

На правах рукописи



Пухов Сергей Александрович

НОВЫЕ АНТИНЕОПЛАСТЫ НА ОСНОВЕ СЕСКВИТЕРПЕНОВЫХ
ЛАКТОНОВ ДЕВЯСИЛА ВЫСОКОГО

02.00.10 – Биоорганическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Черноголовка – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте физиологически активных веществ Российской академии наук (ИФАВ РАН)

Научный руководитель **Клочков Сергей Георгиевич**
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Волчо Константин Петрович**
доктор химических наук, профессор РАН,
Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Новосибирский институт
органической химии им. Н.Н. Ворожцова,
Сибирского отделения Российской академии
наук, лаборатория физиологически активных
веществ, главный научный сотрудник


Гендриксон Ольга Дмитриевна
кандидат химических наук,
Федеральное государственное учреждение
Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук, лаборатория
иммунобиохимии, старший научный сотрудник

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Тихоокеанский институт
биоорганической химии им. Г.Б. Елякова
Дальневосточного отделения Российской
академии наук

Защита диссертации состоится « 27 » декабря 2016 г. в 15 часов 30 минут на
заседании диссертационного совета Д 002.102.01 при ИФАВ РАН по адресу:
142432, Московская обл., г. Черноголовка, Северный проезд, д. 1.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на
сайте ИФАВ РАН: www.ipas.ac.ru

Автореферат разослан « » ноября 2016 года.

Ученый секретарь диссертационного совета  к.х.н. С.В. Афанасьева

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Несмотря на то что конец XX века ознаменовался бурным развитием синтетической медицинской химии, природные соединения остаются ценным источником новых лекарственных препаратов. В настоящее время среди растительных вторичных метаболитов, обладающих противоопухолевой активностью, важное место занимают сесквитерпеновые лактоны. Особенно активно изучаются α -метилен- γ -лактоны с высокореакционноспособной двойной связью, играющей важную роль в их химических превращениях, в том числе в живых организмах. Широко исследуются и модифицированные производные лактонов с улучшенным фармакологическим профилем. На основе таких соединений разработаны препараты для лечения рака, которые уже применяются в клинической практике. В этой связи исследование сесквитерпеновых лактонов растения девясила высокого (*Inula helenium* L., семейство сложноцветных) с целью создания на их основе новых эффективных противоопухолевых препаратов является актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования. В работе развиты опубликованные в литературе сведения российских и зарубежных авторов по выделению и химической модификации сесквитерпеновых α -метилен- γ -лактонов, а также по исследованию механизмов их действия. Полученные результаты не только дополняют существующие представления о противоопухолевой активности соединений этого ряда, но и открывают новые аспекты для их использования в терапии рака.

Цели и задачи. Цель диссертационного исследования заключалась в оценке биологической активности природных сесквитерпеновых α -метилен- γ -лактонов растения *Inula helenium* и производных, полученных на их основе. Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

- Выделение из растительного сырья и наработка в препаративных количествах легкодоступных алантолактонов.

- Модифицирование каркаса природных лактонов с сохранением активированной экзометиленовой группы с целью расширения количества потенциальных скаффолдов для химических превращений.

- Синтез аминопроизводных природных лактонов аза-реакцией Михаэля с использованием фармакофорных *N*-нуклеофилов.

- Оценка биологической активности полученных соединений *in vitro* в отношении опухолевых клеточных линий с целью выявления соединений-лидеров и предположительного механизма их действия.

Научная новизна. Синтезированы новые гибридные молекулы, сочетающие в своей структуре два фармакофорных фрагмента – природного алантолактона и биологически активного амина; практически все соединения ранее в литературе не описаны. На примере модельных аминов впервые исследована стереохимия аза-реакции Михаэля с участием природного α -метилен- γ -лактона. На основе эпоксиалантолактона получены соединения нового структурного типа – гидрированные бензофууроиндолонны, а также предложен механизм протекания этой реакции.

Изучена противоопухолевая активность природных лактонов и их модифицированных производных, в том числе представителей новой гетероциклической системы. Для исследуемых соединений впервые определены показатели IC_{50} в отношении ряда опухолевых клеточных линий. По результатам проведенных биологических испытаний *in vitro* предложены механизмы антипролиферативного действия. В результате комплексного анализа данных о биологической активности протестированных соединений выявлены соединения-лидеры, перспективные для разработки на их основе новых антинеопластов.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты диссертационного исследования вносят теоретический вклад в химию природных соединений, поскольку позволяют дополнить известные данные о взаимосвязи «структура – активность» по отношению к биологическим мишеням действия сесквитерпеновых лактонов и их производных. Показано,

что примененный в работе принцип молекулярного дизайна путем сочетания в одной молекуле двух фармакофорных фрагментов может быть использован для создания новых и улучшения характеристик уже известных лекарственных препаратов. Практическая значимость работы заключается в разработке метода синтеза большого ряда производных лактонов, который позволяет нарабатывать соединения в препаративных количествах исходя из доступных природных объектов. В результате исследования биологической активности выявлен ряд соединений, рекомендованных для проведения доклинических испытаний в качестве эффективных антинеопластов, действующих на биохимические мишени опухолевой клетки.

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования построена по классической схеме, которая включает обоснование актуальности темы, постановку цели и задач, выбор экспериментальных методов, присущих биоорганической химии, интерпретацию и обсуждение результатов, а также формулировку выводов.

При выполнении диссертационной работы использовались современные экспериментальные методы органической химии и химии природных соединений, комплекс инструментальных физико-химических методов: ВЭЖХ, ИК-спектроскопия, масс-спектрометрия, спектроскопия ЯМР, РСА. Биологические исследования включали методы клеточной биологии, в том числе определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста (с применением спектрофотометрии) и теста с ресазурином (флуориметрия), оценку антиоксидантного действия и изучение индукции апоптоза методом проточной цитофлуориметрии.

Положения, выносимые на защиту.

- Выделение из растительного сырья природных сесквитерпеновых лактонов (алантолактона и изоалантолактона) и получение на их основе структурных аналогов, сохраняющих активированную метиленовую группу в лактонном цикле.

- Введение природных лактонов и их аналогов в аза-реакцию Михаэля с участием фармакофорных аминов, в результате которой происходит присоединение нуклеофила по экзоциклической двойной связи.

- Исследование стереохимии этого взаимодействия и установление структуры полученных аминопроизводных с использованием спектроскопии ЯМР, включая двумерные эксперименты.

- Изучение реакций эпоксиалантолактона с рядом первичных аминов, приводящих к образованию новой гетероциклической системы – гидрированных бензо[g]фууро[4,3,2-*cd*]индолон, строение которых доказано с помощью современных физико-химических методов.

- Оценка уровня противоопухолевой активности природных сесквитерпеновых лактонов и их производных *in vitro* в отношении ряда линий опухолевых клеток.

- Определение наиболее активных соединений среди модифицированных лактонов и вероятного механизма их антипролиферативного действия.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность исследования подтверждается выполнением работ на высоком научно-методическом уровне с использованием современного инструментария, сравнением полученных данных с литературными сведениями по указанной тематике, анализом собственных результатов, а также публикацией основного содержания работы в рецензируемых изданиях – российских и международных научных журналах.

Основные положения и результаты работы были представлены на следующих конференциях: «Успехи синтеза и комплексообразования» (г. Москва, 2012 г.) (устный доклад); XV Международной конференции по гетероциклам в биоорганической химии (г. Рига, Латвия, 2013 г.) (устный доклад); 50-й Международной конференции по медицинской химии «RICT 2014» (г. Руан, Франция, 2014 г.); Научно-практической конференции с международным участием «Достижения и перспективы развития фитохимии» (г. Караганда, Казахстан, 2015 г.).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 138 страницах и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследования, обсуждения собственных результатов, заключения и списка использованных источников, включающего 179 ссылок. Работа содержит 83 рисунка и 15 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во Введении к диссертации приведены обоснование актуальности темы исследования, степень её разработанности, цели и задачи, научная новизна, теоретическая и практическая значимость, методология и методы исследования, степень достоверности и апробация результатов.

В разделе 1 представлен обзор литературных данных по эвдесманоидам растений рода *Inula* и их биологической активности. В нем подробно рассмотрены свойства наиболее распространенных представителей этого класса – алантолактона и изоалантолактона, а также приведены структурные формулы и данные по биологической активности других лактонов. Подраздел, посвященный химическим модификациям эвдесманолидов, дает представление о современном состоянии химии таких соединений. Кратко рассмотрены механизмы противоопухолевого действия природных лактонов.

В разделе 2 приведены сведения об объектах и биологических методах, применяемых в диссертационном исследовании. Раздел 3 состоит из двух подразделов, в которых изложены основные результаты работы, – химической части, посвященной выделению и модифицированию природных лактонов, и данных биологических исследований. В разделе 4 указаны использованные в работе приборы, описаны методики химических экспериментов и приведены физико-химические характеристики соединений.

1. Модифицирование природных лактонов

Объектами диссертационного исследования являлись легкодоступные природные сесквитерпеновые лактоны эвдесманового типа, выделенные из растения девясила высокий – изоалантолактон (**L1**, (3a*R*,4a*S*,8a*R*,9a*R*)-8a-метил-3,5-диметилидендекагидронафто[2,3-*b*]фуран-2-он) и алантолактон

(**L2**, (3a*R*,5*S*,8a*R*,9a*R*)-5,8a-диметил-3-метилен-3a,5,6,7,8,8a,9,9a-октагидронафто[2,3-*b*]фуран-2-он). В лактонном цикле этих соединений присутствует высокореакционноспособная α -метиленовая группа, и они обладают довольно высокой биологической активностью в отношении различных линий опухолевых клеток. Химическую модификацию лактонов проводили в двух направлениях:

- расширение количества «билдинг»-блоков для последующей модификации (изомеризация двойной связи, эпексидирование декалинового фрагмента и последующее раскрытие трехчленного цикла);
- введение природных лактонов и их аналогов в аза-реакцию Михаэля с участием ряда фармакофорных аминов.

1.1 Реакции природных лактонов по декалиновому фрагменту

Смесь изомерных лактонов **L1** и **L2**, выделенную из хлороформенного экстракта корней девясила высокого, разделяли на индивидуальные компоненты с помощью колоночной хроматографии на силикагеле, импрегнированном AgNO_3 . Были получены соединения, в структуре которых сохраняется активированная двойная связь лактонного цикла (рис. 1).

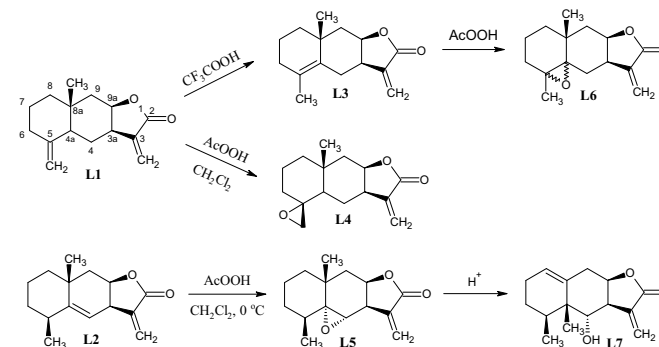


Рис. 1 Схема превращений природных алантолактонов

В изоалантолактоне **L1** в кислой среде происходила миграция несопряженной двойной связи с образованием аллоалантолактона **L3**, причем наибольший выход продукта (81%) был достигнут в случае использования с

5-кратного избытка трифторуксусной кислоты. Реакции эпексидирования лактонов **L1** и **L2** перуксусной кислотой протекали стереоспецифично, в них образовывался один пространственный изомер (**L4** и **L5** соответственно) с α -ориентацией атома кислорода. Эпексидирование аллоалантолактона **L3** в аналогичных условиях привело к диастереомерной смеси эпексидпроизводных **L6** в соотношении 3:2. При перекристаллизации полученной смеси из метанола был выделен основной компонент – (3*aR*, 4*aS*, 5*R*, 8*aR*, 9*aR*)-5,8*a*-диметил-3-метилен-4*a*,5-эпексидоктагидро-3*H*-нафто[2,3-*b*]фуран-2-он (α -**L6**). Методом РСА установлено, что атом кислорода в эпексидном фрагменте имеет α -конфигурацию. Под действием кислоты из эпексидалантолактона **L5** был получен 4-гидрокси-4*a*,5-диметил-3-метиленоктагидро-3*H*-нафто[2,3-*b*]фуран-2-он (**L7**). Соединения **L1–L7** содержатся в растениях рода *Inula* в качестве минорных компонентов. Однако их можно наработать в препаративных количествах исходя из относительно легкодоступных природных алантолактонов.

1.2 Реакции лактонов с фармакофорными аминами

С целью выхода к соединениям с улучшенной или измененной биологической активностью был выбран ряд фармакофорных аминов **1–9**.

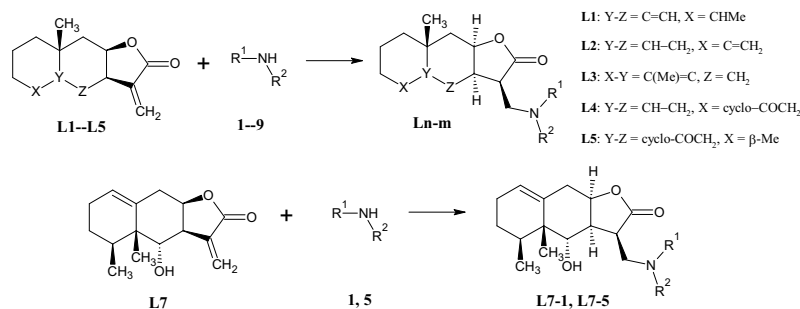


Рис. 2 Схемы реакций лактонов с аминами

Взаимодействие лактонов **L1–L5** и **L7** с аминами протекало в мягких условиях стереоселективно по типу аза-реакции Михаэля с образованием продуктов присоединения амина по экзоциклической двойной связи лактона

(за исключением реакции эпексидалантолактона **L5** с триптамином). В результате был синтезирован ряд гибридных молекул, содержащих два биологически активных фрагмента – сесквитерпенового лактона и амина (в шифре соединений **Ln-m** первая часть обозначает номер исходного лактона, а вторая – номер соответствующего амина). Структуры и физико-химические характеристики соединений приведены в табл. 1.

1.3 Стереохимия аза-реакции Михаэля

При введении хиральных молекул в аза-реакцию Михаэля большое значение имеет её стереохимический результат, поскольку в таких превращениях с участием лактонов **L1–L5** и **L7** сохраняются содержащиеся в молекуле хиральные центры и появляется асимметрический атом углерода в положении 3. На примере конъюгата **L1** с 3,4-диметоксибензиламинем (**10**) (выход 66%, $T_{пл} = 96-98^\circ\text{C}$, $[\alpha]_D = +34^\circ$) была установлена стереоконфигурация нового хирального центра. Эксперименты двумерной

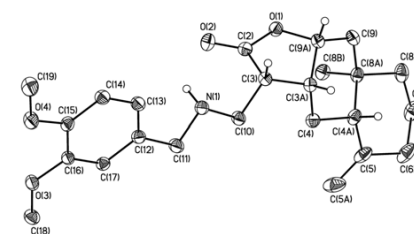


Рис. 3 Структура соединения **L1-10** по данным РСА

Показано, что аминотильный заместитель имеет β -конфигурацию (стереодескриптор *R*). Пространственное строение продукта **L1-10** позволило предположить стереохимию аза-реакции Михаэля. После присоединения амина к двойной связи лактона, сопряженной с карбонильной группой, образующийся енолят протонируется с *экзо*-стороны и получается стерически наименее затрудненный и термодинамически более выгодный диастереомер с аксиальным расположением атома водорода.

Таблица 1 – Продукты аза-реакции Михаэля с участием лактонов **L1–L5** и **L7**

Номер	Амин (HNR ¹ R ²)		Продукты	Выход, %	T _{пл} , °C	[α] _D , °
	Структура					
1		L1-1	85	118–119	+118	
		L2-1	77	149–150	+33	
		L3-1	75	85–86	+50	
		L4-1	87	95–96	+43	
		L5-1	89	121–122	+40	
2		L1-2	83	170–171	+103	
		L2-2	80	122–123	+53	
		L4-2	80	163–164	+60	
		L5-2	81	149–150	+50	
		3		L1-3	86	202–203
L2-3	85			179–181	+75	
L5-3	87			180–181	+90	
4		L1-4	85	135–136	+120	
		L3-4	85	126–127	+40	
		L5-4	88	160–161	+70	
5		L1-5	81	184–185	+105	
		L2-5	81	145–146	+80	
		L3-5	80	167–169	+80	
		L5-5	91	189–190	+60	
		L7-5	89	137–138	–25	
6		L1-6	80	184–185	+75	
		L2-6	78	120–121	+55	
		L3-6	84	127–128	+64	
		L4-6	88	132–133	+54	
		L5-6	80	197–198	+50	
7		L1-7	82	172–173	+50	
		L2-7	85	174–175	+50	
		L3-7	79	90–91	+10	
		L5-7	77	128–129	+120	
8		L4-8	76	112–113	+85	
		L5-8	82	135–136	+100	
9		L2-9	83	184–185	+42	
		L4-9	92	106–108	+20	
		L5-9	70	183–184	+29	

1.4 Образование новой гетероциклической системы

При взаимодействии эпоксиантолактона **L5** с триптамином **9** реакция не завершалась на стадии присоединения амина по экзоциклической двойной связи лактона, а происходило раскрытие эпоксигруппы и замыкание пирролидинового цикла. В результате образовалась не описанная ранее гетероциклическая система – замещенный гидрированный бензо[*g*]фуоро-[4,3,2-*cd*]индолон **L5'-9** в виде одного пространственного изомера.

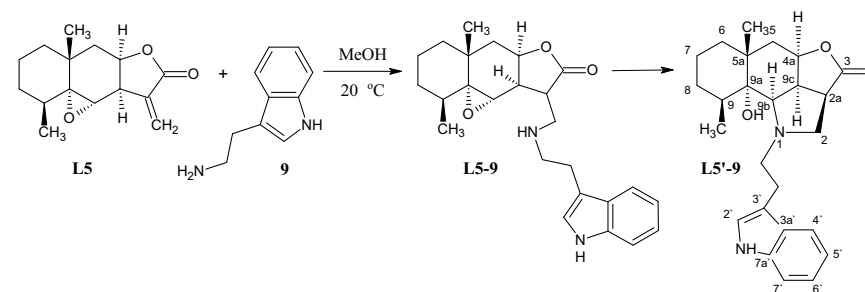


Рис. 4 Схема реакции лактона **L5** с триптамином **9**

При непродолжительном (0,5 ч) выдерживании смеси реагентов удалось выделить аддукт Михаэля **L5-9** (выход 70%), который в течение 24 ч превращался в продукт **L5'-9** (выход 54%). Строение соединения **L5'-9** было установлено на основании спектральных данных (масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР ¹H и ¹³C, в том числе экспериментов COSY и NOESY) и доказано PCA (рис. 5).

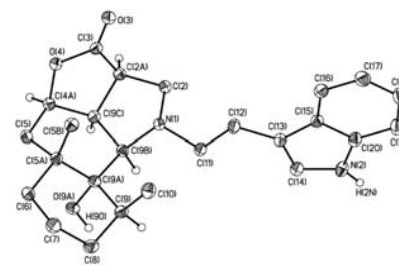


Рис. 5 Структура соединения **L5'-9** по данным PCA

1.5 Реакция эпоксиантолактона с первичными аминами

Другие первичные амины, аналогично триптамину, в реакциях с эпоксиантолактоном образовывали соответствующие замещенные гидрированные бензо[*g*]фуоро[4,3,2-*cd*]индолоны. Наиболее легко реакция

протекала в случае (гет)арилалкиламинов. Гетероциклизации способствовало наличие в ароматическом цикле дополнительных π -донорных фрагментов. В результате реакции лактона **L5** с аминами **9–17** были выделены производные новой гетероциклической системы **L5'-9 – L5'-17** (рис. 6, табл. 2).

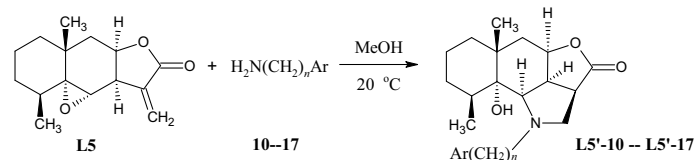


Рис. 6 Реакция лактона **L5** с первичными аминами

Таблица 2 – Продукты гетероциклизации **L5'-10 – L5'-17**

Номер	Амин		Выход, %	$T_{пл}$, °C	$[\alpha]_D$, °
	Ar	<i>n</i>			
9	Indolyl	2	54	235–236	+32
10	3,4-(MeO) ₂ C ₆ H ₃	1	84	177–178	+64
11	Ph	1	70	211–212	+74
12	4-MeOC ₆ H ₄	1	76	166–168	+45
13	Ph	2	68	220–221	+55
14	4-MeOC ₆ H ₄	2	76	137–138	+46
15	3,4-(MeO) ₂ C ₆ H ₃	2	80	185–187	+35
16	Ph	3	77	174–175	+40
17	5-MeOIndolyl	2	76	240–241	+16

Таким образом, в результате проведенных экспериментов был получен ряд лактонов и их конъюгатов (53 соединения), использованных в дальнейшем для изучения противоопухолевой активности.

2. Исследование биологической активности

Объектами для оценки антипролиферативной активности служили коммерчески доступные опухолевые клеточные линии человека: аденокарциномы молочной железы (MCF7), меланомы кожи (MS), аденокарциномы толстого кишечника (HCT116) и суспензионная культура клеток хронического миелоидного лейкоза (K562).

2.1 Определение жизнеспособности линий MCF7, MS и HCT116

Жизнеспособность клеточных линий MCF7, MS и HCT116 была определена по МТТ-тесту (МТТ – бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия), данные представлены в табл. 3. Изоалантолактон **L1**, в отличие от своих аминопроизводных, показал приблизительно равное цитотоксическое действие в отношении всех трех адгезивных линий. В то же время алантолактон **L2** и его аддукты проявили как более высокую активность, так и избирательность действия. Так, соединение **L2-6** оказалось почти в 2 раза токсичнее исходного лактона в отношении линии MS и в 3 раза токсичнее для клеток MCF7, хотя в случае клеток HCT116 активность сохранялась на том же уровне. Продукты аминирования аллоалантолактона **L3** не показали значимого эффекта при действии на исследуемые клеточные линии, за исключением соединения **L3-6**, которое являлось более токсичным для клеток линии HCT116. Аналогичная картина наблюдалась в случае эпоксиизоалантолактона **L4**, но с несколько меньшей разницей в цитотоксичности для разных линий клеток.

Большинство аддуктов Михаэля на основе эпоксиалантолактона **L5** обладали выраженной цитотоксической активностью. Воздействие самого лактона **L5** в течение 48 ч ингибировало рост культур клеточных линий в дозозависимом виде. При этом активность соединений **L5-6**, **L5-7**, **L5-8** превышала активность исходного лактона либо сохранялась на том же уровне. В то же время практически все гидрированные бензо[*g*]фууро[4,3,2-*cd*]индолонны (**L5'-m**) не обладали выраженным цитотоксическим действием.

Следует отметить, что клетки линии HCT116 оказались наиболее чувствительными при воздействии на нее лактонов **L2** и **L5** с показателем IC_{50} , равным ~13 мкМ. При этом производные пиперидина **6** сохраняли активность на уровне исходного лактона, в то время как конъюгат пространственно затрудненного амина **7** только в случае лактона **L5** эффективно подавлял рост клеток этой линии.

Таблица 3 – Цитотоксичность лактонов и их производных в отношении опухолевых клеточных линий (IC₅₀, мкМ)

Ln-m	Клеточная линия			Ln-m	Клеточная линия		
	MCF7	MS	НСТ116		MCF7	MS	НСТ116
L1	41,48±0,03	44,38±0,02	38,09±0,03	L4-3	84,13±0,08	71,90±0,06	76,82±0,02
L1-1	>100	84,53±0,02	68,05±0,02	L4-6	72,56±0,06	65,06±0,04	85,66±0,06
L1-2	>100	81,9±0,02	80,96±0,02	L4-9	>100	>100	>100
L1-3	>100	>100	>100	L4-8	>100	>100	>100
L1-4	>100	>100	>100	L5	29,25±0,03	32,39±0,04	13,88±0,04
L1-5	>100	83,52±0,03	>100	L5-1	34,00±0,04	34,68±0,04	28,01±0,08
L1-6	>100	80,00±0,02	89,27±0,06	L5-2	37,25±0,03	34,98±0,05	34,72±0,07
L1-7	>100	>100	>100	L5-3	38,74±0,06	40,75±0,05	24,40±0,05
L1-9	34,94±0,01	23,11±0,04	29,35±0,02	L5-4	61,13±0,04	50,88±0,04	38,03±0,06
L2	33,01±0,3	22,7±0,03	12,92±0,04	L5-5	35,74±0,02	37,01±0,05	22,48±0,07
L2-1	48,73±0,04	44,04±0,04	45,59±0,04	L5-6	17,18±0,03	31,69±0,04	12,85±0,05
L2-2	71,23±0,05	27,44±0,03	71,25±0,02	L5-7	17,12±0,03	13,34±0,03	10,75±0,07
L2-3	67,63±0,07	28,25±0,04	55,15±0,02	L5-8	24,65±0,04	12,60±0,10	14,55±0,06
L2-4	>100	>100	>100	L5-9	58,39±0,03	51,25±0,04	39,95±0,03
L2-5	51,31±0,04	46,00±0,02	57,44±0,04	L5-10	>100	>100	60,76±0,05
L2-6	12,98±0,03	13,84±0,05	13,36±0,06	L5-11	>100	>100	54,09±0,03
L2-7	>100	>100	>100	L5-12	>100	>100	>100
L2-9	20,92±0,02	16,99±0,02	26,06±0,03	L5-13	>100	>100	>100
L3	---	---	---	L5-14	>100	>100	83,75±0,02
L3-1	>100	66,23±0,03	55,37±0,03	L5-15	>100	>100	68,35±0,02
L3-2	>100	>100	>100	L5-16	>100	>100	>100
L3-4	>100	>100	>100	L5-17	>100	>100	>100
L3-5	>100	68,03±0,03	70,29±0,02	L7	>100	>100	89,60±0,04
L3-6	78,52±0,03	33,93±0,06	38,11±0,05	L7-1	>100	>100	73,07±0,04
L3-7	>100	>100	>100	L7-5	>100	>100	48,53±0,08
L4	63,36±0,04	42,98±0,04	52,27±0,03			84,04±0,02	75,04±0,03
L4-1	>100	>100	>100			>100	61,36±0,04
L4-2	>100	>100	>100			>100	

2.2 Определение жизнеспособности опухолевых клеток линии K562

Для оценки влияния сесквитерпеновых лактонов и их производных на жизнеспособность суспензионных опухолевых клеток был выполнен эксперимент на линии K562 с использованием ресазурина. Из данных табл. 4 видно, что как исходные сесквитерпеновые лактоны, так и продукты их модифицирования обладали общей высокой токсичностью по отношению к клеткам миелоидного лейкоза.

Таблица 4 – Токсичность соединений в отношении линии K562 (IC₅₀, мкМ)

Соединение	IC ₅₀	Соединение	IC ₅₀
L1	9,64±0,05	L5-6	7,36±0,05
L2	6,27±0,03	L5-7	7,03±0,05
L4	4,73±0,09	L5-8	5,81±0,04
L5	3,95±0,04	L6	5,38±0,03
L5-1	7,57±0,04	L7	6,83±0,15
L5-5	6,45±0,06		

2.3 Определение интенсивности перекисного окисления липидов и восстановительной активности

При определении интенсивности перекисного окисления липидов (ПОЛ) гомогената мозга крыс было установлено, что исходный эпоксиалантолактон **L5** не проявил антиоксидантной активности, как и сами фармакофорные амины. В то же время его аминопроизводные эффективно ингибировали Fe³⁺-индуцированное ПОЛ (табл. 5, прочерк означает отсутствие влияния).

В CUPRAC-тесте восстановительную активность проявили производные эпоксиалантолактона **L5-3** и **L5'-17**. Они были более активными, чем тролокс (водорастворимая форма витамина E, известный антиоксидант), а близкими по активности к этому препарату оказались производные **L5-9** и **L5'-9**, которые к тому же наиболее сильно ингибировали ПОЛ.

Таблица 5 – Антиоксидантная активность соединений в тесте ингибирования ПОЛ (в % от контроля) и CUPRAC-тесте (в тролокс-эквивалентах)

Соединение	Ингибирование ПОЛ	CUPRAC-тест
L5	—	—
L5-3	77,69±0,33	1,14±0,12
L5-9	71,78±3,81	0,65±0,04
L5'-9	73,57±3,56	0,77±0,07
L5'-10	64,76±8,28	0,23±0,04
L5'-11	72,95±2,74	—
L5'-12	73,42±11,05	0,22±0,06
L5'-13	82,36±1,29	—
L5-14	77,34±6,09	—
L5'-14	80,99±3,69	0,30±0,09
L5'-15	76,28±2,84	—
L5'-16	79,99±3,81	—
L5'-17	87,39±2,57	1,20±0,06

2.4 Исследование участия сигнального пути p53 в гибели опухолевых клеток

Эксперимент заключался в выяснении факта влияния эндогенного белка p53, находящегося в опухолевых клетках, на цитотоксическую активность лактонов и их производных. Использовали клеточную линию аденокарциномы толстого кишечника человека HCT116wtp53, экспрессирующую белок p53, и ее вариант с нокаутом этого белка (HCT116p53/-). Количественным критерием цитотоксичности тестируемых соединений служил индекс IC₅₀ (табл. 6), определяемый после 48 часов инкубации.

Токсичность эпоксиантолактона **L5** по отношению к линии клеток аденокарциномы толстого кишечника человека HCT116wtp53 (экспрессирующей белок p53) почти в 2 раза превышала таковую для линии с нокаутом этого белка, что может свидетельствовать о вкладе сигнального пути p53 в цитотоксичность лактона.

Таблица 6 – Токсичность соединений в отношении клеток линий HCT116wtp53 и HCT116p53/- (IC₅₀, мкМ)

Соединение	Клеточная линия	
	HCT116 wt p53	HCT116 p53/-
L1	38,09±0,03	37,60±0,07
L2	12,92±0,04	23,89±0,04
L4	52,27±0,03	61,31±0,09
L5	13,88±0,04	21,64±0,05
L5-3	24,40±0,05	>100
L5-5	22,48±0,07	29,05±0,04
L5-7	10,75±0,07	10,07±0,03
L5-8	14,55±0,06	18,05±0,08
L5-9	39,95±0,05	36,71±0,04
L5'-9	60,76±0,03	>100
L5'-10	54,09±0,03	47,29±0,02
L5-14	68,35±0,02	72,83±0,03
L5'-14	83,75±0,02	>100
L6	31,61±0,06	51,29±0,09
L7	48,53±0,08	>100

При этом только аддукт эпоксиантолактона с *n*-фторфенилпиперазином **L5-3** показал отсутствие токсичности в отношении нокаутированной линии клеток и умеренную токсичность в отношении «дикого» типа. Следовательно, сигнальный путь p53 в механизме цитотоксичности соединений **L5-3**, **L5'-9** и **L5'-14** является одним из основополагающих, а остальные вещества индуцируют гибель клеток в обход указанного пути. Необходимо отметить аддукт **L5-7**, эффективность которого превышала действие исходного лактона. Кроме того, это соединение показало одинаковую цитотоксичность как в отношении клеток «дикого» типа, так и нокаутных клеток, что отличало его от исходного лактона. Следовательно, некоторые соединения этого ряда способны индуцировать апоптоз в опухолевых клетках в обход сигнальных путей белка p53.

2.5 Предобработка *N*-ацетилцистеином

Ингибитор образования активных форм кислорода (АФК) – *N*-ацетилцистеин – был использован для выяснения вклада окислительного стресса, вызываемого действием соединений, в механизм гибели опухолевых клеток. В условиях предобработки клеток MCF7 *N*-ацетилцистеином свою токсичность сохраняли только соединения **L5-7** и **L5-8** (рис. 7). Аналогичные результаты наблюдались в отношении клеток MS. В эксперименте с клетками аденокарциномы HCT116 в присутствии *N*-ацетилцистеина исходные лактоны показали снижение эффективности действия, а их производные сохраняли свою токсичность на прежнем уровне.

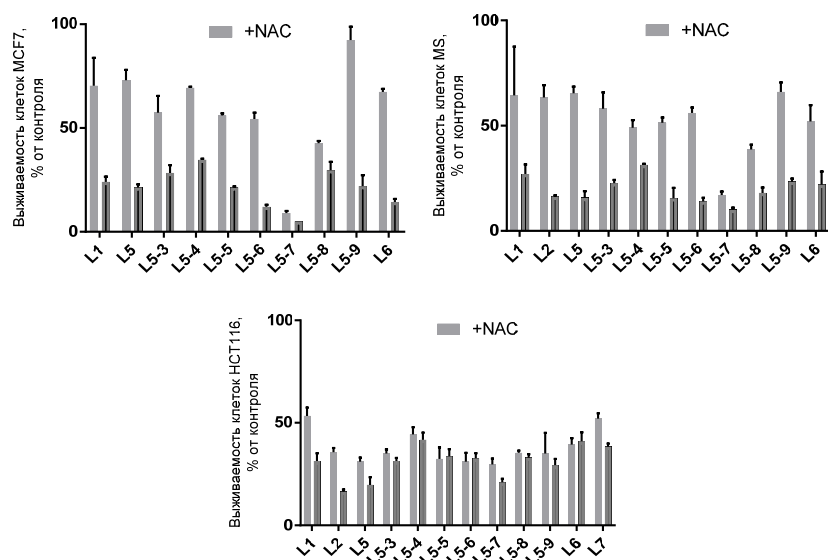


Рис. 7 Выживаемость клеток MCF7, MS, HCT116 при действии соединениями (100 мкМ) в присутствии *N*-ацетилцистеина (NAC) и в его отсутствие по результатам МТТ-теста (48 ч экспозиции, $n = 3$, планки погрешностей означают \pm SD от значения)

Полученные данные свидетельствуют о том, что в основе цитотоксического действия производных лактонов лежат механизмы, связанные не только с генерированием свободных радикалов и влиянием на

окислительное повреждение липидов. В большинстве случаев антиоксидантный потенциал этих соединений не препятствовал проявлению их цитотоксичности по отношению к клеточной линии HCT116. Участие АФК-зависимых механизмов в гибели клеток было более выражено для линий MCF7 и MS, для которых цитотоксический эффект лактонов и их аминопроизводных в большей степени может быть предотвращён присутствием АФК-акцептора. Для клеток линии HCT116 такой закономерности не наблюдалось.

2.6 Исследование гибели опухолевых клеток методом проточной цитометрии

Исследование действия эпоксиантолактона **L5** и ряда его производных на клетки миелоидного лейкоза методом цитометрии показало увеличение апоптотической популяции клеток в 2 раза по сравнению с базальным уровнем. При этом структура аминного фрагмента не оказывала заметного влияния на уровень активности (рис. 8, табл. 7).

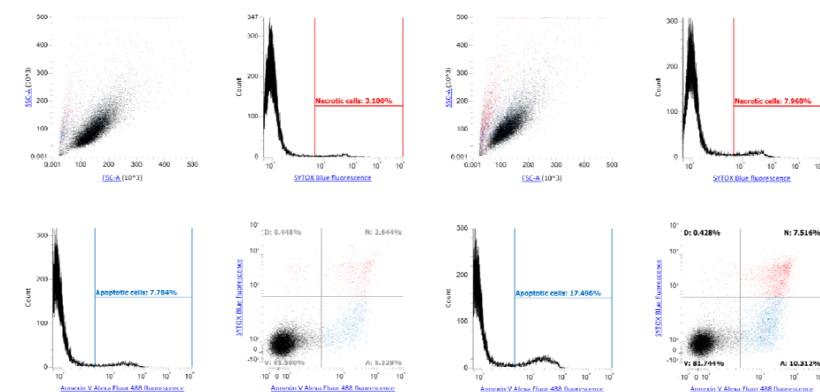


Рис. 8 Цитограммы и гистограммы необработанных клеток K562 (слева) и при воздействии **L5** (5 мкМ) (справа) после 24 часов инкубации

Таблица 7 – Распределение клеток K562 по популяциям (5 мкМ, 24 часа)

Соединение	Содержание популяции клеток, % от общего			
	«D»	«N»	«V»	«A»
Контроль	0,5	2,6	91,6	5,3
Камптогтецин	0,7	17,2	60,3	21,9
L5	0,4	7,5	81,7	10,3
L5-1	0,3	5,6	84,7	9,4
L5-5	0,7	8,7	81,3	9,3
L5-7	0,2	5,4	84,1	10,3
L5-8	0,4	7,3	82,4	9,9

2.7 Вероятные механизмы противоопухолевого действия сесквитерпеновых лактонов

Известно, что эффективность большинства противоопухолевых агентов связана с их способностью индуцировать гибель опухолевых клеток по пути апоптоза. В этих процессах, как правило, задействованы клеточный редокс-статус, образование активных форм кислорода, окислительные повреждения в клетке и запуск митохондриально-зависимого пути апоптоза. Как сами сесквитерпеновые лактоны, так и их производные в экспериментах показали высокую антипролиферативную активность при избирательности действия на клеточные линии. Как наиболее эффективные следует отметить соединения **L2-6**, **L5-6**, **L5-7** и **L5-8**. Цитотоксичность этих аминопроизводных выше, чем исходных лактонов. Практически все исследованные соединения, по данным цитометрии, вызывают гибель опухолевых клеток по пути апоптоза. При этом токсичность не зависит от того, обладают они анти- или прооксидантными свойствами. Как было обнаружено на клетках линии НСТ116, в присутствии *N*-ацетилцистеина исходные лактоны показали пониженную эффективность действия, а все конъюгаты сохранили свою токсичность на том же уровне. Этот факт свидетельствует в пользу механизма действия, в котором роль активных форм кислорода не имеет первостепенного значения. По характеру действия

на линии опухолевых клеток «дикого» типа и с нокаутом по белку p53 все исследованные соединения можно разделить две группы. Сигнальный путь p53 в механизме цитотоксичности аминопроизводных **L5-3**, **L5'-9** и **L5'-14** является одним из основных, в то время как остальные соединения индуцируют гибель клеток в обход этого пути. Для соединений второй группы характерно наличие одинаковой цитотоксичности как в отношении клеток «дикого» типа, так и нокаутных. Отмеченное обстоятельство является особенно важным, поскольку позволяет осуществлять поиск соединений, действующих в обход сигнальных путей белка p53 – одного из характерных факторов малигнизации многих злокачественных новообразований.

Механизмы противоопухолевого действия сесквитерпеновых лактонов и их производных адекватно отражает термин «antineoplasty», достаточно широко распространенный в англоязычной научной литературе и впервые использованный нами для обозначения объектов исследования настоящей диссертационной работы.

Таким образом, проведенные эксперименты по биологическому тестированию природных и модифицированных сесквитерпеновых лактонов показали, что эти соединения перспективны для создания на их основе лекарственных препаратов для лечения рака – высокоэффективных антинеопластов.

ВЫВОДЫ

В результате выполненного диссертационного исследования можно сделать следующие выводы:

1. Синтезирован ряд новых производных эвдесманового ряда (46 соединений) на основе природных сесквитерпеновых лактонов, выделенных из растения *Inula helenium* (девясил высокий). С помощью комплекса физико-химических методов установлены их пространственные структуры.

2. Исследована реакция присоединения аминов к природным лактонам, содержащим α -метиленовую группу. Установлено, что в результате такого взаимодействия образуется единственный стереоизомер с *R*-конфигурацией нового хирального центра.

3. Обнаружено, что при взаимодействии эпоксиалантолактона с первичными аминами образуется новая гетероциклическая система – гидрированные бензо[*g*]фуоро[4,3,2-*cd*]индол-3(1*H*)-оны.

4. Изучена биологическая активность природных и модифицированных лактонов на ряде опухолевых клеточных линий. Определена наиболее чувствительная к действию соединений линия – аденокарцинома толстого кишечника (НСТ116). Предложены наиболее вероятные механизмы антипролиферативного действия производных сесквитерпеновых лактонов.

5. Выявлены соединения-лидеры для разработки на их основе новых эффективных антинеопластов.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Аникина, Л.В. Сравнительное определение жизнеспособности клеток с помощью МТТ и ресазурина / Л.В. Аникина, **С.А. Пухов**, Е.С. Дубровская, С.В. Афанасьева, С.Г. Клочков // *Фундаментальные исследования*. – № 12 (7). – 2014. – С. 1423-1427.

2. Пухов, С.А. Ингибирование роста клеток аденокарциномы молочной железы эпоксиалантолактоном и его производными / **С.А. Пухов**, М.Е. Неганова, Л.В. Аникина, Е.Ф. Шевцова, С.В. Афанасьева, С.Г. Клочков // *Фундаментальные исследования*. – № 9 (9). – 2014. – С. 1988-1992.

3. Клочков, С.Г. Пространственное строение эпоксиаллоалантолактона / С.Г. Клочков, И.В. Ананьев, **С.А. Пухов**, С.В. Афанасьева // *Химия природных соединений*. – 2013. – № 3. – С. 454.

4. Клочков, С.Г. Стереохимия аза-реакции Михаэля с участием природных алантолактонов / С.Г. Клочков, И.В. Ананьев, **С.А. Пухов**, С.В. Афанасьева // *Химия гетероциклических соединений*. – 2012. – № 5. – С. 750-756.

5. Клочков, С.Г. Образование новой гетероциклической системы на основе природного алантолактона / С.Г. Клочков, С.В. Афанасьева, **С.А. Пухов** // *Химия гетероциклических соединений*. – 2012. – № 2. – С. 406-407.

Тезисы докладов:

1. **Pukhov S.A.**, Anikina L.V., Dubrovskaya E.S., Afanasyeva S.V., Klochkov S.G. Antiproliferative activity *in vitro* of epoxyalantolactone aminoderivatives // *Book of Abstracts. Proceedings of the International Research and Practice Conference «Achievements and Prospects for the Development of Phytochemistry»*. April 10-11, 2015, Karaganda, Kazakhstan. P. 68.

2. **Pukhov S.**, Anikina L., Afanasyeva S., Klochkov S. Eudesmanolides of *Inula helenium* and its aminoderivatives with cytotoxic activity // *Book of Abstracts. 2nd Russian Conference on Medicinal Chemistry (MedChem-2015)*. July 5-10, 2015, Novosibirsk, Russia. P. 253.

3. **Pukhov S.A.**, Neganova M.E., Anikina L.V., Afanasiyeva S.V., Shevtsova E.F., Klochkov S.G. Epoxyalantolactone and its derivatives inhibit the growth of MCF7 cells // Book of Abstracts. The 50th International Conference on Medicinal Chemistry (RICT 2014). July 2-4, 2014, Rouen, France. P. 274.

4. **Пухов С.А.**, Ерматова А.Б., Афанасьева С.В., Клочков С.Г. Синтез, структура и антибактериальная активность конъюгатов пиперидинов с сесквитерпеновыми лактонами // Тезисы докладов. Первая Российская конференция по медицинской химии (MedChem Russia-2013) с международным участием. 9-12 сентября, 2013, Москва, Россия. С. 248.

5. **Pukhov S.**, Afanasyeva S., Klochkov S. Recyclization of epoxyalantolactone (het)arylethylaminoderivatives // Book of Abstracts. XVth International Conference on Heterocycles in Bio-organic Chemistry. May 27-30, 2014, Riga, Latvia. P. 52.

6. **Пухов С.А.**, Клочков С.Г., Афанасьева С.В. Пространственное строение новых аминопроизводных природных алантолактонов // Тезисы докладов. Ч. 1. Всероссийская научная конференция (с международным участием) «Успехи синтеза и комплексообразования». 23-27 апреля, 2012, Москва, Россия. С. 73.

7. **Пухов С.А.**, Афанасьева С.В. Гетероциклическая система на основе природного алантолактона // Тезисы докладов. Шестая Всероссийская конференция молодых учёных, аспирантов и студентов с международным участием (Менделеев-2012). 3-6 апреля, 2012 г, Санкт-Петербург, Россия. С. 404-406.

Автор выражает благодарность научному руководителю к.б.н. С.Г. Клочкову, сотрудникам лаборатории природных соединений ИФАВ РАН и лично своим соавторам к.х.н. С.В. Афанасьевой и к.б.н. Л.В. Аникиной за помощь в работе; сотрудникам лаборатории биомолекулярного скрининга ИФАВ РАН и лично к.х.н. Е.Ф. Шевцовой и к.х.н. М.Е. Негановой за исследование антиоксидантных свойств соединений; к.ф.-м.н. В.И. Козловскому (ИНЭПХФ РАН) за масс-спектрометрический анализ образцов; к.х.н. А.В. Черняку (ИПХФ РАН) за регистрацию ЯМР-спектров; к.х.н. И.В.Ананьеву (ИНЭОС РАН) за выполнение РСА; сотрудникам лаборатории генетики опухолевых клеток за предоставление клеточных линий K562 и НСТ116p53-/-, сотрудникам лаборатории механизмов гибели опухолевых клеток НИИ канцерогенеза Российского онкологического научного центр им. Н.Н. Блохина и лично к.м.н. Т.А. Сидоровой; а также своим коллегам, друзьям и всем, кто оказывал поддержку на всех этапах выполнения диссертационного исследования.