
ВЛИЯНИЕ ХИМИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ДЕКАРБОКСИЛИРОВАННОГО ОРНИТИНА И S-АДЕНОЗИЛМЕТИОНИНА НА РОСТ L-КЛЕТОК В КУЛЬТУРЕ ТКАНИ

С.П. Сяткин, Т.Т. Березов, Т.В. Федорончук,
Н.Я. Гридина, Е.А. Неборак, Н.А. Шевкун,
Н.А. Сокуева, Е.В. Устинова, Р.И. Сокуев

Кафедра биохимии
Российский университет дружбы народов
ул. Миклухо-Маклая, 8, Москва, Россия, 117198

Исследовали влияние алифатических amino- и оксипроизводных декарбоксилированного орнитина и S-аденозилметионина на скорость роста L-клеток в культуре ткани. Известные специфические ингибиторы ферментов синтеза полиаминов (ДФМО и МГБГ) использовали для контроля и сравнения эффективности действия тестируемых веществ. Характер действия 1-аминокси-3-аминопропан (АПА) и S-(5'-дезоксаденозил)-S-метил-β-тиоэтилгидроксиламин (АМА) индивидуально и в сочетании одного с другим был сходным с эффектом ДФМО и МГБГ, но менее выражен. Степень торможения роста L-клеток на четвертые сутки достигала 50—60%. К седьмым суткам проявилась тенденция не только к стабилизации скорости роста, но и к ее восстановлению. Это указывает на обратимый характер действия соединений АПА и АМА и служит их отличием от действия ДФМО и МГБГ.

Ключевые слова: полиамины, путресцин, спермидин, спермин, L-клетки, дифформетилорнитин (ДФМО), метилглиоксаль-бис(гуанилгидразон) (МГБГ).

Проблема изучения и выработки подходов к направленному влиянию на механизмы регуляции клеточной пролиферации и дифференцировки в настоящее время остается центральным вопросом фундаментальных и прикладных исследований в биологии и медицине.

Хорошо известно, что биогенные полиамины (ПА) — спермин и спермидин, а также их предшественник путресцин, — принимают активное участие в процессе регуляции активации генов и являются маркерами пролиферации опухолевых клеток [1, 2].

Использование системы биосинтеза ПА в качестве основы для конструирования синтетических аналогов ПА и ингибиторов полиаминсинтезирующих ферментов привело к открытию широкого ряда искусственных химических соединений с потенциально противоопухолевыми, антипролиферативными и даже противопаразитарными свойствами [3, 4].

Целью этой работы стало исследование влияния алифатических amino- и оксипроизводных декарбоксилированного орнитина и S-аденозилметионина на скорость роста L-клеток в культуре ткани.

Материалы и методы. *Количественное определение содержания ПА.* Количественное содержание ПА в тканях животных определяли, применяя флюоресцирующий реагент N,N-1-диметиламинонафталин-5-сульфохлорид (ДАНС-С1) фирм «Schuchardt» (ФРГ) и «Koch-Light» (Англия), на первичные и вторичные аминогруппы. Подготовку образца ткани для анализа и реакцию дансирования проводили по методу [5]. В качестве свидетелей использовали препараты ПА фирм

«Schuchardt» и «Serva» (ФРГ). ВЭЖХ проводили на хроматографе APC/GPC-204 («Water-milipore», США) с флюоресцентным детектором типа 420 при длине волны возбуждения 365 нм и эмиссии 495. Использовали хроматографическую колонку типа Bondapak C₁₈ (3,9×300 мм) с предколонкой 3,9×20 мм. Хроматографировали в течение 10 мин. в линейном градиенте метанола (75—95%). Инкубационную смесь предварительно пропускали через колонку C₁₈ Sep-Pak («Waters», США), промывали 5 мл метанола. Дансильные производные аминов элюировали 2 мл 100% метанола и использовали для анализа путем ВЭЖХ [6].

Фибробласты мышей линии СЗН. Клетки линии L выращивали на питательной среде «Игла» с глутамином и 10% сывороткой крови крупного рогатого скота. В каждый флакон вносили 8000 клеток на 2 мл питательной среды. Использовали 105 флаконов. В каждую из 4 экспериментальных групп было выделено по 15 флаконов. Первая группа была контрольной. Остальные три группы подвергали воздействиюДФМО, МГБГ иДФМО совместно с МГБГ, соответственно. Конечная концентрация исследованных соединений в культуральной среде составила 10⁻⁴ М. Первую смену среды культивирования и введение исследуемых веществ в новую культуральную среду осуществляли на 4-е сутки после начального посева клеток. Через сутки из каждой группы брали по 3 флакона, подсчитывали количество клеток в камере Горяева, взвесь клеток центрифугировали при 1500 об./мин. и осадок использовали для определения Пут и ПА методом ВЭЖХ. Во всех оставшихся флаконах меняли среду культивирования и вносили указанные вещества в исходном количестве. Последующие 2 суток поступали аналогичным образом. После 4 суток культуры ткани L-клеток росли еще 3 дня, но без смены среды и добавления химических соединений.

Статистическая обработка результатов исследования была проведена с использованием пакета Statistica 6,0 (StatSoft, США). Различия между двумя выборками считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$ [7].

Алифатические амино- и оксипроизводные ПА. О-замещенные гидроксиламины (табл. 1), аналоги продуктов ферментативного декарбоксилирования орнитина и S-аденозилметионина, были синтезированы в Институте органической химии им. Н.Д. Зелинского РАН.

Таблица 1

Химические аналоги декарбоксилированного орнитина и S-аденозилметионина

Название	Индекс	Структура
α-дифторметилорнитин	ДФМО	$\begin{array}{c} \text{CHF}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$
1-аминокси-3-аминопропан	АРА	2HCl·NH ₂ OCH ₂ CH ₂ CH ₂ NH ₂
S-(5'-дезоксаденозил)-S-метил-β-тиоэтилгидроксилламин	АМА	$\begin{array}{c} 2\text{H}_2\text{SO}_4 \cdot \text{NH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{S}^+\text{Ade} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$
Метилглиоксаль-бис(гуанилгидразон)	МГБГ	$\begin{array}{c} \text{NH} \\ \\ \text{H}_3\text{C}-\text{C}=\text{N}-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{HC}=\text{N}-\text{NH}-\text{C}-\text{NH}_2 \\ \\ \text{NH} \end{array}$

Результаты и обсуждение. Исследование роли внутриклеточного пула ПА в реализации антипролиферативного действия ингибиторов полиаминсинтезирующих ферментов проводили с о-замещенными производными гидроксиламина (соединения АМА и АРА), проявившими максимальную регуляторную активность в модельных тест-системах [8].

Схема анализа действия 1-аминоокси-3-аминопропана (АПА) и 5'-дезоксаденозил-5'-метилтиоэтилгидроксиламина (АМА) на скорость роста L-клеток в культуре ткани и внутриклеточное содержание ПА была аналогичной опытам с ДФМО и МГБГ (см. Материалы и методы). Результаты этой серии опытов представлены на рис. 1 и 2.

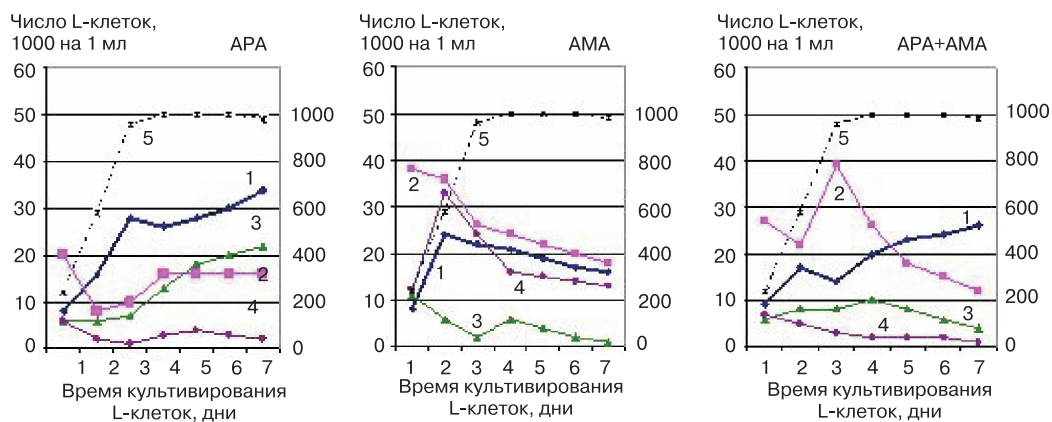


Рис. 1. Влияние 1-аминоокси-3-аминопропана (АРА) и 5'-дезоксаденозил-5'-метилтиоэтилгидроксиламин (АМА) на внутриклеточные уровни ПА и рост L-клеток в культуре ткани:

по оси ординат: слева — число L-клеток (10^3 на 1 мл культуральной среды), справа — содержание поликатионов рМ на 10^6 клеток). 1 — L-клетки, 2 — спермидин, 3 — спермин, 4 — путресцин, 5 — нормальный рост клеток

Характер действия АПА и АМА индивидуально и в сочетании одного с другим был сходным с эффектом ДФМО и МГБГ, но менее выражен. Так, степень торможения роста L-клеток на 4-е сутки достигала 50 и 60%, соответственно (рис. 1). К 7-м суткам инкубирования ткани проявилась тенденция не только к стабилизации скорости роста, но и к ее восстановлению (рис. 2). Это указывает на обратимый характер действия соединений АПА и АМА и служит их отличием от действия ДФМО и МГБГ.

Коэффициент корреляции между степенью ингибирования исследованными соединениями скорости образования поликатионов в бесклеточных тест-системах из тканей с высоким митотическим индексом [8] и уровнем торможения роста L-клеток в культуре ткани этими же веществами равен 0,87. Это указывает на наличие тесной положительной связи между процессами биосинтеза ПА и пролиферации L-клеток.

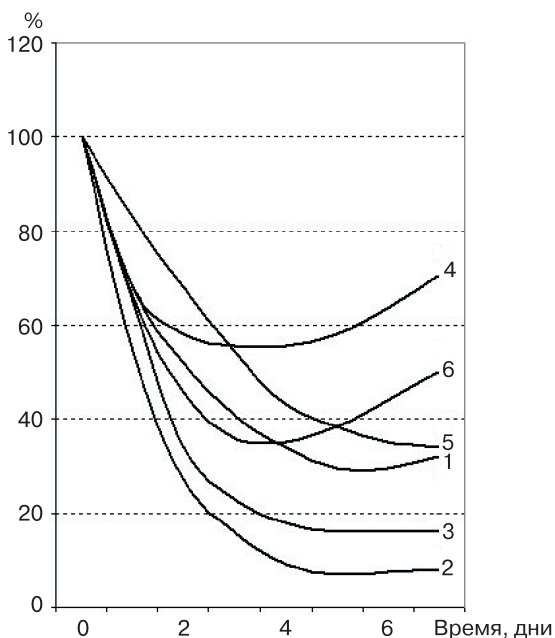


Рис. 2. Влияние ДФМО, МГБГ, АРА и АМА на скорость роста L-клеток в культуре ткани:

по оси абсцисс дано время роста L-клеток в культуре ткани (дни), по оси ординат — отношение количества клеток в опытной к контрольной группе (%). 1 — ДФМО, 2 — МГБГ, 3 — ДФМО + МГБГ, 4 — АРА, 5 — АМА, 6 — АРА + АМА

Более того, изменения в содержании ПА в L-клетках предшествовали и опережали на двое суток изменения в скорости роста этих клеток в культуре ткани. Такая «независимость» роста клеток в первые два дня на фоне применения ингибиторов синтеза ПА, вероятно, происходит за счет той части пула клеток, которая успела войти в цикл митотического деления до стадии, на которой процесс деления приобретает необратимый характер и не зависит от изменений концентрации ПА. Вероятно, в моноклональной культуре клеток с синхронизированным циклом клеточного деления антипролиферативная активность ингибиторов полиаминсинтезирующих ферментов будет выше.

Полученные результаты также показывают, что торможение синтеза спермидина в большей степени сказывается на росте клеток, чем ингибирование ОДК. Это согласуется с общепринятым представлением о запрограммированности системы обмена ПА на поддержание оптимального уровня спермидина в соответствии с пролиферативной активностью клетки. Соединения АПА и АМА проявили высокую активность как ингибиторы синтеза ПА в бесклеточных тест-системах [8] и роста L-клеток в культуре ткани. Это указывает на перспективность дальнейших исследований данной группы оксиаминопроизводных как новых потенциальных противоопухолевых веществ. Аминоокси-аналог путресцина: 1-аминоокси-3-аминопропан (АРА) блокирует активность трех ферментов биосинтеза

ПА: ОДК, АМДК и спермин-синтазу [9] и, как и родственные ему соединения, могут быть полезными в качестве противоопухолевых агентов [10].

Проведенные исследования содержания Пут и ПА в L-клетках в процессе роста в культуре ткани на фоне действия ингибиторов ключевых ферментов биосинтеза этих соединений выявили две характерные особенности. Так, изменения концентрации поликатионов в L-клетках и скорость роста этих клеток в культуре ткани можно рассматривать как два тесно связанных между собой процесса. Более того, изменения в концентрации Пут и ПА, вероятно, первичны по отношению к изменениям скорости роста L-клеток, поскольку они опережают их во времени, как это было показано в опытах с ингибиторами ключевых полиаминсинтезирующих ферментов [6].

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бордо Л.И., Яхимович Л.В., Черный В.А. и др. Выявление биогенных аминов в опухолях с диагностической целью // Архив патологии. — 1976. — Т. 38. — № 9. — С. 33—38.
- [2] Morgan D.M. Polyamines. An overview // Mol Biotechnol. — 1999. — V. 11, N 3. — P. 229—250.
- [3] Wallace H.M., Fraser A.V. Polyamine analogues as anticancer drugs // Biochem. Soc. Trans. — 2003. — V. 31. — N 2. — P. 393—396.
- [4] Seiler N. Thirty years of polyamine-related approaches to cancer therapy. Retrospect and prospect. Part 1. Selective enzyme inhibitors // Curr. Drug. Targets. — 2003. — V. 4. — N 7. — P. 537—564.
- [5] Seiler N., Wiechman M. Zum nachweis von aminen in 10^{-10} M masstab. Trennung von 1-dimethylaminophthalin-5-sulfonsaureamiden auf dunnschi-chromatogrammen // Experientia. — 1965. — V. 21. — P. 203—204.
- [6] Сяткин С.П., Березов Т.Т., Гридина Н.Я. и др. Полиамины как биохимические маркеры антипролиферативного действия ингибиторов ферментов биосинтеза полиаминов и путресцина в культуре L-клеток // Вопр. мед. химии. — 1991. — Т. 37. — № 6. — С. 77—81.
- [7] Фадеев В.В. Редакционные материалы // Проблемы эндокринологии — 2002. — Т. 48. — № 3. — С. 47—48.
- [8] Сяткин С.П., Федорончук Т.В., Гридина Н.Я. и др. Влияние химических аналогов полиаминов, декарбоксилированного орнитина и S-аденозилметионина на скорость синтеза полиаминов в тест-системах из тканей с повышенной пролиферацией // Вестник РУДН. Серия «Медицина». — 2010.
- [9] Eloranta T.O., Khomutov A.R., Khomutov R.M. et al. Aminooxy Analogues of Spermidine as Inhibitors of Spermine Synthase and Substrates of Hepatic Polyamine Acetylating Activity // J. Biochem. — 1990. — V. 108. — P. 593—598.
- [10] Kramer D.L., Khomutov R.M., Bukin Y.V. et al. Cellular characterization of a new irreversible inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase and its use in determining the relative abilities of individual polyamines to sustain growth and viability of L1210 cells // Biochem. J. — 1989. — V. 259. — N 2. — P. 325—331.

THE INFLUENCE OF CHEMICAL ANALOGS OF DECARBOXYLATED ORNITHINE AND S-(ADENOSIL)-METHIONINE ON THE GROWTH OF L-CELL TISSUE CULTURE

**S.P. Siatkin, T.V. Fedoronchuk, N.Ya. Gridina,
E.A. Neborakh, N.A. Shevkhun, N.A. Sokueva,
E.V. Ustinova, R.I. Sokuev**

Department of biochemistry
Russian Peoples' Friendship University
Miklukho-Maklaya str., 8, Moscow, Russia, 117198

The effect of aliphatic amino- and oxy-derivatives of Ornithine and of S-(Adenosil)-methionine on the growth of L-cells in tissue culture was studied. The common known specific inhibitors of polyamines synthesis enzymes DFMO and MGBG were used for control and monitoring of test compounds action efficiency. The action of 1-aminooxy-3-aminopropan (APA), S-(5'-desoxyadenosile)-S-methyl- β -thioethyl-hydroxylamine (AMA) individually manner and in combination of one with another was similar with DFMO and MGBG effect but less pronounced. The degree of L-cell growth inhibition in the 4th day achieved 50—60%. By the 7th day there was observed a tendency not only to the growth rate stabilization but also to its reconstruction. It is indicative of reversible effect of APA and AMA compounds action on the cell growth that it differs from DFMO and MGBG actions.

Key words: polyamines, Putrescine, Spermidine, Spermine, L-cells, Difluoromethylornithine (DFMO), Methylglyoxal-bis(guanylhydrazone) (MGBG), cell growth.