и аналогов полиаминов указывают на необходимость поиска эффективных терапевтических средств в этом направлении. Наш опыт свидетельствует о том, что наибольшего внимания заслуживают те аналоги полиаминов, которые способны конкурировать с природными полиаминами и взаимодействовать с ДНК опухолевых клеток, вызывая тем самым нарушение процессов роста и пролиферации клеток; возможно также, что подобные соединения окажутся менее токсичными для организма опухоленосителя.

Механизмы реализации геномных aberrаций при развитии разных видов неоплазий могут быть различными. Однако, связь с процессами трансформации клеток, индукции ОДК и усиленного синтеза полиаминов (хотя часто наблюдается снижение катаболизма полиаминов) несомненна. Значение исследований роли полиаминов для выяснения молекулярных основ нормального роста, дифференцировки и трансформации клеток огромно. В таблице № 1 суммированы свойства и возможное практическое применение ряда факторов и аналогов полиаминов для терапевтических целей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Белоусова А.К. Молекулярно-биологические подходы к терапии опухолей.-М.-1993.-207с.
2. Лудак М.Ю. Нуклеозиды и рак. // Целенаправленное изыскание физиологически активных веществ: Докл. VII Всесоюз. симпоз. 26-29 янв. 1987 г. – Рига: Зинатне, 1989, С.79-94.
3. Федорончук Т.В., Николаева Т.Г., Добрынин Я.В., Сяткин С.П., Березов Т.Т. // Фундаментальные основы жизнедеятельности организма в норме и патологии: Сб. матер. 3-ей Всеросс. науч. конф. программы "Университеты России", раздел "Медицина".- М., 1996.- С.321-325.
4. Федорончук Т.В., Сяткин С.П., Лулле И.Ж., Янсон Я.Я., Лудак М.Ю., Березов Т.Т. / /Бюлл. эксп. биол. мед.- 1993.- М.9.- С.256-258.
5. Basu H.S., Schwiertert H.C. F., Feuerstein B.G., Marton L.-J. // Biochem.J.- 1990.- V.269.- P.329-334.
6. Basu H.S., Pellarin M., Feuerstein B.G., Shirahata A., Samejima K., Deen D.F., Marton L.J. // Cancer Res.- 1993.- V.53.- P.3948-3955.
7. Bitonti A.J., Dumont J.A., Bush T.L., Edwards M.L., Stemerick D.M., MoCann P.P., Sjoerdsma A. // Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.- 1989.- V.86.- P.651-655.
8. Bitonti A.J., Dumont J.A., Bush T.L., Stemerick D.M., Edwards M.L., MaCann P.P. // J.Biol.Chem.- 1990.- V.265.- P.382-388.
9. Byers T.L., Pegg A.E. // American Physiological Soaiety.- 1989.- P.C545-C553.
10. Calonge M.M., Bayoumi A.E., Cubria J.C., Balana-Fouce R.,Ordonez D. // Life Sci.- 1996.- V.59.- N.12.- P.191-197.
11. Canellakis E.C., Kyriakidis D.A., Rinehart C.A., Huang S.-C.,Panagiotidis C., Fong W.F. // Bioscienae Rep.- 1985.- V.5.- P.189-204.
12. Carper S.W., Tome M. E., Fuller D. J., Chen J. -R., Harari P.M., Gerner E.W. //Biochem. J. - 1991.- V. 280.- P. 289-294.
13. Casero R.A., Gabrielson E.W., Pegg A. E. // Cancer Res. - 1994.- V. 54.- N. 15.- P. 3955-3958.
14. Clement S., DeIcros J.G., Basu H. S., Quash G., Marton L. J.,Feuerstein B. G. //Biochem. J. - 1995.- V. 309.- P. 787-791.
15. Davis R.H. // J.Cell.Biochem.- 1990.- V.44.- N.4.- P.199-205.
16. Fuller D.J.M., Carper S.W., Clay L., Chen J.-R., Gerner E.W. // Biochem. J.- 1990.- V.267.- P.601-605.
17. Harari P.M., Pickart M.A., Contreras L., Petereit D.G., Basu H.S., Marton L.J. // Int.J.Radiat.Oncol.Biol.Phys.- 1995.- V.32.- N.3.- P.678-694.
18. Hirvonen A., Eloranta. T., Hyvonen T., Alhanen L., Janne J. // Bioahem. J.- 1989.-V.258.- P.709-713.
19. Levine A.L. // Cancer Res.- 1993.- V.53.- P.929-930.
20. Marton L.3., Pegg A.E. // Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.- 1995.- V.35.- P.55-91.
21. McCloskey D.E., Casero R.A.Jr., Woster P.M., Davidson N.E. // Cancer Res.- 1995.V.55.- N.15.- P.3233-3236.
22. Nishioka R. // Cancer Res. - 1993.- V.53.- P.2689-2692.
23. Pegg A.E. // Cancer Res.- 1988.- V.48.- P.759-774.
24. Pegg A.E., Hu R.H. // Cancer Lett.- 1995.- V.95.- N.1-2.-P.247-252.
25. Pegg A.E., McCann P.P. // ISI Atlas of Science Biochemistry.-1988.- P.11-18.
26. Pegg A.E., Shantz L.M., Coleman C. S. // J.Cell.Biochem.Suppl.- 1995.- V.22.-

P.132-138.

27. *Porter C.W., Cavanaugh P.F., Stolowich N., Ganis B., Kelly E., Bergeron R. J. // Cancer Res. – 1985. – V. 45. – P. 2050-2057.*
28. *Poulin R., Pelletier G., Pegg A. E. // Biochem. J. – 1995. – V.311. – P.723-727.*
29. *Schenkel E., Dubois J.G., Helson-Cambier M., Hanocq M. // Cell.Biol.Toxicol.– 1996.– V.12.– N.1.– P.1-9.*
30. *Smirnov I.V., Feuerstein B.G., Pellarin M., Marton L.J., Deen D.F., Basu H.S. // Cell. Mol.Biol.– 1994.– V.40.– N.7.– P.975-980.*
31. *Yang Z., Xia L., Berkey K.A., Tamez P.A., Coward J.K., Casero R.A.Jr. //J.Cell.Physiol.– 1995.– V.165.– P.71-76.*

THE MOLECULAR PRINCIPLES FOR APPLICATION OF POLYAMINE ANALOGS AS INHIBITORS OF ENZYMES OF POLYAMINE SYNTHESIS ENZYMES

T. T Berezov., T. V Fedoronchuk.

Russian University of Peoples Friendship, Institute of General and Clinical Pathology at RUPF

Some physiological peculiarities of polyamines metabolism and new achievements in the study of molecular principles for application of inhibitors of polyamine biosynthesis as potent therapeutic agents against different diseases with altered cell proliferation, including cancer, are considered.

Key words: polyamine metabolism, inhibitors of polyamine biosynthesis, ornitine decarboxylase, polyamine oxidase