

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия
(фармацевтические науки)

УДК 615.32

doi: 10.17021/2021.2.4.13.18

**ИССЛЕДОВАНИЕ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСНЫХ
СОЕДИНЕНИЯ МЕДИ (II) С АНИЛИНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ**

Екатерина Владиславовна Неборак¹, Наталья Александровна Шевкун², Сергей Павлович Сяткин³, Мария Вячеславовна Плосконос⁴, Абдулла Хиляль⁵, Сергей Владимирович Кутяков⁶, Роман Иванович Сокуев⁷

^{1, 2, 3, 5, 7} Российский университет дружбы народов

⁴ Астраханский государственный медицинский университет

⁵ Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича

⁶ Институт биорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова

¹neborak_ev@rudn.university, katevladis@mail.ru

²nataliashevkun@gmail.com

³syata_cp@rudn.university

⁴ploskonoz@mail.ru

⁵khilyal-a@rudn.ru

⁶seregiks-2108@mail.ru

⁷ice-rock@nioch.nsc.ru

Аннотация. Были синтезированы медные комплексы с производными анилина и проведен сравнительный анализ антипролиферативных свойств исходных лигандов и их комплексов в отношении трех опухолевых линий – MEL7, MCF-7 и PC3. Выявлена тенденция к появлению и усилению антипролиферативных свойств соединений после комплексообразования. Наиболее активный комплекс содержал о-Ф-замещенный лиганд, вызывающий активацию катаболизма полиаминов на модели регенерирующей ткани, что показывает потенциальную возможность такой активации и в опухолевых клетках. Данное соединение рекомендовано для дальнейших исследований.

Ключевые слова: Комплексные соединения меди, производные анилина, антипролиферативная активность, скрининг, линии опухолевых клеток

Для цитирования: Неборак Е.А., Шевкун Н.А., Сяткин С.П., Плосконос М.В., Хиляль А., Кутяков С.В., Сокуев Р.И. Исследование антипролиферативной активности комплексных соединения меди (II) с анилиновыми лигандами // Прикаспийский вестник медицины и фармации. 2021. Т. 2, № 4. С. 13–18.

**STUDY OF THE ANTIPROLIFERATIVE ACTIVITY OF COPPER (II) COMPLEX
COMPOUNDS WITH ANILINE LIGANDS**

Ekaterina V. Neborak¹, Natal'ya A. Shevkun², Sergey P. Syatkin³, Mariya V. Ploskonos⁴, Abdulla Khilyal⁵, Sergey V. Kutyaakov⁶, Roman I. Sokuev⁷

^{1, 2, 3, 5, 7} RUDN University

⁴ Astrakhan State Medical University

⁵ Institute of Biomedical Chemistry

⁶ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry

¹neborak_ev@rudn.university, katevladis@mail.ru

²nataliashevkun@gmail.com

³syata_cp@rudn.university

⁴ploskonoz@mail.ru

⁵khilyal-a@rudn.ru

⁶seregiks-2108@mail.ru

⁷ice-rock@nioch.nsc.ru

Abstract. Copper complexes with aniline derivatives were synthesized and a comparative analysis of the anti-proliferative properties of the parent ligands and their complexes was carried out in relation to three tumor lines - MEL7, MCF-7, and PC3. A tendency towards the appearance and enhancement of the antiproliferative properties of compounds after complexation was revealed. The most active complex contained an o-F-substituted ligand, which causes activation of polyamine catabolism in a model of regenerating tissue, which shows the potential for such activation in tumor cells as well. This compound is recommended for further research.

Key words: Complex copper compounds, aniline derivatives, antiproliferative activity, screening, tumor cell lines

For citation: Neborak E.V., Shevkun N.A., Syatkin S.P., Ploskonos M.V., Khilyal' A., Kutyaikov S.V., Sokuev R.I. Study of the antiproliferative activity of copper (II) complex compounds with aniline ligands // Caspian Journal of Medicine and Pharmacy. 2021 : 2 (4): 13–18 (In Russ.).

Введение. Развитие науки и медицины произвело за последние годы большой прорыв в области разработки противоопухолевых препаратов, позволяющий купировать рост как солидных, так и системных опухолей [1, 2]. Тем не менее серьезные побочные эффекты и рефрактерность многих видов опухолей [3] делает поиск новых таргетных агентов с противоопухолевой активностью актуальным. Одной из перспективных мишеней в этом отношении является обмен полиаминов – низкомолекулярных поликатионов, играющих важную роль в клеточной пролиферации и росте, а потому являющихся эссенциальными для опухолевой прогрессии [4]. В частности, было показано, что одной из характеристик опухолевых тканей является снижение интенсивности катаболизма полиаминов [4], в связи с чем его активация, сопровождающаяся образованием цитотоксичных продуктов, может запускать апоптоз опухолевых клеток [5, 6]. Поиск противоопухолевых препаратов ведется также среди комплексов меди [7]. Идея совместить эти две характеристики в одном компоненте – влияние на обмен полиаминов и комплексообразование выглядит в данном контексте перспективной. Ранее мы сообщали об обнаружении способности некоторых анилиновых производных активировать катаболизм полиаминов [8]. Продолжая исследования их биологических свойств, мы синтезировали медные комплексы с указанными соединениями и провели пилотное сравнительное тестирование антипролиферативной активности исходных соединений и полученных комплексов на опухолевых линиях клеток меланомы человека MEL-7, эстрогензависимого рака молочной железы человека MCF-7 и рака простаты PC3, о результатах которого сообщается в настоящей статье.

Материалы и методы исследования.

Тестируемые соединения

Все протестированные соединения – производные анилина (группа А, табл. 1) были синтезированы по ранее описанному методу [8]. Синтез их медных комплексов (группа В) осуществляли путем растворения точной навески лиганда в минимальном количестве 96%-ного этанола при нагревании и добавления горячего этанольного раствора эквимолярного количества хлорида меди. После полного выпаривания, охлаждения и кристаллизации получали кристаллический порошок, который высушивали над кристаллическим гидроксидом калия.

Таблица 1

Группа А: анилиновые производные

Шифр	Название соединения
A1	3-анилино-1-фенилпропанон-1
A2	1-фенил-3-(4-толуидино)пропанон-1
A3	3-(4-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1
A4	3-(4-броманилино)-1-фенилпропанон-1
A5	3-(4-йоданилино)-1-фенилпропанон-1

A6	3-(2-фторанилино)-1-фенилпропанон-1
A7	3-(3-трифторметиланилино)-1-фенилпропанон-1
A8	3-(3-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1
A9	3-(3-нитроанилино)-1-фенилпропанон-1
A10	3-(2-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1-гидразон
A11	3-(4-этиланилино)-1-фенилпропанон-1

Культуры клеток

Клетки меланомы человека линии MEL-7, клетки эстрогензависимого рака молочной железы человека линии MCF-7 и клетки рака простаты PC3 были закуплены в Американской коллекции типовых культур (ATCC) и культивировались в CO₂-инкубаторе на среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), обогащенной 10% бычьей эмбриональной сыворотки (FCS, Fetal Calf Serum). В среду также были добавлены 2 мМ L-глутамин и антибиотики (100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина).

Оценка цитотоксичности

Опухолевые клетки рассеивали в 96-луночные планшеты по 4 - 6 тыс. клеток на лунку. Тестируемые вещества добавляли через 24 часа инкубации. Через 72 часа проводили модифицированный МТТ-тест с использованием красителя резазурина вместо 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолиум бромид. Метаболически активные клетки превращают его во флуоресцирующий резорурфин ($\lambda_{\text{ex}}=535$, $\lambda_{\text{em}}=585$ нм). Препаратом сравнения был Доксорубин.

Результаты исследования.

Тестирование соединений группы А

Антипролиферативные свойства данной группы соединений выражены достаточно слабо (Табл. 2). В частности, лишь небольшое ингибирование пролиферации клеток меланомы MEL-7 вызывали соединения А1 (без заместителей, 22% погибших клеток) и А9 (*m*-NO₂, 28% погибших клеток). Рост культуры MCF-7 замедлился на 25% под действием соединения А10 (*o*-Cl и гидразоновый фрагмент) на 15% в присутствии А6 (*o*-F). Четыре вещества А1, А6, А9 и А10, тормозили пролиферацию линии PC-3 на уровне 27-40%.

Таблица 2

Влияние производных анилина (группа А) в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М на пролиферацию клеток опухолей человека MEL-7, MCF-7 и PC3 после 72 часов инкубации

Шифр вещества	MEL-7		MCF-7		PC-3	
	Число клеток, в %					
	живых	% погибших	живых	% погибших	живых	% погибших
К	100,00±5,45	-	100,00±5,83	-	100,00±5,67	-
A1	78,64±5,15	22*	87,22±7,50	13	67,76±7,46	33*
A2	121,20±10,3	-	104,44±8,06	-	97,61±8,06	3
A3	94,40±9,09	6	89,44±5,00	11	96,42±4,78	4
A4	112,12±7,88	-	97,22±9,17	3	101,49±10,45	-
A5	98,64±6,67	-	106,94±10,83	-	110,45±11,34	-
A6	87,42±9,7	12	85,56±6,39	15*	69,85±9,55	31*
A7	95,00±6,36	5	95,45±5,28	5	105,37±6,27	-
A8	96,52±15,45	4	103,61±10,56	-	98,51±10,45	2
A9	71,97±5,15	28*	85,56±8,89	15	76,72±8,96	24*
A10	89,85±5,45	20	75,27±6,11	25*	60,60±5,97	40*
A11	105,00±6,06	-	109,72±8,06	-	104,48±7,76	-

Примечания: Результаты представлены в виде среднего $M \pm t$ в % от общего числа клеток для трех параллельных экспериментов; *) отличия от контроля статистически достоверны ($p < 0,05$).

Тестирование соединений группы В

Большинство соединений группы В оказывали более или менее выраженное ингибирующее действие на опухолевые клетки (Табл. 3). Полное отсутствие антипролиферативной активности было выявлено только у соединений В1 (незамещенный лиганд), В3 (лиганд *p*-Cl), В9 (лиганд *m*-NO₂) и В11 (лиганд *p*-C₂H₅). Четыре соединения В2, В6, В8 и В10 значительно подавляли пролиферацию клеток

MEL-7 и РС-3 в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М в отношении одной или двух опухолевых линий. Наибольшую цитотоксическую активность показали соединения В6 (лиганд *o*-F), В8 (лиганд *m*-Cl) и В10 (лиганд *o*-Cl с гидразиновым фрагментом): первое затормозило рост MEL-7 на 67%, а два других на 55%. Наибольшее ингибирование роста РС-3 было вызвано соединениями В2 (лиганд *p*-CH₃) и В6 (лиганд *o*-F) и В8 (лиганд *m*-Cl) – на 51%, 81% и 64% соответственно. На клетках эстрогензависимого рака молочной железы MCF-7 значимой цитотоксичности (> 50%) не выявлено.

Таблица 3

Влияние медных комплексов производных анилина в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М на пролиферацию клеток опухолей человека MEL-7, MCF-7 и РС3 после 72 часов инкубации

Шифр вещества	MEL-7		MCF-7		РС-3	
	Число клеток					
	живых	% погибших	живых	% погибших	живых	% погибших
К	100,00±5,45	-	100,00±5,82	-	100,00±5,74	-
В1	92,90±6,06	7	85,89±6,07	24*	85,93±7,81	14
В2	52,04±5,45	48*	69,45±8,91	30*	48,74±6,06	51**
В3	90,61±5,15	9	92,10±7,54	8	92,05±8,78	8
В5	87,83±6,36	12*	83,12±8,10	17*	83,23±6,32	17*
В6	42,82±6,67	67**	64,44±5,28	35*	19,86±9,64	81**
В7	70,11±9,63	30*	72,74±6,42	27*	57,64±4,73	42*
В8	45,34±11,29	55**	75,82±9,77	24*	35,43±8,21	64**
В9	77,58±10,41	22*	89,89±10,81	10	71,65±7,50	18*
В10	45,32±4,72	55**	51,71±5,09	48*	51,70±10,44	48*
В11	87,27±7,50	12	91,67±10,54	8	86,82±10,43	13

Примечания: Результаты представлены в виде среднего $M \pm t$ в % от общего числа клеток для трех параллельных экспериментов; *) отличия от контроля статистически достоверны ($p < 0,05$); **) значимая цитотоксичность (>50% в пороговой концентрации).

Выводы. Комплексообразование с ионами меди повышает антипролиферативное действие анилиновых производных в отношении опухолевых клеток. Частные различия действия комплексов могут быть связаны со строением лигандов, которое может как вносить вклад в цитотоксический эффект комплекса, так и влиять на его устойчивость и проникновение внутрь клеток. Наиболее выраженные антипролиферативные свойства были продемонстрированы на данных клеточных моделях для медного комплекса В6 с *o*-F-замещенным лигандом. Данная находка согласуется с общей тенденцией частого использования именно атома фтора в конструировании различных препаратов [10], что может быть связано с довольно малым радиусом этого атома при сильно выраженных электроноакцепторных свойствах и смещении к нему электронной плотности ароматического кольца, а значит высокой плотности частичного отрицательного заряда. Интересно также отметить, что именно этот лиганд А6 был одним из наиболее мощных активаторов окислительного дезаминирования полиаминов в наших более ранних исследованиях [8, 9], что указывает на потенциальную возможность такой активации и внутри опухолевых клеток с последующим запуском клеточной гибели. Данное соединение можно, таким образом, рекомендовать для дальнейших исследований, которые должны прояснить механизм антипролиферативной активности и его связь с активацией катаболизма полиаминов.

Список источников

1. Anwanwan D., Singh S.K., Singh S., Saikam V., Singh R. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*. 2020 Jan; 1873(1): 188314. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.188314. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31682895; PMCID: PMC6981221.
2. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol*. 2019 Nov; 94(11): 1266-1287. doi: 10.1002/ajh.25595. Epub 2019 Oct 4. PMID: 31364186.
3. Davis L. E., Shalin S. C., Tackett A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther*. 2019; 20(11): 1366-1379. doi: 10.1080/15384047.2019.1640032. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31366280; PMCID: PMC6804807
4. Casero R.A. Jr, Murray Stewart T., Pegg A.E. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2018; 18(11): 681–695. doi: 10.1038/s41568-018-0050-3. PMID: 30181570; PMCID: PMC6487480.

5. Arisan E.D., Obakan P., Coker-Gurkan A., Calcabrini A., Agostinelli E., Unsal N.P. CDK inhibitors induce mitochondria-mediated apoptosis through the activation of polyamine catabolic pathway in LNCaP, DU145 and PC3 prostate cancer cells. *Curr Pharm Des.* 2014; 20(2): 180–8. doi: 10.2174/13816128113199990029. PMID: 23701543.
6. Ploskonos M.V., Syatkin S.P., Neborak E.V., Hilal A., Sungrapova K.Y., Sokuyev R.I., Blagonravov M.L., Korshunova A.Y., Terentyev A.A. Polyamine Analogues of Propanediamine Series Inhibit Prostate Tumor Cell Growth and Activate the Polyamine Catabolic Pathway. *Anticancer Res.* 2020 Mar; 40(3): 1437–1441. doi: 10.21873/anticancerres.14085. PMID: 32132040.
7. Denoyer D., Clatworthy S.A.S, Cater M.A. Copper Complexes in Cancer Therapy. *Met Ions Life Sci.* 2018 Feb 5; 18 : /books/9783110470734/9783110470734-022/9783110470734-022.xml. doi: 10.1515/9783110470734-022. PMID: 29394035.
8. Syatkin S.P., Kirichuk A.A., Soldatenkov A.T., Kutyakov S.V., Neborak E.V., Shevkun N.A., Kuznetsova O.M., Skorik A.S., Terent'ev A.A. Screening of Some Dioxaboreninopyridine and Aniline Derivatives for Carcinogenic Properties Using a Model Cell-Free System of Regenerating Rat Liver. *Bull Exp Biol Med.* 2017 Apr; 162(6): 801–807. doi: 10.1007/s10517-017-3717-y. Epub 2017 Apr 21. PMID: 28429226.
9. Wang B.C., Wang L.J., Jiang B., Wang S.Y., Wu N., Li X.Q., Shi D.Y. Application of Fluorine in Drug Design During 2010-2015 Years: A Mini-Review. *Mini Rev Med Chem.* 2017; 17(8): 683–692. doi: 10.2174/1389557515666151016124957. PMID: 26471967.
10. Syatkin S.P., Neborak E.V., Khlebnikov A.I., Komarova M.V., Shevkun N.A., Kravtsov E.G., Blagonravov M.L., Agostinelli E. The investigation of structure-activity relationship of polyamine-targeted synthetic compounds from different chemical groups. *Amino Acids.* 2020 Feb; 52(2): 199–211. doi: 10.1007/s00726-019-02778-3. Epub 2019 Sep 13. PMID: 31520286.

References

1. Anwanwan D., Singh S.K., Singh S., Saikam V., Singh R. Challenges in liver cancer and possible treatment approaches. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer.* 2020 Jan; 1873(1): 188314. doi: 10.1016/j.bbcan.2019.188314. Epub 2019 Nov 1. PMID: 31682895; PMCID: PMC6981221.
2. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2020 update on diagnosis, risk stratification and treatment. *Am J Hematol.* 2019 Nov; 94(11): 1266-1287. doi: 10.1002/ajh.25595. Epub 2019 Oct 4. PMID: 31364186.
3. Davis L. E., Shalin S. C., Tackett A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther.* 2019; 20(11): 1366-1379. doi: 10.1080/15384047.2019.1640032. Epub 2019 Aug 1. PMID: 31366280; PMCID: PMC6804807
4. Casero R.A. Jr, Murray Stewart T., Pegg A.E. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities. *Nat Rev Cancer.* 2018; 18(11): 681–695. doi: 10.1038/s41568-018-0050-3. PMID: 30181570; PMCID: PMC6487480.
5. Arisan E.D., Obakan P., Coker-Gurkan A., Calcabrini A., Agostinelli E., Unsal N.P. CDK inhibitors induce mitochondria-mediated apoptosis through the activation of polyamine catabolic pathway in LNCaP, DU145 and PC3 prostate cancer cells. *Curr Pharm Des.* 2014; 20(2): 180–8. doi: 10.2174/13816128113199990029. PMID: 23701543.
6. Ploskonos M.V., Syatkin S.P., Neborak E.V., Hilal A., Sungrapova K.Y., Sokuyev R.I., Blagonravov M.L., Korshunova A.Y., Terentyev A.A. Polyamine Analogues of Propanediamine Series Inhibit Prostate Tumor Cell Growth and Activate the Polyamine Catabolic Pathway. *Anticancer Res.* 2020 Mar; 40(3): 1437–1441. doi: 10.21873/anticancerres.14085. PMID: 32132040.
7. Denoyer D., Clatworthy S.A.S, Cater M.A. Copper Complexes in Cancer Therapy. *Met Ions Life Sci.* 2018 Feb 5; 18 : /books/9783110470734/9783110470734-022/9783110470734-022.xml. doi: 10.1515/9783110470734-022. PMID: 29394035.
8. Syatkin S.P., Kirichuk A.A., Soldatenkov A.T., Kutyakov S.V., Neborak E.V., Shevkun N.A., Kuznetsova O.M., Skorik A.S., Terent'ev A.A. Screening of Some Dioxaboreninopyridine and Aniline Derivatives for Carcinogenic Properties Using a Model Cell-Free System of Regenerating Rat Liver. *Bull Exp Biol Med.* 2017 Apr; 162(6): 801–807. doi: 10.1007/s10517-017-3717-y. Epub 2017 Apr 21. PMID: 28429226.
9. Wang B.C., Wang L.J., Jiang B., Wang S.Y., Wu N., Li X.Q., Shi D.Y. Application of Fluorine in Drug Design During 2010-2015 Years: A Mini-Review. *Mini Rev Med Chem.* 2017; 17(8): 683–692. doi: 10.2174/1389557515666151016124957. PMID: 26471967.
10. Syatkin S.P., Neborak E.V., Khlebnikov A.I., Komarova M.V., Shevkun N.A., Kravtsov E.G., Blagonravov M.L., Agostinelli E. The investigation of structure-activity relationship of polyamine-targeted synthetic compounds from different chemical groups. *Amino Acids.* 2020 Feb; 52(2): 199–211. doi: 10.1007/s00726-019-02778-3. Epub 2019 Sep 13. PMID: 31520286.

Информация об авторах

Е.В. Неборак, кандидат биологических наук, доцент кафедры биохимии, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия.

Н.А. Шевкун, кандидат биологических наук, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия.

С.П. Сяткин, доктор биологических наук, профессор, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия.

М.В. Плосконос, доктор биологических наук, доцент, профессор кафедры химии, Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

А. Хиляль, младший научный сотрудник, Российский университет дружбы народов, Институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича, Москва, Россия.

С.В. Кутяков, инженер, лаборатория молекулярной тераностики, Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова, Москва, Россия.

Р. И. Сокуев, аспирант, Российский университет дружбы народов, Москва, Россия.

Information about the authors

Ekaterina V. Neborak, Cand. Sci (Biol.), Associate professor of Department, RUDN University, Moscow, Russia.

Natal'ya A. Shevkun, Cand. Sci (Biol.), RUDN University, Moscow, Russia.

Sergey P. Syatkin, Dr. Sci (Biol.), Professor of Department, RUDN University, Moscow, Russia.

Mariya V. Ploskonos, Dr. Sci. (Biol.), Associate Professor, Professor of the Chemistry Department, Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia.

Abdulla Khilyal', junior researcher, Institute of Biomedical Chemistry, RUDN University, Moscow, Russia.

Sergey V. Kutyaakov, engineer, laboratory of molecular theranostics, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russia.

Roman I. Sokuev, post graduate student, RUDN University, Moscow, Russia.*

* Статья поступила в редакцию 02.12.2021; принято к публикации 10.12.2021.
The article was received 02.12.2021; accepted for publication 10.12.2021.