

©Коллектив авторов

МЕХАНИЗМЫ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ РЯДА ЦИКЛИЧЕСКИХ ГИДРОКСАМОВЫХ КИСЛОТ

М.Е. Неганова^{1}, Ю.Р. Александрова¹, С.А. Пухов¹, С.Г. Клочков¹, В.Н. Осипов²*

¹Институт физиологически активных веществ Российской академии наук,
142432, Черноголовка, Северный проезд, 1; *эл. почта: neganova83@mail.ru

²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина,
115478, Москва, Каширское шоссе, 23

Синтезирован ряд циклических гидроксамовых кислот на основе хиназолин-4(3Н)-она и дигидрохиназолин-4(1Н)-она. Исследованы антиоксидантные и железохелатирующие свойства данных соединений, их влияние на активность фермента гистондеацетилазы и цитотоксическое действие по отношению к клеткам различных опухолевых линий. Выявлено два соединения-хита, которые проявляют мультифармакологический тип антинеопластической активности. Для этих веществ показано цитотоксическое действие по отношению к клеткам карциномы лёгкого человека A549 и аденокарциномы молочной железы MCF-7, которое обусловлено способностью модулировать уровень активных форм кислорода и хелатировать ионы двухвалентного железа, а также проявлять ингибирующее действие в отношении металлоферментов гистондеацетилаз, участвующих в эпигенетической регуляции опухолевого генеза. Это позволяет рассматривать гидроксамовые кислоты в качестве основы для создания потенциальных онколитиков.

Ключевые слова: гидроксамовые кислоты; перекисное окисление липидов; хелатирование; цитотоксичность; ингибиторы HDAC

DOI: 10.18097/PBMC20206604332

ВВЕДЕНИЕ

Онкологические заболевания являются серьёзной клинической проблемой, затрагивающей миллионы пациентов [1]. Согласно статистике, частота встречаемости онкопатологий неуклонно растёт. Так, по прогнозу Всемирной организации здравоохранения, к 2030 году в мире от онкозаболеваний будут ежегодно умирать 15 миллионов человек [2]. Это связано с тем, что многочисленные исследования в этой области так и не привели к однозначно положительным результатам, и арсенал методов лечения онкологических заболеваний до сих пор довольно ограничен. Сложность адекватного химиотерапевтического лечения определяется большим разнообразием патогенеза и этиологии опухолей, их развитием и симптоматикой. Поэтому в последние годы перспективным подходом при поиске высокоэффективных малотоксичных онколитиков стало рациональное создание мультитаргетных мишень-ориентированных противоопухолевых веществ. Такой подход позволит получить лекарственные препараты нового поколения, воздействующие одновременно на несколько звеньев патологического процесса, предотвращая тем самым развитие онкологических заболеваний. Процессы, связанные с окислительным стрессом [3], дисбалансом биометаллов и изменением уровня металлоферментов, в частности гистондеацетилаз [4], рассматриваются в качестве важных звеньев развития онкопатологий, одновременное воздействие на которые предполагает запуск элиминации трансформированных клеток под действием фармакологических средств.

Одним из перспективных классов противоопухолевых соединений, способных осуществить вышеуказанные функции, являются гидроксамовые кислоты, важнейшей мишенью которых являются ферменты гистондеацетилазы (Histone deacetylases, HDACs; КФ 3.5.1.98), участвующие в модуляции эпигенетических изменений, происходящих в опухолевых клетках [5]. Ингибиторы HDACs, воздействуя на гистоны и ряд других белков неопластических клеток, могут блокировать пролиферацию раковых клеток, вызывая арест G1 стадии клеточного цикла, и приводить к их гибели, повышая восприимчивость к апоптозу [5]. В настоящее время на экспериментальных моделях опухолей показана цитостатическая активность ряда гидроксамовых кислот как ингибиторов HDACs [6]. Значительное внимание уделяется созданию новых потенциальных противоопухолевых соединений этого класса с мультифармакологическим типом действия как с целью усиления и расширения спектра противоопухолевого эффекта, так и с целью снижения нежелательной токсичности для нормальных клеток.

В связи с этим целью настоящего исследования является синтез производных хиназолин-4(3Н)-она и дигидрохиназолин-4(1Н)-она с гидроксаматной функцией и исследование их биологических свойств, таких как антиоксидантный потенциал, железохелатирующая активность, способность ингибировать активность HDAC и цитотоксичность по отношению к клеткам опухолевых линий A549 и MCF-7 и здоровой клеточной линии НЕК-293.

МЕТОДИКА

Приготовление гомогената мозга крыс

Для получения гомогената мозга крыс декапитацию заранее наркотизированных CO₂ самцов нелинейных беспородных крыс весом 200-220 г проводили с помощью гильотины. Мозг гомогенизировали в 120 мМ KCl / 20мМ HEPES, pH 7,4, при 4°C, центрифугировали при 1500 g и работали с супернатантом в этот же день. Количественное определение белка проводили по стандартной методике с помощью микробиуретового метода [7].

Исследование влияния синтезированных гидроксамовых кислот на интенсивность перекисного окисления липидов

Для оценки действия исследуемых веществ на процесс перекисного окисления липидов (ПОЛ) гомогената мозга крыс, инициируемого ионами Fe(II), применяли модифицированный вариант теста с тиобарбитуровой кислотой (далее ТБК-теста) в планшетном формате [8]. В основе данного метода лежит реакция 2-тиобарбитуровой кислоты с промежуточными продуктами ПОЛ, в результате которой образуется окрашенный триметиновый комплекс.

Согласно схеме эксперимента, в лунку планшета вносили по 2,5 мкл исследуемых соединений в соответствующих концентрациях, 240 мкл гомогената мозга крыс (2 мг/мл) и 10 мкл ионов Fe(II) в качестве инициаторов ПОЛ. После 30-минутной инкубации при 37°C в каждую пробу добавляли ТБК, инкубировали в течение 90 мин при 90°C и центрифугировали при 10000 g. Измерения оптической плотности отобранного супернатанта проводили на планшетном ридере Cytation3 ("Biotek Instruments Inc.," США) при длине волны 540 нм.

Исследование Fe²⁺-хелатирующей активности синтезированных гидроксамовых кислот

Fe²⁺-хелатирующую активность определяли по модифицированной методике, описанной в работе [9]. В основе данного спектрофотометрического метода лежит способность потенциальных хелаторов железа конкурировать с феррозином за связывание с ионами железа.

В ячейки 96-луночного планшета согласно схеме эксперимента к этиловому спирту добавляли вещества в исследуемых концентрациях, после чего вносили FeSO₄ и перемешивали содержимое встряхиванием. По истечении 15-минутной инкубации раствора при комнатной температуре во все лунки планшета добавляли феррозин и спустя 10 мин на планшетном ридере Cytation3 регистрировали оптическую плотность при длине волны 562 нм.

Исследование влияния синтезированных гидроксамовых кислот на активность фермента HDAC1

Определение активности HDAC1 проводили по степени деацетилирования субстрата, которую оценивали с помощью флуоресцентного метода,

основанного на изучении кинетики деацетилирования субстрата в присутствии фермента, выделенного из ядерного экстракта клеток, с использованием коммерчески доступного набора FLUOR DE LYS® HDAC1 fluorometric drug discovery assay ("Enzo Life Sciences", США). Все процедуры выполняли в соответствии с прилагаемым протоколом. Флуоресценцию измеряли на планшетном флуориметре EnVision ("Perkin Elmer", США) при $\lambda_{ex} = 350-380$ нм, $\lambda_{em} = 440-460$ нм.

Клеточные линии и их культивирование

Культуры клеток человека A549 (карцинома лёгкого человека), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы) и HEK-293 ("здоровая" клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека) выращивали в питательной среде DMEM, EMEM и MEM соответственно. В среду добавляли эмбриональную телячью сыворотку (10% по объёму), L-глутамин (конечная концентрация составляла 2 мМ), 1% по объёму антибиотик-антимикотик. Культивирование проводили при 37°C в увлажнённой атмосфере CO₂ (5%).

Исследование цитотоксического профиля синтезированных гидроксамовых кислот

Клеточную жизнеспособность определяли по модифицированной методике МТТ-теста, описанной в работе [10]. Клетки опухолевых линий сеяли в 96-луночный планшет в количестве 1×10^4 клеток/200 мкл полной питательной среды и культивировали при 37°C в атмосфере CO₂ (5%). После 24 ч инкубации к культурам клеток добавляли различные концентрации тестируемых соединений, и далее клетки культивировали в тех же условиях в течение суток. По истечении времени инкубации в каждую лунку добавляли МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия, 5 мг/мл) и дополнительно инкубировали в течение 2 ч (до появления характерной окраски). Спустя 2 ч из планшетов удаляли среду и в каждую лунку добавляли по 200 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана.

С помощью планшетного анализатора Cytation3 определяли оптическую плотность при длине волны 530 нм. Значение концентрации, вызывающее 50% ингибирование роста популяции клеток (IC₅₀), определяли на основе дозозависимых кривых.

Статистическая обработка данных

Нормальное распределение исходных данных позволило выбрать t-критерий Стьюдента для определения статистически достоверных отличий ($p < 0,01$), рассчитанных с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 7.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез циклических гидроксамовых кислот (ГК)

Соединения ГК-1 и ГК-2 были получены по методике, описанной в работе [11] (рис. 1).

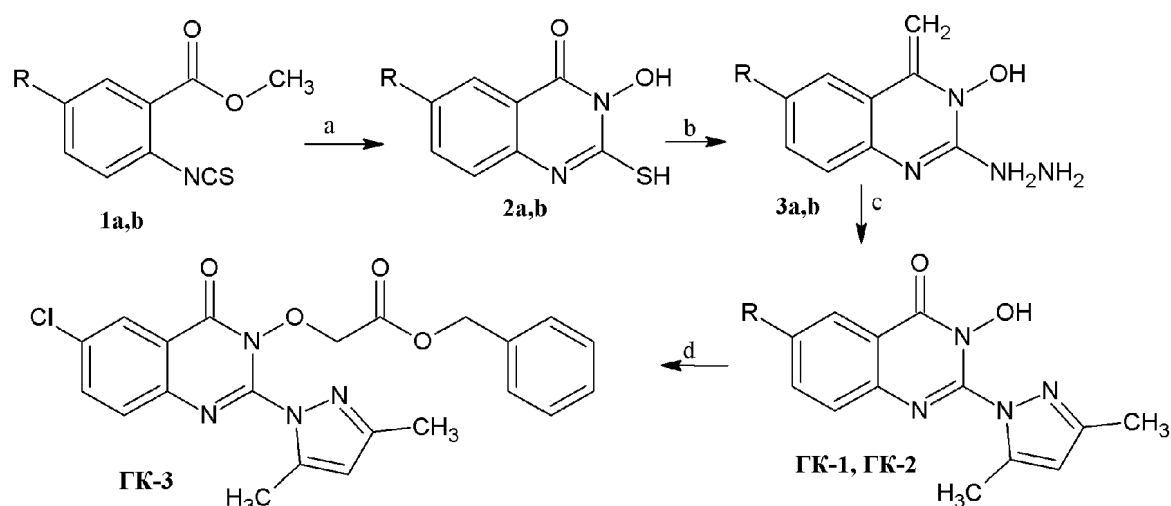


Рисунок 1. Схема получения соединений GK-1, GK-2, GK-3. R = H (a), Cl (b). а) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOH , хлористый метилен/вода, 20°C , 2 ч.; б) гидразингидрат, этанол, кипение, 10 ч.; в) ацетилацетон, этанол, кипение, 4 ч.; д) $\text{ClCH}_2\text{C}(\text{O})\text{OBn}$, K_2CO_3 , DMF , 20°C , 4 ч.

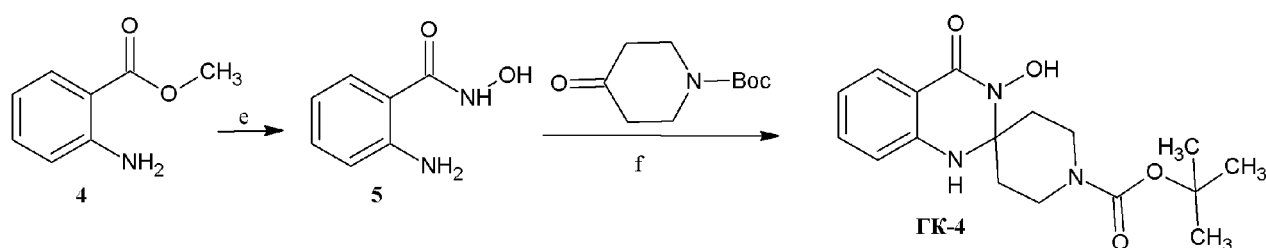


Рисунок 2. Схема получения соединения GK-4. е) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, NaOH , метанол/вода, 20°C , 48 ч.; ф) $p\text{-TSA}$ 0,2 экв, этанол, кипение, 4 ч.

Соединение GK-3 получено алкилированием GK-2 бензиловым эфиром хлоруксусной кислоты в присутствии карбоната калия в условиях реакции, приведённых в работе [12] (рис. 1).

Для получения соединения GK-4 вначале получали антранилгидроксамовую кислоту (5) из метилантранилата (4) по методике [13]. Далее проводили конденсацию 5 с защищённым 4-пиримидоном при катализе *para*-толуолсульфокислотой (*p*-TSA) в условиях реакции, описанных в работе [14], с получением соединения GK-4 (рис. 2).

Антиоксидантные и железохелатирующие свойства циклических гидроксамовых кислот

Перспективность поиска потенциальных противоопухолевых соединений в ряду веществ, обладающих антиоксидантным потенциалом, может быть обусловлена их способностью ингибировать активность транскрипционных факторов NF- κ B и p53 [15], сверхактивация которых связана с нарушениями в метаболической активности опухолевых клеток. Такая интенсивная продукция активных форм кислорода (АФК) может служить причиной повреждения ДНК, способствовать генетической нестабильности и развитию устойчивости трансформированных клеток к химиотерапевтическим агентам [3]. В связи с этим соединения, способные модулировать процессы, связанные с окислительным стрессом, вызывают интерес в качестве

средств, направленных на фармакологическую коррекцию онкопатологий.

При изучении антиоксидантных свойств исследуемых веществ в тесте ПОЛ, инициируемого ионами $\text{Fe}(\text{II})$, нами было установлено, что наибольшими антиокислительными свойствами обладают соединения GK-3 и GK-4, достоверно снижающие содержание в системе конечного продукта ПОЛ — малонового диальдегида (рис. 3А). Поскольку данные ГК наиболее эффективно подавляют ПОЛ, для них была построена концентрационная зависимость ингибирования данного процесса и вычислены величины IC_{50} , представляющие собой концентрации соединений, при воздействии которыми наблюдается эффект, равный половине их максимального эффекта. Так, для GK-3 IC_{50} составляет $(55,05 \pm 0,27) \times 10^{-6}$ М, а для GK-4 — $(22,13 \pm 0,09) \times 10^{-6}$ М (рис. 3Б), что позволяет сделать вывод, что антиоксидантная активность этих соединений является дозозависимой и проявляется при инициации ПОЛ ионами $\text{Fe}(\text{II})$.

Многочисленные данные свидетельствуют о том, что высокий внутриклеточный уровень железа, наблюдающийся в трансформированных клетках, вызывает их интенсивную пролиферацию [16] и способствует росту опухолей [17]. Предполагается, что связывание ионов металлов переменной валентности соединениями-хелаторами $\text{Fe}(\text{II})$ может замедлять каскад реакций, приводящих к образованию АФК; кроме того, такие соединения

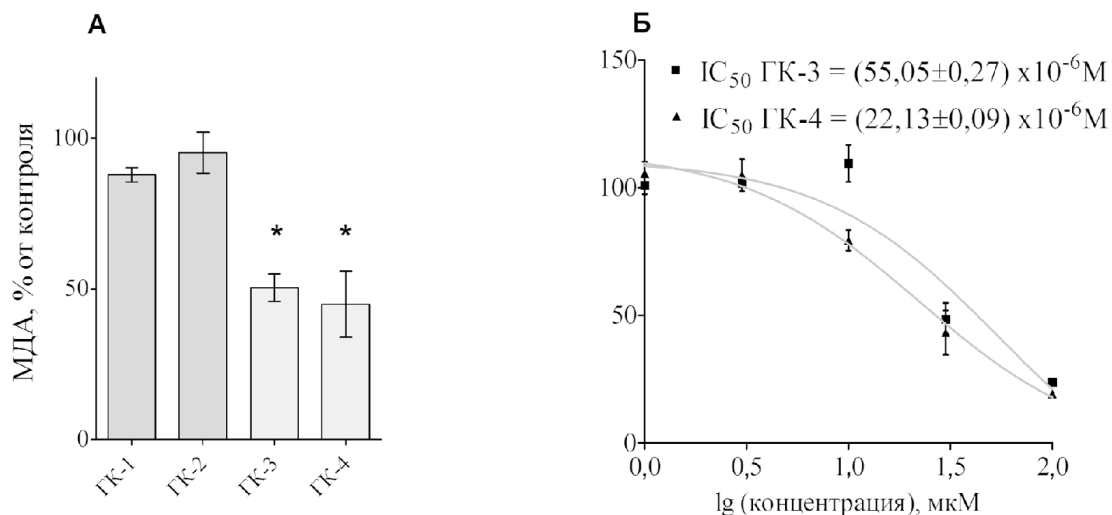


Рисунок 3. Влияние гидроксамовых кислот на процесс Fe(II)-индуцированного перекисного окисления липидов гомогената мозга крыс. Концентрация инициатора Fe(II) составляла $5 \times 10^{-4} M$. Каждую концентрацию исследуемого вещества измеряли в трёх параллелях. **А** — % содержания малонового диальдегида (МДА). Концентрация веществ составляла $3 \times 10^{-5} M$. Данные представлены в виде % активности: как среднее \pm SD по отношению к значениям контроля, принятого за 100%. Звёздочка (*) указывает на статистически значимую ($p < 0,01$) разницу между контролем и исследуемыми веществами (t-критерий Стьюдента). **Б** — концентрационная зависимость антиоксидантного эффекта наиболее активных гидроксамовых кислот и расчет величины IC_{50} . Величина IC_{50} кривой “концентрация-эффект” представляет собой концентрацию соединения, при воздействии которой наблюдается эффект, равный половине его максимального эффекта.

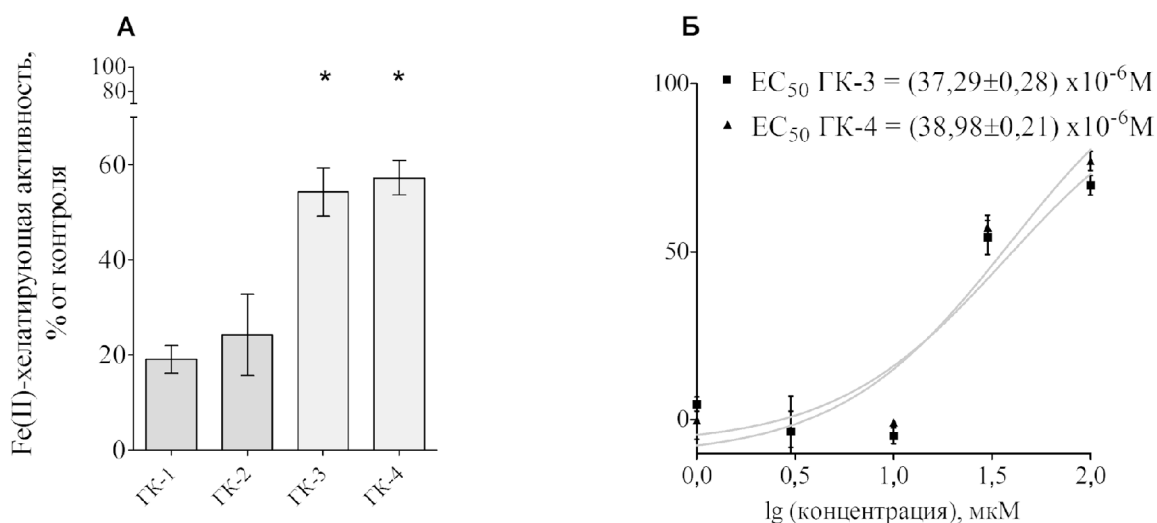


Рисунок 4. Fe(II)-хелатирующая активность синтезированных гидроксамовых кислот. Концентрация Fe_2SO_4 составляла $5 \times 10^{-5} M$, феррозина — $2,5 \times 10^{-5} M$. Каждая концентрация исследуемого вещества измерялась в трёх параллелях. **А** — % Fe(II)-хелатирующей активности исследуемых веществ. Концентрация веществ составляла $3 \times 10^{-5} M$. Данные представлены в виде % активности: как среднее \pm SD по отношению к значениям контроля, принятого за 100%. Звёздочка (*) указывает на статистически значимую ($p < 0,01$) разницу между контролем и исследуемыми веществами (t-критерий Стьюдента). **Б** — концентрационная зависимость хелатирующего эффекта наиболее активных соединений и расчет величины EC_{50} . Величина EC_{50} кривой “концентрация-эффект” представляет собой концентрацию соединения, при воздействии которой наблюдается эффект, равный половине его максимального эффекта.

могут напрямую оказывать антипролиферативное и апоптотическое действие, блокируя клеточный цикл неопластических клеток за счёт снижения содержания данного металла в системе, что открывает интересные перспективы при лечении онкологических заболеваний.

Нами было установлено, что железохелатирующей способностью обладают соединения ГК-3 и ГК-4. Так, процент связывания данных веществ с ионами

двухвалентного железа составляет более 50% (рис. 4А). Для ГК-3 и ГК-4 были вычислены величины EC_{50} Fe(II)-хелатирующего эффекта, которые составили $(37,29 \pm 0,28) \times 10^{-6} M$ и $(38,98 \pm 0,21) \times 10^{-6} M$ соответственно (рис. 4Б). Очевидно, такие железосвязывающие свойства синтезированных ГК могут быть обусловлены их способностью образовывать координационные связи с ионами Fe(II).

Таким образом, данные, полученные в ходе исследования антиоксидантного потенциала синтезированных гидроксамовых кислот, позволяют предположить, что способность соединений ГК-3 и ГК-4 модулировать окислительные процессы может являться одним из возможных механизмов противоопухолевого действия в отношении неопластических клеток, и, что немаловажно, способствовать снижению их токсического действия на нетрансформированные клетки организма.

Влияние синтезированных ГК на активность фермента HDAC1

Одним из основных механизмов противоопухолевого действия существующих в настоящее время противоопухолевых агентов на основе гидроксамовой кислоты является их способность к ингибированию HDACs [18] — ферментов, регулирующих процессы деацетилирования белков гистонов, которые участвуют в формировании генетического аппарата клетки [19, 20]. Многочисленные данные свидетельствуют о том, что при различных онкопатологиях наблюдается дисбаланс работы данных ферментов, а именно, их сверхэкспрессия, что приводит к нарушениям клеточного цикла, неконтролируемой пролиферации, нарушению каскадов клеточной гибели [19] и позволяет опухолевым клеткам избегать апоптоза. В связи с этим модуляция уровнями данных ферментов является перспективным подходом при поиске потенциальных фармакологических средств с противоопухолевым эффектом.

Количественный анализ взаимосвязи “структура-активность” показывает, что доминирующим признаком, ответственным за снижение активности HDACs, является наличие у гидроксамовых кислот функциональных групп, способных хелатировать ионы цинка (Zn^{2+}), локализованные в каталитическом центре фермента [21]. Поскольку нами было выявлено, что соединения ГК-3 и ГК-4 проявляют высокую железохелатирующую активность, мы провели исследование влияния синтезированных гидроксамовых кислот на активность фермента HDAC1, сверхэкспрессия которого наблюдается при злокачественных новообразованиях предстательной железы, желудка и молочной железы [22].

Как видно из полученных данных (рис. 5), для соединений ГК-3 и ГК-4 в концентрации 3×10^{-5} М наблюдается достоверное снижение активности фермента HDAC1.

Таким образом, HDAC1-ингибирующая активность ГК-3 и ГК-4 коррелирует с их Fe(II)-хелатирующими свойствами. Это может указывать на то, что обладая металлосвязывающей способностью, ГК способны модулировать работу металлозависимых ферментов, участвующих в канцерогенезе.

Анализ цитотоксических свойств исследуемых ГК

Оценка жизнеспособности и метаболической активности опухолевых клеток при исследовании химических веществ, синтезированных в качестве

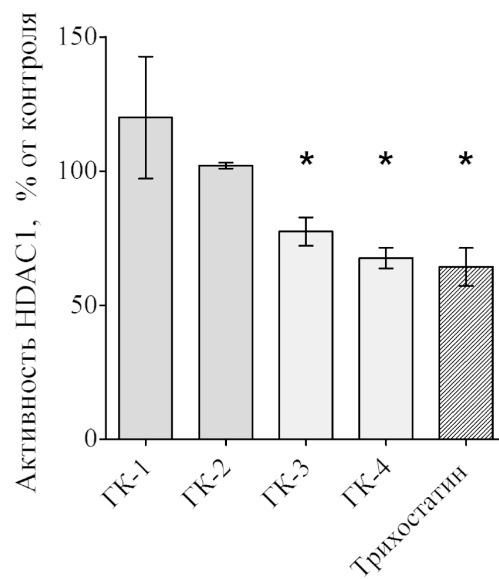


Рисунок 5. Влияние синтезированных гидроксамовых кислот на активность фермента HDAC1. Концентрация исследуемых веществ составляла 3×10^{-5} М, трихостатина — 50×10^{-9} М. Данные представлены в виде % активности: как среднее \pm SD по отношению к значениям контроля (непосредственно активность HDAC), принятого за 100%. Звёздочка (*) указывает на статистически значимую ($p < 0,01$) разницу между контролем и исследуемыми веществами (t-критерий Стьюдента).

потенциальных онколитиков, является важным, и в то же время необходимым этапом изучения противоопухолевых свойств перспективных фармакологических агентов. В связи с этим, используя МТТ-тест, мы оценили потенциальную цитотоксичность синтезированных ГК по отношению к клеткам опухолевых линий A549 и MCF-7, а также “здоровой” клеточной линии НЕК-293, полученной из эмбриональных почек человека.

Как видно из таблицы, при 24-часовой инкубации клеток с соединением ГК-3 наблюдается его концентрационно-зависимое токсическое действие по отношению к опухолевым клеткам. При этом, что немаловажно, цитотоксичность по отношению к нетрансформированным эмбриональным клеткам почки человека НЕК-293 снижена. Это может быть связано со способностью данного соединения проявлять антиоксидантные свойства. Так, величина IC_{50} на клеточной линии карциномы лёгкого составляет $(15,8 \pm 0,4) \times 10^{-6}$ М, аденокарциномы протоков молочной железы — $(13,6 \pm 0,6) \times 10^{-6}$ М, а для линии клеток НЕК-293 этот показатель существенно выше — $(88,9 \pm 4,2) \times 10^{-6}$ М.

Полученные в ходе исследования цитотоксического профиля синтезированных ГК данные коррелируют с наличием у ГК-3 выраженных антиоксидантных свойств и способностью ингибировать работу фермента HDAC за счёт хелатирования ионов металлов переменной валентности, что может являться возможными механизмами противоопухолевого действия данных соединений.

Таблица. Влияние синтезированных гидроксамовых кислот на выживаемость клеток опухолевых линий A549 и MCF-7 и нетрансформированной клеточной линии HEK-293. Данные представлены в виде величины IC₅₀ цитотоксического эффекта для каждого тестируемого соединения

Название клеточной линии	IC ₅₀ (10 ⁻⁶ M)*			
	ГК-1	ГК-2	ГК-3	ГК-4
A549	>100	>100	15,8±0,4	>100
MCF-7	>100	>100	13,6±0,6	>100
HEK-293	>100	>100	88,9±4,2	>100

Примечание. * — Ингибирующую активность оценивали при воздействии исследуемых соединений в течение 24 ч. Данные (среднее ± SD) представлены в виде значений IC₅₀ (10⁻⁶ M) цитотоксического эффекта по отношению к значениям контроля (ДМСО ≤1%), принятого за 100%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, среди исследованных гидроксамовых кислот было выбрано соединение-хит ГК-3, которое проявляет мультифармакологический тип противоопухолевой активности. Это выражается в модулировании сразу нескольких ключевых звеньев патогенеза онкологических заболеваний. Так, данная циклическая ГК имеет выраженные антиоксидантные свойства, обладает способностью хелатировать ионы Fe(II) и ингибировать активность HDACs, как основных ферментов, участвующих в эпигенетической регуляции опухолевого генеза. Такая совокупность действия соединения на модуляцию ключевых мишеней неопластического процесса находит отражение в его токсическом действии в отношении клеток опухолевых культур A549 и MCF-7 и, что немаловажно, сниженной цитотоксичности на нетрансформированных клетках HEK-293. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности синтеза циклических гидроксамовых кислот на основе хинолинон-4(3H)-она и дигидрохинолинон-4(1H)-она и возможности дальнейшего исследования антинеопластических свойств соединения-лидера, в частности, проведения *in vivo* серии экспериментов, включающей анализ токсикологических параметров ГК-3 и изучение её противоопухолевой активности на чувствительных к химиотерапии экспериментальных опухолях.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы работы выражают благодарность Центру коллективного пользования Института физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН) за предоставление возможности проведения экспериментов с использованием лабораторных животных.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект №18-33-01185 мол_а), химическая часть работы была выполнена в рамках Госзадания 0090-2019-0006.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все манипуляции, требующие использование животных, проводили в соответствии с решениями комиссии по биоэтике ИФАВ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. (2015) CA Cancer J. Clin., **65**(2), 87-108.
2. Torre L.A., Siegel R.L., Jemal A. (2016) Adv. Exp. Med. Biol., **893**, 1-19.
3. Mut-Salud N., Alvarez P.J., Garrido J.M., Carrasco E., Aranega A., Rodriguez-Serrano F. (2016) Oxid. Med. Cell Longev., **2016**, 6719534. DOI: 10.1155/2016/6719534.
4. Hrabeta J., Stiborova M., Adam V., Kizek R., Eckschlager T. (2014) Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub., **158**(2), 161-169.
5. Murahari S., Jalkanen A.L., Kulp S.K., Chen C.S., Modiano J.F., London C.A., Kisseberth W.C. (2017) BMC Cancer, **17**, 67. DOI: 10.1186/s12885-017-3046-6.
6. Li Y., Edward S. (2016) Cold Spring Harbor Perspectives Medicine, **6**(10), a026831.
7. Rose A., Funk D., Neiger R. (2016) J. Am. Vet. Med. Assoc., **248**(7), 789-794.
8. Neganova M.E., Klochov S.G., Petrova L.N., Shevtsova E.F., Afanasieva S.V., Chudinova E.S., Fisenko V.P., Bachurin S.O., Barreto G.E., Aliev G. (2017) CNS Neurol. Disord. Drug Targets, **16**(3), 351-355.
9. Gulcin I., Mshvidadze V., Gepdiremen A. (2006) Phytomedicine, **13**, 343-351.
10. Mosmann J. (1983) Immunol. Methods, **65**(1-2), 55-63.
11. Хохлов П.С., Осипов В.Н., Кривенко В.И., Зубаиров М.М., Поцин А.В., Батыев Е.А. (2012) Патент РФ №2451683, 27.05.2012. [Khokhlov P.S., Osipov V.N., Krivenko V.I., Zubairov M.M., Roshchin A.V., Batuev E.A. (2012) Patent RU No. 2451683, 27.05.2012].
12. Осипов В.Н., Хохлов П.С., Поцин А.В. (2011) Известия РАН. Серия хим., **1**, 146-149. [Osipov V.N., Khokhlov P.S., Roshchin A.V. (2011) Russian Chemical Bulletin, **1**, 146-149.]
13. Bodanszky M., Bodanszky A. (1994) The Practice of Peptide Synthesis, 2nd Edn., Springer Verlag, Heidelberg, p. 217.
14. Revathy K., Lalitha A. (2015) J. Iran Chem. Soc., **12**, 2045-2049.
15. Bonner M.Y., Arbiser J.L. (2014) Future Med. Chem., **6**(12), 1413-1422.
16. Corcé V., Gouin S.G., Renaud S., Gaboriau F., Deniaud D. (2016) Bioorgan. Med. Chem. Letts., **26**(2), 251-256.
17. Chua A., Klopčic B., Lawrance I., Olynyk J., Trinder D. (2010) World J. Gastroenterol., **16**(6), 663-672.
18. Pontiki E., Hadjipavlou-Litina D. (2012) Med. Res. Rev., **32**(1), 1-165.

19. Kroesen M., Gielen P., Brok I.C., Armandari I., Hoogerbrugge P.M., Adema G.J. (2014) *Oncotarget*, **5**(16), 6558-6572.
20. Cheung P., Allis C.D., Sassone-Corsi P. (2000) *Cell*, **103**, 263-271.
21. de Ruijter A.J., van Gennip A.H., Caron H.N., Kemp S., van Kuilenburg A.B. (2003) *Biochem. J.*, **370**, 737-749.
22. Benedetti R., Conte M., Altucci L. (2015) *Antioxid. Redox. Signal.*, **23**(1), 99-126.

Поступила в редакцию: 22. 04. 2020.
После доработки: 13. 06. 2020.
Принята к печати: 25. 06. 2020.

MECHANISMS OF CYTOTOXIC ACTION OF A SERIES OF DIRECTIONALLY SYNTHESIZED HETEROCYCLIC HYDROXAMIC ACIDS

M.E. Neganova^{1}, Yu.R. Aleksandrova¹, S.A. Pukhov¹, S.G. Klochkov¹, V.N. Osipov²*

¹Institute of Physiologically Active Compounds of the Russian Academy of Sciences,
1 Severnii pr., Chernogolovka, Moscow Region, 142432 Russia; *e-mail: neganova83@mail.ru
²N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology (N.N. Blokhin NMRC of Oncology),
23 Kashirskoe shosse, Moscow, 115478 Russia

Cyclic hydroxamic acids based on quinazoline-4(3H)-one and dihydroquinazoline-4(1H)-one have been synthesized. The antioxidant and iron-chelating properties of these compounds, their effect on the activity of the histone deacetylase enzyme, and their cytotoxic effect on cells of various tumor lines have been investigated. We have identified two compounds-hits, which exhibit the multipharmacological type of the antineoplastic activity. Their cytotoxic effect on cells of human lung carcinoma A549 and breast adenocarcinoma MCF-7 is obviously associated with their ability to modulate the level of reactive oxygen species and to chelate Fe(II) ions, as well as to inhibit the metalloenzymes, histone deacetylases, involved in the epigenetic regulation of tumor genesis. Thus, the synthesized hydroxamic acids may be considered as a promising basis for creating potential oncolytics.

Key words: hydroxamic acids; lipid peroxidation; chelation; cytotoxicity; HDAC inhibitors

Funding. The work was carried out with financial support from the Russian Foundation for Basic Research (project No. 18-33-01185 mol_a), chemical part of the work was carried out as a part of the State Assignment 0090_2019_0006.

Received: 22.04.2020, revised: 13.06.2020, accepted: 25.06.2020.