Биомедицинская химия, 2015 том 61, вып. 4, с. 497-502.

УДК 615.277.3: 577.113.3: 57.085.23

ИЗБИРАТЕЛЬНОЕ ТОКСИЧЕСКОЕ ДЕЙСТВИЕ ДИАЛЬДЕГИДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ПИРИМИДИНОВЫХ НУКЛЕОЗИДОВ НА ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

А.С. Ефремова[1], С.И. Шрам[1]*, М.С. Дреничев[2], Г.А. Посыпанова[3], Н.Ф. Мясоедов[1], С.Н. Михайлов[2]

[1]Институт молекулярной генетики РАН,
123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 2; тел.: +7 499 1960213;
факс +7 499 1960221; эл. почта: shram@img.ras.ru
[2]Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН, Москва
[3]Московский научно-исследовательский институт организации здравоохранения
и медицинской экологии, Москва

Исследовано влияние ряда синтетических производных нуклеозидов на рост и выживаемость культивируемых клеток опухоли яичника человека (линия SKOV-3) и культивируемых нормальных фибробластов легких человека. Показано, что диальдегидные производные уридина, 1-β-D-эритрофуранозилурацила и 3′-*O*-β-D-рибофуранозил-2′-дезокситимидина, в отличие от их неокисленных аналогов, оказывали выраженное токсическое действие на клетки SKOV-3. Культивируемые фибробласты человека оказались менее восприимчивыми к повреждающему действию диальдегидных нуклеозидов. Наибольшие различия в цитотоксическом действии на эти культуры были выявлены для диальдегидного производного 1-β-D-эритрофуранозилурацила: подавление роста опухолевых клеток SKOV-3 на 50% и более достигалось при концентрациях этого соединения в десятки раз меньших, чем в случае нормальных фибробластов.

Ключевые слова: диальдегидные производные нуклеозидов, цитотоксичность, противоопухолевое действие, линия клеток опухоли яичника человека SKOV-3, фибробласты человека.

DOI: 10.18097/PBMC20156104497

ВВЕДЕНИЕ

Синтетические аналоги и производные природных нуклеозидов представляют собой большую группу органических соединений, обладающих разнообразными биологическими свойствами. Хорошо известны синтетические нуклеозиды с противоопухолевой и противовирусной активностями [1, 2]. За последние три десятилетия достигнуты большие успехи в создании нуклеозидных соединений, обладающих высокой терапевтической эффективностью при лечении ряда вирусных (СПИД, герпес, вирусный гепатит) и онкологических (лейкозы) заболеваний [3-5].

Ранее некоторыми из авторов этой статьи были разработаны новые подходы для синтеза дисахаридных нуклеозидов и их диальдегидных производных [6, 7]. Дисахаридные нуклеозиды широко распространены в природе, например, они являются структурными элементами таких важных молекул как тРНК и поли(ADP-рибоза) [8]. Однако биологические свойства многих дисахаридных нуклеозидов пока ещё недостаточно хорошо изучены [9]. Интересную группу синтетических нуклеозидов составляют диальдегидные соединения, полученные методом перйодатного окисления углеводного остатка нуклеозида. В литературе можно найти целый ряд работ, посвященных исследованию биологических и фармакологических свойств таких соединений (см. обзор [7]). В частности, показано, что диальдегидные производные инозина, 5′-дезоксиинозина, метилпурина и некоторых других нуклеозидов обладают выраженным противоопухолевым действием, а производное аденозина – противовирусной активностью. Считается, что это может быть обусловлено их способностью подавлять активность ферментов синтеза нуклеиновых кислот и их компонентов [10, 11]. Однако избирательность цитотоксического действия диальдегидных производных нуклеозидов к опухолевым клеткам в сравнении с нормальными клетками ранее не изучалась.

* - адресат для переписки

Целью данной работы являлось сравнительное исследование токсического действия ряда диальдегидных производных нуклеозидов на культивируемые опухолевые и нормальные клетки человека.

МЕТОДИКА

В работе использовали культуру клеток опухоли яичника человека SKOV-3 (коллекция клеточных культур Московского научно-исследовательского института организации здравоохранения и медицинской экологии) и первичную культуру фибробластов лёгких эмбриона человека (любезно предоставлена проф. Н.Н. Вейко, Медико-генетический научный центр РАМН, г. Москва). Клетки SKOV-3 культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением эмбриональной сыворотки теленка (10%), L-глутамина (2 мМ) и гентамицина (50 мкг/мл), а фибробласты – в среде ДМЕМ с добавлением эмбриональной сыворотки телёнка (10%), L-глутамина (2 мМ), пенициллина (50 ед./мл) и стрептомицина (50 мкг/мл). Все клеточные культуры выращивали в атмосфере 5% CO_2 при температуре 37°С.

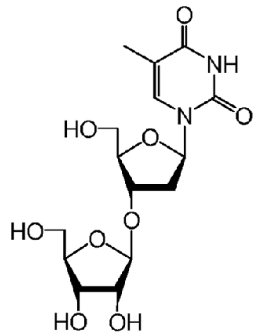
Дисахаридный нуклеозид 3′-*O*-β-D-рибофуранозил-2′-дезокситимидин (**1**) был синтезирован по описанной ранее методике [6]. Диальдегидные производные 3′-*O*-β-D-рибофуранозил-2′-дезокситимидина (**2**), уридина (**3**) и 1-β-D-эритрофуранозилурацила (**4**) получали окислением исходных нуклеозидов перйодатом натрия ($NaIO_4$), который брали с небольшим молярным избытком (1,2:1) относительно количества нуклеозида [12].

Токсическое действие исследуемых соединений анализировали с помощью МТТ-теста. Клетки SKOV-3 и фибробласты высевали в 96-луночные планшеты с плотностью 2500 клеток на лунку. Нуклеозиды в концентрации 0,01-1 мМ или доксорубицин (ДР) в концентрации 0,2 мкМ добавляли через 24 ч после посева клеток, при этом в контрольные культуры никаких добавок не вносили. Через 72 ч проводили замену среды на новую, содержащую 0,5 мг/мл МТТ, и продолжали инкубировать клетки в CO_2-инкубаторе ещё в течение 3 ч. Затем среду отбирали, образовавшиеся соли формазана растворяли в солюбилизирующем растворе и измеряли оптическую плотность на микропланшетном фотометре Multiskan Ascent V1.24 (США) при длине волны 540 нм. Жизнеспособность клеток в культурах рассчитывали, исходя из соотношения значений оптических плотностей в опытных и контрольных лунках. Средние значения оптической плотности в контрольных лунках принимали за 100%.

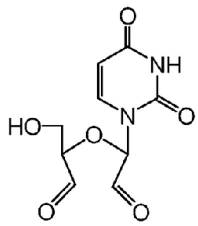
Статистическую обработку данных проводили с помощью программы “Sigma Plot 11” (“Systat Software Inc.”). Достоверность различий сравниваемых выборок при анализе данных по жизнеспособности клеток оценивали с использованием t критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

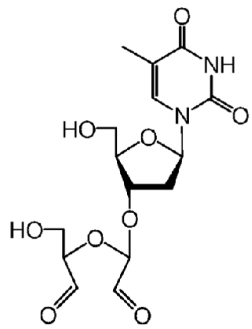
В работе исследовали цитотоксические свойства трёх диальдегидных производных нуклеозидов – **2**, **3** и **4** (рис. 1). В качестве соединений сравнения использовали уридин (Urd) и неокисленный дисахаридный нуклеозид **1** (рис. 1).



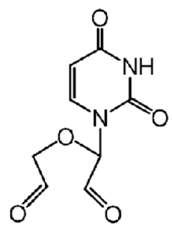
3´-O-β-D-рибофуранозил-2´-дезокситимидин (**1**)



Диальдегидное производное уридина (**3**)



Диальдегидное производное 3´-O-β-D-рибофуранозил-2´-дезокситимидина (**2**)



Диальдегидное производное 1-β-D-эритрофуранозилурацила (**4**)

Рисунок 1. Структуры синтетических производных нуклеозидов.

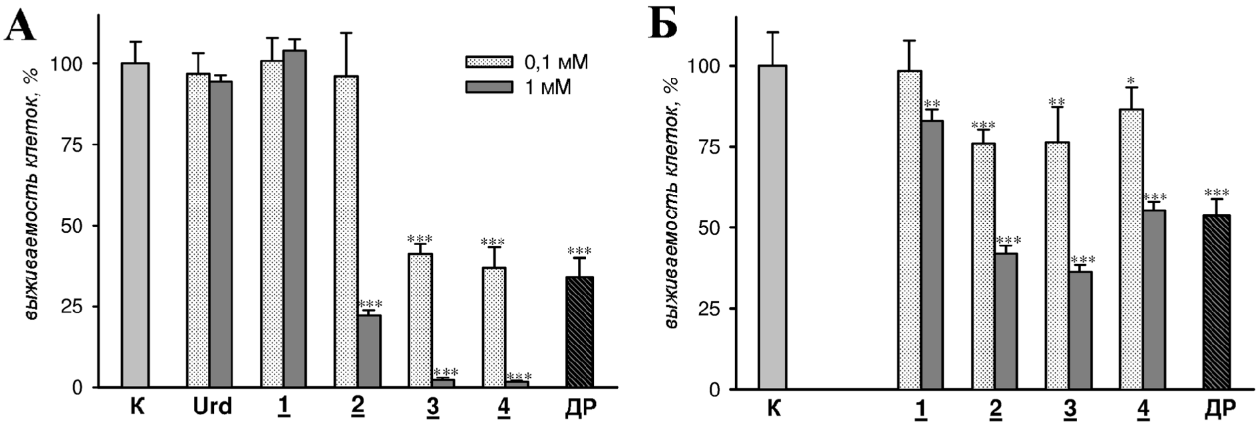


Рисунок 2. Влияние синтетических производных нуклеозидов (соединения **1** - **4**) и доксорубицина (ДР) на выживаемость культивируемых опухолевых клеток SKOV-3 (А) и нормальных фибробластов (Б) человека. Клетки инкубировали с нуклеозидами (0,1 и 1 мМ) и ДР (0,2 мкМ) в течение 72 ч. Результаты представлены в виде: среднее±ошибка среднего,* - $p<0,05$; ** - $p<0,01$; *** - $p<0,001$ - достоверность отличий по сравнению с контролем (К).

Наибольшую токсичность в отношении опухолевых клеток SKOV-3 проявляли диальдегидные производные уридина – соединения **3** и **4** (рис. 2А). После 72-часового культивирования клеток SKOV-3 в присутствии 0,1 мМ **3** или **4** наблюдалось более чем двукратное снижение жизнеспособности клеток – (на 59% и 63%, соответственно), а в концентрации 1 мМ эти соединения вызывали практически полную гибель клеток (рис. 2А и 3). Производное Thd (**2**) оказалось менее токсичным: в концентрации 0,1 мМ оно практически не влияло на рост клеток SKOV-3, а в концентрации 1 мМ – вызывало снижение жизнеспособности клеток примерно на 80%, по сравнению с контролем (рис. 2А). При этом неокисленные нуклеозиды (Urd и **1**) вплоть до концентрации 1 мМ практически не влияли на жизнеспособность клеток SKOV-3 (рис. 2А).

В аналогичных исследованиях на культивируемых нормальных фибробластах человека исследуемые производные нуклеозидов, в целом, оказывали более слабое токсическое действие, чем на опухолевые клетки SKOV-3 (рис. 2Б). Диальдегидные нуклеозиды **2**, **3** и **4** в концентрации 0,1 мМ снижали жизнеспособность фибробластов по сравнению с контролем на 25, 23 и 13%, а в концентрации 1 мМ – на 58, 63 и 45%, соответственно. Как видно, соединение 4 оказалось менее токсичным для культивируемых фибробластов, чем два других диальдегидных производных нуклеозидов. Следует отметить, что соединение **1** лишь в концентрации 1 мМ проявляло незначительную цитотоксичность в отношении фибробластов (рис. 2Б).

На основе анализа концентрационных зависимостей были рассчитаны значения IC_{50} – концентрации нуклеозида, при которой происходит снижение жизнеспособности культивируемых клеток на 50% (табл. 1). Как видно, значения IC_{50} для диальдегидных производных нуклеозидов

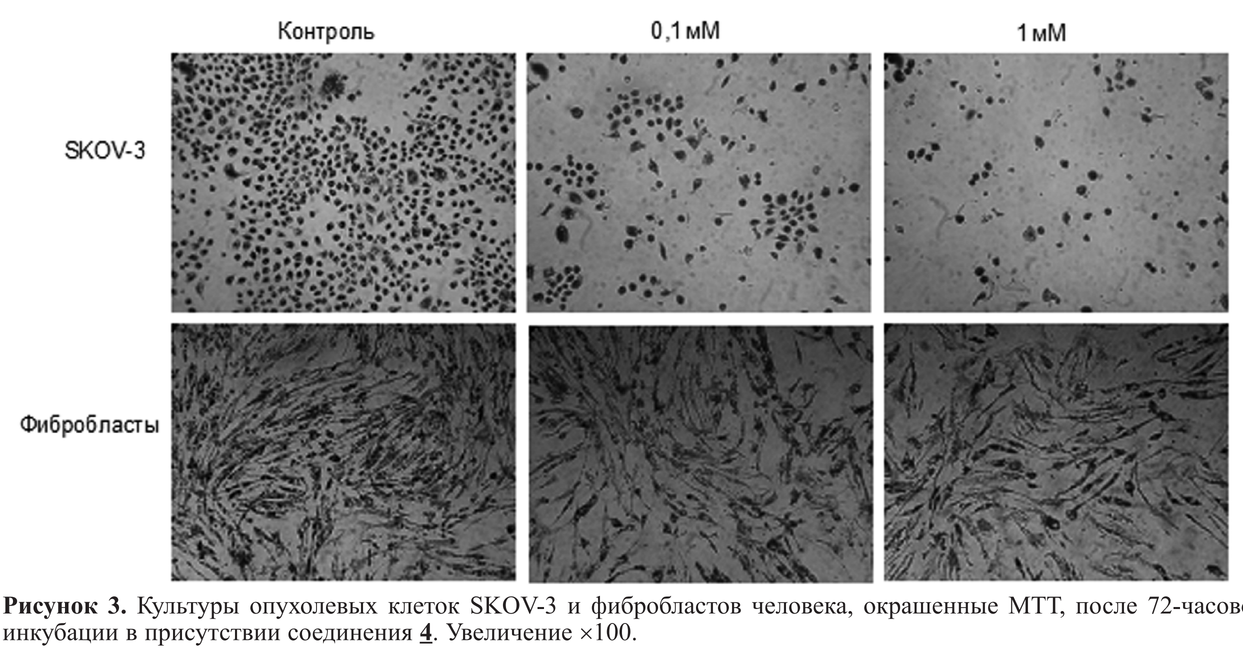


Рисунок 3. Культуры опухолевых клеток SKOV-3 и фибробластов человека, окрашенные МТТ, после 72-часовой инкубации в присутствии соединения **4**. Увеличение ×100.

в случае фибробластов были существенно выше, чем в случае культуры клеток SKOV-3. При этом наибольшее различие в значениях IC_{50} для опухолевых и нормальных клеток было выявлено для соединения **4**. В то же время ДР (0,2 мкМ), взятый в качестве положительного контроля, вообще не проявлял избирательности в отношении опухолевых клеток (рис. 2А и 2Б, табл. 1). Показательным в этом плане является соотношение значений IC_{50} для культур опухолевых и нормальных клеток, указывающее на избирательность противоопухолевого действия анализируемых соединений (табл. 2). Отчётливо видно, что диальдегидные производные нуклеозидов, в отличие от ДР, обнаруживают высокую избирательность действия в отношении опухолевых клеток.

Таблица 1. Характеристики цитотоксического действия синтетических производных нуклеозидов и доксорубицина (ДР) на культивируемые клетки опухоли яичника (SKOV-3) и фибробласты человека.

Соединение	*SKOV-3*		*Фибробласты*	
	IC_{50} (мкМ)	**n_H**	**IC_{50}** (мкМ)	**n_H**
1	>5000	-	>5000	-
2	520±90	1,94	600±90	0,66
3	85±9	2,21	480±80	0,76
4	81±15	2,48	1350±270	0,72
ДР	0,14±0,01	0,52	0,27±0,04	0,56

Примечание. Значения IC_{50} представлены в виде среднее±ошибка среднего.

Таблица 2. Специфичность противоопухолевого действия синтетических производных нуклеозидов и доксорубицина (ДР) на культивируемые клетки опухоли яичника человека.

Соединение	**$IC_{50\ (фибр.)}/IC_{50\ (SKOV\text{-}3)}$**	**$IC_{90\ (фибр.)}/IC_{90\ (SKOV\text{-}3)}$**
2	1,2	10,5
3	5,6	37,3
4	16,6	142
ДР	2	1,5

Примечание. Приведены соотношения средних значений IC_{50} или IC_{90}.

В результате анализа концентрационных кривых были рассчитаны также значения коэффициента Хилла (n_H; табл. 1). Видно, что значения n_H для клеток SKOV-3 и для фибробластов человека существенно отличаются. Для разных диальдегидных нуклеозидов они оказались достаточно близкими – 2,0-2,5 для клеток SKOV-3 и около 0,7 для фибробластов человека. Это указывает на различия в механизмах цитотоксического действия исследуемых соединений на опухолевые и нормальные клетки. В действии диальдегидных нуклеозидов на клетки SKOV-3 наблюдается более высокая степень амплификации сигнала, запускающего механизмы повреждения клетки, чем в случае фибробластов человека. Такие различия выражаются в том, что при повышении концентрации нуклеозида избирательность его действия на опухолевые клетки возрастает, что отчетливо видно при сравнении значений IC_{90} для соединений **2**, **3** и **4** (табл. 2). Интересно, что в случае применения ДР рассчитанные значения n_H для обоих типов клеток были примерно одинаковыми и составляли 0,5-0,6 (табл. 2).

Таким образом, нами было показано, что культивируемые опухолевые клетки SKOV-3 оказались более чувствительными к токсическому действию исследуемых диальдегидных производных нуклеозидов по сравнению с культурой нормальных фибробластов человека. При этом наиболее сильное и одновременно избирательное цитостатическое действие на культивируемые опухолевые клетки яичника оказывало соединение **4** – диальдегидное производное, полученное перйодатным окислением 1-β-D-эритрофуранозилурацила.

История лекарственных препаратов на основе синтетических нуклеозидов насчитывает вот уже около 50 лет, но, несмотря на это, они до сих пор широко применяются для лечения различных онкологических и вирусных заболеваний [13]. Являясь структурными аналогами нуклеозидов, эти соединения могут активно метаболизироваться клеткой по тем же путям, что и их природные прототипы. Основным механизмом цитотоксического действия аналогов нуклеозидов является их превращение в 5′-трифосфаты и включение в состав РНК (видаза) или ДНК (цитарабин, гемцитабин, децитабин, кладрибин) при участии РНК/ДНК-полимераз, что приводит к блокированию дальнейшего синтеза нуклеиновых кислот [1, 3, 5, 12, 14].

Существуют и другие механизмы действия препаратов на основе синтетических нуклеозидов. Так, некоторые из них способны подавлять активность ферментов, вовлеченных в обмен нуклеотидов (флударабин, рибавирин, пентостатин) [5]. По этому же принципу могут действовать и диальдегидные производные нуклеозидов. Предполагается, что противоопухолевая активность таких нуклеозидов реализуется через ингибирование ферментов синтеза нуклеиновых кислот и их компонентов – нуклеотидов и нуклеозидов: РНК-полимераз, тимидилаткиназы, рибонуклеотидредуктазы, S-аденозилгомоцистеинредуктазы и др. [15-17]. Другой возможной мишенью противоопухолевого действия диальдегидных производных нуклеозидов являются галактозилтрансферазы – ферменты, обеспечивающие начальные этапы синтеза клеточных гликозаминогликанов [17]. Последние играют важную роль в пролиферации, дифференцировке и миграции клеток.

Установлено, что токсическое действие диальдегидных производных нуклеозидов является необратимым [15]. Взаимодействие таких соединений с различными белками осуществляется благодаря наличию двух реакционноспособных альдегидных групп, которые образуют сшивки с белками и другими биомолекулами, имеющими свободные аминогруппы [7, 10].

В данной работе были исследованы противоопухолевые свойства новых диальдегидных производных нуклеозидов, как содержащих (соединения **2** и **3**), так и не содержащих (соединение **4**) гидроксиметильную группу в сахарном остатке. Исходя из полученных нами данных, отсутствие различий в токсичности соединений **3** и **4**, отличающихся только наличием гидроксиметильной группы сахарного остатка, на клетки SKOV-3 указывает на то, что их цитотоксичность не обусловлена фосфорилированием и встраиванием в РНК. Аналогичные результаты при работе с другими диальдегидными нуклеозидами были получены и другими авторами [15, 18]. Так, Sheid с соавт. [15] показали, что диальдегидные производные аденозина и N^6-бензиладенозина с остатком β-D-эритрофуранозы проявляли практически такое же токсическое действие на опухолевые клетки L1210, как и их аналоги, имеющие терминальную гидроксиметильную группу. С другой стороны, нами было установлено, что токсичность диальдегидного производного **3** в отношении культивируемых нормальных фибробластов человека выше, чем производного **4**. Эти данные, а также выявленные различия в значениях n_H для фибробластов и клеток SKOV-3, указывают на существенные отличия механизмов токсического действия диальдегидных производных нуклеозидов на нормальные и опухолевые клетки.

Известно, что активно делящиеся клетки более чувствительны к действию цитотоксических агентов по сравнению с неделящимися клетками. Однако, в проводимых нами экспериментах как опухолевые, так и нормальные клетки исследовались на логарифмической стадии роста, то есть когда они находились в активно делящемся состоянии. Исходя из литературы, время удвоения культивируемых фибробластов человека составляет 23-25 ч [19, 20], а клеток SKOV-3 – 29 ч [21], что хорошо согласуется с нашими данными. В связи с этим кажется очевидным, что различия в чувствительности нормальных и опухолевых клеток к действию диальдегидных производных не связано с их пролиферативным статусом. Можно также предположить, что *in vivo* терминально дифференцированные клетки окажутся ещё менее уязвимыми к действию такого рода производных нуклеозидов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В работе показано, что диальдегидные производные Thd и Urd, в отличие от их неокисленных аналогов, обладают выраженным цитотоксическим действием на культивируемые клетки опухоли яичника человека SKOV-3. Сравнительное исследование влияния диальдегидных производных нуклеозидов на рост и жизнеспособность опухолевых и нормальных (фибробласты) клеток человека в культуре показало, что эти соединения обладают избирательным противоопухолевым действием. В то же время, широко распространенный противоопухолевый препарат ДР демонстрировал одинаковую токсичность в отношении опухолевых и нормальных клеток. Анализ взаимосвязи структуры и активности исследуемых нуклеозидов показывает, что цитотоксическая активность этих соединений определяется наличием альдегидных групп, а присутствие свободной гидроксиметильной группы, доступной для фосфорилирования, не существенно. Также на основе анализа параметров концентрационных кривых (IC_{50} и n_H) можно сделать предположение о различной природе цитотоксического действия диальдегидных производных нуклеозидов на нормальные и опухолевые клетки.

С точки зрения конструирования новых противоопухолевых препаратов, наиболее перспективным из исследованных в этой работе соединений является диальдегидное производное 1-β-D-эритрофуранозилурацила (соединение **4**). Среди рассмотренных диальдегидных производных нуклеозидов оно демонстрировало наиболее сильное токсическое действие на опухолевые клетки и наименее токсическое – на нормальные клетки. Однако для подтверждения высокой эффективности его противоопухолевого действия и высокой безопасности для организма необходимо проведение целого комплекса дополнительных исследований, прежде всего на экспериментальных животных.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 11-04-01434, 11-04-02066 и 12-04-32085) и Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология”.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Liekens S., Bronckaers A., Balzarini J.* (2009) Lancet Oncol., **10**, 628-635.
2. *Koczor C.A., Torres R.A., Lewis W.* (2012) Expert Opin. Drug Metab. Toxicol., **8**, 665-676.
3. *Galmarini C.M., Mackey J.R., Dumonte C.* (2002) Lancet Oncol., **3**, 415-424.
4. *Faderl S., Gandhi V., Kantarjian H.M.* (2008) Curr. Opin. Hematol., **15**, 101-107.
5. *Parker W.B.* (2009) Chem. Rev., **109**, 2880-2893.
6. *Mikhailov S.N., De Clerq E., Herdewijn P.* (1996) Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, **15**, 1323-1334.
7. *Ермолинский Б.С., Михайлов С.Н.* (2000) Биоорг. химия, **26**, 483-504.
8. *Efimtseva E.V., Kulikova I.V., Mikhailov S.N.* (2007) Current Organic Chem., **11**, 337-354.
9. *Ефимцева Е.В., Куликова И.В., Михайлов С.Н.* (2009) Мол. биол., **43**, 327-338.
10. *Cory J.G, Mansell M.M.* (1975) Cancer Res., **35**(2), 390-396.

11. *Ohmstede C.A., Cory J.G.* (1985) Biochem. Pharmacol., **34**, 1717-1724.
12. *Efremova A.S., Zakharenko A.L., Shram S.I., Kulikova I.V., Drenichev M.S., Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Myasoedov N.F., Lavrik O.I., Mikhailov S.N.* (2013) Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, **32**(9), 510-528.
13. *Jordheim L.P., Durantel D., Zoulim F., Dumontet C.* (2013) Nat. Rev. Drug Discov., **12**, 447-464.
14. *Muggia F., Diaz I., Peters G.J.* (2012) Expert Opin. Investig. Drugs, **21**(4), 403-408.
15. *Sheid B., Saggar M., Gaetjens E., Lerner L.M.* (1991) Cancer Chemother. Pharmacol., **28**, 339-343.
16. *Plagemann P.G., Graff J.C., Behrens M.* (1977) Cancer Res., **37**(7, Pt 1), 2188-2195.
17. *Lee M.H., Lazo J.S., Li C.D., Hadfield A.F., Maniglia C.A., Sartorelli A.C* (1982) Chem. Biol. Interact., **41**(2), 141-153.
18. *Mirkin B.L., O'Dea R.F., Hogenkamp H.P.* (1987) Cancer Res., **47**, 3650-3655.
19. *Sato T., Yagori A., Niwa M.* (1987) Pharmacol. Toxicol., **61**, 313-315.
20. *Holz O., Zühlke I., Jaksztat E., Müller K.C., Welker L., Nakashima M., Diemel K.D., Branscheid D., Magnussen H., Jörres R.A.* (2004) Eur. Respir. J., **24**, 575-579.
21. *Buick R.N., Pullano R., Trent J.M.* (1985) Cancer Res., **45**, 3668-3676.

Поступила: 16. 12. 2013.

THE SELECTIVE TOXIC EFFECT OF DIALDEHYDE DERIVATIVES OF THE PYRIMIDINE NUCLEOSIDES ON HUMAN TUMOR CELLS

***A.S. Efremova*[1], *S.I. Shram*[1], *M.S. Drenichev*[2], *G.A. Posypanova*[3], *N.F. Myasoedov*[1], *S.N. Mihaylov*[2]**

[1]Institute of Molecular Genetics, Russian Academy of Sciences,
2 Kurchatova str., Moscow, 123182 Russia; tel.: +7(499)1960213; fax: +7(499)1960221;
e-mail: shram@img.ras.ru
[2]Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia
[3]Moscow Research Institute of Medical Ecology, Moscow, Russia

The impact of a number of synthetic nucleoside derivatives on the growth and survival of cultured human ovarian tumor cells (line SKOV-3) and normal human lung fibroblasts was investigated. It was shown that the dialdehyde derivatives of uridine, 1-β-D-eritrofuranozyl uracil and 3′-*O*-β-D-ribofuranosyl-2′-deoxythymidine, in contrast to their unoxidized counterparts, exert marked toxic effect on SKOV-3 cells. Cultured human fibroblasts were less susceptible to the damaging effect of the dialdehyde nucleosides. The dialdehyde derivative of 1-β-D-eritrofuranozyl uracil demonstrated greatest differences in the cytotoxic effect on these cultures: inhibition of tumor SKOV-3 cells growth on 50% or more was achieved at the concentrations of this compound ten times lower than in the case of normal fibroblasts.

Key words: dialdehyde derivatives of nucleosides, cytotoxicity, antitumor action, SKOV3 human ovarian carcinoma cell line, human fibroblasts.