

УДК 547.794.3+547.39
© Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ ВВЕДЕНИЯ ОСТАТКА ДОКОЗАГЕКСАЕНОВОЙ КИСЛОТЫ НА ЦИТОТОКСИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТИАДИАЗОЛА

**М.Г. Акимов^{1*}, Н.М. Грецкая¹, В.А. Карноухова¹, И.В. Серков²,
А.Н. Прошин², В.Ю. Штратникова³, В.В. Безуглов¹**

¹Институт биоорганической химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, 117997, ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10;
тел.: (495) 330-6592; факс (495) 333-7103; эл. почта: akimovmike@yandex.ru

²Институт физиологически активных веществ РАН,
г. Черноголовка, Московская область

³Инновационно-технологический центр “Биологически активные соединения
и их применение” РАН, Москва

Среди производных 3-(2-аминопропил)-1,2,4-тиадиазола, в структурах которых содержится способная к замещению вторичная аминогруппа, и обладающих цитотоксической активностью по отношению к клеткам глиомы С6 крысы, отобрано три соединения с LD₅₀ в диапазоне 6–48 мкМ. Синтезированы амиды докозагексаеновой кислоты этих производных и изучена их цитотоксическая активность. Показано, что хотя сама докозагексаеновая кислота не токсична для клеток глиомы С6, её присоединение к аминопроизводным 1,2,4-тиадиазола может приводить как к усилению, так и снижению цитотоксического действия. Этот эффект зависит от структуры заместителей 1,2,4-тиадиазольного фрагмента. Полученные данные свидетельствуют, что не всегда ацилирование докозагексаеновой кислотой веществ с цитотоксической активностью приводит к усилению такой активности, но может и инактивировать вещество. Этот факт необходимо принимать во внимание, учитывая возможность биологического присоединения остатка докозагексаеновой кислоты к аминогруппе противораковых лекарственных препаратов.

Ключевые слова: докозагексаеновая кислота, 1,2,4-тиадиазолы, глиома С6 крысы.

ВВЕДЕНИЕ

Производные тиадиазолов обладают интересной биологической активностью за счёт сильной ароматичности циклической системы, что приводит к высокой стабильности *in vivo* [1]. У этих соединений, как правило, отсутствует токсичность для высших позвоночных, включая человека. Присоединение к тиадиазольному ядру разнообразных функциональных групп, способных реагировать с различными рецепторами, позволяет получить соединения с превосходными фармакологическими свойствами. Эти вещества проявляют фунгицидную, бактерицидную, инсектицидную,

гербицидную, противораковую, противовоспалительную, нейростимулирующую и антиконвульсивную активность. Несмотря на то, что в настоящее время только один препарат на основе 1,2,4-тиадиазолов (гибридный антибиотик цефозопран) является коммерчески доступным лекарством, значительная часть веществ с разнообразной активностью находится на различных стадиях доклинических и клинических испытаний [1]. Ранее нами были синтезированы производные 1,2,4-тиадиазола, которые эффективно блокировали захват ионов кальция синапсомы мозга крысы [2].

* - адресат для переписки

Далее было показано, что введение фрагмента докозагексаеновой кислоты в производные 1,2,4-тиадиазола, содержащие реакционноспособную вторичную аминогруппу, приводит к кардинальному изменению спектра действия этих соединений [3]. Докозагексаеновая кислота широко применяется для усиления активности лекарственных препаратов, в том числе, противораковых, например паклитакселя [4]. Однако вопрос, всегда ли введение остатка докозагексаеновой кислоты приводит к усилению цитотоксического эффекта исходного соединения мало исследован.

Цель данной работы – выяснить, как изменяется цитотоксическая активность аминопроизводных 1,2,4-тиадиазола (1–3, рис. 1) после ацилирования докозагексаеновой кислотой.

МЕТОДИКА

Синтез соединений 1–6 (рис. 1)

Исходные аминопроизводные 1,2,4-тиадиазола (1–3) синтезировали по описанной ранее методике [5]. Ацилирование докозагексаеновой кислотой проводили по методу смешанных ангидридов, как описано ранее [3]. Все полученные соединения имели чистоту не менее 95% по данным ТСХ (хлороформ–метанол, 10:1). Масс-спектры (ионизация распылением в электрическом поле): 1, m/z 452.048, $[M+H]^+$, ($C_{24}H_{30}N_5O_2S$); 2, m/z 422.07, $[M+H]^+$, ($C_{21}H_{33}ClN_5S$); 3, m/z 441.967, $[M+H]^+$, ($C_{20}H_{30}Cl_2N_5S$); 4, m/z 762.087 $[M+H]^+$, ($C_{46}H_{60}N_5O_3S$); 5, m/z 732.113 $[M+H]^+$, ($C_{43}H_{63}ClN_5OS$); 6, m/z 751.160 $[M]^+$, ($C_{42}H_{51}Cl_2N_5OS$).

Определение цитотоксической активности in vitro

Клетки глиомы С6 крысы (клеточный банк Российской коллекции клеточных культур, Институт цитологии РАН, СПб) культивировали при температуре 37°C в атмосфере 5% CO_2 в среде DMEM (“ПанЭко”, Россия), содержащей 10% телячью эмбриональную сыворотку (“РАА Laboratories”, США), 2 mM глутамин, 25 mM HEPES [6], 100 ед./мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл амфотерицина В (“ПанЭко”). Прикрепленные клетки снимали с помощью 0,25% раствора трипсина в 0,53 mM ЭДТА с солями Хэнкса (“ПанЭко”). Подсчёт клеток выполняли с помощью камеры Горяева.

Для анализа токсичности производных докозагексаеновой кислоты культуры клеток рассеивали в 96-луночные планшеты в количестве $1,25 \times 10^4$ клеток/см² и растили в течение трёх дней до плотности 10^5 клеток/см² (половина максимальной плотности клеток). Серийные разведения испытуемых веществ в диапазоне 0,1–50 мкМ (финальная концентрация после добавления к клеткам) готовили в ДМСО и растворяли в среде культивирования, после чего добавляли к культуре клеток (три повтора для каждой концентрации) и инкубировали 18 ч. Время инкубации выбирали, исходя из критерия наибольших различий между веществами. Финальная концентрация ДМСО составила 0,5%. К контролю добавляли только ДМСО в финальной концентрации 0,5%. Отдельно был поставлен контроль без ДМСО (нет различий с контролем с 0,5% ДМСО). Для оценки жизнеспособности клеток под действием исследуемых веществ использовали МТТ-тест (оценка восстановления красителя МТТ митохондриями живых клеток) [7]. Вкратце, после удаления среды с исследуемыми веществами клетки инкубировали 1,5 ч с 0,5 мг/мл раствором МТТ (“ПанЭко”) в растворе Хэнкса (“ПанЭко”). После этого раствор удаляли, клетки растворяли в ДМСО и оценивали количество восстановленного красителя фотометрически при длинах волн 594 и 620 нм с помощью аппарата Эфос 9505 (“МЗ Сапфир”, Россия). Дополнительно, перед проведением МТТ-теста состояние клеток оценивали микроскопически. Кривые для вычисления LD_{50} строили с помощью программы GraphPad Prism. Каждый эксперимент повторяли три раза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью поиска новых цитотоксических веществ среди производных 1,2,4-тиадиазола была синтезирована серия производных содержащих в положении 3 2-аминопропильный радикал, функционализированный остатком тетраметилпиперидина или этил-5-метоксииндола, а в положении 5 – замещённый арильный радикал. Многие из синтезированных соединений обладали цитотоксической активностью по отношению к клеткам глиомы С6 крысы. Из этой серии были отобраны три вещества (1–3, рис. 1), два из которых обладали выраженным цитотоксическим действием (таблица). Наибольшей активностью обладало

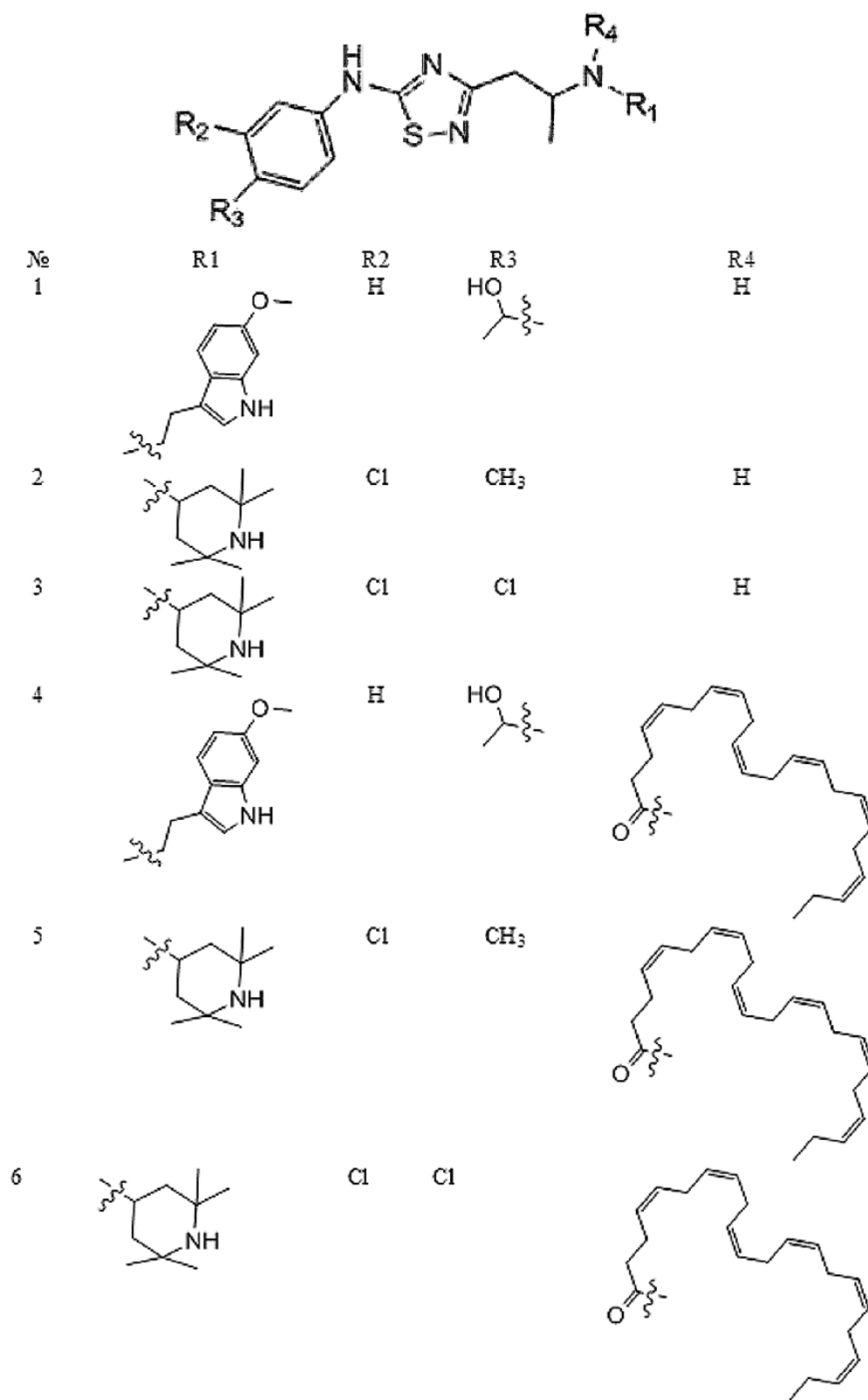


Рисунок 1. Структуры производных 1,2,4-тиадиазола.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНЫХ 1,2,4-ТИАДИАЗОЛА

тетраметилпиперидиновое производное **3** с 3,4-дихлорфениламиным радикалом в положении 5, а наименьшей – индольный аналог **1**. Ацилирование вторичной алифатической аминогруппы этих производных докозагексаеновой кислотой в различной степени повлияло на цитотоксическую активность. Способность соединений **3** и **6** вызвать гибель клеток глиомы практически не отличалась, т.е. введение остатка докозагексаеновой кислоты не повлияло на цитотоксическую активность (рис. 2Б, таблица). Напротив, для близкого аналога соединения **3**, содержащего в пара-положении фенильного радикала метильную группу вместо атома хлора (соединение **2**), модификация докозагексаеновой кислотой с образованием соединения **5** привела к возрастанию цитотоксической активности в 2.5 раза (рис. 2В, таблица). Это согласуется с опубликованными данными об усилении цитотоксического эффекта противораковых препаратов после присоединения докозагексаеновой

кислоты [4]. Противоположный эффект такая модификация оказала на индольное производное **1**: умеренная цитотоксическая активность (LD_{50} 48 мкМ) практически исчезла после превращения в амид **4**, который даже в концентрации 100 мкМ был мало токсичен для клеток глиомы (рис. 2А, таблица).

Таблица. Цитотоксическое действие синтезированных соединений на клетки глиомы С6 крысы (среднее \pm стандартное отклонение).

Вещество	Цитотоксичность, LD_{50} , мкМ
1	48 \pm 14
2	10 \pm 3,5
3	6,3 \pm 4,6
4	>50
5	3,9 \pm 1,8
6	6,7 \pm 1,2

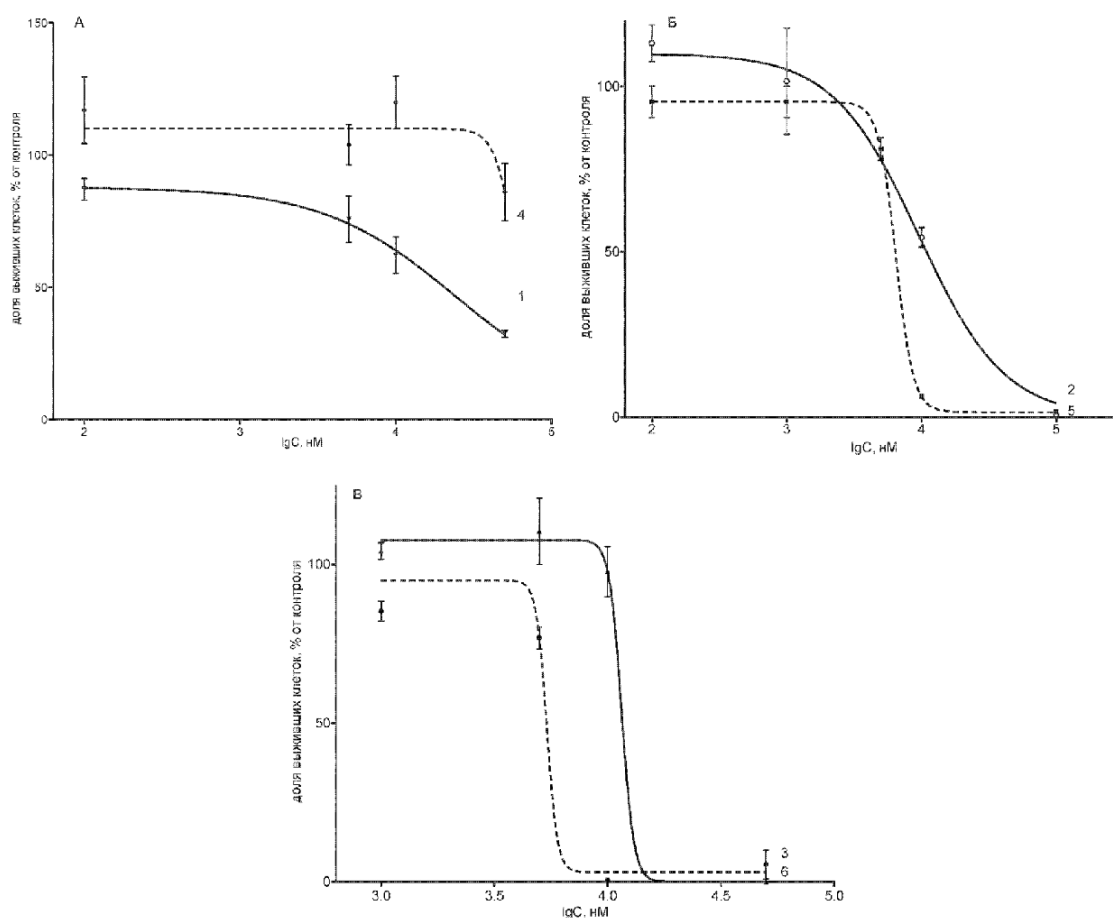


Рисунок 2. Дозовая зависимость цитотоксичности производных 1,2,4-тиадиазола. А - вещества 1 и 4, Б - вещества 2 и 5, В - вещества 3 и 6.

Следует отметить, что сама докозагексаеновая кислота не только не оказывает токсического действия на клетки глиомы С6 крысы, но и значительно стимулирует пролиферацию (на 40% при концентрации 10–26 мкМ) [6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Докозагексаеновая кислота в настоящее время все более широко применяется для модификации лекарственных препаратов с целью улучшения их специфической активности и снижения токсичности лекарственного компонента [4]. Например, препарат таксопрексин (Taxoprexin®) – конъюгат докозагексаеновой кислоты и паклитакселя – успешно проходит вторую фазу клинических испытаний среди пациентов с метастазирующей меланомой [8]. Из анализа многочисленных публикаций на эту тему может сложиться впечатление, что простое добавление остатка докозагексаеновой кислоты к цитотоксическому соединению обязательно приведёт к положительному результату. В данном сообщении на ограниченной выборке производных 1,2,4-тиадиазола нам удалось показать, что это не верно. В зависимости от структуры функционализируемой докозагексаеновой кислотой части молекулы активность такого гибридного соединения может сильно различаться: от полного отсутствия цитотоксического действия до активности в микромолярной концентрации. Поэтому при планировании модификации потенциального лекарственного препарата жирными кислотами необходимо учитывать возможность полного исчезновения желаемой активности после ацилирования,

как это наблюдалось в случае индольного производного **1**. Кроме того, нельзя исключить, что при активных патологических процессах произойдёт присоединение остатков жирных кислот, а в случае очага в головном мозге – остатка докозагексаеновой кислоты, к свободным аминогруппам лекарственных препаратов. Такая модификация может привести как к усилению их терапевтического эффекта, так и к его полному исчезновению.

Работа частично финансировалась Министерством образования и науки: гранты № 8865 и № 8840.

ЛИТЕРАТУРА

1. Castro A., Castaño T., Encinas A., Porcal W., Gil C. (2006) *Bioorg. Med. Chem.*, **14**, 1644–1652.
2. Серков И.В., Прошин А.Н., Петрова Л.Н., Бачурин С.О. (2010) *ДАН*, **435**, 479–481.
3. Серков И.В., Прошин А.Н., Петрова Л.Н., Грецкая Н.М., Безуглов В.В., Бачурин С.О. (2012) *ДАН*, **447**, 49–52.
4. Jaracz S., Chen J., Kuznetsova L.V., Ojima J. (2005) *Bioorg. Med. Chem.* **13**, 5043–5054.
5. Прошин А.Н., Серков И.В., Бачурин С.О. (2012) *ДАН*, **446**, 48–50.
6. Андрианова Е.Л., Бобров М.Ю., Грецкая Н.М., Зинченко Г.Н., Серков И.В., Фомина-Агеева Е.В., Безуглов В.В. (2010) *Нейрохимия*, **27**, 53–62.
7. Mosmann T. (1983) *J. Immunol. Methods*, **65**, 55–63.
8. Gastaldi D., Zonari D., Dosio F. (2011) *Drug Delivery Letters*, **1**, 105–117.

Поступила: 20. 12. 2012.

THE INFLUENCE OF DOCOSAHEXAENOIC ACID MOIETY ON CYTOTOXIC
ACTIVITY OF 1,2,4-THIADIAZOLE DERIVATIVES

*M.G. Akimov¹, N.M. Gretskeya¹, V.A. Karnoukhova¹, I.V. Serkov², A.N. Proshin²,
V. Yu. Shtratnikova³, V.V. Bezuglov¹*

¹Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya, 16/10, 117997 Russia; tel.: +7(495) 330-65-92; fax: +7 (495) 333-7103;
e-mail: akimovmike@yandex.ru

²Institute of Physiologically Active Compounds Russian Academy of Sciences,
Tchernogolovka, Moscow region, Russia

³Innovative Technological Center “Biologically Active Compounds and their Applications”
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Among 3-(2-aminopropyl)-1,2,4-thiadiazole derivatives containing substitution-ready secondary amino group and exhibiting cytotoxic towards rat C₆ glioma cells three compounds with LD₅₀ values ranged from 6 to 48 mM were chosen. For these compounds amides with docosahexaenoic acid were synthesised and their cytotoxic activity was studied. It was shown that, although docosahexaenoic acid itself was not toxic for C₆ glioma cells, its addition to the amino derivatives of 1,2,4-thiadiazole increased or decreased resultant cytotoxicity. The effect depended on the structure of 1,2,4-thiadiazole substituents. The obtained data show that the acylation of cytotoxic compounds with docosahexaenoic acid does not necessarily lead to the increase of their activity, but sometimes can inactivate a compound. This fact should be taken into account, especially in the case of anti-cancer drug development.

Key words: docosahexaenoic acid, 1,2,4-thiadiazoles, rat C6 glioma.