

С. Ю. Макан, В. М. Корхов, Р. Н. Лозицкая

## АФФИНИТЕТ МАКРОЦИКЛИЧЕСКИХ ПИРИДИНОФАНОВ И ИХ АЦИКЛИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ К ПЕРИФЕРИЧЕСКИМ БЕНЗДИАЗЕПИНОВЫМ РЕЦЕПТОРАМ ЦНС

Физико-химический институт им. А. В. Богатского НАН Украины, Одесса, Украина

Макроциклические пиридинофаны (МЦП; макрогероциклы, содержащие пиридиновый фрагмент в кольце) проявляют антивирусную активность [1]. Недавно обнаружена способность МЦП и их ациклических аналогов ингибировать *in vitro* рост клеток некоторых злокачественных опухолей человека [2]. Нами высказано предположение, что одним из возможных механизмов противоопухолевой активности этих соединений может быть их способность связываться с периферическими бензодиазепиновыми рецепторами (ПБДР).

ПБДР вовлечены в кальциевый гомеостаз [3], митохондриальный стероидогенез [4] и окисление [5], клеточную пролиферацию [6], регулируют функции иммунной системы [7]. Накоплены многочисленные свидетельства увеличения плотности ПБДР при различных опухолях мозга, раке груди, яичников и др. [8 – 11]. Клинические исследования последних лет показали, что уровень ПБДР-иммунореактивных клеток в опухолях пациентов коррелирует с продолжительностью жизни [12]. В настоящее время ПБДР предложены в качестве маркера для диагностики опухолей, определения их границ и направления метастазирования [13]. ПБДР рассматриваются как новая внутриклеточная селективная мишень для противоопухолевых агентов — лигандов ПБДР [11].

В настоящей работе изучен аффинитет ряда макроциклических оснований Шиффа — производных 2,6-бис(2- и 4-формиларилоксиметил)пиридинов и их ациклических аналогов к ПБДР. Все исследованные соединения (рис. 1) были синтезированы в ФХИ им. А. В. Богатского НАН Украины.

### Экспериментальная биологическая часть

#### Изучение противоопухолевой активности

Противоопухолевая активность МЦП и их ациклических аналогов определяли в отделе лечения и диагностики рака Национального института рака, США [14].

#### Изучение радиолигандного связывания

Все эксперименты проведены на половозрелых крысах самцах линии Вистар массой 200 – 220 г, содержащихся в стандартных условиях вивария. Предварительно анестезированных крыс декапитировали, мозг быстро выделяли и гомогенизировали в 30 объемах ледяного буфера Трис-НС1 (50 мМ, рН 7,1 при 20 °С) в гомогенизаторе Даунса. Гомогенат центрифугировали 10 мин при 1000 г (4 °С) для удаления “ядерной фракции” мембран. Надосадочную жидкость центрифугировали 20 мин при 40000 г (4 °С). Супернатант декантировали, осадок ресуспендировали в 30 объемах буфера выделения и центрифугировали 20 мин в прежних условиях. Полученный осадок митохондриальных мембран ресуспендировали в буфере инкубации с образованием суспензии с концентрацией влажных мембран, равной 30 мг/мл.

Для изучения связывания исследуемых соединений с ПБДР использовали метод конкурентного вытеснения радиолиганда из мест его специфического связывания с рецептором. Связывание [<sup>3</sup>H]Ro5 – 4864 (3171 ТБк) проводили в конечном инкубационном объеме 500 мкл и концентрации радиолиганда 1 нМ. К 300 мкл буфера инкубации Трис-НС1 (50 мМ, рН 7,4 при 0 °С), содержащего [<sup>3</sup>H]Ro5 – 4864 в присутствии вытесняющего агента добавляли 200 мкл полученной суспензии мембран мозга. Инкубацию проводили в течение 90 мин при 4 °С. Остановку связывания осуществляли 12-кратным разбавлением пробы ледяным Трис-НС1 буфером (50 мМ, рН 7,4).

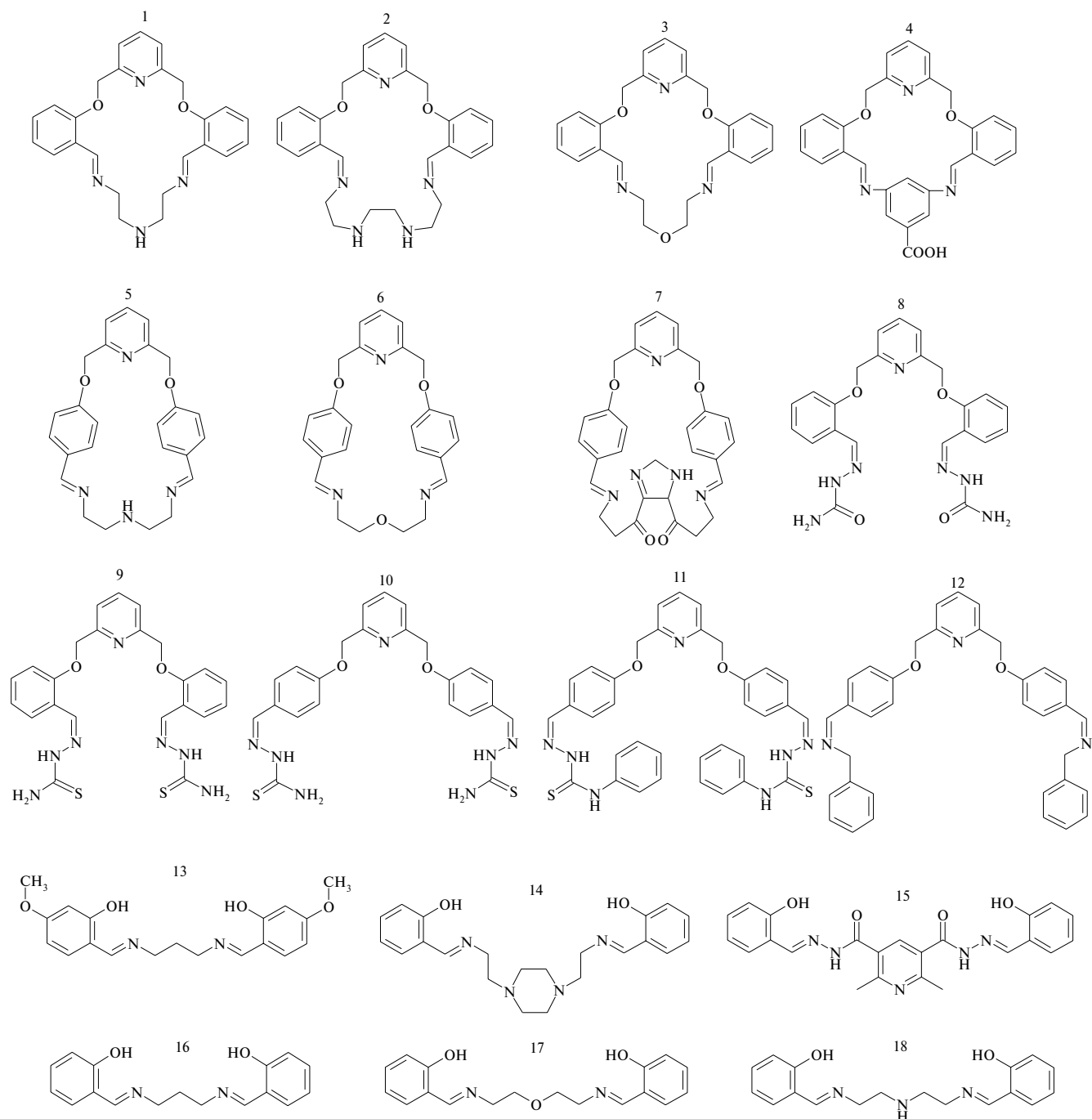
Пробы быстро фильтровали через фильтры GF/B (Whatman, Англия) на 12-позиционном харвестере. Фильтры промывали 6 мл ледяного Трис-НС1 буфера. Подсушенные фильтры помещали в сцинтилляционные флаконы и заливали 10 мл сцинтиллятора Optifase (ЛКВ, Швеция) при 20 °С. Радиоактивность измеряли через сутки на счетчике Rackbeta 1219 Spectral.

Общее связывание определяли в отсутствие вытесняющего соединения. Для выявления неспецифического связывания радиолиганда пробы инкубировали в присутствии 1 мкМ немеченного Ro5 – 4864, а специфическое связывание определяли как разность между общим и неспецифическим связыванием. Сродство исследованных соединений оценивали по величине процента ингибирования специфического связывания радиолиганда с МБДР в концентрации 10 мкМ. Для определения IC<sub>50</sub> использовали 8 возрастающих концентраций тестируемого соединения (от 0,1 нМ до 10 мкМ) в трех параллелях. Определение IC<sub>50</sub> и построение кривых вытеснения проводили методом нелинейного регрессионного анализа. В таблице представлены усредненные данные как минимум двух независимых экспериментов.

Общее связывание определяли в отсутствие вытесняющего соединения. Для выявления неспецифического связывания радиолиганда пробы инкубировали в присутствии 1 мкМ немеченного Ro5 – 4864, а специфическое связывание определяли как разность между общим и неспецифическим связыванием. Сродство исследованных соединений оценивали по величине процента ингибирования специфического связывания радиолиганда с МБДР в концентрации 10 мкМ. Для определения IC<sub>50</sub> использовали 8 возрастающих концентраций тестируемого соединения (от 0,1 нМ до 10 мкМ) в трех параллелях. Определение IC<sub>50</sub> и построение кривых вытеснения проводили методом нелинейного регрессионного анализа. В таблице представлены усредненные данные как минимум двух независимых экспериментов.

### Результаты и их обсуждение

Установлено, что наиболее активно связываются с ПБДР производные 2,6-бис(2-формиларилоксиметил)пиридина циклической структуры (соединения 1 – 4), которые в концентрации 10 мкМ проявляют высокие величины процента ингибирования связывания радиолиганда [<sup>3</sup>H]Ro5 – 4864 с ПБДР (таблица). Для



**Рис. 1.** Структуры исследованных пиридинофанов (1 – 7), их ациклических аналогов (8 – 12) и мостиковых структурных фрагментов МЦП (13 – 18)

двух активных представителей ряда (соединения 1 и 2) были определены значения  $IC_{50}$ , составившие 2,8 и 1,6 мкМ соответственно. На основании полученных результатов можно сделать предварительный вывод о структурных фрагментах, ответственных за рецепторное связывание исследованных соединений. Вероятно, циклическая структура, содержащая 2,6-оксиметилпиридиновый фрагмент с линкером различного строения между двумя арильными кольцами в *орто*-положении (соединения 1 – 4), является минимально необходимым детерминантом рецепторного распознавания пиридинофанов. Следует отметить, что *пара*-замещенные МЦП (соединения 5 – 7), не вызывают су-

щественного ингибирования связывания радиолиганда. Кроме того, ациклические аналоги с сохраненной 2,6-бис-феноксиметилпиридиновой частью (соединения 8 – 12), и мостиковые структурные фрагменты МЦП (соединения 13 – 18) также не проявляют высоких характеристик связывания с ПБДР. Однако для более глубокого понимания связи структура – аффинитет в данном ряду необходимы дальнейшие исследования.

Сопоставление данных радиолигандного анализа и противоопухолевой активности показало, что соединения, проявляющие более высокую противоопухолевую активность также характеризуются более высо-

**Способность исследованных МЦП ингибировать связывание радиолиганда с периферическими бенздиазепиновыми рецепторами**

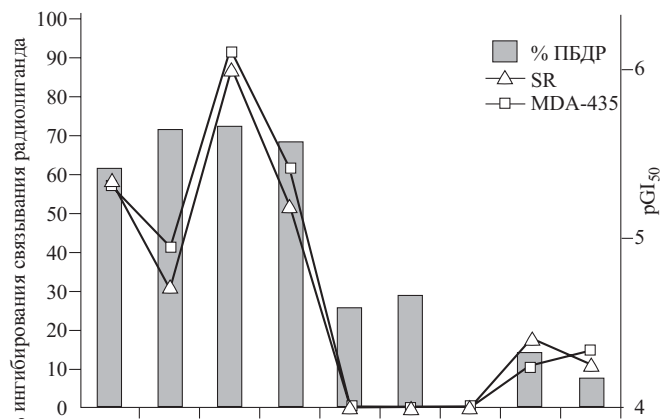
Соединение	%I*	Соединение	%I
1	61,5	10	13,8
2	71,5	11	0
3	72	12	39,2
4	68,1	13	7,3
5	6,4	14	22,5
6	25,7	15	0
7	6,6	16	20
8	28,8	17	8,2
9	0	18	0

\* — процент ингибирования связывания радиолиганда [<sup>3</sup>H]Ro5 – 4864 тестируемыми соединениями в концентрации 1 мкМ.

ким аффинитетом к ПБДР. В частности, эти соединения подавляют рост отдельных линий клеток рака человека с величинами GI<sub>50</sub> (концентрация вещества, ингибирующая рост 50 % клеток) в интервале 10<sup>-5</sup> – 10<sup>-6</sup> М. При этом ингибирование роста линий рака молочной железы (MDA-435) и лейкемии (SR) соединениями 1 – 4 согласуется с их аффинитетом к ПБДР (рис. 2). Это позволяет говорить о взаимодействии исследованных соединений с ПБДР как об одном из возможных путей опосредования их противоопухолевой активности.

**Список литературы**

1. R. Lozytska, V. Kuz'min, V. Lozitsky, et al., *Int. J. Microb. Agents*, **19**, suppl. 1, 70 (2000).
2. V. E. Kuz'min, A. G. Artemenko, V. P. Lozitsky, et al., *Acta Biochimica Polonica*, **49**, 157 – 168 (2002).
3. E. H. Cantor, A. Kenessey, G. Semenuk, and S. Spector, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 1549 – 1552 (1984).



**Рис. 2.** Связь между аффинитетом к ПБДР (% ингибирования) и противоопухолевой активностью (pGI<sub>50</sub>) исследованных МЦП и их ациклических аналогов. Точками обозначены данные *in vitro* скрининга на клетках лейкемии (линии SR) и рака груди (MDA-435). На оси абсцисс указаны номера соединений.

4. K. E. Krueger and V. Papadopoulos, *J. Biol. Chem.*, **265**, 15015 – 15022 (1990).
5. R. Moreno-Sanchez, B. A. Hogue, C. Bravo, et al., *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 1479 – 1484 (1991).
6. J. K. T. Wang, J. I. Morgan, and S. Spector, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 753 – 756 (1984).
7. H. Stepien, A. Pawlikowska, M. Pawlikowsky, *Thymus*, **12**, 117 – 121 (1988).
8. Y. Katz, G. Ben-Baruch, Y. Kloog, et al., *Clin. Sci.*, **78**, 155 – 158 (1990).
9. Y. Katz, A. Eitan, M. Gavish, *Oncology*, **47**, 139 – 142 (1990).
10. K. L. Black, K. Ikezaki, E. Santori, et al., *Cancer*, **65**, 93 – 97 (1990).
11. M. Hardwick, D. Fertikh, M. Culty, et al., *Cancer Res.*, **59**, 831 – 842 (1999).
12. H. Miettinen, J. Kononen, H. Haapasalo, et al., *Cancer Res.*, **55**, 2691 – 2695 (1995).
13. M. E. Van Dort, B. J. Ciliax, D. L. Gildersleeve, et al., *J. Med. Chem.*, **31**, 2081 – 2086 (1988).
14. <http://dtp.nci.nih.gov>.

Поступила 14.10.02