

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования  
Российской Федерации

*На правах рукописи*

**Хиляль Абдулла**

**ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ, ЦИКЛИЧЕСКИХ И  
АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК  
ОТДЕЛЬНЫХ ОПУХОЛЕВЫХ ЛИНИЙ**

3.3.3. Патологическая физиология  
1.5.4. Биохимия

Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научные руководители:  
**Благонравов Михаил Львович,**  
доктор медицинских наук, профессор  
**Сяткин Сергей Павлович,**  
доктор биологических наук, профессор

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	4
<b>Глава 1. РОЛЬ ПОЛИАМИНОВ И ИХ АНАЛОГОВ В МЕТАБОЛИЗМЕ И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)</b> .....	12
1.1. Современные представления об обмене ПА и их роли в клеточной пролиферации .....	12
1.2. Полиамины и опухолевая пролиферация .....	19
1.3. Обмен полиаминов как патогенетическая мишень противоопухолевой терапии .....	29
<b>Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b> .....	35
2.1. Общий дизайн исследования .....	35
2.2. Тестируемые соединения и обоснование их выбора .....	35
2.3. Количественный анализ основных показателей обмена ПА в бесклеточных тест-системах .....	38
2.4. Количественные корреляции «структура-активность» (ККСА) [по Hu Q.N. et al., 2003] .....	42
2.5. Оценка цитотоксичности тестируемых веществ на клеточных культурах .....	43
2.6. Молекулярный докинг .....	45
2.7. Методы статистической обработки данных .....	45
<b>Глава 3. ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ, ЦИКЛИЧЕСКИХ И АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА МЕТАБОЛИЗМ ПОЛИАМИНОВ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЕ</b> .....	47
3.1. Результаты оценки влияния тестируемых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на активность ферментов катаболизма ПА на бесклеточной тест-системе [Сяткин С.П. и др., 2024] ...	48
3.2. Анализ влияния гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на активность ферментов синтеза ПА на бесклеточной тест-системе .....	51
3.3. Исследование концентрации ПА на фоне действия тестируемых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на бесклеточной тест-системе .....	54
<b>Глава 4. ВЛИЯНИЕ ТЕСТИРУЕМЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ, ЦИКЛИЧЕСКИХ И АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА СКОРОСТЬ ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИЙ A549, SkBr3 И HELA</b> .....	57
4.1. Результаты исследования антипролиферативного эффекта тестируемых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на опухолевые клетки карциномы лёгкого линии A549 .....	58
4.2. Влияние тестируемых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на пролиферативную активность клеток рака молочной железы линии SkBr3 .....	60

4.3. Исследование антипролиферативного эффекта тестируемых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на пролиферативную активность клеток рака шейки матки линии HeLa .....	62
4.4. Сравнительная характеристика антипролиферативного эффекта исследованных гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на культурах опухолевых клеток линий A549, SkBr и HeLa .....	64
<b>Глава 5. ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИССЛЕДУЕМЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ, ЦИКЛИЧЕСКИХ И АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДАМИ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ .....</b>	<b>67</b>
5.1. Количественные корреляции «структура-активность» (ККСА) .....	67
5.2. Молекулярный докинг [Neborak E. V. et al., 2021] .....	70
<b>Глава 6. ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПОЛИАМИНОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК (обсуждение полученных результатов) .....</b>	<b>78</b>
6.1. Влияние органических соединений отдельных классов на метаболизм природных ПА в тканях с усиленной пролиферативной активностью .....	78
6.2. Особенности влияния новых органических соединений направленного действия на скорость пролиферации клеток отдельных опухолевых линий..	84
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b>	<b>91</b>
<b>СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ .....</b>	<b>93</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....</b>	<b>95</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>96</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ .....</b>	<b>123</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность темы исследования

Полиамины (ПА) (спермидин (Спд), спермин (Спм), путресцин) осуществляют регуляцию процессов клеточного роста, пролиферации и дифференцировки [Gamble L. D. et al., 2012; Damiani E. et al., 2018]. ПА необходимы для поддержания метаболизма эукариотических клеток, поскольку они участвуют во многих ключевых молекулярных процессах, включая транскрипцию генов, регуляцию функции белков, обеспечение стабильности клеточных мембран [Soda K. et al., 2013]. Повышение содержания ПА в клетках наблюдается в ходе эмбрионального развития и регенерации [Lenis Y. Y. et al., 2017], а также при различных патологических процессах, включая онкологические заболевания, паразитарные инфекции и др. [Velez N. et al., 2015; Vannier-Santos M. A. et al., 2017; Novita Sari I. et al., 2021]. Снижение уровня ПА за счет уменьшения скорости их синтеза или повышения активности катаболизма приводит к остановке клеточного цикла. Аккумуляция ПА при определенных условиях может индуцировать апоптоз [Murray-Stewart T. R. et al., 2016; Damiani E. et al., 2018]. В связи с этим обмен ПА играет важную роль в регуляции клеточного состава тканей. Химически модифицированные аналоги ПА могут рассматриваться в качестве перспективных модуляторов митотического деления клеток. На основе данных скрининга, выполненного *in vitro*, новые синтетические аналоги ПА классифицируют по их влиянию на скорость пролиферации клеток.

Одной из основных характеристик патогенеза опухолевого роста является метаболический атипизм, который выражается в значительных изменениях интенсивности и направленности обменных процессов в малигнизированных клетках [Korpenol W. H. et al., 2011]. При канцерогенезе наблюдается модуляция различных способов поглощения питательных веществ, что обеспечивает резкое увеличение скорости клеточной регенерации и, как следствие, стремительный рост новообразования [Lunt S. Y. et al., 2011]. В быстро пролиферирующих тканях, включая опухолевые, уровень ПА существенно выше по сравнению с обычными. ПА участвуют в пролиферации и миграции атипичных клеток. Было также

показано, что они способствуют инвазии злокачественных клеток в соседние ткани [Soda K., 2011; Provanzano B. et al., 2019]. Напротив, снижение уровня ПА при ингибировании их синтеза приводит к подавлению роста опухолевых клеток [Gamble L. D. et al., 2012]. Деградация ПА (Спд и Спм) осуществляется посредством ацетилирования с последующим окислительным дезаминированием либо путём прямого окисления (для Спм) [Murray-Stewart T. R. et al., 2016]. При развитии злокачественной опухоли интенсивность окисления ПА часто снижена, что сопровождается увеличением уровня ацетилированных ПА в сыворотке крови [Venäläinen M. K. et al. 2018]. Продукты окисления ПА обладают цитотоксическими свойствами и могут также выступать в качестве индукторов апоптоза клеток [Murray-Stewart T. R. et al., 2016; Damiani E. et al., 2018]. С учётом указанных особенностей в настоящее время метаболизм ПА рассматривается в качестве патогенетической мишени для разработки противоопухолевых препаратов [Gamble L. D. et al., 2012; Murray-Stewart T. R. et al., 2016].

К одной из перспективных стратегий в разработке новых методов фармакотерапии злокачественных опухолей можно отнести применение химических аналогов ПА. К настоящему времени синтезировано и описано уже довольно много подобных соединений. Некоторые из них обладают способностью подавлять активность опухолевых клеток, нарушая метаболизм их собственных ПА [Murray-Stewart T. R. et al., 2016; Li M. et al. 2018]. В частности, такой агент как тетрабутилпропандиамин (ТБП) является новым аналогом путресцина, для которого была показана способность ингибировать рост и миграцию клеток гепатоцеллюлярной карциномы человека HepG2 и остеосаркомы MG-63 посредством индукции апоптоза [Yang J. L. et al., 2012]. Аналогичный эффект был отмечен при исследовании лейкемических клеток K549. Так, применение ТБП приводило к значительному снижению пролиферации K549 за счёт блокады фазы G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> митотического цикла указанной линии опухолевых клеток. При этом также показано, что ТБП обладают способностью активировать ферменты, ответственные за катаболизм ПА, таких как сперминоксидаза и ацетилполиаминоксидаза [Wang Q. et al., 2015].

В процессе разработки новых фармацевтических агентов следует оценивать их свойства по отношению к патогенетической мишени. С этой целью активно применяются такие методики как количественные корреляции «структура-активность» (ККСА) и молекулярная стыковка *in silico* (докинг).

Анализ имеющихся на сегодняшний день данных позволяет утверждать, что метаболизм ПА занимает особое место в жизнедеятельности активно пролиферирующих клеток как в норме, так и в условиях патологии. Ранее были исследованы эффекты ряда азотсодержащих гетероциклических соединений на распад ПА в клетках печени, а также их антипролиферативные свойства в отношении клеток опухолевых линий [Шевкун Н. А., 2013]. Вместе с тем, синтезированы и другие вещества, принадлежащие к данному ряду, для которых подобные эффекты изучены не были. Дальнейшие исследования в этом направлении позволят определить новые перспективные противоопухолевые агенты и особенности их влияния на метаболизм ПА в тканях с усиленной пролиферацией.

### **Степень разработанности темы**

Роль ПА в молекулярных механизмах, опосредующих различные патологические процессы, весьма значительна. При этом перечень заболеваний, для которых на основе метаболомных исследований выявляются связи с нарушениями обмена ПА, постоянно расширяется. Ассоциация ПА с патогенезом онкологических заболеваний была установлена более 45 лет назад в работах Рассела и Снайдера, наблюдавших увеличение активности орнитиндекарбоксилазы (ОДК) в злокачественных опухолях. За время, прошедшее с тех пор, получены многочисленные данные, достоверно подтверждающие роль ПА в канцерогенезе. Отмечено, что имеются существенные различия в обмене ПА и потребности в них для нормальных и опухолевых клеток. Эти наблюдения позволяют рассматривать обмен ПА в качестве рациональной мишени для разработки новых эффективных методов химиотерапии. Поиск молекулярных агентов, способных проявлять активность в отношении ПА, осуществляется, в частности, среди полиаминовых аналогов различных химических классов. Наиболее перспективными

представляются те из них, которые могут вызывать истощение пула ПА и/или генерацию цитотоксических агентов посредством активации окисления ПА.

### **Цель исследования**

Оценить влияние отдельных гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на обмен ПА на модели усиленной физиологической регенерации и их эффект в отношении пролиферации опухолевых клеток линий A549, SkBr3 и HeLa.

### **Задачи исследования**

1. Провести тестирование путем обширного скрининга влияние отдельных гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на метаболизм ПА в бесклеточной тест-системе.

2. Исследовать влияние тестируемых соединений на пролиферацию клеток карциномы лёгкого человека линии A549, рака молочной железы человека линии SkBr3 и рака шейки матки человека линии HeLa.

3. Выполнить анализ корреляции «структура-активность» (ККСА-анализ) на базе полученных результатов и определить наиболее значимые структурные дескрипторы.

4. Осуществить *in silico* докинг тестируемых соединений в системе «белок-лиганд» для полиаминоксидазы (ПАО).

5. Для соединений с наиболее высокой найденной активностью определить значение IC50 (концентрацию полумаксимального ингибирования).

### **Научная новизна**

Получены новые данные об изменении активности синтеза и катаболизма ПА в бесклеточной тест-системе на основе регенерирующей печени крыс для тестируемых соединений в опытах *in vitro*.

Впервые выполнен скрининг антипролиферативного действия отдельных гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на клетки

карциномы лёгкого линии A549, рака молочной железы линии SkBr3 и рака шейки матки линии HeLa.

Впервые методом молекулярного докинга (стыковки) было проведено исследование связывания ряда тестируемых органических соединений с ПАО. Определены аминокислотные звенья для соответствующих лигандов.

Впервые проведены количественные корреляции топологических индексов с активностью аминоксидаз.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В эксперименте на бесклеточной тест-системе было показано, что ряд исследованных гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений повышает интенсивность катаболизма ПА, что свидетельствует об их потенциальном противоопухолевом действии. Вещества A16 (2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9H-флуорен-9-он) и A2 (5,5-диметил имидазолидин-2,4-дион) показали способность ингибировать пролиферацию клеток отдельных опухолевых линий.

Полученные результаты расширяют базу данных, необходимую для прогнозирования биологических свойств вновь синтезированных органических соединений с потенциальными противоопухолевыми свойствами. Результаты работы могут быть использованы для оригинального синтеза новых более эффективных химиотерапевтических агентов.

### **Методология и методы исследования**

Исследование влияния тестируемых соединений на метаболизм ПА в ткани с активной пролиферацией проводилось путём оценки активности ключевых ферментов синтеза и катаболизма ПА на бесклеточной тест-системе, полученной на основе регенерирующей печени крыс. Активность ферментов синтеза ПА (орнитиндекарбоксилаза (ОДК), спермидинсинтаза (СДС) и сперминсинтаза (СМС)) и уровня ПА определялась методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с флуоресцентной детекцией в виде дансильных



производных. Анализ удельной активности ферментов окислительного дезаминирования (диаминоксидазы (ДАО), полиаминоксидазы (ПАО) и сперминоксидазы (СМО)) проводили с использованием метода спектрофотометрии. Оценка цитотоксичности тестируемых веществ в отношении опухолевых клеток проводилась на культурах карциномы лёгкого человека линии A549, рака молочной железы человека линии SkBr3 и рака шейки матки линии HeLa. В качестве контроля использовали клеточную линию фибробластов (wi-38). Антипролиферативную активность оценивали по стандартной методике МТТ-теста. ККСА рассчитывали с использованием компьютерных программ «ChemicDescript» и «ChemicPen». Молекулярный докинг тестируемых соединений *in silico* в системе «белок-лиганд» для ПАО проводился с использованием программного обеспечения Molegro Virtual Docker (MVD) версии 6.0.

### **Внедрение результатов исследования**

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования РФ.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Соединения А3 (метил-2-(5-формилфуран-2-ил) бензоат), А16 (2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9Н-флуорен-9-он), А1 (диэтил-2-(4-(4-пентилейклогексифенил)-4,5-дигидро-1,2,4-триазол-4,5-дикарбоксилат), А2 (5,5-диметилимидазо-лидин-2,4-дион) и А5 (4-бутил-2,3,5,6-тетрафторбензойная кислота) проявили максимальный эффект в качестве активаторов распада ПА в бесклеточной тест-системе, тем самым продемонстрировав потенциальное противоопухолевое действие.

2. Соединения А16 (2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9Н-флуорен-9-он) и А2 (5,5-диметилимидазо-лидин-2,4-дион) показали способность к ингибированию пролиферации клеток рака лёгкого линии А549.

3. Соединение A16 (2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9H-флуорен-9-он) проявляет выраженное антипролиферативное действие в отношении клеток рака молочной железы линии SkBr-3 и рака шейки матки линии HeLa.

### **Степень достоверности**

Применявшиеся бесклеточные тест-системы представляли собой цитозольную фракцию 33%-ного гомогената ткани печени самцов беспородных лабораторных крыс. Использовались культуры клеток злокачественных опухолей линий A549, SkBr-3, HeLa при достаточном объёме выборки в каждой серии исследований. Оценку соответствующих показателей с применением методик спектрофотометрии, ВЭЖХ с флуориметрической детекцией, компьютерного моделирования проводили на сертифицированном оборудовании. Статистические методы, применявшиеся для обработки полученных данных, соответствовали цели и задачам исследования.

**Апробация результатов работы.** Результаты работы доложены и обсуждены на международных конгрессах «The 44-th FEBS Congress» (Краков, 2019 г.), «The 45-th FEBS Congress» (Любляна, 2021 г.), «The 48-th FEBS Congress» (Милан, 2024 г.), на заседании кафедры общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова медицинского института РУДН, 2023 г.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ, в числе которых 6 публикаций в журналах, индексируемых в МБЦ WoS/Scopus.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материала и методов исследования, 3-х глав, в которых изложены результаты собственного исследования, главы с обсуждением полученных результатов, заключения и списка литературы. Диссертация изложена на 123 страницах

печатного текста, содержит 13 таблиц и 9 рисунков. Библиография содержит 230 источников российской и зарубежной литературы.

## Глава 1.

# РОЛЬ ПОЛИАМИНОВ И ИХ АНАЛОГОВ В МЕТАБОЛИЗМЕ И ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

## (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

### 1.1. Современные представления об обмене ПА и их роли в клеточной пролиферации

ПА представляют собой низкомолекулярные алифатические поликатионы, образующиеся из аминокислот метионина и орнитина. Их присутствие в организме поддерживается как синтезом *de novo*, так и за счёт поступления с пищей. Основными ПА млекопитающих являются путресцин (Пут), спермидин (Спд), спермин (Спм).

ПА обладают множеством различных функций в организме. Особое значение имеет их участие в процессах роста и пролиферации клеток. Однако превышение их содержания в клетках может сопровождаться токсическими эффектами [Силачѐв Д. Н. и др., 2018].

*Синтез ПА.* Метионин с участием метионинаденозилтрансфераз (MAT1A, MAT2A и MAT2B) превращается в S-аденозилметионин (SAM), который выступает в качестве донора метильных групп [Chiang P. K. et al., 1996]. Далее SAM метаболизирует по двум путям: трансметилирование под действием метилтрансфераз (MTC), которые переносят метильную группу на другие молекулы, и декарбоксилирование через аденозилметиониндекарбоксилазу 1 (AMD1). В результате образуется декарбоксилированный S-аденозилметионин (dcSAM), который выступает в качестве субстрата для последующего синтеза ПА. С другой стороны, орнитин синтезируется из аргинина с участием аргиназ. Орнитин декарбоксилируется орнитиндекарбоксилазой 1 (ODC1) [Raina A. et al., 1968] с образованием Пут. Последний также может образовываться по альтернативному пути. В частности, при декарбоксилировании аргинина

появляется агматин, который служит в качестве промежуточного продукта при участии ферментов аргининдекарбоксилазы и агматиназы [Wang X. et al., 2014].

Под действием спермидинсинтазы из декарбоксилированного S-аденозилметионина (dcSAM) и Пут образуются метилтиоаденозин (МТА) и Спд. Последний вступает в реакцию со второй молекулой dcSAM с участием фермента сперминсинтазы, в результате чего синтезируется Спм и МТА, который метаболизируется МТА-фосфорилазой с образованием аденина и метилтиорибозо-1-фосфата. Далее эти вещества могут превращаться обратно в метионин [Takahashi T. et al., 2015].

Спд также дает начало аминокислоте гипузину под действием ферментов дезоксигипузинсинтазы и дезоксигипузингидроксилазы. Гипузин связан с регулятором трансляции eIF5A [Costa-Neto C.M. et al., 2006]. Данный путь включает в себя множество этапов, которые строго контролируются, что обеспечивает тонкую регуляцию потока ПА и адекватные размеры их пула [Pegg A. E., 2009]. Так, количество ПА контролирует +1 рибосомный сдвиг рамки ингибитора орнитиндекарбоксилазы 1, антизима 1 [Palanimurugan R. et al., 2004]. Трансляция аденозилметионин декарбоксилазы 1 также реагирует на повышение количества ПА ввиду существования восходящей открытой рамки считывания. Она кодирует гексапептид MAGDIS, который индуцирует остановку рибосомы в ее терминальном кодоне, предотвращая рибосомальное включение кодирующей последовательности аденозилметионин декарбоксилазы 1 [Ruan H. et al., 1996]. Процессинг и каталитическая активность AMD1 в значительной степени стимулируются Пут для координации производства субстратов для SRS [Pegg A. E., 2009].

*Катаболизм и утилизация ПА.* ПА ацетируются спермидин/спермин N1-ацетилтрансферазой 1, в результате чего они превращаются обратно в Пут, который далее выводится из организма [Pegg A.E., 2008]. Катаболизм ПА активируется продукцией ПА через индукцию экспрессии спермидин/спермин N1-ацетилтрансферазы 1 [Casero Jr R. A. et al., 2009]. Распад ПА реализуется с участием сперминоксидазы (СМО), а также конститутивно экспрессируемой N1-

ацетилполиаминоксидазы (АПАО). Активность спермидин/спермин N1-ацетилтрансферазой 1 обеспечивает образование субстратов для АПАО [Casero Jr R. A. et al., 2009].

*Транспорт ПА.* Системная доступность ПА зависит от ряда факторов, в частности, от синтеза микрофлорой кишечника [Madeo F. et al. 2018]. На сегодняшний день описаны следующие основные пути транспорта ПА: глипикан-опосредованный эндоцитоз, плазменный транспорт, везикулярная секвестрация и кавеолин-опосредованный эндоцитоз [Abdulhusein A. A. et al., 2014]. В качестве медиатора для транспорта ПА выступают, в частности, транспортеры АТФ, такие как АТФ13А2 и АТФ13А3 [van Veen S. et al., 2020; Sekhar V. et al., 2022; Hamouda N. N. et al., 2021]. Также сообщается, что был обнаружен везикулярный транспортер ПА (VPAT или SLC18B1) в астроцитах [Hiasa M. et al., 2014] и тучных клетках [Takeuchi T. et al., 2017], что может свидетельствовать о нейро- и иммуномодулирующих эффектах данного транспортного механизма.

*Роль ПА в физиологических процессах.* ПА играют важную роль в физиологических процессах в организме, участвуя в обеспечении механизмов внутриклеточного метаболизма различных органов и систем [Sánchez-Jiménez F. et al., 2019].

Наличие ПА в семенной плазме повышает резистентность клеток к влиянию окислительного стресса. Также считается, что Спм и Спд, являясь внутриклеточными шаперонами, вызывают нарушение стабильности мембран сперматозоидов, что приводит к повышению их оплодотворяющей способности [Singh B. P. et al., 2017]. Однако при повышенной концентрации Спм уменьшается подвижность и снижается количество половых клеток в семенной жидкости посредством стимуляции их апоптотической гибели [Minois N., 2014, Плосконос М. В., 2015].

За счёт наличия положительных зарядов ПА способны взаимодействовать с нуклеиновыми кислотами. Низкомолекулярные РНК обладают повышенной аффинностью к поликатионам. Следовательно, ПА можно использовать как средства РНК-интерференции [Klauber T. C. et al., 2016]. Кроме того, ПА способны

взаимодействовать с протеинами, оказывая влияние на структуру, функции, локализацию и взаимодействие этих белков [Namba T. et al., 2015; Yu C. H. et al., 2015]. Поскольку эти реакции являются зарядозависимыми, многие из них дополнительно стабилизируются посредством ферментативного полиаминирования. Основная ферментативная реакция, в которой происходит полиаминирование белков, катализируется трансглутаминазами [Yu C. H. et al., 2015].

ПА принимают участие в функционировании эпителия кишечника. В частности, Спм и Спд стимулируют рост ворсинок, а также стимулируют образование отдельных мембранных гидролаз [Ramani D. et al., 2014].

В некоторых работах показана роль ПА в проведении нервных импульсов, причём, в зависимости от типа нейрона, молекулы ПА имеют либо возбуждающую, либо депрессивную функцию. Это позволяет предположить, что ПА являются важными регуляторами активности нейронов. При этом их функция может варьироваться в зависимости от источника их появления (внеклеточный либо внутриклеточный), природа молекул канала и ряда других вспомогательных факторов [Bowie D., 2018; Nichols C. G. et al., 2018]. Данные наблюдения позволили описать ряд каналов, на которые влияют ПА, включая ионотропные рецепторы глутамата и калиевые каналы [Bowie D., 2018; Varonas V. A. et al., 2014]. Было установлено, что ПА являются модуляторами рецепторов глутамата [Bowie D., 2018; Rozov A. et al., 2018]. Регуляция этих каналов осуществляется за счёт блокирования активности транспорта ионов через них [Bowie D., 2018].

Важнейшей функцией ПА является регуляция процессов, опосредующих воспалительные механизмы. Также установлена их роль в развитии аутоиммунной агрессии и противоопухолевом иммунитете [Chia T. Y. et al., 2022]. В частности, было показано, что ПА вовлечены в реализацию аутоиммунных реакций с участием Т-хелперов 17 типа (Th17). Последние характеризуются усиленным метаболизмом ПА. При этом отмечается, что генетический нокаут либо фармакологическое ингибирование ПА приводит к ослаблению аутоиммунитета [Wagner A. et al., 2021]. Также в исследовании Wu R. et al. (2020) на модели экспериментального

аутоиммунного энцефаломиелита было показано, что скоординированная блокада захвата ПА и их синтеза предупреждает воспаление, опосредованное Т-клетками.

С другой стороны, имеются данные о том, что метаболизм ПА играет ключевую роль в регуляции эпигенома Т-хелперов, за счёт которой происходит супрессия аутоиммунных реакций. Так, торможение синтеза ПА посредством ингибирования ODC1 сопровождается возникновением дефектного воспалительного фенотипа Т-клеток [Puleston D. J. et al., 2021]. Однако, как показали исследования Carriche G. M. et al. (2021), ПА могут и препятствовать развитию воспаления. Так, Спд способен проявлять противовоспалительный эффект за счёт усиления развития Т-супрессоров (Treg). Авторы данной работы обнаружили, что Спд способствует появлению Treg из наивных CD4<sup>+</sup> лимфоцитов, регулируемых аутофагическим потоком. Таким образом, на сегодняшний день данные о роли ПА в воспалительном ответе довольно противоречивы.

Что касается влияния ПА на функциональное состояние CD8<sup>+</sup> клеток, то по данному вопросу информации существенно меньше.

В исследовании Yang Q. et al. (2016) отмечается, что ПА способны также оказывать противовоспалительный эффект посредством воздействия на миелоидные клетки. Так, в экспериментах на лабораторных мышах было установлено, что при моделировании аутоиммунного энцефаломиелита экзогенный Спд подавляет экспрессию гена Arg1, который кодирует аргиназу в макрофагах [Yang Q. et al., 2016].

В недавно опубликованных работах, в которых исследовались особенности воспаления сетчатки глаза, отмечается роль ПА в жизнедеятельности глиальных элементов. В частности, авторы сообщают, что при фармакологической блокаде ПА наблюдается торможение активации микроглии с последующим повреждением сетчатки [Patel C. et al., 2016; Pichavaram P. et al., 2019]. При этом экспериментальная абляция микроглии приводит к инфильтрации периферических миелоидных клеток с транскриптомной программой, аналогичной (но не идентичной) клеткам исходной микроглии [Bruttger J. et al., 2015].



ПА также предупреждают чрезмерную активацию дендритных клеток, вызванную интерферонами. Так, в экспериментах на мышах было показано, что при активации транскрипционного фактора FOXO3 имеет место ограничение функциональной активности дендритных клеток, при этом отмечается уменьшение тяжести патологического процесса [Li G. et al., 2020]. В другом исследовании было обнаружено, что образование ПА, опосредованное Arg1, необходимо для индукции экспрессии индоламин-2,3-диоксигеназы в дендритных клетках, в которых данный фермент выступает в качестве эффектора иммуносупрессии [Mondanelli G. et al., 2017].

Клинические исследования подтверждают тот факт, что уровень ПА снижается при воспалении и различных аутоиммунных процессах. В частности, было установлено, что содержание N1-ацетилкадаверина, Спд, N1-ацетилспермидина и Спм значительно снижен у пациентов, страдающих системной красной волчанкой по сравнению со здоровыми лицами [Kim H. A. et al., 2018]. Также в пользу данной гипотезы выступают исследования Song J. et al. (2019), показавшие снижение уровня Спм при различных аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы, таких как диффузный токсический зоб (Базедова болезнь), тиреоидит Хашимото. Таким образом, в целом можно констатировать, что снижение синтеза или биодоступности ПА может способствовать развитию воспалительного ответа и аутоиммунной агрессии [Chia T. Y. et al., 2022].

*Роль ПА в клеточной пролиферации и клеточной гибели.* ПА играют важную роль в поддержании клеточного состава тканей, оказывая влияние на процессы клеточной пролиферации и гибели клеток, включая некроз и апоптоз [Minois N., 2014; Bae D. H. et al.].

За последние несколько десятилетий были получены многочисленные данные, касающиеся метаболизма ПА и его регуляции в тканях, включая сигнальные механизмы, контроль экспрессии генов в различных тканях и под влиянием разных факторов [Sánchez-Jiménez F. et al., 2019]. В качестве основных моделей для изучения роли ПА в пролиферации использовались две группы клеток:

злокачественные клетки [Arruabarrena-Aristorena A. et al., 2018; Gerner E. W. et al., 2018] и паразиты эукариот [Roberts S. et al., 2017; Vannier-Santos M. A. et al., 2017].

ПА тесно связаны с рядом важнейших внутриклеточных процессов, включая репликацию, транскрипцию, трансляцию, посттрансляционные модификации, что в конечном итоге имеет огромное значение для клеточной пролиферации, дифференцировки, реализации запрограммированной клеточной гибели. Истощение запасов ПА приводит к остановке роста и пролиферации клеток [Juan M. et al., 2023].

Как было указано ранее, на основе Спм синтезируется гипузин, связанный с регулятором трансляции eIF5A. Последний образует связь с пептидил-тРНК в Р-сайте рибосомы [Melnikov S. et al., 2016]. Характерно, что ПА могут стабилизировать пептидил-тРНК, которая локализована на Р-сайте рибосомы, без участия eIF5A [Shin B. S. et al., 2017].

В клетках млекопитающих большая часть ПА ассоциирована с ДНК и РНК, при этом лишь около 10% присутствуют в виде свободных молекул [Igarashi K. et al., 2019].

ПА не только оказывают непосредственное воздействие на структуру и функции ДНК, но также нейтрализуют АФК и влияют на реакции Фентона, посредством которых осуществляется защита нуклеиновых кислот и даже клеток от свободных радикалов кислорода [Murray Stewart T. et al., 2018].

В последнее время в литературе появляются всё новые данные об особенностях влияния ПА на деление клеток в конкретных тканях. Так, в экспериментах на свиньях было установлено, что Смд и Пут усиливают пролиферацию эпителия кишечника [Wei Z. X. et al., 2022].

Что касается влияния ПА на запрограммированную клеточную гибель, то в последнее время обсуждается способность их продуктов окисления проявлять проапоптотические свойства [Grancara S. et al., 2016]. Это подтверждается данными Jain V. et al. (2018), показавшими, что нокаутирование генов, кодирующих ферменты катаболизма ПА (спермидин/спермин-N1-ацетилтрансферазу и сперминоксидазу), приводит к увеличению концентрации свободных

(неацелированных) Спм и Спд, что сопровождается усилением апоптоза клеток эпителия бронхов при аллергическом воспалении дыхательных путей [Jain V. et al., 2018]. Кроме того,  $\alpha$ -дифлуорометилорнитин, ингибируя ОДК, индуцирует программированную клеточную гибель [Hwang W. Y. et al., 2001].

В ряде работ высказывается предположение о том, что Спм способен замедлять процессы старения тканей за счёт усиления аутофагии клеток [LaRossa T. J. et al., 2013; Madeo F. et al., 2019; Hofer S. J. et al., 2022], а также посредством повышения биодоступности NO и подавления влияния оксидативного стресса [LaRossa T. J. et al., 2013]. В работе Holbert C. E. et al. (2020) было показано, что аминоксидаза способна катализировать окисление экзогенных ПА и в последующем стимулировать высвобождение активных форм кислорода, приводя к индукции аутофагии. Спм также усиливает ацетилирование и стабильность ассоциированного с микротрубочками протеина 1S (MAP1S), одновременно индуцируя аутофагический поток [Yue F. et al., 2017].

## **1.2. Полиамины и опухолевая пролиферация**

К настоящему времени получены экспериментальные доказательства центральной роли ПА в пролиферации и росте опухолевых клеток. Однако механизмы активации метаболического пути и молекулярных сигналов, лежащих в основе онкогенного действия ПА при канцерогенезе, остаются во многом невыясненными. Современные исследования вновь привлекли внимание к обмену ПА как к метаболическому пути, который обеспечивает связь между генетическими, метаболическими и сигнальными процессами при опухолевом росте.

Метаболические пути генерируют промежуточные продукты и метаболиты, которые, не превращаясь непосредственно в анаболические предшественники, играют центральную роль в пролиферативном процессе. Этим свойством обладают ПА, которые необходимы злокачественным клеткам для построения анаболической сигнальной и метаболической программы. Эти молекулы встречаются в большом количестве в различных типах опухолевых клеток и были

признаны неинвазивными биомаркерами благодаря их обнаружению в биожидкостях [Park M. H. et al., 2013].

Несмотря на наличие определённого массива данных, свидетельствующих о взаимосвязи ПА и онкогенеза, исследования молекулярных механизмов поддержания ими онкогенности находятся лишь в начале пути.

Как уже упоминалось выше, ПА являются поликатионами и поэтому проявляют высокое сродство к связыванию с нуклеиновыми кислотами. Способность ПА связывать РНК и ДНК с высоким сродством лежит в основе их активности [Alexiou G. A. et al., 2017].

*Трансляция белка.* ПА осуществляют селективный контроль биосинтеза белков. В частности, Спд является субстратом для синтеза редкой аминокислоты – гипузина [Yamashita Ею et al., 2013], которая ковалентно связывается с единственным белком – фактором инициации трансляции eIF5A [Shiba et al., 1971].

Гипузинированный eIF5A участвует в эмбриогенезе, а также в процессе развития опухолей. Продукция eIF5A равно как и ферментов, обеспечивающих гипузинирование (таких как дезоксигипузин синтаза и дезоксигипузин гидроксилаза), усилена в клетках различных новообразований [Muramatsu T. et al., 2016]. Гипузинирование eIF5A приводит к накоплению белков, способствующих росту и агрессивности опухолевых клеток, включая RhoA, PEAK1 и малый белок теплового шока HSP27 – ядерный фактор kB [Mémin E. et al., 2014; Scuoppo et al., 2018]. Был изучен терапевтический потенциал ингибирования процесса гипузинирования. Например, BCR-ABL–положительные лейкозы проявляют большую чувствительность к ингибированию гипузинированного eIF5A, чем те, которые не имеют такой транслокации [Sievert H. et al., 2014]. Дальнейшее понимание регуляции этой посттрансляционной модификации и влияния гипузинированного eIF5A на процессы канцерогенеза будет иметь большое значение для исследований опухолевого роста.

*Ремоделирование хроматина.* Помимо регуляции репликации ДНК, транскрипции и трансляции, метаболизм ПА также влияет на эпигеном. Эпигенетические изменения часто происходят на уровне гистонов и ДНК, за счет

ацетилирования и/или метилирования. Катаболизм ПА ограничивает доступность свободного ацетил-КоА: ПА ацетируются под действием SAT1, который представляет собой звено в механизме клиренса и экскреции ПА. Экспрессия SAT1 при раке предстательной железы истощает пулы ацетил-КоА и вызывает противоопухолевый ответ [Hardbower D. M. et al., 2017]. Также имеются сообщения о роли SAT1 в канцерогенезе независимо от ПА [Liu C. et al., 2014]. Вместе с тем, остаётся открытым вопрос о том, в какой степени контроль ремоделирования хроматина метаболизмом ПА зависит от изменений в окислительном метаболизме, балансе ПА, ацетилировании белков и аутофагии.

*Межклеточная сигнализация.* ПА способствуют активации  $\beta$ -катенина – белка, участвующего в регуляции и координации межклеточной адгезии, а также транскрипции генов. В эпителиальных клетках ПА необходимы для заживления ран и миграции клеток – процесса, который зависит от увеличения притока кальция и активации  $\beta$ -катенина [Guidotti S. et al., 2013]. Это может свидетельствовать о важности этих метаболитов в таких типах опухолей, которые зависят от данного онкогенного пути. С этим согласуется недавнее сообщение, касающееся гепатоцеллюлярной карциномы, в котором представлены доказательства опухолесупрессивного действия клиренса ПА за счет экспрессии SAT1, среди прочего оказывающей отрицательное действие на ядерную транслокацию и активность  $\beta$ -катенина [Manna S. K. et al., 2014]. Сообщалось также о негативной регуляции ПА онкогенных сигнальных путей, связанных с рецептором эпидермального фактора роста, митоген-активированной протеинкиназой (МАРК) или АКТ-сигнальной системой [Wang C. et al., 2017].

*Аутофагия.* Контроль аутофагии является новым аспектом функции ПА. Как было указано ранее, ПА активируют процесс аутофагии. Сообщалось о нескольких системных преимуществах данного вида молекулярной активности, в то время как ее влияние на опухолевые клетки остается в значительной степени неисследованным. Добавление ПА к клеткам дрожжей, скармливание мухам, червям и млекопитающим вызывает целый ряд эффектов, связанных с увеличением продолжительности жизни и здоровым старением. К ним, в частности, относятся

кардиопротекция, нейропротекция, устранение нарушений памяти и миопатий [Eisenberg T. et al., 2016; Galluzzi L. et al., 2017]. При этом уменьшается рост опухолей печени и усиливается противоопухолевый иммунитет [Pietrocola F. et al., 2016; Yang Y. et al., 2017]. Существует высокая когерентность вокруг молекулярных сигналов, лежащих в основе этих полезных эффектов. Хотя антиапоптотические эффекты этих поликатионов были также зафиксированы [Eisenberg T. et al., 2016], всё же основным эффектом ПА является активация аутофагии, обусловленная регуляцией процессов ацетилирования. Это согласуется с представлением о том, что мощным ингибитором аутофагии является ацетил-КоА [Eisenberg T. et al., 2014; Yue F. et al., 2017]. Добавление Спд ингибирует активность гистонацетилтрансфераз, в частности EP300, что сопровождается индукцией аутофагии [Mariño G. et al., 2014]. Что касается канцерогенеза, то судить о потенциальном вкладе аутофагической активности ПА представляется довольно затруднительным, т.к. есть данные о том, что этот процесс связан как с развитием опухоли, так и с ее подавлением [Pietrocola F. et al., 2015].

*Онкогенные сигнальные пути, влияющие на метаболизм ПА.* Поскольку опухолевым клеткам необходимо большое количество ПА для поддержания своего роста, можно предположить, что молекулярные изменения, лежащие в основе малигнизации, потребовали бы активного дисрегулирования данного метаболического пути. Однако его молекулярный контроль на сегодняшний день изучен недостаточно.

Сообщается о генетических дефектах, с которыми, в частности, может быть связано нарушение функции фермента МТАР (МТА фосфорилаза). Данный фермент кодируется геном, расположенным в локусе 9p21, который часто подвергается делеции в опухолевых клетках, и его взаимосвязь с онкогенезом была приписана сопутствующей потере CDKN2A (ингибитор циклинзависимой киназы 2A) в этой геномной позиции. Было обнаружено, что в нескольких опухолевых образцах МТАР отсутствует совместно с CDKN2A, тогда как его присутствие проявляет опухолесупрессивную активность [White E., 2015]. Недавние исследования выявили уязвимости, связанные с делециями МТАР и изменением

метаболизма ПА. Так, отмечается, что потеря МТАР вызывает повышенную восприимчивость к ингибированию PRMT5 (протеин-аргинин метилтрансферазы 5) [Marjon K. et al., 2016].

ПА секретируются во внеклеточную среду и поэтому могут быть поглощены соседними клетками. В связи с этим было показано, что эти метаболиты инкорпорируются в опухолевые клетки через эндоцитарный путь, обеспечивая таким образом альтернативный источник ПА для поддержки клеточного роста. Установление факта, что кавеолин-1 (отрицательный регулятор этого эндоцитарного механизма поглощения) ингибирует включение ПА, привело к открытию онкогенных мутаций RAS в качестве регуляторов этой стратегии поглощения через ингибирующее фосфорилирование кавеолина - 1 [Roy U.K. et al., 2008]. Эта активность мутантного RAS согласуется с другими молекулярными процессами, вызываемыми онкогеном, которые максимизируют поглощение «топлива» из внеклеточной среды [Commisso C. et al., 2013].

Изменения в пути PI3K также часто встречаются в опухолях. В злокачественных клетках проявляется aberrантная активация данного пути в результате множественных мутаций, включая PTEN, P110a (каталитическая субъединица PI3K), AKT и TSC2. Дисрегулированная активация пути PI3K способствует развитию состояния, характеризующегося увеличением количества факторов роста, при котором сигнальные изменения имитируют сценарий внеклеточной сигнализации, кодирующей рост и пролиферацию. Клетки с активированным PI3K-путем, в свою очередь, потенцируют анаболические пути, включая синтез липидов, белков и нуклеотидов. В одном из недавних исследований было показано, что метаболизм ПА также индуцируется в условиях активации PI3K. Изучение изогенных клеток дикого типа PI3K и мутантных (E545K) CRC выявило изменения в биосинтезе ПА у мутантов с преимущественным увеличением содержания Пут, Спд и МТА [Ray R. M. et al., 2012]. Также недавно было установлено, что mTORC1 (механистическая мишень рапамицинового комплекса 1) активирует продукцию dcSAM и Пут через регуляцию AMD1 и ODC1, соответственно. С одной стороны, активация *in vivo* PI3K в эпителиальных

клетках предстательной железы путем делеции *Pten* вызывала изменения в метаболоме, из которого преобладало накопление ПА и промежуточных продуктов его биосинтеза. С другой стороны, *mTORC1* способствует стабильности мРНК *ODC1*, в свою очередь поддерживая повышенный уровень ферментов [Origanti S. et al., 2012]. Это подтверждается дополнительными фактами, показывающими, что активность *mTORC1* блокирует выработку *OAZ1* через отрицательную регуляцию *mTORC2*, который является активатором выработки *OAZ1* [Ray R. M. et al., 2015].

Помимо участия основных онкогенных сигнальных путей в производстве ПА, другие каскады также влияют на активность данного метаболического пути. В соответствии с преобладающей регуляцией *ODC1* онкогенными путями сигнализация *sonic hedgehog (SHH)* регулирует трансляцию фермента, который играет важную роль в развитии медуллобластомы [D'Amico D. et al., 2015].

*Пути супрессии опухоли.* Учитывая важную роль ПА в процессах физиологической пролиферации клеток, а также канцерогенеза, возникает предположение, что механизмы подавления опухоли будут негативно регулировать и этот путь. В последние годы появилось несколько примеров, подтверждающих данную гипотезу. Активация *p53* индуцирует множественные противоопухолевые программы [Bieganski K. T. et al., 2014]. Ферроптоз – это форма запрограммированной гибели клеток, характеризующаяся возникновением дисфункциональных конденсатных митохондрий и повышением чувствительной к хелаторам железа продукции активных форм кислорода (АФК). Некоторое время назад было показано, что активация *p53* вызывает ферроптотический ответ, который частично требует модуляции метаболизма ПА [Ou Y. et al., 2016]. *SAT1* является мишенью *p53*, и его накопление приводит к деацетилированию ацетилированных ПА и превращению Спд и Спм в Пут. Удивительно, но *SAT1* частично требовался для ферроптотического ответа, вызванного *p53*, способствуя накоплению АФК. Опухолесупрессивная активность *SAT1* в данном контексте подтверждается его пониженным содержанием в опухолях, на основании чего можно предположить, что противодействие метаболизму ПА *SAT1* может лежать в основе подавления опухоли [Bronson A. S. et al.; Wei W. et al., 2023].



Несмотря на существование отдельных сообщений, в которых отмечается наличие жесткой регуляции метаболизма ПА под действием онкогенов и опухолевых супрессоров, требуются дополнительные факты, подтверждающие наличие подобной патогенетической связи. Кроме того, данные роли ПА в регуляции физиологических процессов, их влияние на генерацию циркадианных ритмов организма [Zwighaft Z. et al., 2015], могут служить в качестве основы для дальнейших исследований их роли в канцерогенезе.

*ПА и канцерогенез.* Учитывая данные отдельных наблюдений, согласно которым ПА предупреждают аутоиммунное воспаление, можно предположить, что в опухолях данное явление способно блокировать механизмы противоопухолевого иммунитета. В последние десятилетия появилось достаточно много публикаций, в которых доказывалась роль ПА в патогенезе злокачественных новообразований. Отмечается, что у пациентов, страдающих онкологическими заболеваниями, в целом повышен уровень ПА по сравнению со здоровыми людьми [Chia T. Y., 2022].

В ряде работ предпринимались попытки исследовать ингибирование синтеза ПА в качестве возможного инструмента противоопухолевого воздействия. Были получены положительные результаты, особенно в тех случаях, когда это сочеталось с ингибированием захвата ПА [Gitto S. B. et al., 2018; Khan A. et al., 2021]. Необходимость блокирования захвата ПА при введении дифлуорометилорнитина объясняется тем, что ПА имеют ряд транспортеров, которые обеспечивают их поступление в клетки [Sala-Rabanal M. et al., 2013]. Также в исследовании Gamble L. D. et al. (2019) было установлено, что при нейробластоме введение животным (мышам) ингибитора захвата ПА и дифлуорометилорнитина сопровождается уменьшением размера опухоли. Несмотря на то что в этих исследованиях внимание в основном было сосредоточено на прямых противоопухолевых эффектах ингибирования синтеза ПА, имеются также наблюдения, согласно которым при данном воздействии имеет место усиление инфильтрации опухоли CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами и формирование воспалительного ответа в целом [Hayes C. S. et al., 2014; Alexander E. T. et al., 2017; Miska J. et al., 2021].

Как показало исследование, выполненное в эксперименте на мышах, при меланоме сочетание поглощения ПА (дифторметилорнитин) и их синтеза (АМХТ-1501) сопровождается нормализацией патологически изменённого иммунного ответа [Hayes C. S. et al., 2014]. В последующих исследованиях на моделях меланомы и рака толстой кишки у мышей было также установлено, что ингибирование синтеза ПА вызывает усиление инфильтрации гранзим В<sup>+</sup> Inf- $\gamma$ <sup>+</sup> содержащих CD8<sup>+</sup> лимфоцитов и сопутствующие снижению иммуносупрессивных миелоидных клеток [Alexander E. T. et al., 2017]. Комбинаторный эффект ингибирования синтеза ПА и иммунотерапии был также показан на модели рака молочной железы у мышей [Alexander E. T. et al., 2020].

Важной особенностью микроокружения опухолей является рекрутирование иммуносупрессивных миелоидных клеток, именуемых опухолеассоциированными макрофагами миелоидного происхождения. Они представляют собой генетически разнообразный набор плеiotропных клеток, отвечающих за механизмы врождённого иммунитета, встречающихся в большинстве солидных опухолей [Cheng S. Et al., 2021]. Данные клетки имеют широкий диапазон различных функций от провоспалительных эффектов до иммуносупрессивных [Kiss M. et al., 2018; Yunna C. et al., 2020]. Таким образом, можно сказать, что миелоидные клетки выполняют преимущественно иммуносупрессивную функцию в опухолевой ткани (особенно в новообразованиях ЦНС, где они являются наиболее многочисленными инфильтрирующими клетками) [Friebel E. et al., 2020; Klemm F. et al., 2020]. При этом известно, что иммуносупрессивный фенотип клеток зависит от интенсивности экспрессии аргиназы-1, катализирующей образование орнитина из аргинина [Caldwell R. W. et al., 2018]. Биохимические реакции, которые протекают при участии аргиназы-1 и глицинамидинотрансферазы, являются единственным источником образования орнитина, который далее превращается в Пут под действием ODC1 [Humm A. et al., 1997].

Hardbower D. M. et al. (2017) попытались установить роль участия ПА в реализации иммуносупрессивного или «репаративного» фенотипа миелоидных клеток. С этой целью был произведён нокаут генов, кодирующих фермент ODC1 в

этих клетках. В результате у мышей в кишечнике было обнаружено больше провоспалительных макрофагов. Аналогичные данные были получены в исследованиях на модели канцерогенеза, ассоциированного с колитом [Singh K. et al., 2018].

В ряде других исследований также установлены отдельные механизмы, посредством которых ПА участвуют в реализации функций миелоидных клеток. В частности, показано, что захват аргинина играет ключевую роль в пролиферации Т-клеток и реализации их эффекторных функций [Geiger R. et al., 2016], а дефицит аргинина стимулирует рекрутирование клеток-супрессоров миелоидного происхождения и одновременное ингибирование пролиферации Т-лимфоцитов [Fletcher M. et al., 2015].

Существует и другая гипотеза. Поскольку ПА необходимы для клеточной пролиферации, миелоидные клетки могут выступать в качестве поставщиков питательных веществ для злокачественных клеток. Имеются убедительные доказательства того, что ПА активно потребляются опухолевыми тканями, что следует учитывать при ингибировании синтеза ПА *de novo* [Gamble L. D. et al., 2019; Corral M. et al., 2020; Khan A. et al., 2021].

Наконец, третья гипотеза предполагает механизм, при котором опосредованная ПА гипузинация EIF5a напрямую контролирует митохондриальную транскрипцию и трансляцию белков, участвующих в движении электронов по дыхательной цепи и цикл трикарбоновых кислот. Считается, что ПА, источником которых являются макрофаги, имеют черты метаболизма, свойственные данному типу клеток [Puleston D. J. et al., 2019].

Определённые особенности метаболизма ПА в миелоидных клетках были определены при исследовании аутоиммунных реакций. Было отмечено, что, если продукция ПА снижена, миелоидные клетки теряют способность предупреждать развитие воспаления [Chia, T. Y. et al., 2022]. С другой стороны, во многих опухолях наблюдается повышение активности обмена ПА. При этом наличие миелоидных клеток в ткани новообразования, предположительно, стимулирует их рост и повышает резистентность к проводимой терапии [Zhang P. et al., 2019;

Horikawa N. et al., 2020]. Следовательно, ингибирование синтеза ПА можно рассматривать как стратегию усиления иммунотерапевтической эффективности, достигаемой за счёт индукции аутоиммунитета [Chia, T. Y. et al., 2022].

В ряде работ по изучению комбинаторной иммунотерапии контрольных точек меланомы было обнаружено, что иммуноопосредованные нежелательные явления значительно усиливаются у пациентов с двойной терапией [Larkin J. et al., 2015; Wolchok J. D. et al., 2017]. Указанные явления могут быть либо результатом направленного ответа Т-клеток против общих антигенов опухоли, либо нетаргетированного усиления воспалительного ответа. При этом существуют свидетельства в пользу обоих указанных процессов. Так, при одном из вариантов таких иммуноопосредованных нежелательных явлений – миокардите, прослеживается роль как Т-лимфоцитов, так и моноцитов [Johnson D. V. et al., 2016]. Ряд других нежелательных явлений связан с гуморальными и клеточными механизмами иммунитета [Kim K. H. et al., 2020; Liu X. et al., 2021].

В целом, можно сделать предварительный вывод о том, что благодаря ПА устанавливается баланс между воспалением и иммуносупрессией [Chia, T. Y. et al., 2022]. При развитии воспалительного ответа миелоидные клетки начинают проявлять иммуносупрессивные свойства, сопровождающиеся генерацией ПА [Yurdagul A. Jr. et al., 2020].

Подводя итог данного подраздела, касающегося роли ПА в опухолевой пролиферации, следует подчеркнуть, что понимание особенностей их обмена в малигнизированных клетках необходимо для формирования основ стратификации пациентов и совершенствования методов комбинированной терапии с использованием ингибиторов синтеза ПА, которая, вероятно, способна будет обеспечить максимальную эффективность данной антиметаболической стратегии.

### **1.3. Обмен полиаминов как патогенетическая мишень противоопухолевой терапии**

*Аналоги ПА как противоопухолевые агенты.* С момента публикации, посвященной открытию полиаминовых препаратов [Casero R. A. Jr. et al., 2001],

данное направление исследований претерпело многочисленные изменения. Наиболее значимым из них является смещение вектора в поиске новых химических агентов от ингибиторов синтеза ПА к веществам, стимулирующим их распад. Этот сдвиг отчасти объясняется существованием множества компенсаторных механизмов, способных поддерживать гомеостаз в клеточных пулах ПА [С. W. Porter, 1986] и, таким образом, полезностью специфических ингибиторов ферментов синтеза ПА в качестве лекарств является ограниченной. Подобные ингибиторы имеются для каждого фермента в пути биосинтеза ПА [Casero R. A. Jr. et al., 2001; Danzin C. et al., 1990] и в системе их транспорта [P. M. Cullis, 1998; Weeks R. S. et al. 2000].

Аналоги ПА, как потенциально противоопухолевые агенты, имеют структуру, сходную с естественными ПА, но не могут полностью заменить их функционально. При этом они способны конкурировать с природными ПА, проникать в клетки через мембранные каналы, снижая активность различных ферментов, участвующих в синтезе ПА, а также способствуя распаду ПА. В свою очередь, это приводит к истощению запаса внутриклеточных ПА. Так, аналоги ПА на основе пропилендиамина и бис(этил)спермина показали способность ингибировать ODC в опухолевых клетках, что приводило к подавлению роста опухолевых клеток [Thomas T. J. et al., 2018; Ploskonos M. V. et al., 2020].

*Дифторметилорнитин (ДФМО) в химиотерапии злокачественного роста.* Несмотря на то что эти ингибиторы обладают выраженным эффектом в отношении соответствующих ферментов-мишеней, только один из них, альфа-дифторметилорнитин (ДФМО $\alpha$ ), на сегодняшний день вышел в клиническую практику. Изначально ДФМО был разработан как противоопухолевый агент, но он оказался недостаточно эффективным, чтобы оправдать продолжения испытаний фазы II. Однако было показано, что он имеет значительный потенциал в качестве химиопрофилактического средства против злокачественных опухолей [Wang X. et al., 2007; Raul F. et al., 2007]. Хотя ни один другой ингибитор биосинтеза ПА не был выведен на рынок, повсеместное распространение природных ПА позволяет

сделать вывод о том, что эти молекулы можно использовать в качестве ингибиторов биосинтеза ПА.

На модели рака толстой кишки у мышей было показано, что лечение с применением ДФМО предупреждало появление мутаций протоонкогена *KRAS*, что позволяет рассматривать его в качестве эффективного средства подавления канцерогенеза в условиях химиопрофилактики [LeGendre-McGhee S. et al., 2015]. Благодаря использованию методов метаболомики удалось обнаружить существенные изменения в обмене ряда внутриклеточных веществ при воздействии ДФМО на клеточные линии колоректальной аденокарциномы человека HT-29, в частности, снижение содержания Пут, Спд, метилтиоаденозина и N-ацетилпутресцина [Pbáñez C. et al., 2015].

В исследованиях, проведённых на клеточных линиях меланомы и на трансгенных мышах было показано, что ингибирование синтеза и поглощения ПА даёт выраженный эффект. Более того, данная стратегия позволяет добиться ингибирования иммуносупрессивного ответа опухоли. Таким образом, данный метод терапии оказывает двойное влияние на опухолевые клетки: наблюдается подавление образования ПА и стимуляция иммунного ответа, в связи с чем на данную стратегию возлагаются серьёзные надежды [Hayes C. S. et al., 2014]. В ряде других работ последних лет подтверждается эффективность комбинированной стратегии на примере нейробластомы, а также в исследованиях на клеточных линиях рака предстательной железы, поджелудочной железы и молочной железы [Muth A. et al., 2014; Gitto S. B. et al., 2018].

Необходимо также отметить, что применение ДФМО продемонстрировало положительный эффект не только при лечении нейробластомы и колоректального рака. Так, в качестве одной из возможных мишеней следует рассматривать рак поджелудочной железы, поскольку данный орган характеризуется самым высоким содержанием Спд среди всех тканей организма человека [Massaro C. et al., 2017; Phanstiel O. 4th, 2018]. ДФМО оказался эффективным в качестве агента, предупреждающего развитие рака поджелудочной железы у мышей с мутантным протоонкогеном *KRAS* [Mohammed A. et al., 2014]. Кроме того, в экспериментах на

мышцах было показано, что при злокачественной опухоли поджелудочной железы сочетание ингибирования ОДК с ингибитором транспорта ПА приводило к замедлению роста опухолевых клеток, что сопровождалось увеличением продолжительности жизни животных [Massaro C. et al., 2017; Gitto, S. B. et al., 2018].

*Активность ферментов метаболизма ПА как патогенетическая мишень.* В недавно проведённых исследованиях *in vitro* и *in vivo* была продемонстрирована отчётливая зависимость синтеза орнитина из глутамина *de novo* в клетках аденокарциномы поджелудочной железы. Данный процесс, опосредованный орнитинаминотрансферазой, поддерживает синтез ПА и необходим для роста опухоли. Активность этого фермента контрастирует с зависимостью большинства нормальных тканей и других типов рака от орнитина, синтезированного из аргинина, который далее направляется на синтез ПА. Данная зависимость связана со снижением количества аргинина в микроокружении аденокарциномы поджелудочной железы и обусловлена мутантным протоонкогеном KRAS. Активированный KRAS инициирует экспрессию ферментов синтеза ПА, что приводит к изменениям в транскриптоме и ландшафте открытого хроматина в малигнизированных клетках [Lee M. S. et al., 2023].

Альтернативный взгляд на участие ПА в опухолевом росте представлен в ряде исследований по оценке интенсивности катаболизма ПА, определяемой по активности аминоксидаз, в малигнизированных клетках. В частности, была отмечена высокая степень экспрессии MAO в различных злокачественных новообразованиях [Liu F. et al., 2018; Meenu M. et al., 2020; Chen C. H. et al., 2023]. В отдельных работах продемонстрирована достоверная корреляционная связь между экспрессией MAO A и частотой рака предстательной железы высокой степени злокачественности [Wu J. B. et al., 2014]. Повышенная активность MAO A также характерна для глиобластомы [Kushal S. et al., 2016]. Кроме того, предполагается, что MAO A способствует прогрессированию немелкоклеточного рака лёгких за счёт регуляции эпителиально-мезенхимального перехода, являющегося ключевым механизмом опухолевой инвазии и метастазирования [Liu F. et al., 2018; Huang B. et al., 2020]. Повышенная экспрессия MAO B характерна

также для глиобластомы [Sharpe M. A. et al., 2016] и рака толстой кишки [Yang Y. C. et al., 2020]. Таким образом, в настоящее время ингибиторы MAO рассматриваются рядом авторов как потенциальные противоопухолевые агенты [Aljanabi R. et al., 2021; Wang X. et al., 2021; Mehndiratta S. et al., 2022].

В качестве подобных ингибиторов MAO могут выступать отдельные дериваты ПА. В ряде исследований было показано, что синтетические аналоги ПА способны воздействовать на патогенетические мишени опухолевого роста, такие как ферменты, рецепторно-опосредованные механизмы и т.д. [Casero R. A. Jr. et al., 2018; Dobrovolskaite A. et al., 2022; Houdou M. et al., 2023]. На клеточной линии глиобластомы LN-229 был обнаружен выраженный антипролиферативный эффект аналогов ПА (аналоги метоктрамина с дианилиновым и дианилидиновым фрагментами), который сопровождался ингибированием двух изоформ MAO – А и В [Nordio G. et al., 2023].

*Аналоги ПА как модуляторы эпигенетических процессов.* Ранее было упомянуто о том, что ПА участвуют в поддержании стабильности ДНК, а также в процессинге и трансляции РНК. Расшифровка многочисленных регуляторных механизмов, посредством которых ПА оказывают своё влияние на ферменты-модификаторы хроматина, привлекает внимание к отдельным генам. Также, по-видимому, необходима оценка уже известных ферментов, ответственных за ремоделирование хроматина, на предмет их индивидуальной чувствительности к ПА либо их производным. В частности, можно ожидать, что определение их влияния на различные изоформы соответствующих ферментов, позволит найти новые подходы к разработке противоопухолевых агентов. Иными словами, производные ПА, действующие как эпигенетические модуляторы, предположительно, несут в себе определённый потенциал в качестве средств, обладающих активностью в отношении канцерогенеза [Pasini A. et al., 2014].

В роли агентов, влияющих на экспрессию определённых генов, могут также выступать полиаминовые конъюгаты. Последние, как правило, состоят из ПА и ДНК-интеркалятора. ПА отвечают за транспортировку конъюгатов в опухолевые клетки, конкурентно ингибируя захват экзогенных ПА. ДНК-интеркалятор может



встраиваться в некоторые гены, приводя к нарушению взаимодействия ДНК и белков, в результате чего происходит нарушение их функции и гибели клетки. К известным интеркаляторам относятся такие соединения как нафталимид, флавоноиды, нафтохинон, антрахинон и халкон [Lu B. et al., 2022].

Показано, что конъюгаты ПА на основе нафталимида достоверно угнетают опухолевый рост и развитие метастазов. При этом максимальный антипролиферативный эффект наблюдался в отношении гепатомы. Более того, результаты оказались даже более значительными по сравнению с другими противоопухолевыми препаратами, уже применяющимися в онкологической практике, такими как амонафил и цисплатин. Было установлено, что механизм действия одного из указанных конъюгатов заключается в регуляции активности ряда ферментов метаболизма ПА (таких как ПАО и спермидин/спермин-N(1)-ацетилтрансфераза), что сопровождается снижением концентрации Спм, Спд и Пут и, как следствие, снижением скорости роста опухолевых клеток [Ma J. et al., 2021].

Wang C. et al. (2017) в экспериментах *in vitro* и *in vivo* показали наличие противоопухолевых свойств ряда конъюгатов ПА на основе флавоноидов. При комбинации с аспирином было отмечено увеличение цитотоксического действия в отношении гепатокарциномы линии H22 и её метастазирования в лёгкие: конъюгат ПА инициировал экспрессию протеинов, опосредующих апоптоз клеток, а аспирин усиливал данный эффект [Li Q. et al., 2016]. Примечательно, что другие флавоноиды вызывают индукцию аутофагии, однако, не влияют на апоптотическую гибель злокачественных клеток [Li Q. et al., 2018].

\* \* \*

Подводя итог представленным в данной главе литературным данным, следует подчеркнуть, что метаболизм ПА, несомненно, является одним из важнейших процессов жизнедеятельности опухолевых клеток, на который может быть направлено действие потенциальных цитотоксических агентов. К настоящему времени продемонстрирован антипролиферативный эффект ряда веществ, которые

по своей природе являются аналогами ПА. Последние за счёт конкурентного ингибирования синтеза естественных внутриклеточных ПА воздействуют на активность различных ферментов, участвующих в анаболизме и катаболизме данного класса соединений. Дальнейшее развитие данного направления исследований позволит расширить диапазон органических веществ, способных посредством влияния на обмен ПА оказывать избирательное альтерирующее действие на опухолевые клетки.

## Глава 2

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

## 2.1. Общий дизайн исследования

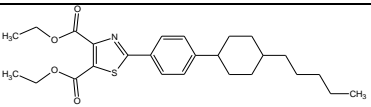
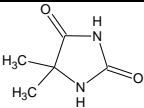
Исследование проводилось в несколько этапов, каждый из которых соответствовал определённой задаче. Тестирование гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений проводили *in vitro* в бесклеточной тест-системе с целью оценки их влияния на активность ферментов обмена ПА и на клеточных линиях опухолей: карциномы лёгкого линии K549, рака молочной железы линии SkBr3 и рака шейки матки линии HeLa с целью анализа их антипролиферативного действия. Докинг отдельных тестируемых соединений в системе «белок-лиганд» для ПАО осуществлялся в эксперименте *in silico*.

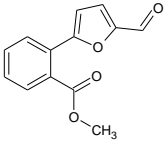
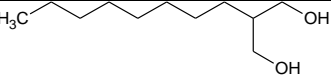
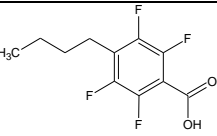
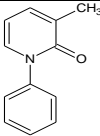
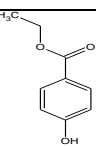
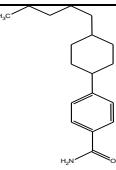
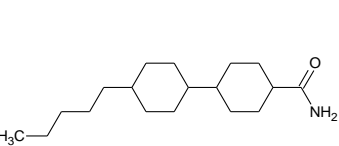
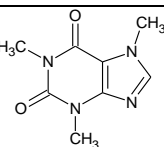
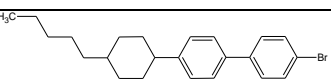
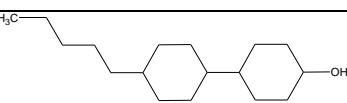
## 2.2. Тестируемые соединения и обоснование их выбора

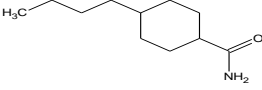

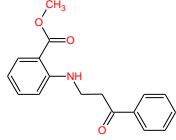
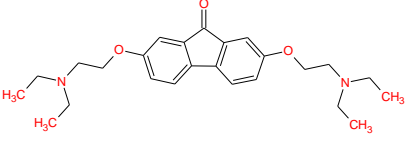
Исследуемые вещества были синтезированы по стандартной методике [Волков С.В., Кутяков С.В, 2007] в лаборатории синтеза гетероциклических соединений кафедры органической химии РУДН. В таблице 1 приведены индексы, названия и формулы тестируемых соединений.

Таблица 1.

Тестируемые соединения.

Индекс	Название соединения	Формула соединения
A1	диэтил-2-(4-(4-пентилейклогексифенил)-4,5-дигидротиазол-4,5-дикарбоксилат	
A2	5,5-диметилимидазолидин-2,4-дион	

A3	метил-2-(5-формилфуран-2-ил)бензоат	
A4	2-октилпропан-1,3-диол	
A5	4-бутил-2,3,5,6-тетрафторбензойная кислота	
A6	3-метил-1-фенилпиридин-2(1H)-он	
A7	этил 4-гидроксибензоат	
A8	4-(4-пентилциклогексил)бензамид	
A9	4'-пентил-1,1'-би(циклогексил)-4-карбоксамид	
A10	1,3,7-триметил-3,7-дигидро-1H-пурин-2,6-дион	
A11	4-брум-4-(4-бутилциклогексил)-1,1-бифенил	
A12	4'-пентил[1,1'-би(циклогексан)]-4-ол	

A13	4-бутилциклогексан-1-карбоксамид	
A14	3-метилпиридин-2-ол	
A15	метил-2-[(3-оксо-3-фенилпропил)амино]бензоат	
A16	2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9Н-флуорен-9-он (и в виде дигидрохлорида)	

В качестве растворителя для тестируемых веществ использовался диметилсульфоксид (ДМСО).

Указанные соединения имеют структурное сходство с веществами, для которых была доказана антипролиферативная активность (например, противоопухолевые антибиотики), чем и обусловлен их выбор [Семенов А. А., 1979]. Тестируемые соединения содержат в своей структуре фрагменты, гомологичные ПА, что позволяет предположить наличие у них способности заменять природные ПА во внутриклеточных процессах. В частности, они могут частично или полностью блокировать некоторые метаболические пути. В этом случае они выступают в качестве антагонистов ПА или их частичных агонистов. В противоположном случае они являются агонистами рецепторов к ПА. Такое сродство тестируемых соединений к рецепторам ПА позволяет замещать внутриклеточные ПА в местах их связывания с расчётом на то, что на клеточный рост они не будут оказывать влияние [Marton L. J., et al., 1995; Musso M., et al., 1997; Федорончук Т. В., и др., 2000]. В результате может произойти остановка роста и гибель клеток, в частности, опухолевых.

В процессе эксперимента проводилось исследование антипролиферативных свойств отдельных органических соединений оригинального синтеза, содержащих

фрагменты, сходные по структуре с ПА. Исследуемые вещества были получены в виде кристаллических порошков.

### **2.3. Количественный анализ основных показателей обмена ПА в бесклеточных тест-системах**

*Подготовка бесклеточной тест-системы.* Для изготовления бесклеточной тест-системы использовали печень лабораторных крыс. В эксперимент было включено 85 взрослых беспородных крыс-самцов с массой тела 270 – 360 г. Животные содержались в виварии РУДН на стандартном пищевом рационе со свободным доступом к пище и воде. У животных под общим обезболиванием проводили резекцию печени, а через 12 часов забирали её оставшуюся часть [Higgins G. M., Anderson R. M., 1931]. Регенерирующую печень использовали в качестве модели активно пролиферирующей ткани, характеризующейся повышенной продукцией ПА. Для каждого из 16 тестируемых соединений было использовано по 5 крыс. Контрольную группу составили также 5 животных. Образцы печени измельчали с использованием гомогенизатора Omni MultiMix (Omni Inc., США). Бесклеточная тест-система представляла собой цитозольную фракцию, полученную путём центрифугирования 33% гомогената с ускорением 20 000 g в течение 20 мин при 4°C на ультрацентрифуге Beckman L8-80M (США).

В условиях эксперимента содержание животных и все манипуляции с ними проводились в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.). Исследование одобрено Комитетом по этике медицинского института РУДН (протокол № 13 от 15 декабря 2022 г.).

*Анализ удельной активности ДАО, ПАО и СМО в бесклеточной тест-системе.* Полученный супернатант использовался для оценки активности ферментов распада ПА – аминоксидаз: ДАО, ПАО, СМО [Сяткин С. П. и Березов Т. Т., 1979, 1982]. Активность аминоксидаз определялась при инкубировании супернатанта с субстратами окисления (Спд, Спм, Пут) и соответствующим тестируемым соединением. Концентрация исследуемых веществ в пробах

составляла 0,1 мМ. Оптическую плотность определяли с помощью спектрофотометра SpectraMax (Molecular Devices, США). Удельную активность фермента рассчитывали по стандартной формуле и выражали в нкатал на 1 мг белка.

***Определение уровней ПА и активностей ферментов синтеза ПА.***

Совместное определение активности ферментов синтеза ПА – орнитиндекарбоксилазы (ОДК), спермидинсинтазы (СПС) и сперминсинтазы (СМС) и уровней ПА проводилось методом ВЭЖХ.

Первый этап подготовки проб проводился по стандартной методике [Березов Т.Т., Сяткин С.П., 1986]. Использовали реакционную среду, которая содержала орнитин (Реахим, Россия) в концентрации 80 мМ, пиридоксальфосфат (Реанал, Венгрия) в концентрации 4 мМ, дитиотриэтол (Serva, Германия) в концентрации 20 мМ в 50мМ фосфатном буфере с рН 6,6. В реакционную среду добавляли соответствующие исследуемые вещества до концентрации 0,1 мМ и 0,3 мл 33% супернатанта и проводили инкубацию при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  в течение 1 часа. Далее выполняли депротеинизацию посредством добавления 0,1 мл 0,2 М раствора  $\text{HClO}_4$ . Затем проводили центрифугирование при 6000 об/мин в течение 5 мин. Полученные пробы надосадочной жидкости хранили при  $t = 4^{\circ}\text{C}$ .

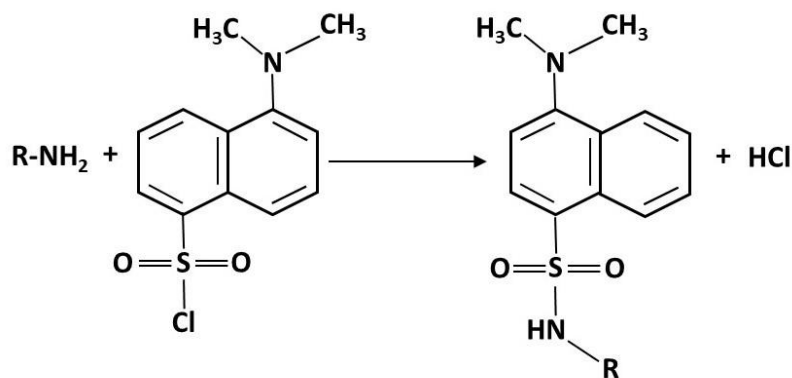
На втором этапе проводилась подготовка проб к измерению концентрации ПА и активности ферментов. Для этого использовался дериватирующий агент – дансил-хлорид (7,5 мг/мл ацетон), который в реакции с первичными и вторичными аминами образует устойчивые флуоресцирующие молекулы.

«Реакция дансирования проводилась в темноте при  $55^{\circ}\text{C}$  в течение 60 минут. Избыток реагента после окончания реакции удалялся 30-минутной инкубацией с 0,2 мл дистиллированной воды. Жидкофазная экстракция продуктов реакции проводилась в бензол. После тщательного перемешивания и разделения фаз аликвота 400  $\mu\text{л}$  переносилась в эппендорф, растворитель выпаривался, а осадок растворялся в 1 мл метанола хроматографической чистоты. После ультрацентрифугирования ( $50\ 000 \times 15$  мин) надосадочная жидкость переносилась

в виалу. Объем вводимой пробы составил 20  $\mu$ л. Анализ был выполнен на высокоэффективном жидкостном хроматографе на базе платформы Agilent 1200 с использованием метода абсолютной калибровки.

Был проведен подбор оптимальных условий хроматографирования на имеющемся оборудовании (Nucleosil C18, 250 мм, 4,6 мм, 5 мкм, MachereyNagel). Состав элюирующей смеси был наиболее простым из предложенных в литературе — вода-метанол. Оптимальным оказался состав вода-метанол в соотношении 40% : 60%. Режим хроматографического элюирования представлял собой комбинацию градиентного и изократического элюирования. Так, с 1-й по 23 минуту градиент метанола возрастал с 60% до 95%, последующие 2 минуты происходило изократическое элюирование 95% метанолом, 5 минут — промывка колонки 100% метанолом, 5 минут — приведение системы в исходное состояние. Все время анализа занимало 35 минут. Параметры флуоресцентной детекции:  $\lambda_{em} = 365$  нм,  $\lambda_{ex} = 510$  нм» [Неборак Е.В. и др., 2016]. Для измерения концентрации ПА строились калибровочные кривые.

После проведения реакций с использованием субстратов ОДК осуществлялась дериватизация с образованием флуоресцирующих производных ПА. С этой целью применялся дансил-хлорид, поскольку при его участии появляются продукты, наиболее устойчивые при взаимодействии с аминогруппами. Общая схема реакции дансирования представлена на рисунке 1 [Wang Q. et al., 2016].



**Рисунок 1.** Схема реакции дансирования.



В качестве элюирующей смеси использовалась смесь вода : метанол в соотношении 40% : 60%. Параметры флуоресцентной детекции:  $\lambda_{em}=365$  нм,  $\lambda_{ex}=510$  нм.

**Калибровочные кривые аналитов.** На калибровочных стандартах была воспроизведена ВЭЖХ-ФЛД методика одновременного количественного определения путресцин-дансила, спермидин-дансила и спермин-дансила.

В таблице 2 представлены результаты ВЭЖХ-ФЛД количественного анализа 5 калибровочных стандартов.

На основании таблицы 2 получены 3 градуировочные зависимости для путресцина-дансил, спермидина-дансил и спермина-дансил площади хроматографических пиков аналитов в стандартных растворах. Градуировочные кривые всех трех веществ описывались линейными уравнениями типа  $y=ax+b$ , с коэффициентами детерминации  $> 0,998$

**Таблица 2.**

Результаты анализа калибровочных стандартов.

№ стандарта	Концентрация аналита, нМ/мл	Спика Путресцин	Спика Спермидин	Спика Спермин
1	30	58,608	63,37	77,26
2	45	82,15	82,73	101,52
3	90	211,44	265,49	363,98
4	180	425,1	555,51	801,19
5	360	944,45	1202,87	1756,66

**Количественный анализ белка.** Количество белка в пробах измеряли фармакопейным методом [Государственная Фармакопея СССР, XI, 1987] по Лоури (1951) в модификации Сяткина С. П. (1982).

Поскольку определяемые значения активности ферментов выражались в единицах удельной активности, они относились к единице массы белка в пробе. В качестве детергента был использован дезоксихолат. Растворение белков достигалось посредством повышения концентрации NaOH до 1 М.

**Реактивы, использованные в эксперименте.** В эксперименте использовались следующие реактивы: пероксидаза хрена (Merck, Германия), о-дианизидин, 97% (Acros, Бельгия), путресцина гидрохлорид, 99,5% (Sigma, США), спермидина гидрохлорид, 99,5% (Sigma, США), спермина гидрохлорид, 99,5% (Sigma, США), пиридоксаль-фосфат (Реанал, Венгрия), дитиотреитол (Serva, Германия), натрия гидрокарбонат (ЧДА), трис(гидроксиметил)аминометан, 97% (Acros, Бельгия), калия фосфат (ЧДА), калия гидрофосфат (ЧДА) (Марбиофарм, Россия), соляная кислота 9,8N (ЧДА).

#### **2.4. Количественные корреляции «структура-активность» (ККСА) [по Hu Q. N. et al., 2003]**

ККСА рассчитывали с использованием компьютерных программ «ChemicDescript» [Попов П. И., 2003] и «ChemicPen» [Попов П. И., 2005]. Производили расчет топологических индексов: Винера (W), Балабана (J), обхода ( $\omega$ ) и электропии ( $\epsilon$ ) по структуре молекулы.

Индекс Винера (Wiener index) рассчитывали по формуле [Wiener H., 1947]:

$$W = \frac{1}{2} \sum d_{ij}, \quad i > j, \quad \text{где } d_{ij} \text{ является элементом в матрице расстояний.}$$

Индекс Балабана (Balaban index) рассчитывали по формуле [Balaban A. T., 1982]:

$J = q \sum (S_i S_j)^{-1/2}$ , где  $S_i$  и  $S_j$  – суммы расстояний вершин  $V_i$  и  $V_j$  в матрице расстояний;  $q = n_e / (\mu + 1)$ , где  $n_e$  – число ребер,  $\mu$  – число циклов.

Индекс обхода (Detour index) определяли по формуле [Lukovits I., 1996; Razinger M., 1997]:

$$\omega = (1/2) \sum \sum (\Delta)_{ij}, \quad i, j, \text{ где } \Delta_{ij} \text{ является элементом в матрице обхода.}$$

Индекс электропии (Electropy index) определяли по формуле [Yee W. T. et al., 1977]:

$\varepsilon = \log_2(N! / \prod N_i!)$ , где  $N$  – общее число атомов в молекуле;  $N_i$  – число атомов одного вида.

## **2.5. Оценка цитотоксичности тестируемых веществ на клеточных культурах**

В исследовании были использованы клетки карциномы легкого человека линии (линия A549), клетки рака молочной железы человека (линия SkBr3) и клетки рака шейки матки (линия HeLa). В качестве контроля использовали клеточную линию фибробластов (wi-38). Указанные линии клеток были получены из компании «АТСС» (American type culture collection) и выращивались в соответствии с условиями стандартного культивирования во влажной атмосфере с 5%  $\text{CO}_2$  при  $37^\circ\text{C}$  в  $\text{CO}_2$ -инкубаторе. «Использовалась питательная среда, состоящая из Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM), pH 7.4, обогащенного 10% бычьей эмбриональной сывороткой FCS (Fetal Calf Serum), с добавлением L-глутамина 2 мМ и смеси пенициллина со стрептомицином (100 ед/мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина)» [Шевченко А. А., 2011].

«Клетки культивировали в 75 см<sup>2</sup> флаконах (Greiner, США). Смена среды проводилась 3 раза в неделю, а пересев клеток – раз в 3 дня. Для посева клеток в новый флакон удаляли старую среду, дважды промывали клетки 10 мл раствора Версена (ПанЭко, Россия), затем открепляли клетки от дна флакона с помощью 2 мл 0,125% раствора трипсина-ЭДТА (ПанЭко, Россия) в течение 6 мин при  $37^\circ\text{C}$ ,

контролируя диссоциацию под микроскопом. После этого клетки тщательно ресуспендировали в 4 мл среды с сывороткой и полученную суспензию центрифугировали 5 мин, 300xg. Клеточный осадок ресуспендировали в 5 мл среды и добавляли аликвоту в новый флакон с полной средой (рекомендуемое разведение – 1:8)» [Неборак Е. В., 2012].

Клетки опухолей линий A549, SkBr-3, HeLa культивировались в стандартных условиях. Через 24 ч добавлялись растворы тестируемых соединений с заданной конечной концентрацией. «По истечению 24, 48 и 72 ч инкубации с изучаемыми веществами количество живых клеток определяли с помощью красителя Аламар Блю. Аламар Блю представляет собой нефлуоресцентный краситель резаруцин, который при восстановлении в метаболически активных клетках превращается во флуоресцентный продукт резоруфин. Уменьшение флуоресценции ( $\lambda_{Ex}=535$ ,  $\lambda_{Em}=585$  нм) в присутствии тестируемого вещества отражает пониженную пролиферацию. Такое изменение сигнала пропорционально количеству живых клеток и используется для измерения цитотоксичности» [Неборак Е. В., 2012].

Влияние тестируемых веществ на пролиферативную активность клеток опухолевых линий A549, SkBr и HeLa исследовали с использованием МТТ-теста. Для определения числа жизнеспособных клеток применяли краситель МТТ, который даёт окраску при восстановлении в клетках с высокой активностью обменных процессов.

«Процент пролиферации клеток, инкубированных с тестируемыми веществами, высчитывается следующим образом:

*Уровень пролиферации (%) = 100-100 x (Сигнал<sub>МАКС</sub>-Сигнал<sub>ТЕСТ</sub>)/(Сигнал<sub>МАКС</sub>-Сигнал<sub>МИН</sub>), где*

*Сигнал<sub>ТЕСТ</sub>* – среднее значение флуоресценции (из 2-х повторов) для лунок с изучаемым веществом

*Сигнал<sub>МИН</sub>* – среднее значение флуоресценции (из 6-ти повторов) для лунок без клеток

*Сигнал*<sub>МАКС</sub> – среднее значение флуоресценции (из 6-ти повторов) для лунок с клетками, но без обработки веществами» [Шевкун Н. А., 2013].

**IC50 (концентрация полумаксимального ингибирования)** для вещества с наиболее высокой найденной ингибирующей активностью определялась путём построения кривой «доза – эффект».

## 2.6. Молекулярный докинг

Единственный фермент млекопитающих ПАО, а именно мышьяная АРАО (PAOX\_MOUSE), доступен в базе данных Protein Data Bank (PDB) с его кристаллической структурой. Было выполнено выравнивание с помощью онлайн-сервиса Clustal Omega (Madeira et al. 2019) на сайте <https://www.uniprot.org> и обнаружили, что он имеет 62,5% сходства с АПАО человека и 79,8% с АПАО крысы; поэтому он считался подходящим модельным белком и использовался для исследования стыковки. Молекулярная модель 5LFO в комплексе с его субстратом N1-ацетилспермином (N1-ацетил-Spm) и коферментом ФАД [Sjögren T. et al. 2017] был загружен с PDB. Модель была импортирована в программу Molegro Virtual Docker (MVD) версии 6.0. Пространство поиска для стыковки было выбрано в виде сферы радиусом 12 Å, расположенной в геометрическом центре тяжести со-кристаллизованной подложки. Структуры всех исследованных соединений (лигандов) были построены с использованием программного обеспечения ChemBioOffice 2010 и предварительно оптимизированы полуэмпирическим методом PM3 с помощью программы HyperChem 7.

## 2.7. Методы статистической обработки данных

Статистическая обработка проводилась с использованием программы Excel 2010. Были рассчитаны средние ( $M$ ) и стандартные ошибки среднего ( $m$ ), данные представлены в виде  $M \pm m$ . Достоверность отличий оценивали с помощью  $t$ -критерия Стьюдента. Отличия считались достоверными при  $p \leq 0,05$ . Для

статистического анализа данных докинга использовалось программное обеспечение IBM SPSS Statistics 21.0.

### Глава 3.

## **ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ, ЦИКЛИЧЕСКИХ И АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА МЕТАБОЛИЗМ ПОЛИАМИНОВ В БЕСКЛЕТОЧНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЕ**

Между содержанием в клетках ПА и их митотической активностью существует взаимосвязь [Polyamines Methods and Protocols, 2018]. Повышенная активность пролиферации (эмбриональное развитие, регенерация), сопровождается увеличением концентрации ПА [Miller-Fleming L. et al., 2015]. Изменение концентрации ПА в клетках характерно и для ряда патологических состояний, включая опухолевый рост [Sánchez-Jiménez F. et al., 2019]. Влияние различных химических агентов на пролиферативную активность клеток может быть оценено по активности метаболизма ПА [Murray-Stewart T. R. et al., 2016]. В частности, имеет место выраженное уменьшение (практически до нуля) активности окислительного дезаминирования ПА при участии ДАО и ПАО на мышинных моделях гепатом Гельштейна 27, 22а, 46, 48, 60, 61 и в первичных гепатомах, возникновение которых инициировано диэтилнитрозамином. При этом продукция ПА повышается несущественно. Напротив, интенсивность биосинтеза ПА в бесклеточной среде, полученной из регенерирующей печени, выше скорости их расщепления под действием амиоксидаз [Сяткин С. П., Березов Т. Т., 1982]. Данное наблюдение позволяет допустить, что повышение концентрации ПА в тканях с нормальной и патологически усиленной пролиферацией клеток обусловлено разными механизмами. Таким образом, можно предположить, что химические агенты, которые поддерживают продукцию ПА и тормозят их окисление, могут обладать канцерогенным действием. С другой стороны, вещества, препятствующие биосинтезу ПА и усиливающие их разрушение, должны, по идее, проявлять антипролиферативные свойства. Соединения, которые стимулируют образование ПА и не влияют на их распад, вероятно, будут способствовать более активной пролиферации. Одним из перспективных направлений в разработке новых методов фармакотерапии злокачественных опухолей является применение химических

аналогов ПА. Некоторые из них способны подавлять активность атипичных клеток, нарушая обмен их собственных ПА [Murray-Stewart T. R. et al., 2016; Li M. et al., 2018].

Химические агенты, ингибирующие продукцию Пут и других ПА и способствующие их окислительному дезаминированию, можно рассматривать в качестве потенциальных антиканцерогенных соединений. Вещества, активирующие биосинтез ПА, могут стимулировать клеточную пролиферацию.

В настоящей главе представлены результаты оценки влияния тестируемых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на процессы синтеза и катаболизма (окислительного дезаминирования) ПА в бесклеточной тест-системе.

### **3.1. Результаты оценки влияния тестируемых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на активность ферментов катаболизма ПА на бесклеточной тест-системе [Сяткин С. П. и др., 2024]**

Продукты катаболизма ПА, которые образуются при их окислительном дезаминировании, обладают токсическими свойствами и способны выступать в качестве триггеров регулируемой (программированной) гибели малигнизированных клеток. Данные по влиянию исследуемых соединений на активность ферментов распада ПА в бесклеточной тест-системе представлены в таблице 3.

Согласно полученным данным, статистически значимого ингибирования ДАО не показало ни одно из исследованных соединений. Активность ПАО достоверно снижалась лишь под влиянием вещества А14.



Таблица 3.

Активность ферментов распада ПА в бесклеточной тест-системе в контроле и при воздействии тестируемых соединений ( $M \pm m$ ).

Индекс ве- щества	ДАО		ПАО		СМО	
	нкатал/мг белка	$\Delta, \%$	нкатал/мг белка	$\Delta, \%$	нкатал/мг белка	$\Delta, \%$
Конт- роль	0,023±0,001	0	0,007±0,0005	0	0,006±0,0005	0
A 1	0,027±0,001*	117,4	0,013±0,0004*	185,7	0,018±0,0004*	257,1
A 2	0,023±0,001	100,0	0,009±0,0004*	128,6	0,018±0,0004*	257,1
A 3	0,028±0,001*	121,7	0,015±0,0007*	214,3	0,02±0,0005*	285,7
A 4	0,018±0,0004	78,3	0,008±0,0011	114,3	0,015±0,0005*	214,3
A 5	0,022±0,001	95,7	0,009±0,0002*	128,6	0,012±0,001*	171,4
A 6	0,034±0,001*	147,8	0,019±0,0004*	237,5	0,0002±0,00001*	3,8
A 7	0,022±0,001	95,7	0,013±0,0007*	162,5	0,003±0,0001*	66,0
A 8	0,03±0,0002*	130,4	0,01±0,0004*	125,0	0,0005±0,0001*	9,0
A 9	0,035±0,001*	152,2	0,017±0,0005*	212,5	0,0002±0,00003*	3,3
A 10	0,029±0,001*	126,1	0,014±0,0012*	175,0	0,0003±0,0001*	5,2
A 11	0,025±0,0004*	108,7	0,014±0,0004*	175,0	0,0001±0,00001*	1,9
A 12	0,029±0,0001*	126,1	0,01±0,0014*	142,9	0,004±0,0012*	78,4
A 13	0,026±0,001*	113,0	0,011±0,0008*	157,1	0,0024±0,0003*	47,0
A 14	0,026±0,002	113,0	0,006±0,0003*	85,7	0,00014±0,0001*	2,8
A 15	0,026±0,002	113,0	0,008±0,0009	114,3	0,008±0,0001*	16,0
A 16	0,03±0,001*	130,4	0,025±0,0003*	357,1	0,027±0,0005*	549,9

*Примечание.* Результаты представлены для 10 параллельных измерений удельной активности ферментов в каждой из 5 проб.  $\Delta, \%$  – измерение удельной активности от контроля. \* – отличие достоверно при  $p \leq 0,05$ . % отличия от контроля:  $> 100\%$  – активация,  $< 100\%$  – ингибирование. ДАО – диаминоксидаза, ПАО – полиаминоксидаза, СМО – сперминоксидаза.

Что касается, СМО, то отмечается достоверное снижение её активности под действием агентов А6, А7, А8, А9, А10, А11, А12, А13, А14 и А15. Полученные данные позволяют предположить наличие канцерогенных свойств у тестируемых соединений. Во всех остальных случаях наблюдается преимущественно значимая активация ДАО, ПАО и СМО.

Каждому веществу был присвоен ранг в порядке убывания степени активации катаболизма того или иного ПА, а затем ранги, относящиеся к одному веществу, но к разным ПА, были просуммированы (таблица 4).

**Таблица 4.**

Ранжирование тестируемых соединений по влиянию на активность окислительного дезаминирования ПА.

Индекс вещества	Активность распада Пут, %	Ранг	Активность распада Спд, %	Ранг	Активность распада Спм, %	Ранг	Сумма рангов
А1	125	2	117	7	134	3	12
А2	117	3	104	14	134	4	21
А3	128	1	121	4	139	2	7
А4	105	12	102	15	124	5	32
А5	113	4	105	12	116	6	22
А6	109	8	135	2	76	14	24
А7	87	16	117	8	81	10	34
А8	103	13	106	11	81	9	33
А9	111	7	128	3	69	16	26
А10	100	14	120	6	78	11	31
А11	93	15	120	5	76	13	33
А12	111	6	107	10	95	7	23

A13	106	9	109	9	89	8	26
A14	106	11	97	16	77	12	39
A15	106	10	104	13	72	15	38
A16	113	5	147	1	184	1	7

Для тестируемых веществ можно выстроить ряды в порядке снижения активирующего действия на катаболизм ПА, наиболее активные: А3 = А16 >> А1 >>> А2 > А5. Эти результаты хорошо согласуются с полученными ранее данными в экспериментах с производными азафлуорена [Лисицкая К. В. и др., 2013; Syatkin S. P. et al., 2020].

### **3.2. Анализ влияния гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на активность ферментов синтеза ПА на бесклеточной тест-системе**

Результаты измерения активности ферментов синтеза ПА (ОДК – орнитиндекарбоксилазы, СДС – спермидинсинтазы, СМС – сперминсинтазы) представлены в таблице 5.

Согласно полученным данным, достоверное и выраженное ингибирование активности ОДК, СДС и СМС продемонстрировало соединение А16, в меньшей степени данный эффект проявило вещество А5 и в незначительной степени – вещество А2.

Выраженный активирующий эффект в отношении фермента СДС показало лишь соединение А10. В остальных случаях наблюдалась либо достоверная незначительная активация ферментов синтеза ПА, либо повышение активности было даже недостоверным.

Таблица 5.

Влияние тестируемых веществ на активность ферментов синтеза ПА из регенерирующей печени крыс.

Индекс вещества	ОДК		СДС		СМС	
	нкатал/мг белка	Δ, %	нкатал/мг белка	Δ, %	нкатал/мг белка	Δ, %
Конт роль	0,083 ± 0,001	0	0,054 ± 0,0005	0	0,027 ± 0,002	0
А 1	0,086 ± 0,0004*	3,6	0,056 ± 0,0005*	3,7	0,028 ± 0,0003	3,7
А 2	0,080 ± 0,0004*	-3,6	0,052 ± 0,0003*	-3,7	0,026 ± 0,0001	-3,7
А 3	0,082 ± 0,0008	-1,2	0,054 ± 0,009	0,0	0,027 ± 0,006	0,0
А 4	0,084 ± 0,0008	1,2	0,055 ± 0,0007	1,9	0,028 ± 0,0003	3,7
А 5	0,067 ± 0,0006*	-19,3	0,038 ± 0,0004*	-29,6	0,012 ± 0,0001*	-55,6
А 6	0,087 ± 0,0005*	4,8	0,058 ± 0,0003*	7,4	0,029 ± 0,0003	7,4
А 7	0,088 ± 0,0012*	6,0	0,058 ± 0,0011*	7,4	0,029 ± 0,007	7,4
А 8	0,086 ± 0,0011*	3,6	0,057 ± 0,008	5,6	0,029 ± 0,001	7,4
А 9	0,085 ± 0,0010	2,4	0,056 ± 0,009	3,7	0,028 ± 0,008	3,7
А 10	0,084 ± 0,0013	1,2	0,088 ± 0,0011*	63,0	0,027 ± 0,007	0,0
А 11	0,087 ± 0,0016*	4,8	0,057 ± 0,0015	5,6	0,029 ± 0,0011	7,4
А 12	0,083 ± 0,001	0,0	0,055 ± 0,001	1,9	0,027 ± 0,001	0,0
А 13	0,085 ± 0,001	2,4	0,056 ± 0,001	3,7	0,028 ± 0,001	3,7
А 14	0,084 ± 0,001	1,2	0,055 ± 0,001	1,9	0,028 ± 0,0005	3,7
А 15	0,084 ± 0,0006	1,2	0,056 ± 0,0006*	3,7	0,028 ± 0,0003	3,7
А 16	0,012 ± 0,0002*	-85,5	0,008 ± 0,0002*	-85,2	0,004 ± 0,0002*	-85,2

*Примечание.* Результаты представлены для 10 параллельных измерений удельной активности ферментов. \* – отличие достоверно при  $p \leq 0,05$ . % отличия от контроля: > 100% – активация, < 100% – ингибирование. ОДК – орнитиндекарбоксилаза, СдС – спермидинсинтаза, Смс – сперминсинтаза.

По аналогии с данными, отражающими ранги тестируемых веществ в зависимости от степени активации катаболизма ПА, ранжирование было проведено для данных соединений по их влиянию на активность ферментов синтеза ПА (таблица 6).

Как следует из представленных данных, минимальная величина ранга была присвоена веществу с наибольшей ингибирующей активностью в отношении синтеза ПА. В данном случае вещества, наиболее активные по способности ингибировать синтеза ПА, выстроились в следующей последовательности: A16 > A5 > A2 > A3.

**Таблица 6.**

Ранжирование тестируемых соединений по влиянию на активность синтеза ПА.

Индекс вещества	Активность ОДК, %	Ранг	Активность СПС, %	Ранг	Активность СМС, %	Ранг	Сумма рангов
A1	3,6	12	3,7	8	3,7	7	27
A2	-3,6	3	-3,7	3	-3,7	3	9
A3	-1,2	4	0	4	0	4	12
A4	1,2	6	1,9	5	3,7	8	19
A5	-19,3	2	-29,6	2	-55,6	2	6
A6	4,8	14	7,4	14	7,4	13	41
A7	6	16	7,4	15	7,4	14	45
A8	3,6	13	5,6	12	7,4	15	40
A9	2,4	10	3,7	9	3,7	9	28
A10	1,2	7	63	16	0	5	28
A11	4,8	15	5,6	13	7,4	16	44
A12	0	5	1,9	6	0	6	17
A13	2,4	11	3,7	10	3,7	10	31

A14	1,2	8	1,9	7	3,7	11	26
A15	1,2	9	3,7	11	3,7	12	32
A16	-85,5	1	-85,2	1	-85,2	1	3

Таким образом, тестируемые соединения в целом оказывали незначительное влияние на активность ферментов синтеза ПА в бесклеточной тест-системе, за исключением вещества А16 и в меньшей степени А5 и А2, которые ингибировали активность ферментов синтеза ПА.

### **3.3. Исследование концентрации ПА на фоне действия тестируемых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на бесклеточной тест-системе**

В таблице 7 представлены результаты измерения содержания ПА в бесклеточной тест-системе, полученной из печени крыс, при инкубировании с соответствующими субстратами (Пут, Спд и Спм) и тестируемыми соединениями.

Согласно полученным данным, под влиянием соединения А16 произошло достоверное и выраженное уменьшение по сравнению с контролем концентрации всех исследованных ПА: Пут, Спд и Спм. Под действием соединений А10 и А11 наблюдалось также снижение содержания Пут, но не других ПА. В присутствии вещества А5 имело место уменьшение Спм относительно контрольного уровня.

Также необходимо отметить, что концентрация Спм достоверно увеличивалась при инкубации тест-системы с большинством тестируемых соединений, однако, эти изменения были несущественными.

Таблица 7.

Концентрации ПА в бесклеточной тест-системе при инкубации с исследуемыми соединениями.

<b>Индекс вещества</b>	<b>Пут</b> нмоль/мл	<b>Спд</b> нмоль/мл	<b>Спм</b> нмоль/мл	<b>Спд/Спм</b>
Контроль	104.4 ± 6.2	98.796 ± 6.2	97.2 ± 1.2	1.0
А 1	108 ± 1.1	97.2 ± 105	104.4 ± 1.7*	0.9
А 2	108 ± 2.7	93.6 ± 3.0	93.6 ± 1.6	1.0
А 3	104.4 ± 3.0	97.2 ± 4.9	97.2 ± 5.2	1.0
А 4	122.4 ± 3.6*	97.2 ± 2.4	100.8 ± 2.7	1.0
А 5	104.4 ± 2.6	93.6 ± 2.7	43.2 ± 1.5*	2.2
А 6	104.4 ± 4.7	104.4 ± 4.0	104.4 ± 1.9*	1.0
А 7	109 ± 2.6	108 ± 3.4	104.4 ± 1.5*	1.0
А 8	103.4 ± 3.2	93.6 ± 1.3	111.6 ± 1.0*	0.8
А 9	115 ± 3.4	90 ± 2.6	100.8 ± 2.1*	0.9
А 10	57.6 ± 3.2*	151.2 ± 2.2*	93.6 ± 3.2	1.6
А 11	90 ± 2.0*	118.8 ± 3.4*	104.4 ± 1.1*	1.1
А 12	100 ± 3.2	108 ± 4.0	90 ± 1.7*	1.2
А 13	104.4 ± 3.0	93.6 ± 3.4	108 ± 1.3*	0.9
А 14	108 ± 1.4	93.6 ± 3.0	100.8 ± 1.7*	0.9
А 15	100.8 ± 2.8	100.8 ± 3.0	100.8 ± 0.7*	1.0

A 16	15.3 ± 2.4*	14.4 ± 5.6*	14.4 ± 4.5*	1.1
------	-------------	-------------	-------------	-----

*Примечание.* Результаты представлены для 5 параллельных измерений. \* – отличие достоверно при  $p < 0,05$ . Пут – путресцин, Спд – спермидин, Спм – спермин.

Суммируя данные таблиц 3 – 7, можно сделать вывод о том, что наиболее перспективными агентами с точки зрения влияния на обмен ПА являются вещества А16, А2 и А5.

Количественная оценка особенностей действия каждого из тестируемых соединений на основные показатели обмена ПА в указанных условиях позволит сделать заключение о канцерогенных, канцеростатических или пролиферативных свойствах этих веществ.

\* \* \*

Резюмируя изложенные в настоящей главе данные, следует подчеркнуть, что тестируемые органические соединения преимущественно стимулируют распад ПА в бесклеточной тест-системе на основе ткани регенерирующей печени, тем самым демонстрируя потенциальную противоопухолевую активность. Наиболее активными в отношении активации аминоксидаз оказались соединения: А3 = А16 >> А1 >>> А2 > А5. Соединения А16 и А5 также ингибировали активность ферментов синтеза ПА.



#### Глава 4.

### **ВЛИЯНИЕ ТЕСТИРУЕМЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ, ЦИКЛИЧЕСКИХ И АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ НА СКОРОСТЬ ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИЙ A549, SkBr3 И HELA**

При разработке химических агентов, влияющих на пролиферацию клеток, необходимо учитывать особенности метаболизма атипичных клеток. Обмен ПА, играющих ключевую роль в регуляции клеточного роста и созревания, а также механизмов программированной гибели клеток, может рассматриваться как одна из главных мишеней для вновь создаваемых соединений оригинального синтеза, имеющих структурные сходства с натуральными ПА.

Представленные в предыдущей главе результаты оценки эффектов исследуемых веществ на обмен ПА показали, что отдельные соединения ингибируют ферменты синтеза ПА, однако, более значимой оказалась активация аминоксидаз, что свидетельствует об усилении катаболизма ПА. Обнаруженные эффекты в ткани с высокой пролиферативной активностью позволяют говорить о потенциальном противоопухолевом действии соединений A3, A16, A1, A2 и A5, поскольку ПА являются важнейшими регуляторами клеточного роста и дифференцировки [Damiani E. et al., 2018].

В данной главе анализируется влияние тех же самых веществ (A1 ... A16) на скорость пролиферации клеток трёх различных опухолевых линий: аденокарциномы лёгкого (линия A549), рака молочной железы (линия SkBr) и рака шейки матки (линия HeLa).

#### 4.1. Результаты исследования антипролиферативного эффекта тестируемых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на клетки карциномы лёгкого линии А549

В таблице 8 и на рисунке 2 представлены данные оценки влияния тестируемых соединений на скорость пролиферации клеток рака лёгкого линии А549.

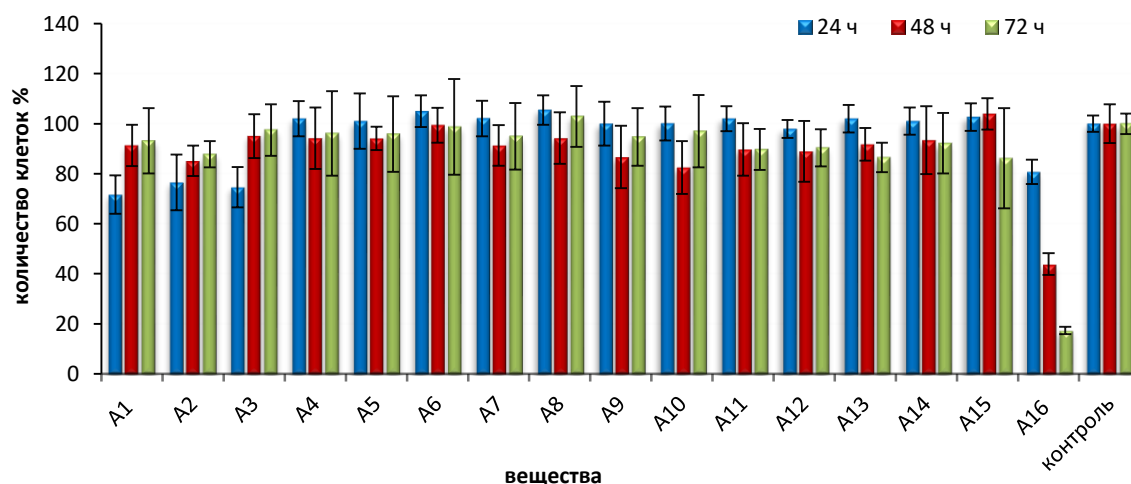
**Таблица 8.**

Влияние тестируемых веществ на скорость пролиферации опухолевых клеток карциномы лёгкого линии А549 при культивировании.

Индекс вещества	% ( $\pm$ ) 24 ч	% ( $\pm$ ) 48 ч	% ( $\pm$ ) 72 ч
Контроль	0	0	0
А 1	-28	-9	-7
А 2	-23	-15	-12
А 3	-25	-5	-3
А 4	+2	-6	-4
А 5	+1	-6	-4
А 6	+5	-1	-1
А 7	+2	-9	-5
А 8	+6	-6	+3
А 9	0	-13	-5
А 10	0	-18	-3
А 11	+2	-10	-10
А 12	-2	-11	-10
А 13	+2	-8	-14
А 14	+1	-7	-8

A 15	+3	+4	-14
A 16	-20	-56	-83

Примечание. % отличия от контроля: + активация, – ингибирование.



**Рисунок 2.** Влияние тестируемых веществ на интенсивность деления клеток карциномы лёгкого линии А549 в зависимости от времени инкубации.

Результаты оценки влияния исследуемых соединений на пролиферацию опухолевых клеток линии А549 показывают, что в основном они оказывают ингибирующее действие. Активация наблюдалась на сроке 24 час при инкубации с веществами А4, А5, А6, А7, А8, А11, А13, А14 и А15. Однако отличие от контроля было весьма незначительным: от 1 до 6%.

На сроке 48 час все вещества (кроме А15) проявили ингибирующее действие в отношении пролиферативной активности клеток. При этом наиболее выраженный эффект (снижение скорости пролиферации 10% и более) характерен для соединений А2, А10, А11, А12 и А16.

Через 72 часа от начала инкубации также в основном все вещества показали ингибирующий эффект (за исключением А8). Наиболее активными соединениями оказались А2, А11, А12, А13, А15 и А16.

В целом можно отметить, что значимое снижение данного показателя на всех трёх сроках исследования наблюдается под действием соединений А2 и А16. Наиболее выраженный эффект характерен для А16.

#### **4.2. Влияние тестируемых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на пролиферативную активность клеток рака молочной железы линии SkBr3**

Результаты оценки эффекта исследуемых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на интенсивность пролиферации клеток рака молочной железы линии SkBr3 приведены в таблице 9 и на рисунке 3.

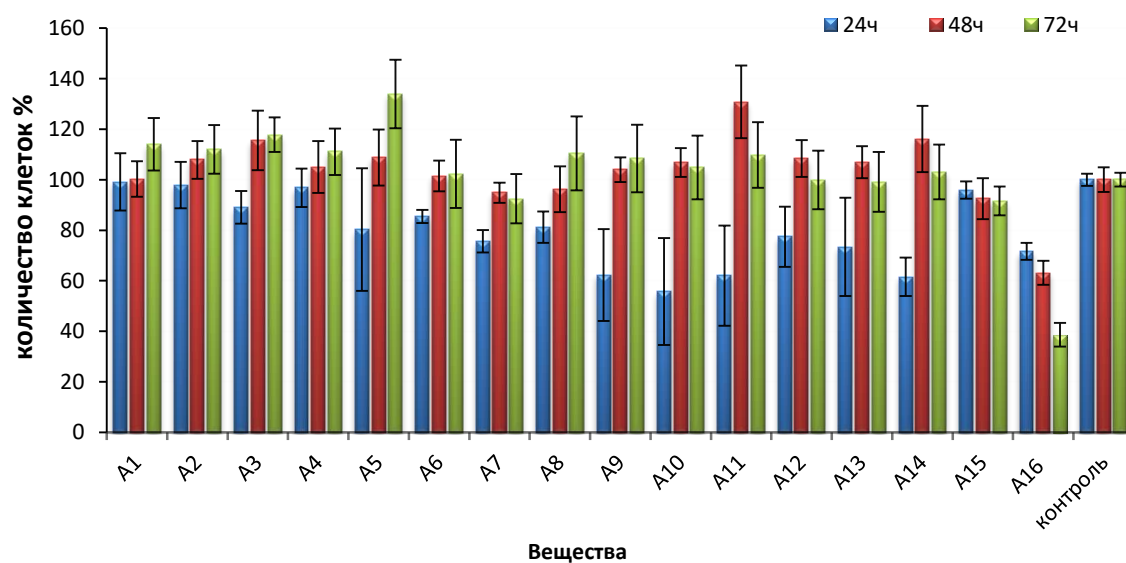
**Таблица 9.**

Влияние тестируемых веществ на скорость пролиферации клеток рака молочной железы линии SkBr3 при культивировании.

Индекс вещества	% ( $\pm$ ) 24 ч	% ( $\pm$ ) 48 ч	% ( $\pm$ ) 72 ч
Контроль	0	0	0
А 1	-1	0	14
А 2	-2	+8	12
А 3	-11	+16	+18
А 4	-3	+5	+11
А 5	-20	+9	+34
А 6	-15	+1	+2
А 7	-24	-5	-8
А8	-19	-4	10

A 9	-38	+4	+8
A 10	-44	+7	+5
A 11	-38	+31	+10
A 12	-23	+8	0
A 13	-27	+7	-1
A 14	-38	+16	+3
A 15	-4	-8	-8
A 16	-28	-37	-61

*Примечание.* % отличия от контроля: + активация, – ингибирование.



**Рисунок 3.** Влияние тестируемых веществ на рост клеток рака молочной железы линии SkBr3 в зависимости от времени инкубации.

Под действием всех исследованных соединений на сроке 24 часа от начала инкубации происходит заметное замедление деления опухолевых клеток линии

SkBr3. Однако через 48 и 72 часа антипролиферативное действие продемонстрировали только вещества А7, А15 и А16. При этом опять же наиболее значимый эффект показало соединение А16.

Следует также отметить, что некоторые из исследованных соединений на отдельных сроках продемонстрировали значимый активирующий эффект в отношении пролиферации клеток. Так, в присутствии соединения А3 через 48 час активность пролиферации увеличилась на 16%, а через 72 час – на 18%. Аналогичные данные на тех же сроках получены для веществ А5, А11 и А14. При этом данные соединения на сроке 24 часа показали выраженный ингибирующий эффект: снижение скорости пролиферации на 20, 38 и 38%, соответственно.

#### **4.3. Исследование антипролиферативного эффекта тестируемых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на пролиферативную активность клеток рака шейки матки линии HeLa**

Результаты оценки влияния тестируемых соединений на скорость пролиферации опухолевых клеток рака шейки матки линии HeLa представлены в таблице 10 и на рисунке 4.

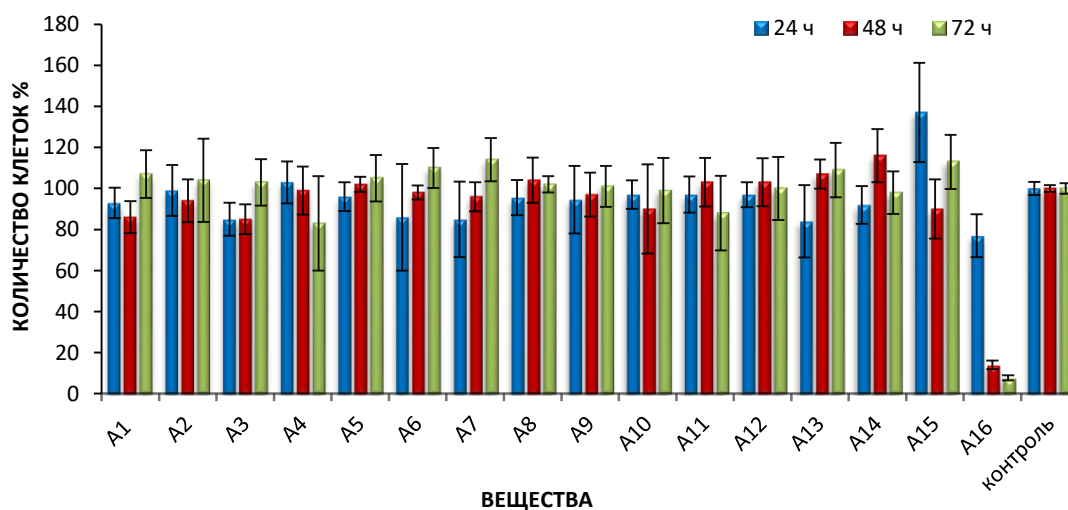
**Таблица 10.**

Влияние тестируемых веществ на скорость пролиферации опухолевых клеток рака шейки матки линии HeLa при культивировании.

Индекс вещества	% ( $\pm$ ) 24 ч	% ( $\pm$ ) 48 ч	% ( $\pm$ ) 72 ч
Контроль	0	0	0
А 1	-7	-14	+7
А 2	-1	-6	+4
А 3	-15	-15	+3
А 4	3	-1	-17
А 5	-4	+2	+5

A 6	-14	-2	+10
A 7	-15	-4	+14
A8	-5	+4	+2
A 9	-6	-3	+1
A 10	-3	-10	-1
A 11	-3	+3	-12
A 12	-3	+3	0
A 13	-16	+7	+9
A 14	-8	+16	-2
A 15	+37	-10	+13
A 16	-23	-86	-92

*Примечание.* % отличия от контроля: + активация, – ингибирование.



**Рисунок 4.** Влияние тестируемых веществ на рост клеток рака шейки матки линии HeLa в зависимости от времени инкубации.

В отношении клеток опухолевой линии HeLa на 1-е сутки исследования определённый ингибирующий эффект показали все тестируемые соединения, за исключением A4 и A15.

В последующие сроки некоторые вещества также продемонстрировали аналогичный эффект. Так, через 48 час инкубации характерно выраженное ингибирование пролиферации клеток под действием соединений A1, A3, A10, A15 и A16. На сроке 72 час торможение деления клеток отмечено при инкубации с веществами A4, A11 и A16.

Наиболее выраженное торможение клеточной пролиферации на всех трёх сроках исследования наблюдалось лишь под действием соединения A16.

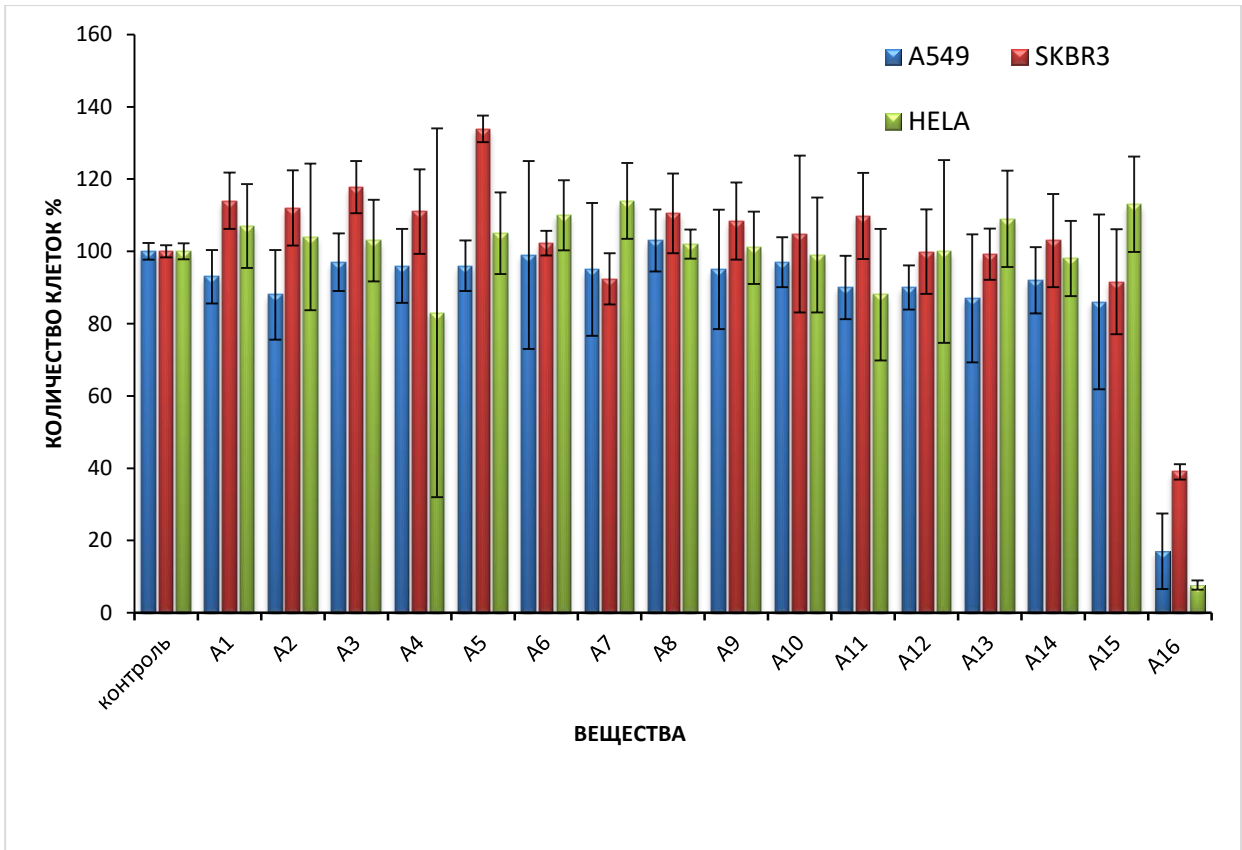
Как и в экспериментах с культурой клеток линии SkBr, на отдельных сроках наблюдалась активация пролиферации.

#### **4.4. Сравнительная характеристика антипролиферативного эффекта исследованных гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на культурах опухолевых клеток линий A549, SkBr и HeLa**

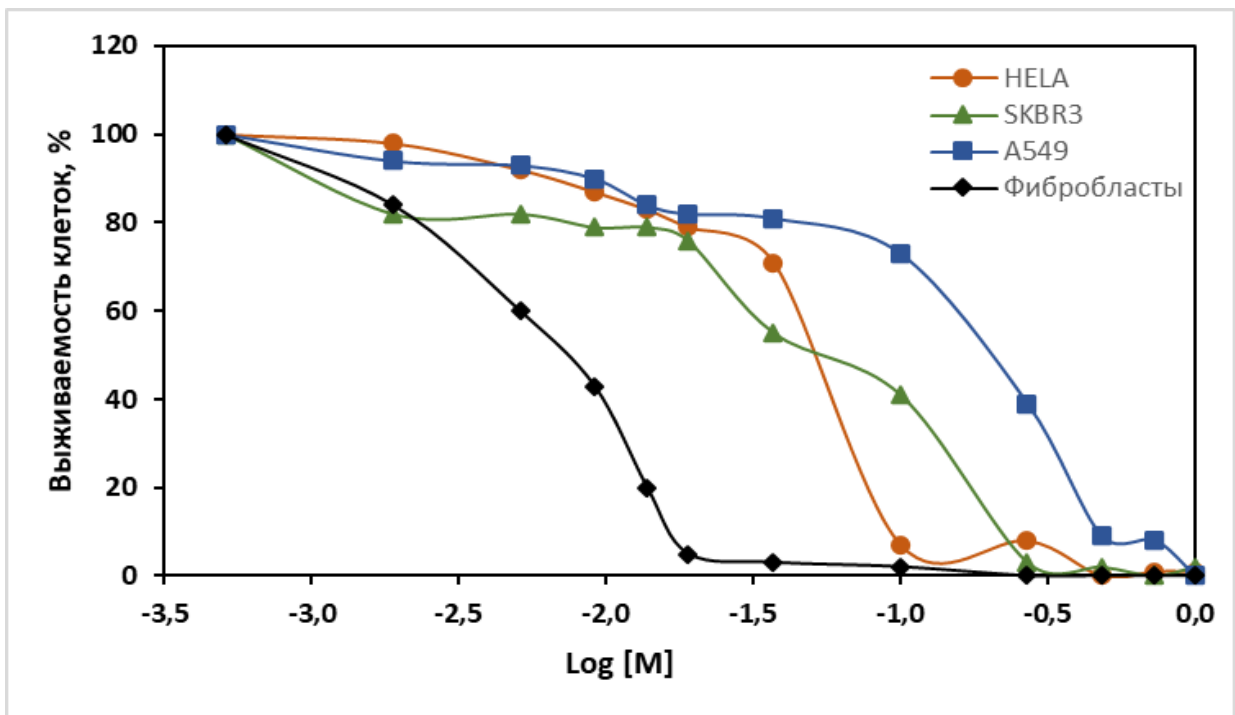
На рисунке 5 представлены результаты оценки влияния тестируемых соединений на скорость пролиферации опухолевых клеток трёх исследуемых линий – A549, SkBr-3 и HeLa при 72-часовом культивировании.

Согласно приведённым результатам, наиболее активным соединением, проявляющим способность ингибировать пролиферацию опухолевых клеток, оказалось A16 (рисунок 6). В этой связи для данного вещества были определены значения IC50 (концентрация полумаксимального ингибирования) во всех исследуемых линиях опухолевых клеток после 72 часов инкубации (таблица 11).





**Рисунок 5.** Влияние тестируемых веществ на рост опухолевых клеток линий A549, SkBr3 и HeLa при 72-часовом культивировании.



**Рисунок 6.** Действие вещества A16 на пролиферацию опухолевых клеток линий A549, SkBr3 и HeLa.

**Таблица 11.**

IC50 (концентрация полумаксимального ингибирования) в опухолевых линиях A549, SkBr и HeLa для вещества A16 после 72 часов инкубации.

Клеточная линия	IC50
A549	$0.381 \pm 0.078 * 10^{-6} \text{M}$
SkBr	$0.176 \pm 0.021 * 10^{-6} \text{M}$
HeLa	$0.126 \pm 0.011 * 10^{-6} \text{M}$

Как следует из данных таблицы 11, индекс IC50 для соединения A16 после 72 часов инкубации был значительным при исследовании во всех трёх опухолевых линиях.

\* \* \*

Результаты исследований, представленные в данной главе, свидетельствуют о том, что значимый ингибирующим эффектом в отношении скорости пролиферации опухолевых клеток линии A549 на всех сроках исследования обладают вещества A2 и A16. Соединение A16 продемонстрировало антипролиферативное действие на опухолевых линиях SkBr-3 и HeLa также на всех сроках инкубации. Наиболее активным соединением оказалось вещество A16, для которого IC50 на сроке 72 час при инкубации с опухолевыми клетками линий A549, SkBr3 и HeLa было значительным. В целом можно отметить, что такие вещества как A2 и A16 показали способность как к стимуляции катаболизма ПА (на модели усиленной пролиферации), так и к ингибированию пролиферации злокачественных клеток (на отдельных опухолевых линиях). Это позволяет рассматривать их потенциальные противоопухолевые свойства, которые, вероятно, могут быть обусловлены их способностью изменять направленность обмена ПА.

## Глава 5.

# ОЦЕНКА ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ ИССЛЕДУЕМЫХ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ, ЦИКЛИЧЕСКИХ И АЗОТСОДЕРЖАЩИХ СОЕДИНЕНИЙ МЕТОДАМИ КОМПЬЮТЕРНОГО МОДЕЛИРОВАНИЯ

### 5.1. Количественные корреляции «структура-активность» (ККСА)

В настоящее время создание новых химиотерапевтических агентов с заранее заданными свойствам может осуществляться гораздо более эффективно благодаря применению компьютерных методов, в частности, ККСА-анализа [Khlebnikov A. I. et al., 2008].

Выбор соединений-кандидатов с использованием компьютерной программы «Chemic Descript» [Попов П. И., 2003] необходимо осуществлять на основе корректного определения дескриптора, который несёт информацию о значимых параметрах для соответствующего типа веществ и их активности (геометрии, топологии, распределение заряда и т.д.).

Применение дескрипторов химических соединений в ККСА-анализе дает возможность существенно сузить круг потенциальных кандидатов. Дескриптор (от англ. descriptor) – «описатель», «описательный элемент». В качестве дескриптора может выступать любое число, которое можно определить исходя из структурной формулы соответствующего вещества: молекулярный вес, количество атомов, связей, групп, частичные заряды на атомах и т.д. Топологический индекс же – некоторое (обычно числовое) значение (или набор значений), стерически характеризующее структуру молекулы. С помощью дескрипторов можно выполнить математическое описание структуры соединения. Следовательно, применяя топологические индексы, можно проводить прицельный поиск новых фармацевтических агентов с заранее заданными характеристиками.

Для этих целей подходит комплекс программ, которые позволяют подбирать соединения-кандидаты, обладающие некоей предполагаемой активностью, а также определять информацию для расчета и оценивать биологическую активность.

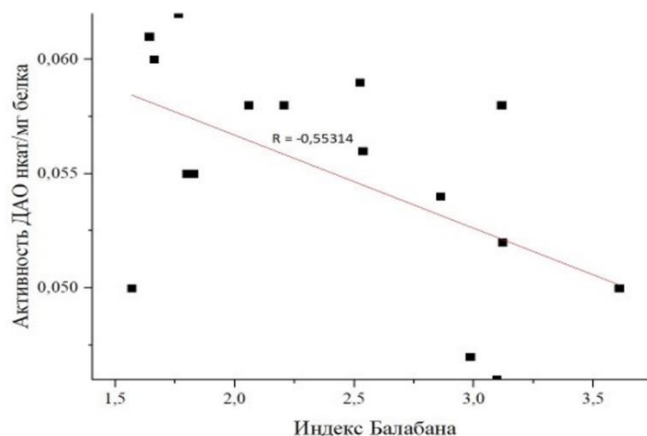
Программный комплекс включает в себя три отдельные программы («ChemicPen», «ChemicDescript», «ChemicBase»), которые взаимодействуют друг с другом посредством обмена данными в файлах.

В последнее время наблюдается тенденция к поиску методов прогнозирования свойств химических соединений, точность прогноза которых была бы выше по сравнению с уже существующими. Одним из направлений в этой области является математическое моделирование молекул с использованием различных молекулярных дескрипторов, описывающих строение соединений. К наиболее употребляемым можно отнести индексы Детуар (обхода), Руврэ, электропии, Балабана и Винера. Последние два считаются интегральными.

Для активности ДАО, ПАО и СМО были рассчитаны корреляционные зависимости с топологическими индексами. На рисунке 7 в качестве примера представлен график, отражающий корреляционную зависимость активности ДАО и индекса Балабана.

«Индекс  $W$  в основном отражает размеры и сложность молекулы – наличие функциональных групп, количество связей и атомов, в то время как индекс Балабана учитывает число циклов и сопряжений [Hu, Q. N. et al., 2003]. Индексы  $W$ ,  $R$  и  $J$  основаны на матрице расстояний, индекс  $I_p$  – на матрице обхода. Индексы  $W$  и  $R$  также являются вершинно- и реберно-вершинными графами, так как они учитывают тип атомов (вершин графа) и химических связей (ребер графа)» [Шевкун Н. А., 2013].

«В индексе электропии указывается разнообразие атомов в структуре молекулы» [Шевкун Н. А., 2013].



**Рисунок 7.** График количественных корреляций активности ДАО с индексом Балабана.

Результаты расчёта корреляционных зависимостей для ферментов катаболизма ПА оказались следующими.

*Для ДАО:*

Индекс электропии практически не зависит,  $R \sim 0,11$ . Это очень мало.

Индекс Винера и обхода мало зависят,  $R 0,3 - 0,4$ .

Индекс Балабана имеет наиболее яркую зависимость,  $R \sim 0,55$ .

*Для ПАО (в целом гораздо сильнее коррелирует с дескрипторами):*

Индекс Балабана  $-0,44$ .

Индекс обхода наиболее сильно коррелирует. Он равен  $0,78$ .

Индекс электропии равен  $0,4$ .

Индекс Винера равен  $0,55$ .

*Для СМО (на уровне ДАО):*

Индекс Балабана менее всех коррелирует и составляет  $0,2$ .

Наиболее сильно зависит Индекс электропии. Он равен 0,55.

Индексы обхода и Винера малозависимы. Они равны 0,36.

Зависимость для индекса Балабана и активности ДАО оказалась равной -0,55, для ПАО и индекса обхода 0,78, для СМО и индекса электропии 0,53. Остальные зависимости проявили незначительную силу корреляции. Количественные корреляции топологических индексов с активностью аминоксидаз для тестируемых соединений показали значимость индекса Балабана. Таким образом, для дальнейшего анализа целесообразно использовать индекс Балабана, а также индекс обхода для ПАО.

## 5.2. Молекулярный докинг [Neborak E. V. et al., 2021]

Результаты статистической обработки данных, полученных при проведении докинга, представлены в таблице 12. Статистически значимыми были различия в связывании с АМК Val206. Для различения активаторов от соединений с амбивалентным действием  $p < 0,05$ .

**Таблица 12.**

Статистический анализ взаимодействия веществ с АМК активного центра 5LFO.

АМК	I	Am	A	p I-Am	p I-A	p Am-A
Кофактор	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	0,615
Leu58	-3,83 (-3,83... -3,83)	-3,36 (-12,41... -0,36)	-0,75 (-3,23...0)	1,000	0,500	0,326
Gly59	0 (0...0)	0 (-0,1...0)	0 (-0,34...0)	0,842	0,750	0,976
Ala60	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,836
His61	0 (0...0)	0 (-1,09...0)	0 (-0,53...0)	0,737	0,750	0,790
Trp62	0 (0...0)	-1,41	-7,1	0,421	0,500	0,357

		(-6,19...0)	(-9,27...0)			
His64	-13,42 (-13,42... -13,42)	-14,25 (-19,77... -8,7)	-15,17 (-24,22... -9,16)	1,000	0,750	0,701
Gly65	0 (0...0)	0 (-0,37...0)	0 (0...0)	0,737	1,000	0,701
Asn70	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
Tyr127	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,790
Ile130	0 (0...0)	0 (-1,05...0)	0 (-0,83...0)	0,632	0,750	0,615
Glu131	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,701
Thr133	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
Arg134	0 (0...0)	0 (-3,25...0)	-2,52 (-7,56...0)	0,632	0,500	0,158
Ile183	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,842	1,000	1,000
Glu184	0 (0...0)	0 (-2,76...0)	-3,12 (-4,04...0)	0,632	0,500	0,220
Cys186	-0,48 (-0,48... -0,48)	-1,62 (-3,1...0)	-2,02 (-5,34...0)	0,632	0,750	0,458
Val187	-10,99 (-10,99... -10,99)	-10,43 (-15,51...-7)	-7,09 (-13,78...0)	1,000	1,000	0,389
Ser188	-0,39 (-0,39... -0,39)	-0,19 (-4,74...0)	-0,74 (-3,08...0)	0,842	0,750	0,423
Gly189	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,836
Met193	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	0,615
Val196	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
Phe201	0 (0...0)	0 (-5,02...0)	-4,85	0,632	0,500	0,495

			(-8,51...0)			
Gly202	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
Tyr204	-2,49 (-2,49... -2,49)	-4,81 (-11,99... -2,24)	-6,53 (-14,5...0)	0,526	0,750	0,745
Thr205	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,745
<b>Val206*</b>	<b>0 (0...0)</b>	<b>-0,98 (-3,27...0)</b>	<b>0 (-0,52...0)</b>	<b>0,316</b>	<b>0,750</b>	<b>0,025</b>
Leu207	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,842	1,000	1,000
Pro208	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
Gly209	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,745
Leu210	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
Asp211	0 (0...0)	-5 (-6,71...0)	-3,2 (-6,46...0)	0,316	0,500	0,574
Asn313	0 (0...0)	0 (-2,24...0)	0 (0...0)	0,632	1,000	0,458
Asn314	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	0,615
Lys315	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,883
Phe331	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,836
Ile358	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,883
Cys373	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,929
Phe375	0 (0...0)	0 (-0,87...0)	0 (0...0)	0,737	1,000	0,745
Ile376	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	0,615
Ala377	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	0,615
Tyr430	-2,79 (-2,79... -2,79)	-2,39 (-6,53...0)	-0,89 (-2,92...0)	0,842	0,750	0,574

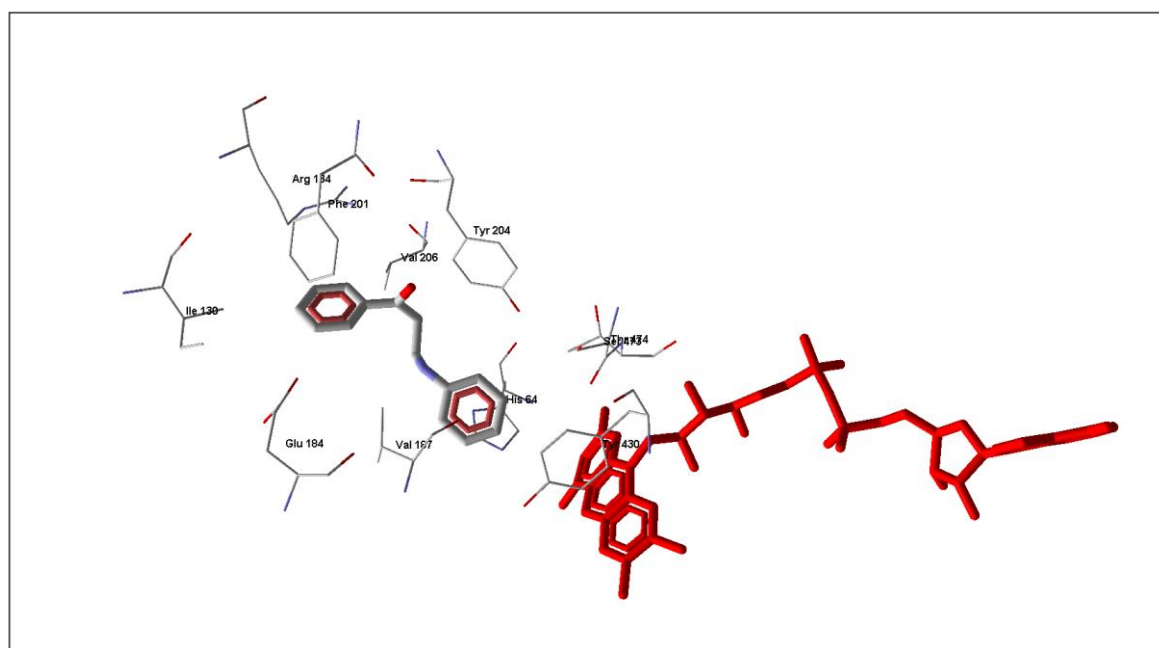


Ser431	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,701
Tyr432	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,836
Val433	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
Thr470	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
Phe471	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
Tyr472	-0,55 (-0,55... -0,55)	0 (-0,53...0)	0 (-2,67...0)	0,526	1,000	0,534
Ser473	-4,21 (-4,21... -4,21)	0 (-2,77...0)	-1,41 (-3,78...0)	0,526	0,500	0,615
Thr474	-3,11 (-3,11... -3,11)	0 (-1,1...0)	-0,43 (-1,2...0)	0,105	0,250	0,574
His476	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	0,615
HydrCofactor	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,836
HydrGly59	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,836
HydrHis61	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,701
HydrHis64	-2,46 (-2,46... -2,46)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,211	0,500	0,790
HydrCys186	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
HydrVal187	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
HydrTyr204	-1,37 (-1,37... -1,37)	0 (0...0)	0 (-1,44...0)	0,105	0,750	0,297
HydrTyr204-2	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
HydrLeu207	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000

HydrLeu207-2	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
HydrAsp211	0 (0...0)	0 (-0,13...0)	0 (0...0)	0,842	1,000	0,423
HydrArg134	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,842	1,000	0,976
HydrGlu184	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,701
HydrAsn313	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
HydrLys315	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,701
HydrTyr430	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,701
HydrTyr430-2	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	1,000
HydrTyr472	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	1,000	1,000	0,615
HydrSer473	0 (0...0)	0 (0...0)	0 (0...0)	0,947	1,000	0,836

Примечание. \* –  $p \leq 0,05$ ; I – вещество-ингибитор, A – вещество-активатор, Am – вещество с амбивалентным действием.

Данная аминокислота (Val206) находится в непосредственной близости от Tyr204, как видно на рисунке 8, представленном в качестве примера.



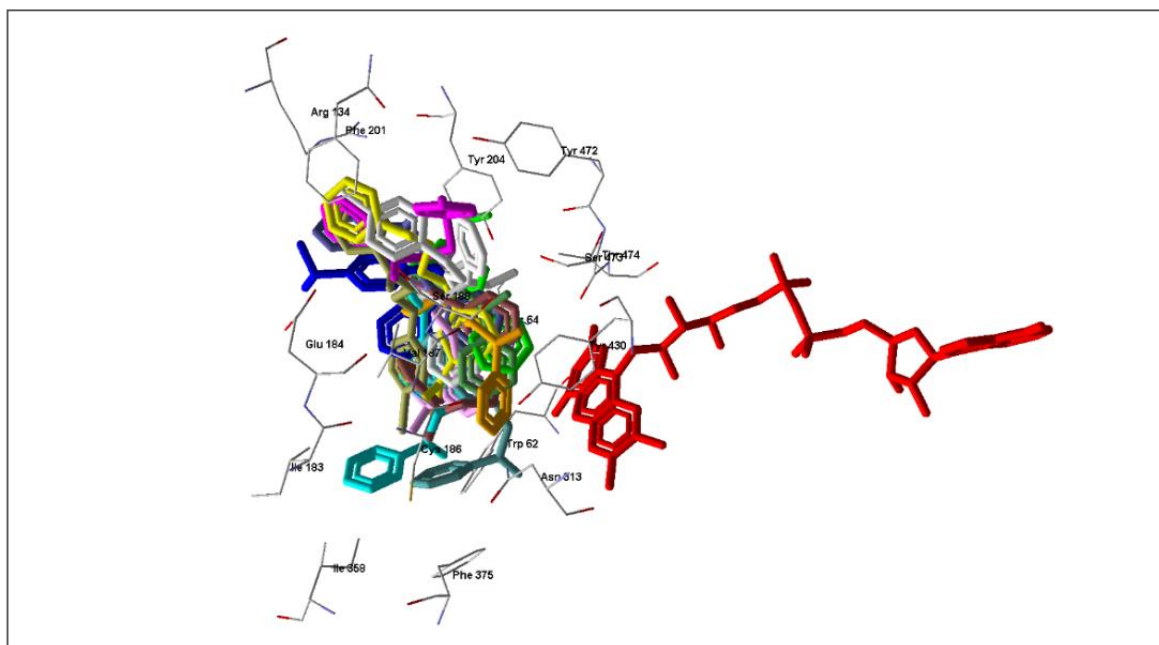
**Рисунок 8.** Положение вещества A15 в активном центре 5LFO.

Предшествующие исследования показали значимость силы взаимодействия с Tyr204 для разделения веществ на активаторы и ингибиторы [Syatkin S. P. et al., 2020]. Поскольку в тестируемой группе оказались в основном вещества с амбивалентным действием, возможно, такую амбивалентность обеспечивает их взаимодействие с АМК, соседствующей с Tyr204.

Как видно из таблицы 3 (глава 3, п. 3.1.), амбивалентность проявляется в том, что все вещества группы А (исключение – А14) активируют окисление Спд, а вещества А6 – А15 активируют окисление Спд, но ингибируют окисление Спм, т.е. тормозится распад полиамина с более длинной цепью, с большим количеством положительно заряженных аминогрупп ( $pH = 9,5$ ,  $q = 4+$ ). Как следует из результатов докинга взаимодействие амбивалентных агентов с Val206 выражено сильнее, значит это сильное гидрофобное взаимодействие играет решающую роль для торможения окисления Спм, но не приводит к торможению окисления Спд, напротив, в отношении Спд сохраняется активация его окисления, как и для веществ, не столь активно взаимодействующих с Val206. Как следует из данных таблицы 3 (глава 3, п. 3.1.), вещества-истинные активаторы гораздо более активны в отношении окисления Спм, чем Спд. Экранирование этой гидрофобной АМК, таким образом, приводит к более активному окислению более заряженного Спм ( $4+$ ) по сравнению со Спд ( $3+$ ), тогда как отсутствие взаимодействия с этой АМК приводит к торможению окисления Спм.

С точки зрения влияния на обмен ПА вещества могут быть классифицированы на 2 группы – активаторы и ингибиторы по их влиянию на окисление Пут, и на 3 группы – активаторы, ингибиторы и вещества с амбивалентным действием – по их влиянию на окисление высших ПА. Такое деление обусловлено тем, что Пут окисляется ДАО, тогда как на ацетилированные ПА действует другой фермент – АПАО.

На рисунке 9 представлены совмещенные конформации веществ группы А в активном центре 5LFO.



**Рисунок 9.** Совмещенные конформации тестируемых веществ в активном центре 5LFO.

В нашем эксперименте использовались свободные ПА, поэтому можно предположить изменение субстратной специфичности при воздействии исследуемых соединений. Результаты классификации представлены в таблице 13.

**Таблица 13.**

Классификация веществ по характеру их действия на окисление ПА.

Код	Изменение активность по сравнению с контролем, %				
	Субстрат Пут	Категория	Субстрат Спд	Субстрат Спм	Категория
A1	124,6	Активатор	116,8	134,2	Активатор
A2	116,9	Активатор	103,5	133,6	Активатор
A3	128,2	Активатор	120,8	139,5	Активатор
A4	105,1	Активатор	102,0	124,4	Активатор
A5	113,5	Активатор	104,8	115,6	Активатор

A6	109,0	Активатор	134,7	75,8	Амбивалент
A7	87,5	Ингибитор	116,5	81,2	Амбивалент
A8	102,8	Активатор	106,4	81,5	Амбивалент
A9	111,0	Активатор	127,9	68,9	Амбивалент
A10	99,8	Активатор	120,0	78,3	Амбивалент
A11	93,2	Ингибитор	120,2	76,4	Амбивалент
A12	111,4	Активатор	107,4	94,6	Амбивалент
A13	105,8	Активатор	109,4	88,7	Амбивалент
A14	105,7	Активатор	97,2	76,5	Ингибитор
A15	105,7	Активатор	103,7	71,7	Амбивалент
A16	130,2	Активатор	357,6	550,7	Активатор

*Примечание.* Коричневый цвет ячейки – активирующее действие на окисление субстрата, синий цвет ячейки – ингибирующее действие на окисление субстрата, желтый цвет ячейки – отличие от контроля в пределах 5%. Пут – путресцин, Спд – спермидин, Спм – спермин.

## Глава 6.

### ОБ ОСОБЕННОСТЯХ ВЛИЯНИЯ СИНТЕТИЧЕСКИХ АНАЛОГОВ ПОЛИАМИНОВ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

(обсуждение полученных результатов)

#### 6.1. Влияние органических соединений отдельных классов на метаболизм природных ПА в тканях с усиленной пролиферативной активностью

Анализ имеющихся на сегодняшний день данных позволяет утверждать, что метаболизм ПА занимает особое место в жизнедеятельности активно пролиферирующих клеток как в норме, так и в условиях патологии. Ранее было описано влияние определенных азотсодержащих гетероциклических соединений на активность аминоксидаз клеток печени, а также установлены их противоопухолевые свойства на линиях L-клеток [Лисицкая К. В. и др., 2013]. Формирование группы тестируемых веществ проводили с учетом полученных ранее результатов аналогичных исследований с производными азакраун-эфиров, бактериопурпурина, азафлуорена, анилина и диоксаборенинопиридина [Syatkin S. P. et al., 2020]. Вместе с тем, синтезированы и другие вещества, принадлежащие к данному ряду, для которых подобные эффекты изучены не были. Продукты окислительного дезаминирования ПА – перекись водорода, иминоальдегиды и акролеин, образующийся при дезаминировании иминоальдегидов, являются цитотоксичными и могут инициировать апоптоз злокачественных клеток [Cervelli M. et al., 2013].

Дальнейшие исследования в данном направлении позволят определить новые перспективные противоопухолевые агенты и особенности их влияния на метаболизм ПА в тканях с усиленной пролиферацией.

В нашей работе было показано, что определённые гетероциклические, циклические и азотсодержащие соединения в основном увеличивали активность аминоксидаз в бесклеточной тест-системе.

При этом необходимо отметить, что максимальный эффект проявили соединения А3 (метил-2-(5-формилфуран-2-ил) бензоат) и А16 (2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9Н-флуорен-9-он), а менее выраженное – вещества А1 диэтил-2-(4-(4-пентилейклогексифенил)-4,5-дигидротиазол-4,5-дикарбокси-лат), А2 (5,5-диметилимидазолидин-2,4-дион) и А5 (4-бутил-2,3,5,6-тетрафторбензойная кислота). Вещества А3 и А16 отличаются друг от друга по своей структуре: первое является гетероциклическим с атомом кислорода в пятичленном цикле, а второе – азотсодержащее производное флуорена. Ранее производные азафлуорена проявили противоопухолевые свойства [Голомазова К. А., 2006]. В этой связи представляется несколько затруднительным предположить наличие какой-либо общности в механизме их действия. При этом, согласно нашей классификации по характеру действия на окисление ПА, построенной на основании исследования субстратной специфичности, соединения А16, А3, А1, А2 и А5 оказались активаторами по отношению к ДАО и СМО. К СМО вещества А16, А3 и А1 проявили те же свойства; исключение составили лишь соединения А2 и А5, для которых отличие от контроля было незначительным (в пределах 5%).

В более ранних работах исследовались подобные характеристики обмена ПА при воздействии различных органических соединений, обладающих потенциальным антипролиферативным эффектом. В частности, изучалось влияние производных анилина, диоксаборенинопиридина, азакраун-эфиров, бактериопурпурина и азафлуорена на аминоксидазную активность в бесклеточной тест системе.

Было показано, что некоторые производные анилина, такие как 3-(4-изопропиланилино)-1-фенилпропанон-1; 3-(4-хлоранилино)-1-фенилпропанон-1; 3-(4-броманилино)-1-фенилпропанон-1; 3-(1-фенил-2-фторанилино)-пропанон-1; 3-(3-трифторметилаланино)-1-фенилпропанон-1 усиливали окислительное фосфорилирование 3-х метаболитов: Спд, Спм и Пут. При этом обычно исходят из предположения, что антипролиферативный эффект определяется структурным ядром этих соединений. Вместе с тем, появление в ядре каких-либо заместителей (нитрогруппы, ацетильной группы и др.) может изменить биологические свойства

молекулы на потенциально канцерогенные [Сяткин С.П. и др., 2016]. При этом в составе металлокомплексов их действие на активность соответствующих ферментов (ДАО и ПАО) снижается [Шевкун Н. А., 2013].

Производные диоксаборининопиридина преимущественно оказывают ингибирующее влияние на аминоксидазы [Шевкун Н. А., 2013; Сяткин С.П. и др., 2016], что косвенно свидетельствует об их потенциально канцерогенных свойствах, поскольку известно, что повышение активности аминоксидаз сопровождается замедлением клеточной пролиферации [Wang Y. et al., 2006].

Производные азакраун-эфиров действовали двояко: одни из них активировали, другие – напротив, ингибировали окисление ПА. Производные бактериопурпурина ингибируют аминоксидазную активность, а производные азафлуорена – повышают её, стимулируя распад Спм и Спд. Таким образом, разные соединения одного класса могут проявлять противоположный эффект в отношении активности ферментов катаболизма ПА [Шевкун Н. А., 2013].

Помимо влияния аналогов ПА на активность аминоксидаз, исследуется также их способность воздействовать на процессы синтеза ПА на бесклеточной тест-системе. В нашем исследовании было показано, что под действием соединения А16 и, в меньшей степени, веществ А5 и А2 происходит ингибирование активности ОДК, а также СдС и СмС. Однако соединение А10, напротив, повышало активность СдС. Остальные исследованные нами вещества не вызывали существенного влияния на активность ферментов синтеза ПА и содержание ПА.

В предыдущих работах также изучалась активность синтеза ПА под действием различных групп органических соединений (оксиаминоаналогов декарбоксилированного орнитина и S-аденозилметионина, алифатических гомологов Пут и Спд и др.). В частности, было установлено, что в присутствии отдельных оксиаминоаналогов декарбоксилированного орнитина и S-аденозилметионина (1-аминоокси-3-аминопропан и S-(5'-дезоксаденозил)-S-метил-β-тиоэтил-гидроксиламин), а также алифатических гомологов Пут и Спд (1,3-диаминопропан, 1,5-диамино-3-азапентан и др.) снижается активность ОДК,



что приводит к торможению синтеза ПА. При этом активность данных веществ не уступала по эффекту ДФМО и МГБГ [Сяткин С. П. и др., 2010].

В работе Голомазовой К.А. (2006) исследовалось влияние ряда психотропных веществ, являющихся аналогами ПА, на распад ПА в бесклеточной тест-системе, а также в гепатоме Г-27 у крыс. Было показано, что под действием указанных соединений усиливается распад ПА в злокачественных клетках. При этом также наблюдается ингибирование ОДК в ткани печени под действием 1-амино-4-азафлуорена, 1-амино-9-фениламино-4-азафлуорена и 1,4-диазоацетонафтилено[1,2-f]флуорантена, что указывает на их потенциальный антипролиферативный эффект. Исследованные вещества не вызывали повышение уровня ПА в бесклеточной тест-системе, что, по мнению автора, косвенно указывает на отсутствие у них канцерогенных свойств.

В исследовании Шевченко А.А. (2008) оценивались эффекты метилированных производных ксантина, производных бензимидазола и азафлуорена, производных анилина, диоксаборенинопиридина, а также пиперидона в отношении активности метаболизма ПА. Отмечено, что производные диоксаборенинопиридина и бензимидазола ингибируют распад ПА, а производные азафлуорена подавляют их синтез.

Также на бесклеточной тест-системе было показано, что отдельные производные 3-анилино-1-фенил-пропанона-1 ингибируют активность ОДК, демонстрируя тем самым канцеростатический эффект. В то же время производные диоксаборенинопиридина ингибируют аминоксидазную активность и повышают активность ОДК, что может способствовать усиленному клеточному делению за счёт повышения содержания ПА. Таким образом, представители данной группы соединений обладают потенциальным канцерогенным действием [Неборак Е. В. и др., 2012].

Необходимо отметить, что ингибирование ОДК рассматривается рядом исследователей как одна из стратегий, направленных на подавление митотической активности в тканях с активной пролиферацией, включая опухолевые. При этом механизмы в данном случае могут быть как прямыми, так и опосредованными. В

частности, в клетках опухоли молочной железы экспрессия ОДК может увеличиваться под влиянием эстрогенов и, напротив, снижаться под действием антиэстрогенов. Аналоги бис(этил)спермина ингибируют пролиферацию клеток рака молочной железы, содержащих и не содержащих рецепторы к эстрогену. Так, на культуре опухолевых клеток MCF-7 было показано, что активность ОДК снижается под влиянием указанных аналогов ПА, тогда как активность катаболизирующего фермента спермидин/спермин N<sup>1</sup>-ацетилтрансферазы (SSAT) существенно увеличивается [Thomas T. J. et al., 2018].

В одном из исследований было установлено, что эндоксифен (метаболит тамоксифена) ингибирует ОДК и аденозилметиониндекарбоксилазу, а также повышает активность СМО и N<sup>1</sup>-ацетилполиаминоксидазы в клетках линии MCF-7. При этом имеет место снижение содержания клеточного Пут и Спд. Повышение активности СМО и N<sup>1</sup>-ацетилполиаминоксидазы сопровождается деградацией ПА, повышением продукции свободных радикалов кислорода, что приводит к индукции апоптоза клеток [Cervelli M. et al., 2010; Murray-Stewart T. et al., 2017]. Необходимо отметить, что усиление катаболизма может иметь двойкий эффект в отношении пролиферации клеток, в одних случаях способствуя канцерогенезу, а в других – стимулируя апоптоз в зависимости от концентрации активных форм кислорода, которая увеличивается при индукции СМО и спермидин/спермин N<sup>1</sup>-ацетил-трансферазы [Zou Z. et al., 2017].

Таким образом, в клетках гормонозависимых новообразований молочной железы ПА играют важную роль в реализации эффектов антагонистов эстрогенов. Результаты данного исследования свидетельствуют о том, что стимуляция распада ПА может выступать в качестве значимого механизма действия метаболитов тамоксифена [Thomas T. J. et al., 2016].

Повышение активности спермидин/спермин N<sup>1</sup>-ацетилтрансферазы вызывает заметные изменения метаболизма ПА, которые были исследованы при разных типах злокачественного роста [Peng Q. et al., 2021; Tse R. T. et al., 2022]. В клетках млекопитающих, для которых характерна избыточная экспрессия спермидин/спермин N<sup>1</sup>-ацетилтрансферазы, наблюдается быстрая остановка

синтеза белка. Как следствие, происходит существенное замедление пролиферации в результате истощения запасов Спм и Спд [Park M. H. et al., 2013]. Обнаружено также, что экспрессия мРНК спермидин/смермин  $N^1$ -ацетилтрансферазы и самого фермента повышены в несколько раз в тканях злокачественных новообразований предстательной железы, молочной железы и лёгких [Maksymiuk A. W. et al., 2018].

Многочисленные данные, указывающие на способность аналогов ПА изменять направленность метаболизма эндогенных внутриклеточных ПА, заставляют задуматься о возможных механизмах подобных эффектов. Ряд авторов высказывают предположение о том, что синтетические аналоги могут использовать различные пути транспорта ПА и далее нарушать клеточные функции природных ПА [Cervelli M. et al., 2014; Keinänen T. A. et al., 2014; Vijayanathan V. et al., 2014; Murray-Stewart T. R. et al., 2016].

Изначально исследования в направлении возможного применения аналогов ПА включали в себя синтез соответствующих соединений со структурными изменениями числа метиленовых групп между амино- и имино-группами естественных ПА [Thomas T. J. et al., 2018]. В работах с культурой клеток лейкемии линии L1210 было обнаружено, что гомологи Спм и Пут активно поглощаются лейкемическими клетками, причем аналоги с незначительными изменениями в длине цепи могут препятствовать ингибированию деления клеток, опосредованному ДФМО, в то время как соединения с большими структурными изменениями не проявляют способности поддерживать клеточный рост [Porter C. W. et al., 1983]. ПА с концевыми аминогруппами являются хорошими субстратами для аминоксидаз, в частности, для СМО и  $N^1$ -ацетилполиаминоксидазы [Sjögren T. et al., 2017].

В целом, можно отметить, что от активности указанных ферментов катаболизма ПА во многом зависит пролиферативный потенциал и особенности ключевых механизмов клеточного цикла малигнизированных клеток. Так, было показано, что гены, ответственные за регуляцию процессов митотического деления клетки, подвержены воздействию  $N^1$ -ацетилтрансферазы. Последняя регулирует MELK (maternal embryonic leucine zipper kinase) и онкогенного протеина EZH2

(enhancer of zeste homolog 2) путём прямого взаимодействия с хроматином [Thakur V. S. et al., 2019]. Также считается, что  $N^1$ -ацетилполиаминоксидазы является мишенью транскрипции проапоптозного протеина p53 [Ou Y. et al., 2016]. На различных опухолевых линиях было установлено, что p53 способствует экспрессии  $N^1$ -ацетилтрансферазы [Soussi T., 2000]. Таким образом, можно предположить, что антионкогенный эффект белка p53 реализуется также посредством активации аминоксидазной активности в опухолевых клетках. С другой стороны, на иммортализованных клеточных линиях рака лёгкого A549, рака предстательной железы LNCaP и рака молочной железы T-47D был обнаружен высокий уровень экспрессии  $N^1$ -ацетилтрансферазы [Maksymiuk, A.W. et al., 2018]. При этом под действием данного фермента снижается уровень Спм и Спд, обладающих способностью к нейтрализации АФК. Это в свою очередь создаёт предпосылки для развития хронического воспаления и канцерогенеза [Battaglia V. et al., 2014].

Также интересно, что реактивное воспаление при канцерогенезе сопровождается повышением активности ДАО и ПАО лимфоцитами под влиянием фитогемагглютинаина [Korzun I. et al., 2021].

В целом, анализируя результаты исследования аналогов ПА и других органических соединений, можно прийти к выводу о том, что чаще всего они способствуют снижению содержания природных ПА в клетках, причем преимущественно за счёт активации аминоксидазной активности, что согласуется с данными настоящего диссертационного исследования. Таким образом, представляется перспективным дальнейший поиск новых химических агентов, способных вызывать истощение пула ПА за счёт воздействия на ферменты, ответственные за их катаболизм.

## **6.2. Особенности влияния новых органических соединений направленного действия на скорость пролиферации клеток отдельных опухолевых линий**

Согласно результатом нашего исследования, значимое ингибирование пролиферации клеток рака лёгкого линии A549 наблюдается через 24, 48 и 72 час

под влиянием соединений A16 (2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9H-флуорен-9-он) и A2 (5,5-диметил имидазолидин-2,4-дион). На опухолевых линиях SkBr-3 (рак молочной железы) и HeLa (рак шейки матки) максимальную ингибирующую активность показало соединение A16. Для него IC50 оказалось значительным при 72-часовой инкубации с опухолевыми клетками всех трёх исследованных клеточных линий.

Как видно, соединения A16 и A2 эффективно ингибируют пролиферацию трёх опухолевых линий и при этом повышают аминоксидазную активность, а также снижают интенсивность синтеза ПА. Таким образом, исходя из анализа полученных данных, можно предположить, что антипролиферативное действие этих веществ, по крайней мере, отчасти может быть обусловлено их влиянием на метаболизм ПА.

В исследовании на клеточной линии рака молочной железы SkBr-3 мы также показали, что синтетические аналоги азафлуорена, такие как 2-хлоро-N-(5H-индено[1,2-b]пиридин-5-ил)ацетамидеанданд и (5Z)-5-[нитро(фенил) метилиден]-5H-индено[1,2-b]пиридин, способны ингибировать рост малигнизированных клеток, а также активировать ПАО. При этом, (5Z)-5-[нитро(фенил)метилен]-5H-индено[1,2-b]пиридин превосходит антипролиферативную активность других производных азафлуорена (IC50 6.83 ммоль/л) и вызывает более выраженную активацию ПАО [Hilal A. et al., 2021].

В наших предыдущих работах [Sungrapova K. et al., 2019; Ploskonos M. V. et al., 2020] исследовалось влияние отдельных аналогов ПА на скорость пролиферации клеток рака предстательной железы и активность катаболизма ПА. В качестве аналогов ПА были взяты 3 вещества: N,N,N',N'-тетрабутилпропане-1,3-диамин (аналог Пут) и два его производных – NN'(1,3)-дибутилпропан-1,3-диамин и N,N(1,1)-дибутилпропан-1,3-диамин. Культура опухолевых клеток была представлена линией LNCaP (клеточный клон FGC (ESASS 89110211)). N,N,N',N'-тетрабутилпропане-1,3-диамин и оба его производных показали выраженный ингибирующий эффект в отношении клеточной пролиферации на сроке 48 час инкубации. При этом активность СМО в клетках опухолевой линии LNCaP также

существенно снижалась под действием этих же агентов. Также было обнаружено, что N,N(1,1)-дибутилпропан-1,3-диамин обладает более выраженным цитостатическим действием и более эффективно ингибирует СМО по сравнению с N,N,N',N'-тетрабутилпропане-1,3-диамином, однако, для достижения этих эффектов требуется его более высокая концентрация. Таким образом, в данном случае также обнаруживается возможная связь между повышением активности окислительного дезаминирования ПА и уменьшением интенсивности деления малигнизированных клеток при воздействии органических соединений, которые являются аналогами ПА.

В другом исследовании [Neborak E. V. et al., 2022] мы провели оценку влияния производных биспидина (диазабициклононанов) на катаболизм ПА в бесклеточной тест-системе и их цитотоксического действия в отношении клеток карциномы печени HepG2. Согласно полученным результатам, все тестируемые вещества (всего исследовалось 8 соединений) вызывали достоверное увеличение активности окисления Пут, Спм и Спд. Нами также было отмечено, что наличие ароматического радикала у соответствующего производного биспидина обеспечивает более выраженное повышение активности катаболизма ПА. Цитотоксический эффект тестируемых веществ анализировался на основании оценки жизнеспособности злокачественных клеток и интенсивности их апоптоза при 72-часовой инкубации. Оказалось, что вещество 3-(3-метоксипропил)-7-[3-(1Н-пиперазин-1-ил)этил]-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан проявляет цитотоксическое действие как в отношении опухолевых, так и нормальных клеток (фибробластов), снижая их жизнеспособность и инициируя их апоптоз. При этом добавление Спд и Спм в качестве субстрата окисления сопровождается повышением токсичности данного производного биспидина именно по отношению к злокачественным клеткам. Однако в нормальных фибробластах подобное явление не наблюдалось. Соединение 3-(3-метоксипропил)-7-[3-(1Н-пиперазин-1-ил)этил]-3,7-диазабицикло[3.3.1]нонан, таким образом, может рассматриваться в качестве потенциального противоопухолевого агента, механизм действия которого основан на усилении распада ПА в опухолевых клетках.

Одним из возможных механизмов, посредством которых может быть ограничена жизнеспособность и пролиферативная активность опухолевых клеток, является также нарушение их способности к биосинтезу аминокислот, в частности, L-аспарагина. В здоровых клетках L-аспарагин синтезируется с участием аспарагинсинтетазы. Злокачественные клетки не синтезируют L-аспарагин самостоятельно по причине дефицита аспарагинсинтетазы, данная аминокислота транспортируется в них из кровотока [Sharma D. et al., 2019]. L-аспарагиназа обладает потенциальным антипролиферативным эффектом, что объясняется его способностью катализировать гидролиз L-аспарагина до L-аспартата. Установлено, что L-аспарагиназа способствует истощению лейкозных клеток, что в последующем приводит к их гибели [Lubkowski J. et al., 2020].

Считается, что антипролиферативное действие L-аспарагиназы связано с дефицитом L-аспарагина в злокачественных клетках. Вместе с тем, рассматриваются и другие потенциальные механизмы, в частности, распад L-глутамина, D-аспарагина, моноамида янтарной кислоты, аспарагинила-тРНК, являющихся субстратами данного фермента [Kessel D., 1971; Aghaiypour K. et al., 2001]. Некоторое время назад был установлен цитопатический эффект мутантной L-аспарагиназы микроорганизма *Rhodospirillum rubrum*, который объясняется ингибированием активности теломераз в клетках отдельных опухолей [Zhdanov D. D. et al, 2017]. В одном из проведённых недавно исследований оценивалась способность *Rhodospirillum rubrum* к угнетению экспрессии hTERT (telomerase reverse transcriptase – обратная транскриптаза теломеразы) и ингибированию теломеразы в клетках опухолевых линий A549, SkBr3, HeLa (на которых мы изучали способность тестируемых веществ подавлять пролиферацию опухолевых клеток в данном диссертационном исследовании), а также на линиях K562, Jurkat, Raji и PC3 [Plyasova A. A. et al., 2020]. После 3-часовой инкубации отмечалось ингибирование теломеразы во всех опухолевых линиях. Однако наиболее выраженная супрессия наблюдалась в клетках линий Jurkat и SkBr3 (89,34% и 91,16%, соответственно), а клетки линии PC3, напротив, показали наименьшую скорость торможения активности фермента (26,67%). При этом инкубация клеток

с FITC-конъюгированной RrA с последующей проточной цитометрией показало наиболее сильную связь RrA с клетками линии Jurkat, клетки линии РСЗ продемонстрировали слабое взаимодействие. Следовательно, можно отметить, что аспарагиназы могут проявлять разные механизмы противоопухолевой активности, которые заключаются не только в обеспечении деградации аминокислот, но также в подавлении активности теломераз и регуляции транскрипции. Таким образом, можно предположить, что снижение скорости пролиферации опухолевых клеток, сопровождающееся усилением катаболизма ПА под воздействием различных синтетических соединений направленного действия, может быть также связано с изменением активности теломераз.

Возвращаясь к исследованию влияния аналогов ПА на пролиферативный потенциал малигнизированных клеток, следует привести результаты ряда других предыдущих работ, выполненных в рамках данного направления.

В частности, были исследованы эффекты NNN'N'-тетрабутилпропан1,3диамина (ТБП), N,N(1,1)-дибутилпропан1,3ди-амина (ДБП) и N,N'(1,3)-дибутилпропандиамина (ВДП), являющихся аналогами Пут, на пролиферативную активность клеток культуры рака предстательной железы линии LNCAP клона ФСК и активность ПАО [Николаев А.А. и др., 2016]. Было установлено, что все исследованные соединения в той или иной степени подавляют клеточный рост в исследованной опухолевой линии при различных концентрациях, проявляя максимальную эффективность на сроке 48 часов инкубации. Также все три вещества достоверно повышали активность ПАО в клетках линии LNCAP. При этом ДБП оказывал более выраженное влияние на данный показатель по сравнению с ТБП. Данное исследование подтверждает одно из наблюдений, сделанных в ходе нашей работы, согласно которому снижение скорости пролиферации опухолевых клеток в присутствии тестируемых веществ сочетается с увеличением аминоксидазной активности.

В эксперименте на культуре опухолевых клеток меланомы мыши линии В16-F10 было установлено, что отдельные производные азафлуорена и ксантина снижают скорость пролиферации клеток и содержание внутриклеточного пула ПА.



Однако производные пиперидона, напротив, увеличивают интенсивность деления малигнизированных клеток [Шевченко А.А., 2008].

В работе Шевкун Н.А. (2013) проводилась оценка противоопухолевых эффектов производных анилина, комплексов меди с производными анилина диоксаборенинопиридина, азафлуорена, азакраун-эфиров и бактериопурпурина на опухолевых клеточных линиях рака предстательной железы РС-3, меланомы человека MEL-7 и рака молочной железы MCF-7. Результаты работы показали, что отдельные производные анилина, азафлуорена и азакраун-эфиров ингибируют пролиферацию опухолевых клеток в культуре. При этом оказалось, что наибольшую чувствительность к тестируемым соединениям проявляют злокачественные клетки опухоли простаты линии РС-3. Вместе с тем, как отмечалось в п. 6.1., большинство производных диоксаборенинопиридина, бактериопурпурина, а также отдельные молекулы из группы азакраун-эфиров снижают активность аминоксидаз [Шевкун Н. А., 2013; Сяткин С. П. и др., 2016], что косвенно указывает на их потенциально канцерогенный эффект. Более того, при инкубации с отдельными производными диоксаборенинопиридина наблюдалось усиление пролиферации клеток линий РС-3, MEL-7 и MCF-7. Таким образом, соединения, принадлежащие группам производных диоксаборенинопиридина и бактериопурпурина, следует расценивать как химические агенты, обладающие как потенциальным канцеростатическим, так и канцерогенным действием.

Подводя итог представленным в данной главе данным, необходимо отметить, что органические соединения разных классов, влияющие на пролиферативную активность опухолевых клеток, как правило, оказывают воздействие и на активность ферментов метаболизма ПА. Многие из исследованных соединений демонстрируют способность к ингибированию деления малигнизированных клеток и повышению активности аминоксидаз. Вместе с тем, отдельные соединения, напротив, увеличивают активность ферментов синтеза ПА и снижают интенсивность их распада, проявляя потенциальный канцерогенный эффект. Данные, касающиеся эффектов органических соединений оригинального синтеза в

отношении пролиферативной активности клеток позволяют прогнозировать свойства вновь синтезируемых химических агентов к патогенетической мишени. Результаты представленного в настоящей работе исследования дополняют существующую базу данных, которая используется для оценки биологических свойств веществ на основе методов математического и компьютерного моделирования.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

### Итоги выполненного исследования

1. Исследованные органические соединения преимущественно активируют распад ПА в бесклеточной тест-системе на основе ткани печени, тем самым демонстрируя потенциальную противоопухолевую активность. Наиболее активными в отношении аминоксидаз являются вещества:  $A3 = A16 \gg A1 \gg A2 > A5$ .

2. Тестируемые соединения не оказывали существенного влияния на активность ферментов синтеза ПА в бесклеточной тест-системе, за исключением вещества A16, которое значительно ингибировало синтез ПА. Вещества, наиболее активные по способности ингибировать синтез ПА, можно выстроить в следующей последовательности:  $A16 > A5 > A2 > A3$ .

3. Выраженный ингибирующий эффект в отношении скорости пролиферации опухолевых клеток линии A549 при 24-, 48- и 72-часовом культивировании продемонстрировали соединения A16 (2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9Н-флуорен-9-он) и A2 (5,5-диметил имидазолидин-2,4-дион).

4. Значимое антипролиферативное действие в отношении клеток опухолевых линий SkBr-3 и HeLa на всех сроках культивирования показало соединение A16 (2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9Н-флуорен-9-он).

5. Наиболее активным соединением, проявляющим способность ингибировать пролиферацию опухолевых клеток, оказалось вещество A16 (2,7-Бис-[2-(диэтиламино)этокси]-9Н-флуорен-9-он), для которого IC50 при 72-часовой инкубации с опухолевыми клетками линий A549, SkBr3 и HeLa был значительным.

6. Вещества A2 и A16 показали потенциальный противоопухолевый эффект как на модели усиленной физиологической пролиферации (посредством влияния на метаболизм ПА), так и на отдельных культурах опухолевых клеток (за счёт подавления скорости их деления).

### **Практические рекомендации**

Результаты проведённого исследования могут быть использованы для совершенствования методов химиотерапевтического лечения онкологических заболеваний. Полученные данные следует учитывать при исследовании биологических свойств вновь синтезированных органических соединений, являющихся аналогами ПА. Необходимо также принять во внимание тот факт, что отдельные гетероциклические, циклические и азотсодержащие соединения способны проявлять потенциальный канцерогенный эффект, что связано с их способностью к угнетению катаболизма ПА.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы**

Описание свойств и характеристик исследованных гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений расширяет базу данных для последующего прогнозирования эффектов новых химических агентов с использованием методов компьютерного моделирования, включая молекулярный докинг. Вещества, которые продемонстрировали наиболее значимый эффект в отношении метаболизма ПА, могут рассматриваться в качестве кандидатов для создания новых противоопухолевых препаратов направленного действия.

**СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ  
ДИССЕРТАЦИИ**

1. Ploskonos, M. V. Polyamine analogues of propanediamine series inhibit prostate tumor cell growth and activate the polyamine catabolic pathway / M. V. Ploskonos, S. P. Syatkin, E. V. Neborak, **A. Hilal**, K. Y. Sungrapova, R. I. Sokuyev, M. L. Blagonravov, A. Y. Korshunova, A. A. Terentyev // **Anticancer Research**. – 2020. – Vol. 40. – N 3. – P. 1437-1441. DOI: 10.21873/anticancer.14085.

2. Neborak, E. V. The use of computational methods for design of polyamine-targeted synthetic compounds with antitumor activity / E. V. Neborak, S. P. Syatkin, Y. S. Gushchina, A. Y. Korshunova, **A. Hilal**, A. S. Tveritina, A. V. Protasov, T. A. Lobaeva, I. P. Smirnova // **FEBS Open Bio**, Vol. 11 (Suppl. S1) (2021), P. 300-301. DOI: 10.1002/2211-5463.13205.

**3. Hilal, A.** Inhibition of tumor cell growth by novel synthetic polyamine analogues / A. Hilal, M. Ploskonos, S. Syatkin, M. Blagonravov, A. Terentyev, E. Kharlitskaya, Z. Kaitova, E. Dobina, D. Zhdanov // **FEBS Open Bio**, Vol. 11 (Suppl. 1) (2021), P. 308. DOI: 10.1002/2211-5463.13205.

4. Korzun, I. The brain glioma patients lymphocytes excrete polyamine oxidase after phytohemagglutinin stimulation / I. Korzun, S. P. Syatkin, N. Y. Gridina, M. L. Blagonravov, **A. Hilal**, Z. Kaitova, E. Kharlitskaya, V. I. Kuznetsov, L. Varekha // **FEBS Open Bio**, Vol. 11 (Suppl. 1) (2021), P. 423-424. DOI: 10.1002/2211-5463.13205.

5. Neborak, E. V. Anticancer cytotoxic activity of bispidine derivatives associated with the increasing catabolism of polyamines / E. V. Neborak, A. B. Kaldybayeva, L. Bey, A. Y. Malmakova, A. S. Tveritina, **A. Hilal**, V. K. Yu, M. V. Ploskonos, M. V. Komarova, E. Agostinelli, D. D. Zhdanov // **Molecules**. – 2022. – Vol. 27. – N 12.: 3872. DOI: 10.3390/molecules27123872.

6. Syatkin, S. P. Influence of some heterocyclic, cyclic, and nitrogen-containing compounds on oxidative deamination of polyamines in a cell-free test system / S. P. Syatkin, M. L. Blagonravov, **A. Hilal**, K. Y. Sungrapova, R. I. Sokuev, I. A. Korzun, V. A. Goryachev // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. – 2024. – Vol. 177. – N 3. – P. 307-312. DOI: 10.1007/s10517-024-06179-9.

7. **Abdullah, H.** The impact of some nitrogen-containing, heterocyclic and cyclic compounds on cell proliferation of some tumor lines / H. Abdullah, S. Syatkin, T. Lobaeva, A. Fedosov, Z. Kaitova, E. Tarasenko, E. Zheludova, E. V. Mitina, V. Botchey, D. T. Titarov, E. Hilal, T. Zotova // **FEBS Open Bio**, Vol. 14 (Suppl. 2) (2024), P. 301. DOI: 10.1002/2211-5463.13837.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДАО – диаминооксидаза

ККСА – количественные корреляции «структура-активность»

МТС – метилтрансфераза

ОДК – орнитиндекарбоксилаза

ПА – полиамины

ПАО – полиаминооксидаза

Пут – путресцин

СДС – спермидинсинтаза

СМО – сперминооксидаза

СМС – сперминсинтаза

Спд – спермидин

Спм – спермин

ТБП – тетрабутилпропандиамин

ODC1 – ornithine decarboxylase 1 (орнитиндекарбоксилаза 1)

dcSAM – decarboxylated S-adenosylmethionine (декарбоксилированный S-аденозилметионин)

SAM – S-adenosylmethionine (S-аденозилметионин)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Березов, Т. Т. Флюорометрический метод определения активности орнитиндекарбоксилазы из тканей животных / Т. Т. Березов, С. П. Сяткин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1986. – № 7. – С. 119-122.
2. Волков, С. В. Превращение 3-бензоил-1-метил-4-фенил-γ-пиперидаола под действием ариламинов и арилгидразинов. Синтез 3-ариламино-1-оксо-1-фенилпропанов и 1,3-диарилпиразолов и их фрагментация под электронным ударом / С. В. Волков, С. В. Кутяков, А. Н. Левов [и др.] // Химия гетероциклических соединений. – 2007, № 4. – С. 544-554.
3. Голомазова, К. А. Антипролиферативные и антиопухолевые свойства синтетических аналогов полиаминов: диссертация ... кандидата биологических наук: 03.00.04 / Голомазова Ксения Алексеевна; [Место защиты: Российский университет дружбы народов]. – Москва, 2006. – 129 с.
4. Государственная фармакопея СССР / Ю. Г. Бобков, Э. А. Бабаян, М. Д. Машковский [и др.]. Том Выпуск 1. – 11-е издание, дополненное. – Москва : Издательство "Медицина", 1987. – 336 с. – EDN XCDOKF.
5. Лисицкая, К. В. Определение функциональной активности синтетических аналогов полиаминов с помощью биотест-системы на основе быстро пролиферирующих культивируемых клеток человека / К. В. Лисицкая, Н. А. Сокуева, Ю. Г. Малышева Ю.Г. [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. – 2013. – Т. 49, № 2. – С. 124-128. – doi: 10.7868/S0555109913020086.
6. Неборак, Е. В. Модифицированный микрометод определения концентрации полиаминов в биопробах с флуориметрической детекцией / Е. В. Неборак, С. П. Сяткин, С. В. Кутяков, Р. И. Сокуев, К. Ю. Сунграпова // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. – 2016. – Т. 18, № 9. – С. 84-89.
7. Неборак, Е. В. Синтез, строение и биологические свойства комплексных соединений меди с азотсодержащими органическими лигандами:



диссертация ... кандидата биологических наук: 03.01.04 / Неборак Екатерина Владиславовна; [Место защиты: Российский университет дружбы народов]. – Москва, 2012. – 129 с

8. Николаев, А. А. Торможение роста клеток культуры рака простаты LNCaP аналогами полиаминов / А. А. Николаев, С. В. Выборнов // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 69.

9. Плосконос, М. В. Динамика экспрессии фосфатидилсерина на поверхности мембраны клеток после воздействия «средних молекул» спермоплазмы мужчин разной фертильности / М. В. Плосконос // Рос. иммунол. журн. – 2015. – Т. 9, № 2. – С. 86-89.

10. Попов, П. И. ChemicDescript. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2003612305. Роспатент, 2003

11. Попов, П. И. ChemicPen. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2005612073. Роспатент, 2005

12. Семёнов, А. А. Природные противоопухолевые соединения (структура и механизм действия). Новосибирск: Наука, 1979, 222 с.

13. Силачѳв, Д. Н. Роль полиаминов в жизнедеятельности клеток репродуктивной системы / Д. Н. Силачѳв, Е. Ю. Плотников, К. В. Горюнов [и др.] // Цитология. – 2018. – Т. 60, № 3. – С. 164–172. – doi: 10.31116/tsitol.2018.03.02.

14. Сяткин, С. П. Влияние некоторых гетероциклических, циклических и азотсодержащих соединений на окислительное дезаминирование полиаминов в бесклеточной тест-системе / С. П. Сяткин, М. Л. Благоднравов, А. Хиляль [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2024. – Т. 177, № 3– С. 291-297. doi: 10.47056/0365-9615-2024-177-3-291-297.

15. Сяткин, С. П. Влияние химических аналогов полиаминов, декарбоксилированного орнитина и S-аденозилметионина на скорость синтеза полиаминов в тест-системах из тканей с повышенной пролиферацией / С. П. Сяткин, Т. Т. Березов, Т. В. Федорончук [и др.] // Вестник РУДН. Серия Медицина. – 2010. – № 3. – С. 9–14.

16. Сяткин, С. П. Мониторинг канцерогенных свойств у производных диоксаборининопиридина и анилина в бесклеточной тест-системе из регенерирующей печени крыс / С. П. Сяткин, А. А. Киричук, А. Т. Солдатенков [и др.] // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2016. – Т. 162, № 12. – С. 773–780.
17. Сяткин, С. П. Обмен полиаминов в злокачественных опухолях / С. П. Сяткин, Т. Т. Березов // Вестник АМН СССР. – 1982, № 3. – С. 10–21.
18. Сяткин, С. П. Окислительное дезаминирование полиаминов в гепатомах с различной скоростью роста / С. П. Сяткин, Т. Т. Березов // Вопросы медицинской химии. – 1979. – Т. 25, № 5. – С. 611.
19. Федорончук, Т. В. Цитотоксическая активность аналогов полиаминов, модифицированных азотистыми основаниями / Т. В. Федорончук, Т. Г. Николаева, Г. А. Ваньчкова [и др.] // Вестник Российского университет дружбы народов. Серия: Медицина. – 2000. – № 2. – С. 17–20.
20. Шевкун, Н. А. Скрининг гетероциклических азотсодержащих соединений как потенциальных модуляторов обмена полиаминов и противоопухолевых агентов: диссертация ... кандидата биологических наук: 14.03.03, 03.01.04 / Шевкун Наталья Александровна; [Место защиты: Российский университет дружбы народов]. – Москва, 2013. – 194 с.
21. Шевченко, А. А. Исследование влияния веществ оригинального синтеза на пролиферацию и дифференцировку клеток мышинной меланомы линии В16-F10<sup>1</sup> / А. А. Шевченко // Известия Кабардино-Балкарского научного центра РАН. – 2011. – Том 43(5). – С. 38–42.
22. Шевченко, А. А. Канцеростатические и канцерогенные свойства синтетических аналогов полиаминов: диссертация ... кандидата биологических наук: 03.00.04 / Шевченко Анна Александровна; [Место защиты: Российский университет дружбы народов]. – Москва, 2008. – 156 с.
23. Abdulhussein, A. A. Polyamines and membrane transporters / A. A. Abdulhussein, H. M. Wallace // Amino Acids. – 2014. – Vol. 46 (3). – P. 655–660. – doi: 10.1007/s00726-013-1553-6.

24. Aghaiypour, K. Structural basis for the activity and substrate specificity of *Erwinia chrysanthemi* L-asparaginase / K. Aghaiypour, A. Wlodawer, J. Lubkowski // *Biochemistry*. – 2001. – Vol. 40(19). – P. 5655–5664. doi: 10.1021/bi0029595.
25. Alexander, E. T. A novel polyamine blockade therapy activates an anti-tumor immune response / E. T. Alexander, A. Minton, M. C. Peters [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8(48). – P. 84140–84152. – doi: 10.18632/oncotarget.20493.
26. Alexander, E. T. Polyamine blocking therapy decreases survival of tumor-infiltrating immunosuppressive myeloid cells and enhances the antitumor efficacy of PD-1 blockade / E. T. Alexander, K. Mariner, J. Donnelly [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2020. – Vol. 19(10). – P. 2012–2022. – doi: 10.1158/1535-7163.MCT-19-1116.
27. Alexiou, G. A. Difluoromethylornithine in cancer: new advances / G. A. Alexiou, G. D. Lianos, V. Ragos [et al.] // *Future Oncol.* – 2017. – Vol. 13(9). – P. 809–819. – doi: 10.2217/fon-2016-0266.
28. Aljanabi, R. Monoamine oxidase (MAO) as a potential target for anticancer drug design and development / R. Aljanabi, L. Alsous, D. A. Sabbah [et al.] // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26(19): 6019. – doi: 10.3390/molecules26196019.
29. Arruabarrena-Aristorena, A. Oil for the cancer engine: The cross-talk between oncogenic signaling and polyamine metabolism / A. Arruabarrena-Aristorena, A. Zabala-Letona, A. Carracedo // *Sci. Adv.* – 2018. – Vol. 4(1): eaar2606. – doi: 10.1126/sciadv.aar2606.
30. Bae, D. H. The old and new biochemistry of polyamines / D. H. Bae, D. J. R. Lane, P. J. Jansson [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta. Gen. Subj.* – 2018. – Vol. 1862(9). – P. 2053–2068. – doi: 10.1016/j.bbagen.2018.06.004.
31. Balaban, A. T. Highly discriminating distance-based topological index / A. T. Balaban // *Chemical Physics Letters*. – 1982. – Vol. 89(5). – P. 399–404. – doi: 10.1016/0009-2614(82)80009-2.
32. Baronas, V. A. Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines / V. A. Baronas, H. T. Kurata // *Front. Physiol.* – 2014. – Vol. 5: 325. – doi: 10.3389/fphys.2014.00325.

33. Battaglia, V. Polyamine catabolism in carcinogenesis: potential targets for chemotherapy and chemoprevention / V. Battaglia, C. DeStefano Shields, T. Murray-Stewart [et al.] // *Amino Acids*. – 2014. – Vol. 46(3). – P. 511–519. doi: 10.1007/s00726-013-1529-6.
34. Biegging, K. T. Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression / K. T. Biegging, S. S. Mello, L. D. Attardi // *Nat. Rev. Cancer*. – 2014. – Vol. 14(5). – P. 359–370. – doi: 10.1038/nrc3711.
35. Bowie, D. Polyamine-mediated channel block of ionotropic glutamate receptors and its regulation by auxiliary proteins / D. Bowie // *J. Biol. Chem*. – 2018. – Vol. 293(48). – P. 18789–18802. – doi: 10.1074/jbc.TM118.003794.
36. Bronson, A. S. Polyamine catabolism is concentrated in tumor-associated histiocytes in diffuse large B-cell lymphoma and classic Hodgkin lymphoma / A. S. Bronson, C. M. Lilley, M. Zlaczewski [et al.] // *Pathol. Res. Pract*. – 2023. – Vol. 248: 154627. – doi: 10.1016/j.prp.2023.154627.
37. Bruttger, J. Genetic cell ablation reveals clusters of local self-renewing microglia in the mammalian central nervous system / J. Bruttger, K. Karram, S. Wörtge [et al.] // *Immunity*. – 2015. – Vol. 43(1). – P. 92–106. – doi: 10.1016/j.immuni.2015.06.012.
38. Caldwell, R. W. Arginase: a multifaceted enzyme important in health and disease / R. W. Caldwell, P. C. Rodriguez, H. A. Toque [et al.] // *Physiol. Rev*. – 2018. – Vol. 98(2). – P. 641–665. – doi: 10.1152/physrev.00037.2016.
39. Casero, R. A. Jr. Polyamine catabolism and disease / R. A. Casero Jr, A. E. Pegg // *Biochem. J*. – 2009. – Vol. 421. – P. 323–338.
40. Casero, R. A. Jr. Polyamine metabolism and cancer: treatments, challenges and opportunities / R. A. Casero, T. Murray Stewart, A. E. Pegg // *Nat. Rev. Cancer*. – 2018. – Vol. 18(11). – P. 681–695. – doi: 10.1038/s41568-018-0050-3.
41. Casero, R. A. Jr. Terminally alkylated polyamine analogues as chemotherapeutic agents / R. A. Jr. Casero, Woster P. M. // *J. Med. Chem*. – 2001. – Vol. 44(1). – P. 1–26. – doi: 10.1021/jm000084m.

42. Cervelli, M. Polyamines metabolism and breast cancer: state of the art and perspectives / M. Cervelli, S. Pietropaoli, F. Signore [et al.] // *Breast Cancer Res. Treat.* – 2014. – Vol. 148(2). – P. 233–248. doi: 10.1007/s10549-014-3156-7.
43. Cervelli, M. Spermine oxidase (SMO) activity in breast tumor tissues and biochemical analysis of the anticancer spermine analogues BENSpm and CPENSpm / M. Cervelli, G. Bellavia, E. Fratini [et al.] // *BMC Cancer.* – 2010. – Vol. 10: 555. – doi: 10.1186/1471-2407-10-555.
44. Cervelli, M. Structure-function relationships in the evolutionary framework of spermine oxidase / M. Cervelli, D. Salvi, F. Polticelli [et al.] // *J. Mol. Evol.* – 2013. – Vol. 76(6). – P. 365–370. doi: 10.1007/s00239-013-9570-3. Epub 2013 Jul 5. PMID: 23828398.
45. Chen, C. H. Monoamine oxidase A: an emerging therapeutic target in prostate cancer / C. H. Chen, B. J. Wu // *Front. Oncol.* – 2023. – Vol. 13: 1137050. – doi: 10.3389/fonc.2023.1137050.
46. Cheng, S. A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells / S. Cheng, Z. Li, R. Gao [et al.] // *Cell.* – 2021. – Vol. 184(3). – P. 792–809.e23. – doi: 10.1016/j.cell.2021.01.010.
47. Chia, T. Y. Polyamine immunometabolism: central regulators of inflammation, cancer and autoimmunity / T. Y. Chia, A. Zolp, J. Miska // *Cells.* – 2022. – Vol. 11(5): 896. – doi: 10.3390/cells11050896.
48. Chiang, P. K. S-Adenosylmethionine and methylation / P. K. Chiang, R. K. Gordon, J. Tal [et al.] // *FASEB J.* – 1996. – Vol. 10 (4). – P. 471–480.
49. Commisso, C. Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells / C. Commisso, S. M. Davidson, R. G. Soydaner-Azeloglu [et al.] // *Nature.* – 2013. – Vol. 497(7451). – P. 633–637. – doi: 10.1038/nature12138.
50. Corral, M. Upregulation of polyamine transport in human colorectal cancer cells / M. Corral, H. M. Wallace // *Biomolecules.* – 2020. – Vol. 10(4): 499. – doi: 10.3390/biom10040499.
51. Costa-Neto, C. M. Molecular modeling of the human eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A) based on spectroscopic and computational analyses / C. M.

Costa-Neto, L. T. Parreiras-e-Silva, R. Ruller [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2006. – Vol. 374. – P. 634–640.

52. Damiani, E. Polyamines and cancer / E. Damiani, H. M. Wallace // *Methods Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 1694. – P. 469–488. – doi: 10.1007/978-1-4939-7398-9\_39.

53. D'Amico, D. Non-canonical hedgehog/AMPK-mediated control of polyamine metabolism supports neuronal and medulloblastoma cell growth / D. D'Amico, L. Antonucci, L. Di Magno [et al.] // *Dev. Cell.* – 2015. – Vol. 35(1). – P. 21–35. – doi: 10.1016/j.devcel.2015.09.008.

54. Danzin, C. Irreversible inhibition of rat S-adenosylmethionine decarboxylase by 5'-([(Z)-4-amino-2-butenyl]methylamino)-5'-deoxyadenosine / C. Danzin, P. Marchal, P. Casara // *Biochem. Pharmacol.* – 1990. – Vol. 40(7). – P. 1499–1503. – doi: 10.1016/0006-2952(90)90446-r.

55. Dobrovolskaite, A. Development of polyamine lassos as polyamine transport inhibitors / A. Dobrovolskaite, R. A. Gardner, J. G. Delcros [et al.] // *ACS Med. Chem. Lett.* – 2022. – Vol. 13(2). – P. 319–326. – doi: 10.1021/acsmchemlett.1c00557.

56. Eisenberg, T. Cardioprotection and lifespan extension by the natural polyamine spermidine / T. Eisenberg, M. Abdellatif, S. Schroeder [et al.] // *Nat. Med.* – 2016. – Vol. 22(12). – P. 1428–1438. – doi: 10.1038/nm.4222.

57. Eisenberg, T. Nucleocytosolic depletion of the energy metabolite acetyl-coenzyme a stimulates autophagy and prolongs lifespan / T. Eisenberg, S. Schroeder, A. Andryushkova [et al.] // *Cell Metab.* – 2014. – Vol. 19(3). – P. 431–444. – doi: 10.1016/j.cmet.2014.02.010.

58. Fletcher, M. l-arginine depletion blunts antitumor T-cell responses by inducing myeloid-derived suppressor cells / M. Fletcher, M. E. Ramirez, R. A. Sierra [et al.] // *Cancer Res.* – 2015. – Vol. 75(2). – P. 275–283. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-1491.

59. Friebel, E. Single-cell mapping of human brain cancer reveals tumor-specific instruction of tissue-invading leukocytes / E. Friebel, K. Kapolou, S. Unger [et al.] // *Cell.* – 2020. – Vol. 181(7). – P. 1626–1642.e20. – doi: 10.1016/j.cell.2020.04.055.

60. Galluzzi, L. Molecular definitions of autophagy and related processes / L. Galluzzi, E. H. Baehrecke, A. Ballabio [et al.] // *EMBO J.* – 2017. – Vol. 36(13). – P. 1811–1836. – doi: 10.15252/embj.201796697.
61. Gamble, L. D. Inhibition of polyamine synthesis and uptake reduces tumor progression and prolongs survival in mouse models of neuroblastoma / L. D. Gamble, S. Purgato, J. Murray [et al.] // *Sci. Transl. Med.* – 2019. – Vol. 11(477): eaau1099. – doi: 10.1126/scitranslmed.aau1099.
62. Gamble, L. D. Polyamine pathway inhibition as a novel therapeutic approach to treating neuroblastoma / L. D. Gamble, M. D. Hogarty, X. Liu [et al.] // *Front. Oncol.* – 2012. – Vol. 2: 162. – doi: 10.3389/fonc.2012.00162.
63. Geiger, R. L-arginine modulates T cell metabolism and enhances survival and anti-tumor activity / R. Geiger, J. C. Rieckmann, T. Wolf [et al.] // *Cell.* – 2016. – Vol. 167(3). – P. 829–842.e13. – doi: 10.1016/j.cell.2016.09.031.
64. Gerner, E. W. Cancer pharmacoprevention: Targeting polyamine metabolism to manage risk factors for colon cancer / E. W. Gerner, E. Bruckheimer, A. Cohen // *J. Biol. Chem.* – 2018. – Vol. 293(48). – P. 18770–18778. – doi: 10.1074/jbc.TM118.003343.
65. Gitto, S. B. Difluoromethylornithine combined with a polyamine transport inhibitor is effective against gemcitabine resistant pancreatic cancer / S. B. Gitto, V. Pandey, J. L. Oyer [et al.] // *Mol. Pharm.* – 2018. – Vol. 15(2). – P. 369–376. – doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.7b00718.
66. Grancara, S. Milestones and recent discoveries on cell death mediated by mitochondria and their interactions with biologically active amines / S. Grancara, S. Ohkubo, M. Artico [et al.] // *Amino Acids.* – 2016. – Vol. 48(10). – P. 2313–2326. – doi: 10.1007/s00726-016-2323-z.
67. Guidotti, S. Enhanced osteoblastogenesis of adipose-derived stem cells on spermine delivery via  $\beta$ -catenin activation / S. Guidotti, A. Facchini, D. Platano [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2013. – Vol. 22(10). – P. 1588–1601. – doi: 10.1089/scd.2012.0399.
68. Hamouda, N. N. ATP13A3 is a major component of the enigmatic mammalian polyamine transport system / N. N. Hamouda, C. Van den Haute, R.

Vanhoutte [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2021. – Vol. 296: 100182. – doi: 10.1074/jbc.RA120.013908.

69. Hardbower, D. M. Ornithine decarboxylase regulates M1 macrophage activation and mucosal inflammation via histone modifications / D. M. Hardbower, M. Asim, P. B. Luis [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* – 2017. – Vol. 114(5). – P. E751–E760. – doi: 10.1073/pnas.1614958114.

70. Hayes, C. S. Polyamine blockade promotes antitumor immunity / C. S. Hayes, M. R. Burns, S. K. Gilmour // *Oncoimmunology*. – 2014. – Vol. 3(1): e27360. – doi: 10.4161/onci.27360.

71. Hayes, C. S. Polyamine-blocking therapy reverses immunosuppression in the tumor microenvironment / C. S. Hayes, A. C. Shicora, M. P. Keough [et al.] // *Cancer Immunol. Res.* – 2014. – Vol. (3). – P. 274–285. – doi: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0120-T.

72. Hiasa, M. Identification of a mammalian vesicular polyamine transporter / M. Hiasa, T. Miyaji, Y. Haruna [et al.] // *Sci. Rep.* – 2014. – Vol. 4: 6836. – doi: 10.1038/srep06836.

73. Higgins, G. M. Experimental pathology of liver: restoration of liver of white rat following partial surgical removal / G. M. Higgins, R. M. Anderson // *Arch. Pathol.* – 1931. – Vol. 12. – 186–202.

74. Hilal, A. Inhibition of tumor cell growth by novel synthetic polyamine analogues / A. Hilal, M. Ploskonos, S. Syatkin [et al.] // *FEBS Open Bio.* – 2021. – Vol. 11 (Suppl. 1). – P. 308. – doi: 10.1002/2211-5463.13205.

75. Hofer, S. J. Mechanisms of spermidine-induced autophagy and geroprotection / S. J. Hofer, A. K. Simon, M. Bergmann [et al.] // *Nat. Aging.* – 2022. – Vol. 2(12). – P. 1112–1129. – doi: 10.1038/s43587-022-00322-9.

76. Holbert, C. E. Autophagy induction by exogenous polyamines is an artifact of bovine serum amine oxidase activity in culture serum / C. E. Holbert, M. Dunworth, J. R. Foley [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2020. – Vol. 295(27). – P. 9061–9068. – doi: 10.1074/jbc.RA120.013867.



77. Horikawa, N. Anti-VEGF therapy resistance in ovarian cancer is caused by GM-CSF-induced myeloid-derived suppressor cell recruitment / N. Horikawa, K. Abiko, N. Matsumura [et al.] // *Br. J. Cancer.* – 2020. – Vol. 122(6). – P. 778–788. – doi: 10.1038/s41416-019-0725-x.
78. Houdou, M. Novel green fluorescent polyamines to analyze ATP13A2 and ATP13A3 activity in the mammalian polyamine transport system / M. Houdou, N. Jacobs, J. Coene [et al.] // *Biomolecules.* – 2023. – Vol. 13(2): 337. – doi: 10.3390/biom13020337.
79. Hu, Q. N. The matrix expression, topological index and atomic attribute of molecular topological structure / Q. N. Hu, Y. Z. Liang, K. T. Fang // *Journal of Data Science.* – 2003. – Vol. 1(4). – P. 361–389.
80. Humm, A. Crystal structure and mechanism of human L-arginine:glycine amidinotransferase: a mitochondrial enzyme involved in creatine biosynthesis / A. Humm, E. Fritsche, S. Steinbacher [et al.] // *EMBO J.* – 1997. – Vol. 16(12). – P. 3373–3385. – doi: 10.1093/emboj/16.12.3373.
81. Hwang, W. Y. Difluoromethylornithine induces apoptosis through regulation of AP-1 signaling via JNK phosphorylation in epithelial ovarian cancer / W. Y. Hwang, W. H. Park, D. H. Suh [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – Vol. 22(19): 10255. – doi: 10.3390/ijms221910255.
82. Ibáñez, C. Metabolomics of adherent mammalian cells by capillary electrophoresis-mass spectrometry: HT-29 cells as case study / C. Ibáñez, C. Simó, A. Valdés [et al.] // *J. Pharm. Biomed. Anal.* – 2015. – Vol. 110. – P. 83–92. – doi: 10.1016/j.jpba.2015.03.001.
83. Igarashi, K. The functional role of polyamines in eukaryotic cells / K. Igarashi, K. Kashiwagi // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* – 2019. – Vol. 107. – P. 104–115. doi: 10.1016/j.biocel.2018.12.012.
84. Jain, V. Reduction in polyamine catabolism leads to spermine-mediated airway epithelial injury and induces asthma features / V. Jain, S. Raina, A. P. Gheware [et al.] // *Allergy.* – 2018. Vol. 73(10). – P. 2033–2045. – doi: 10.1111/all.13472.

85. Johnson, D. B. Fulminant myocarditis with combination immune checkpoint blockade / D. B. Johnson, J. M. Balko, M. L. Compton [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2016. – Vol. 375(18). – P. 1749–1755. – doi: 10.1056/NEJMoa1609214.
86. Keinänen, T. A. Selective regulation of polyamine metabolism with methylated polyamine analogues / T. A. Keinänen, M. T. Hyvönen, L. Alhonen [et al.] // *Amino Acids.* – 2014. – Vol. 46(3). – P. 605–620. doi: 10.1007/s00726-013-1587-9.
87. Khan, A. Dual targeting of polyamine synthesis and uptake in diffuse intrinsic pontine gliomas / A. Khan, L. D. Gamble, D. H. Upton [et al.] // *Nat. Commun.* – 2021. – Vol. 12(1): 971. – doi: 10.1038/s41467-021-20896-z.
88. Khlebnikov, A. I. Computational structure-activity relationship analysis of non-peptide inducers of macrophage tumor necrosis factor-alpha production / A. I. Khlebnikov, I. A. Schepetkin, L. N. Kirpotina [et al.] // *Bioorg. Med. Chem.* – 2008. – Vol. 16(20). – P. 9302–9312. – doi: 10.1016/j.bmc.2008.08.078.
89. Kim, H. A. Polyamine patterns in plasma of patients with systemic lupus erythematosus and fever / H. A. Kim, H. S. Lee, T. H. Shin [et al.] // *Lupus.* – 2018. – Vol. 27(6). – P. 930–938. – doi: 10.1177/0961203317751860.
90. Kim, K. H. Immune-related adverse events are clustered into distinct subtypes by T-cell profiling before and early after anti-PD-1 treatment / K. H. Kim, J. Y. Hur, J. Cho [et al.] // *Oncoimmunology.* – 2020. – Vol. 9(1): 1722023. – doi: 10.1080/2162402X.2020.1722023.
91. Kiss, M. Myeloid cell heterogeneity in cancer: not a single cell alike / M. Kiss, S. Van Gassen, K. Movahedi [et al.] // *Cell. Immunol.* – 2018. – Vol. 330. – P. 188–201. – doi: 10.1016/j.cellimm.2018.02.008.
92. Klauber, T. C. Elucidating the role of free polycations in gene knockdown by siRNA polyplexes / T. C. Klauber, R. V. Søndergaard, R. R. Sawant [et al.] // *Acta Biomater.* – 2016. – Vol. 35. – P. 248–259. – doi: 10.1016/j.actbio.2016.02.021.
93. Klemm, F. Interrogation of the microenvironmental landscape in brain tumors reveals disease-specific alterations of immune cells / F. Klemm, R. R. Maas, R. L. Bowman [et al.] // *Cell.* – 2020. – Vol. 181(7). – P. 1643–1660.e17. – doi: 10.1016/j.cell.2020.05.007.

94. Koppenol, W. H. Otto Warburg's contributions to current concepts of cancer metabolism / W. H. Koppenol, P. L. Bounds, C. V. Dang // *Nat. Rev. Cancer.* – 2011. – Vol. 11(5). – P. 325–337. – doi: 10.1038/nrc3038.
95. Korzun, I. The brain glioma patients lymphocytes excrete polyamine oxidase after phytohemagglutinin stimulation / I. Korzun, S. P. Syatkin, N. Y. Gridina [et al.] // *FEBS Open Bio.* – 2021. – Vol. 11 (Suppl. 1). – P. 423–424. – doi: 10.1002/2211-5463.13205.
96. Kushal, S. Monoamine oxidase A (MAO A) inhibitors decrease glioma progression / S. Kushal, W. Wang, V. P. Vaikari [et al.] // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7(12). – P. 13842–13853. – doi: 10.18632/oncotarget.7283.
97. Larkin, J. Combined nivolumab and Ipilimumab or monotherapy in untreated melanoma / J. Larkin, V. Chiarion-Sileni, R. Gonzalez [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 373(1). – P. 23–34. – doi: 10.1056/NEJMoa1504030.
98. LaRocca, T. J. The autophagy enhancer spermidine reverses arterial aging / T. J. LaRocca, R. A. Gioscia-Ryan, C. M. Jr. Hearon [et al.] // *Mech. Ageing Dev.* – 2013. – Vol. 134(7-8). – P. 314-320. – doi: 10.1016/j.mad.2013.04.004.
99. Lee, M. S. Ornithine aminotransferase supports polyamine synthesis in pancreatic cancer / M. S. Lee, C. Dennis, I. Naqvi [et al.] // *Nature.* – 2023. – Vol. 616(7956). – P. 339–347. – doi: 10.1038/s41586-023-05891-2.
100. LeGendre-McGhee, S. Time-serial assessment of drug combination interventions in a mouse model of colorectal carcinogenesis using optical coherence tomography / S. LeGendre-McGhee, P. S. Rice, R. A. Wall [et al.] // *Cancer Growth Metastasis.* – 2015. – Vol. 8(Suppl 1). – P. 63–80. – doi: 10.4137/CGM.S21216.
101. Lenis, Y. Y. Physiological importance of polyamines / Y. Y. Lenis, M. A. Elmetwally, J. G. Maldonado-Estrada [et al.] // *Zygote.* – 2017. – Vol. 25(3). – P. 244–255. – doi: 10.1017/S0967199417000120.
102. Li, G. Spermidine suppresses inflammatory DC function by activating the FOXO3 pathway and counteracts autoimmunity / G. Li, H. Ding, X. Yu [et al.] // *iScience.* – 2020. – Vol. – 23(1): 100807. – doi: 10.1016/j.isci.2019.100807.

103. Li, M. Synthesis and biological evaluation of novel alkylated polyamine analogues as potential anticancer agents / M. Li, Y. Wang, C. Ge [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 143. – P. 1732–1743. – doi: 10.1016/j.ejmech.2017.10.069.

104. Li, Q. Synthesis and biological properties of polyamine modified flavonoids as hepatocellular carcinoma inhibitors / Q. Li, Y. Zhai, W. Luo [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2016. – Vol. 121. – P. 110–119. – doi: 10.1016/j.ejmech.2016.04.031.

105. Li, Q. The lead optimization of the polyamine conjugate of flavonoid with a naphthalene motif: synthesis and biological evaluation / Q. Li, Z. X. Zhu, X. Zhang [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2018. – Vol. 146. – P. 564–576. – doi: 10.1016/j.ejmech.2018.01.074.

106. Liu, C. Modulation of polyamine metabolic flux in adipose tissue alters the accumulation of body fat by affecting glucose homeostasis / C. Liu, O. Perez-Leal, C. Barrero [et al.] // *Amino Acids.* – 2014. – Vol. 46(3). – P. 701–715. – doi: 10.1007/s00726-013-1548-3.

107. Liu, F. Increased expression of monoamine oxidase A is associated with epithelial to mesenchymal transition and clinicopathological features in non-small cell lung cancer / F. Liu, L. Hu, Y. Ma [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2018. – Vol. 15(3). – P. 3245–3251. – doi: 10.3892/ol.2017.7683.

108. Liu, X. Risk factors for immune-related adverse events: what have we learned and what lies ahead? / X. Liu, Y. Shi, D. Zhang [et al.] // *Biomark. Res.* – 2021. – Vol. 9(1). – P. 79. – doi: 10.1186/s40364-021-00314-8.

109. Lu, B. Recent advances in fluorescent methods for polyamine detection and the polyamine suppressing strategy in tumor treatment / B. Lu, L. Wang, X. Ran [et al.] // *Biosensors (Basel).* – 2022. – Vol. 12(8): 633. – doi: 10.3390/bios12080633.

110. Lubkowski, J. Mechanism of catalysis by l-asparaginase / J. Lubkowski, J. Vanegas, W. K. Chan [et al.] // *Biochemistry.* – 2020. – Vol. 59(20). – P. 1927–1945. doi: 10.1021/acs.biochem.0c00116.

111. Lukovits, I. On calculation of the detour index / I. Lukovits, M. Razinger // *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* – 1997. – Vol. 37(2). – P. 283–286. – doi: 10.1021/ci960034j.

112. Lukovits, I. The detour index / I. Lukovits // *Croat. Chem. Acta.* – 1996. – Vol. 69. – P. 873–883.
113. Lunt, S. Y. Aerobic glycolysis: meeting the metabolic requirements of cell proliferation / S. Y. Lunt, M. G. Vander Heiden // *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* – 2011. – Vol. 27. – P. 441–464. –doi: 10.1146/annurev-cellbio-092910-154237.
114. Ma, J. A naphthalimide-polyamine conjugate preferentially accumulates in hepatic carcinoma metastases as a lysosome-targeted antimetastatic agent / J. Ma, L. Li, K. Yue [et al.] // *Eur. J. Med. Chem.* – 2021. – Vol. 221: 113469. – doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113469.
115. Madeo, F. Spermidine in health and disease / F. Madeo, T. Eisenberg, F. Pietrocola [et al.] // *Science.* – 2018. – Vol. 359 (6374): eaan2788. – doi: 10.1126/science.aan2788.
116. Madeo, F. Spermidine: a physiological autophagy inducer acting as an anti-aging vitamin in humans? / F. Madeo, M. A. Bauer, D. Carmona-Gutierrez [et al.] // *Autophagy.* – 2019. – Vol. 15(1). – P. 165–168. – doi: 10.1080/15548627.2018.1530929.
117. Maksymiuk, A. W. Spermidine/spermine *N*-acetyltransferase-1 as a diagnostic biomarker in human cancer / A. W. Maksymiuk, D. S. Sitar, R. Ahmed [et al.] // *Future Sci. OA.* – 2018. – Vol. 4(10): FSO345. doi: 10.4155/fsoa-2018-0077.
118. Manna, S. K. Biomarkers of coordinate metabolic reprogramming in colorectal tumors in mice and humans / S. K. Manna, N. Tanaka, K. W. Krausz [et al.] // *Gastroenterology.* – 2014. – Vol. 146(5). – P. 1313–1324. – doi: 10.1053/j.gastro.2014.01.017.
119. Mariño, G. Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A / G. Mariño, F. Pietrocola, T. Eisenberg [et al.] // *Mol. Cell.* – 2014. – Vol. 53(5), – P. 710–725. – doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.016.
120. Marjon, K. MTAP Deletions in cancer create vulnerability to targeting of the MAT2A/PRMT5/RIOK1 axis / K. Marjon, M. J. Cameron, P. Quang [et al.] // *Cell Rep.* – 2016. – Vol. 15(3). – P. 574–587. – doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.043.

121. Marton, L. J. Polyamines as targets for therapeutic intervention / L. J. Marton, A. E. Pegg // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 1995. – Vol. 55–91. – doi: 10.1146/annurev.pa.35.040195.000415.
122. Massaro, C. Investigation of polyamine metabolism and homeostasis in pancreatic cancers / C. Massaro, J. Thomas, Iv. O. Phanstiel // *Med. Sci. (Basel)*. – 2017. – Vol. 5(4): 32. – doi: 10.3390/medsci5040032.
123. Meenu, M. Association of monoamine oxidase A with tumor burden and castration resistance in prostate cancer / M. Meenu, V. K. Verma, A. Seth [et al.] // *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* – 2020. – Vol. 93: 100610. – doi: 10.1016/j.curtheres.2020.100610.
124. Mehndiratta, S. *N*-Methylpropargylamine-conjugated hydroxamic acids as dual inhibitors of monoamine oxidase A and histone deacetylase for glioma treatment / S. Mehndiratta, B. Qian, J. Y. Chuang [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2022. – Vol. 65(3). – P. 2208–2224. – doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c01726.
125. Melnikov, S. Crystal structure of hypusine-containing translation factor eIF5A bound to a rotated eukaryotic ribosome / S. Melnikov, J. Mailliot, B. S. Shin [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2016. – Vol. 428. – P. 3570–3576. – doi: 10.1016/j.jmb.2016.05.011.
126. Mémin, E. Blocking eIF5A modification in cervical cancer cells alters the expression of cancer-related genes and suppresses cell proliferation / E. Mémin, M. Hoque, M. R. Jain [et al.] // *Cancer Res.* – 2014. – Vol. 74(2). – P. 552–562. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0474.
127. Miller-Fleming, L. Remaining mysteries of molecular biology: the role of polyamines in the cell / L. Miller-Fleming, V. Olin-Sandoval, K. Campbell [et al.] // *J. Mol. Biol.* – 2015. – Vol. 427(21). – P. 3389–3406. – doi: 10.1016/j.jmb.2015.06.020.
128. Minois, N. Molecular basis of the ‘anti-aging’ effect of spermidine and other natural polyamines – a mini-review / N. Minois // *Gerontology*. – 2014. – Vol. 60. – P. 319–326.
129. Miska, J. Polyamines drive myeloid cell survival by buffering intracellular pH to promote immunosuppression in glioblastoma / J. Miska, A. Rashidi, C. Lee-Chang [et al.] // *Sci Adv.* – 2021. – Vol. 7(8): eabc8929. – doi: 10.1126/sciadv.abc8929.

130. Mohammed, A. Eflornithine (DFMO) prevents progression of pancreatic cancer by modulating ornithine decarboxylase signaling / A. Mohammed, N. B. Janakiram, V. Madka [et al.] // *Cancer Prev. Res. (Phila)*. – 2014. – Vol. 7(12). – P. 1198–1209. – doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-14-0176.

131. Mondanelli, G. A relay pathway between arginine and tryptophan metabolism confers immunosuppressive properties on dendritic cells / G. Mondanelli, R. Bianchi, M. T. Pallotta [et al.] // *Immunity*. – 2017. – Vol. 46(2). – P. 233–244. – doi: 10.1016/j.immuni.2017.01.005.

132. Muramatsu, T. The hypusine cascade promotes cancer progression and metastasis through the regulation of RhoA in squamous cell carcinoma / T. Muramatsu, K. I. Kozaki, S. Imoto [et al.] // *Oncogene*. – 2016. – Vol. 35(40). – P. 5304–5316. – doi: 10.1038/onc.2016.71.

133. Murray-Stewart, T. Polyamine catabolism and oxidative damage / T. Murray Stewart, T. T. Dunston, P. M. Woster [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2018. – Vol. 293(48). – P. 18736–18745. – doi: 10.1074/jbc.TM118.003337.

134. Murray-Stewart T. R. Targeting polyamine metabolism for cancer therapy and prevention / T. R. Murray-Stewart, P. M. Woster, R. A. Jr. Casero // *Biochem. J.* – 2016. – Vol. 473(19). – P. 2937–2953. – doi: 10.1042/BCJ20160383.

135. Murray-Stewart, T. Regulation of polyamine metabolism by curcumin for cancer prevention and therapy / T. Murray-Stewart, R. A. Casero // *Med. Sci. (Basel)*. – 2017. – Vol. 5(4): 38. doi: 10.3390/medsci5040038.

136. Musso, M. Effects of chain length modification and bis(ethyl) substitution of spermine analogs on purine-purine-pyrimidine triplex DNA stabilization, aggregation, and conformational transitions / M. Musso, T. Thomas, A. Shirahata [et al.] // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36(6). – P. 1441–1449. – doi: 10.1021/bi9624494. PMID: 9063892.

137. Muth, A. Polyamine transport inhibitors: design, synthesis, and combination therapies with difluoromethylornithine / A. Muth, M. Madan, J. J. Archer [et al.] // *J. Med. Chem.* – 2014. – Vol. 57(2). – P. 348–363. – doi: 10.1021/jm401174a.

138. Namba, T. Extracellular and Intracellular Signaling for Neuronal Polarity / T. Namba, Y. Funahashi, S. Nakamuta [et al.] // *Physiol. Rev.* – 2015. – Vol. 95(3). – P. 995–1024. – doi: 10.1152/physrev.00025.2014.
139. Neborak, E. V. Anticancer cytotoxic activity of bispidine derivatives associated with the increasing catabolism of polyamines / E. V. Neborak, A. B. Kaldybayeva, L. Bey [et al.] // *Molecules.* – 2022. – Vol. 27 (12): 3872. – doi: 10.3390/molecules27123872.
140. Neborak, E. V. The use of computational methods for design of polyamine-targeted synthetic compounds with antitumor activity / E. V. Neborak, S. P. Syatkin, Y. S. Gushchina [et al.] // *FEBS Open Bio.* – 2021. – Vol. 11 (Suppl. S1). – P. 300–301. – doi: 10.1002/2211-5463.13205.
141. Nichols, C. G. Polyamines and potassium channels: A 25-year romance / C. G. Nichols, S. J. Lee // *J. Biol. Chem.* – 2018. – Vol. 293(48). – P. 18779–18788. – doi: 10.1074/jbc.TM118.003344.
142. Nordio, G. From monoamine oxidase inhibition to antiproliferative activity: new biological perspectives for polyamine analogs / G. Nordio, F. Piazzola, G. Cozza [et al.] // *Molecules.* – 2023. – Vol. 28(17): 6329. – doi: 10.3390/molecules28176329.
143. Novita Sari, I. Metabolism and function of polyamines in cancer progression / I. Novita Sari, T. Setiawan, K. Seock Kim [et al.] // *Cancer Lett.* – 2021. – Vol. 519. – P. 91–104. – doi: 10.1016/j.canlet.2021.06.020.
144. Origanti, S. Ornithine decarboxylase mRNA is stabilized in an mTORC1-dependent manner in Ras-transformed cells / S. Origanti, S. L. Nowotarski, T. D. Carr [et al.] // *Biochem. J.* – 2012. – Vol. 442(1). – P. 199–207. – doi: 10.1042/BJ20111464.
145. Ou, Y. Activation of SAT1 engages polyamine metabolism with p53-mediated ferroptotic responses / Y. Ou, S. J. Wang, D. Li [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2016. – Vol. 113(44). – P. E6806–E6812. – doi: 10.1073/pnas.1607152113.
146. Palanimurugan, R. Polyamines regulate their synthesis by inducing expression and blocking degradation of ODC antizyme / R. Palanimurugan, H. Scheel, K. Hofmann [et al.] // *EMBO J.* – 2004. – Vol. 23. – P. 4857–4867.



147. Park, M. H. Polyamines and their metabolites as diagnostic markers of human diseases / M. H. Park, K. Igarashi // *Biomol Ther (Seoul)*. – 2013. – Vol. 21(1). – P. 1–9. – doi: 10.4062/biomolther.2012.097.
148. Pasini, A. Chromatin remodeling by polyamines and polyamine analogs / A. Pasini, C. M. Caldarera, E. Giordano // *Amino Acids*. – 2014. – Vol. 46(3). – P. 595–603. – doi: 10.1007/s00726-013-1550-9.
149. Patel, C. Treatment with polyamine oxidase inhibitor reduces microglial activation and limits vascular injury in ischemic retinopathy / C. Patel, Z. Xu, E. Shosha [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta*. – 2016. – Vol. 1862(9). – P. 1628–1639. – doi: 10.1016/j.bbadis.2016.05.020.
150. Pegg, A. E. S-Adenosylmethionine decarboxylase / A. E. Pegg // *Essays Biochem*. – 2009. – Vol. 46. – P. 25–45.
151. Pegg, A. E. Spermidine/spermine-N(1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator / A. E. Pegg // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. – 2008. – Vol. 294 (6). – P. E995–E1010. – doi: 10.1152/ajpendo.90217.2008.
152. Peng, Q. The emerging clinical role of spermine in prostate cancer / Q. Peng, C. Y. Wong, I. W. Cheuk [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. – 2021. – Vol. 22(9): 4382. doi: 10.3390/ijms22094382.
153. Phanstiel, O. 4th. An overview of polyamine metabolism in pancreatic ductal adenocarcinoma / O. Phanstiel 4<sup>th</sup> // *Int. J. Cancer*. – 2018. – Vol. 142(10). – P. 1968–1976. – doi: 10.1002/ijc.31155.
154. Pichavaram, P. Targeting polyamine oxidase to prevent excitotoxicity-induced retinal neurodegeneration / P. Pichavaram, C. D. Palani, C. Patel [et al.] // *Front. Neurosci*. – 2019. – Vol. 12: 956. – doi: 10.3389/fnins.2018.00956.
155. Pietrocola, F. Caloric restriction mimetics enhance anticancer immunosurveillance / F. Pietrocola, J. Pol, E. Vacchelli [et al.] // *Cancer Cell*. – 2016. – Vol. 30(1). – P. 147–160. – doi: 10.1016/j.ccell.2016.05.016.
156. Pietrocola, F. Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300 / F. Pietrocola, S. Lachkar, D. P. Enot [et al.] // *Cell Death Differ*. – 2015. – Vol. 22(3). – P. 509–516. – doi: 10.1038/cdd.2014.215.

157. Ploskonos, M. V. Polyamine analogues of propanediamine series inhibit prostate tumor cell growth and activate the polyamine catabolic pathway / M. V. Ploskonos, S. P. Syatkin, E. V. Neborak [et al.] // *Anticancer Research*. – 2020. – Vol. 40 (3). – P. 1437-1441. – doi: 10.21873/anticancer.14085.
158. Plyasova, A. A. Penetration into cancer cells via clathrin-dependent mechanism allows L-asparaginase from *Rhodospirillum rubrum* to inhibit telomerase / A. A. Plyasova, M. V. Pokrovskaya, O. M. Lisitsyna [et al.] // *Pharmaceuticals (Basel)*. – 2020. – Vol. 13 (10). – doi: 10.3390/ph13100286.
159. *Polyamines Methods and Protocols*. Edited by Rubén Alcázar and Antonio F. Tiburcio. Humana Press, 2018. P 510. – doi: 10.1007/978-1-4939-7398-9.
160. Porter, C. W. Spermidine requirement for cell proliferation in eukaryotic cells: structural specificity and quantitation / C. W. Porter, R. J. Bergeron // *Science*. – 1983. – Vol. 219(4588). – P. 1083–1085. doi: 10.1126/science.6823570. PMID: 6823570.
161. Provenzano, B. Evaluation of polyamines as marker of melanoma cell proliferation and differentiation by an improved high-performance liquid chromatographic method / B. Provenzano, A. Lentini, R. Tatti [et al.] // *Amino Acids*. – 2019. – Vol. 51(10-12). – P. 1623–1631. – doi: 10.1007/s00726-019-02799-y.
162. Puleston, D. J. Polyamine metabolism is a central determinant of helper T cell lineage fidelity / D. J. Puleston, F. Baixauli, D. E. Sanin [et al.] // *Cell*. – 2021. – Vol. 184(16). – P. 4186–4202. – doi: 10.1016/j.cell.2021.06.007.
163. Puleston, D. J. Polyamines and eIF5A hypusination modulate mitochondrial respiration and macrophage activation / D. J. Puleston, M. D. Buck, R. I. Klein Geltink [et al.] // *Cell. Metab.* – 2019. – Vol. 30(2). – P. 352–363.e8. – doi: 10.1016/j.cmet.2019.05.003.
164. Raina, A. Biosynthesis of putrescine: Characterization of ornithine decarboxylase from regenerating rat liver / A. Raina, J. Janne // *Acta Chem. Scand.* – 1968. – Vol. 22. – P. 2375–2378.
165. Ramani, D. Aliphatic polyamines in physiology and diseases / D. Ramani, J. P. De Bandt, L. Cynober // *Clin. Nutr.* – 2014. – Vol. 33 (1). – P. 14–22. – doi: 10.1016/j.clnu.2013.09.019.

166. Raul, F. Follow-up of tumor development in the colons of living rats and implications for chemoprevention trials: assessment of aspirin-difluoromethylornithine combination / F. Raul, F. Gosse, A. B. Osswald [et al.] // *Int. J. Oncol.* – 2007. – Vol. 31(1). – P. 89–95.
167. Ray, R. M. Interaction of polyamines and mTOR signaling in the synthesis of antizyme (AZ) / R. M. Ray, M. Bavaria, L. R. Johnson // *Cell Signal.* – 2015. – Vol. 1850–1859. – doi: 10.1016/j.cellsig.2015.06.002.
168. Ray, R. M. Spermine, a molecular switch regulating EGFR, integrin  $\beta$ 3, Src, and FAK scaffolding / R. M. Ray, C. Li, S. Bhattacharya [et al.] // *Cell Signal.* – 2012. – Vol. 24(4). – P. 931–942. – doi: 10.1016/j.cellsig.2011.12.016.
169. Roberts, S. Parasite polyamines as pharmaceutical targets / S. Roberts, B. Ullman // *Curr. Pharm. Des.* – 2017. – Vol. 23(23). – P. 3325–3341. – doi: 10.2174/1381612823666170601101644.
170. Roy, U. K. Activated K-RAS increases polyamine uptake in human colon cancer cells through modulation of caveolar endocytosis / U. K. Roy, N. S. Rial, K. L. Kachel [et al.] // *Mol. Carcinog.* – 2008. – Vol. 47(7). – P. 538–553. – doi: 10.1002/mc.20414.
171. Rozov, A. The role of polyamine-dependent facilitation of calcium permeable AMPARs in short-term synaptic enhancement / A. Rozov, Y. Zakharova, A. Vazetdinova [et al.] // *Front. Cell. Neurosci.* – 2018. – Vol. 12: 345. – doi: 10.3389/fncel.2018.00345.
172. Ruan, H. The upstream open reading frame of the mRNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase is a polyamine-responsive translational control element / H. Ruan, L. M. Shantz, A. E. Pegg [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 1996. – Vol. 271. – P. 29576–29582.
173. Sala-Rabanal, M. Polyamine transport by the polyspecific organic cation transporters OCT1, OCT2, and OCT3 / M. Sala-Rabanal, D. C. Li, G. R. Dake [et al.] // *Mol. Pharm.* – 2013. – Vol. 10(4). – P. 1450–1458. – doi: 10.1021/mp400024d.

174. Sánchez-Jiménez, F. Polyamines in mammalian pathophysiology / F. Sánchez-Jiménez, M. Á. Medina, L. Villalobos-Rueda [et al.] // *Cell Mol. Life Sci.* – 2019. – Vol. 76(20). – P. 3987–4008. – doi: 10.1007/s00018-019-03196-0.
175. Sekhar, V. ATP13A3 facilitates polyamine transport in human pancreatic cancer cells / V. Sekhar, T. Andl, O. Phanstiel 4<sup>th</sup> // *Sci. Rep.* – 2022. – Vol. 12 (1): 4045. – doi: 10.1038/s41598-022-07712-4.
176. Sharma, D. Insights into the microbial L-asparaginases: from production to practical applications / D. Sharma, K. Singh, K. Singh [et al.] // *Curr. Protein Pept. Sci.* – 2019. – Vol. 20(5). – P. 452–464. doi: 10.2174/1389203720666181114111035.
177. Sharpe, M. A. Monoamine oxidase B levels are highly expressed in human gliomas and are correlated with the expression of HiF-1 $\alpha$  and with transcription factors Sp1 and Sp3 / M. A. Sharpe, D. S. Baskin // *Oncotarget.* – 2016. – Vol. 7(3). – P. 3379–3393. – doi: 10.18632/oncotarget.6582.
178. Shin, B. S. Amino acid substrates impose polyamine, eIF5A, or hypusine requirement for peptide synthesis / B. S. Shin, T. Katoh, E. Gutierrez [et al.] // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – Vol. 45. – P. 8392–8402. – doi: 10.1093/nar/gkx532.
179. Sievert, H. A novel mouse model for inhibition of DOHH-mediated hypusine modification reveals a crucial function in embryonic development, proliferation and oncogenic transformation / H. Sievert, N. Pällmann, K. K. Miller [et al.] // *Dis. Model. Mech.* – 2014. – Vol. 7(8). – P. 963–976. – doi: 10.1242/dmm.014449.
180. Singh, B. P. Spermine and spermidine act as chemical chaperones and enhance chaperone-like and membranolytic activities of major bovine seminal plasma protein, PDC-109 / B. P. Singh, I. Saha, I. Nandi [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 493. – P. 1418–1424.
181. Singh, K. Ornithine decarboxylase in macrophages exacerbates colitis and promotes colitis-associated colon carcinogenesis by impairing M1 immune responses / K. Singh, L. A. Coburn, M. Asim [et al.] // *Cancer Res.* – 2018. – Vol. 78(15). – P. 4303–4315. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0116.
182. Sjögren, T. The structure of murine N<sup>1</sup>-acetylspermine oxidase reveals molecular details of vertebrate polyamine catabolism / T. Sjögren, C. M. Wassvik, A.

Snijder [et al.] // *Biochemistry*. – 2017. – Vol. 56(3). – P. 458–467. – doi: 10.1021/acs.biochem.6b01140.

183. Smith, M. A. Separation and quantitation of polyamines in plant tissue by high performance liquid chromatography of their dansyl derivatives / M. A. Smith, P. J. Davies // *Plant Physiol.* – 1985. – Vol. 78(1). – P. 89–91. – doi: 10.1104/pp.78.1.89.

184. Soda, K. The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread / K. Soda // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2011. – Vol. 30(1): 95. – doi: 10.1186/1756-9966-30-95.

185. Soda, K. Increased polyamine intake inhibits age-associated alteration in global DNA methylation and 1,2-dimethylhydrazine-induced tumorigenesis / K. Soda, Y. Kano, F. Chiba [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8(5): e64357. – doi: 10.1371/journal.pone.0064357.

186. Song, J. Serum polyamine metabolic profile in autoimmune thyroid disease patients / J. Song, Z. Shan, J. Mao [et al.] // *Clin. Endocrinol. (Oxf)*. – 2019. – Vol. 90(5). – P. 727–736. – doi: 10.1111/cen.13946.

187. Soussi, T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation / T. Soussi // *Ann N. Y. Acad. Sci.* – 2000. – Vol. 910. – P. 121–137. doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb06705.x.

188. Sungrapova, K. Polyamine analogues are capable to inhibit the prostate cancer cells proliferation / K. Sungrapova, M. Ploskonos, A. Hilal [et al.] // *FEBS Open Bio*. – 2019. – Vol. 9 (Suppl. 1). – P. 359–360. – doi: 10.1002/2211-5463.12675.

189. Syatkin, S. P. The investigation of structure-activity relationship of polyamine-targeted synthetic compounds from different chemical groups / S. P. Syatkin, E. V. Neborak, A. I. Khlebnikov [et al.] // *Amino Acids*. – 2020. – Vol. 52(2). – P. 199–211. – doi: 10.1007/s00726-019-02778-3.

190. Takahashi T., Tong W. (2015) Polyamines: A universal molecular nexus for growth, survival, and specialized metabolism. In: K. Kusano, K. Tomonobu, K. Suzuki, K. Hideyuki (eds) *Polyamines*. Springer, Japan, pp 1–336.

191. Takeuchi, T. Vesicular polyamine transporter mediates vesicular storage and release of polyamine from mast cells / T. Takeuchi, Y. Harada, S. Moriyama [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2017. – Vol. 292 (9). P. 3909–3918. – doi: 10.1074/jbc.M116.756197.
192. Thakur, V. S. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1 is a gene-specific transcriptional regulator that drives brain tumor aggressiveness / V. S. Thakur, B. Aguila, A. Brett-Morris [et al.] // *Oncogene.* – 2019. – Vol. 38(41). – P. 6794–6800. doi: 10.1038/s41388-019-0917-0.
193. Thomas, T. J. Cellular and animal model studies on the growth inhibitory effects of polyamine analogues on breast cancer / T. J. Thomas, T. Thomas // *Med. Sci. (Basel).* – 2018. – Vol. 6(1): 24. – doi: 10.3390/medsci6010024.
194. Thomas, T. J. Tamoxifen metabolite endoxifen interferes with the polyamine pathway in breast cancer / T. J. Thomas, T. Thomas, S. John [et al.] // *Amino Acids.* – 2016. – Vol. 48(10). – P. 2293–2302. doi: 10.1007/s00726-016-2300-6.
195. Tse, R. T. The potential role of spermine and its acetylated derivative in human malignancies / R. T. Tse, C. Y. Wong, P. K. Chiu [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – Vol. 23(3): 1258. doi: 10.3390/ijms23031258.
196. van Veen, S. ATP13A2 deficiency disrupts lysosomal polyamine export / S. van Veen, S. Martin, C. Van den Haute [et al.] // *Nature.* – 2020. – Vol. 578 (7795). – P. 419–424. – doi: 10.1038/s41586-020-1968-7.
197. Vannier-Santos, M. A. Role of polyamines in parasite cell architecture and function / M. A. Vannier-Santos, A. M. Suarez-Fontes // *Curr. Pharm. Des.* – 2017. – Vol. 23(23). – P. 3342–3358. – doi: 10.2174/1381612823666170703163458.
198. Vélez, N. Molecular characterization of *Shigella sonnei* isolates recovered by the laboratory surveillance program for acute diarrheal disease in Colombia / N. Vélez, P. L. Díaz, C. Rodríguez [et al.] // *Biomedica.* – 2015. – Vol. 35(3). – P. 395–406. – doi: 10.7705/biomedica.v35i3.2622. PMID: 26849701.
199. Venäläinen, M. K. Altered polyamine profiles in colorectal cancer / M. K. Venäläinen, A. N. Roine, M. R. Häkkinen [et al.] // *Anticancer Res.* – 2018. – Vol. 38(6). – P. 3601–3607. – doi: 10.21873/anticancerres.12634.

200. Vijayanathan, V. Innovative approaches to the use of polyamines for DNA nanoparticle preparation for gene therapy / V. Vijayanathan, E. Agostinelli, T. Thomas [et al.] // *Amino Acids*. – 2014. – Vol. 46(3). – P. 499–509. doi: 10.1007/s00726-013-1549-2.
201. Wagner, A. Metabolic modeling of single Th17 cells reveals regulators of autoimmunity / A. Wagner, C. Wang, J. Fessler [et al.] // *Cell*. – 2021. – Vol. 184(16). – P. 4168–4185. – doi: 10.1016/j.cell.2021.05.045.
202. Wang, C. Spermidine/spermine N1-acetyltransferase regulates cell growth and metastasis via AKT/ $\beta$ -catenin signaling pathways in hepatocellular and colorectal carcinoma cells / C. Wang, P. Ruan, Y. Zhao [et al.] // *Oncotarget*. – 2017. – Vol. 8(1). – P. 1092–1109. – doi: 10.18632/oncotarget.13582.
203. Wang, Q. Determination of the levels of two types of neurotransmitter and the anti-migraine effects of different dose-ratios of *Ligusticum chuanxiong* and *Gastrodia elata* / Q. Wang, L. Shen, S. Y. Ma et al. // *J. Food Drug Anal.* – 2016. – Vol. 24(1). – P. 189–198. doi: 10.1016/j.jfda.2015.08.005.
204. Wang, Q. Polyamine analog TBP inhibits proliferation of human K562 chronic myelogenous leukemia cells by induced apoptosis / Q. Wang, Y. L. Wang, K. Wang [et al.] // *Oncol. Lett.* – 2015. – Vol. 9(1). – P. 278–282. – doi: 10.3892/ol.2014.2615.
205. Wang, X. Arginine decarboxylase and agmatinase: An alternative pathway for de novo biosynthesis of polyamines for development of mammalian conceptuses / X. Wang, W. Ying, K. A. Dunlap [et al.] // *Biol. Reprod.* – 2014. – Vol. 90. – P. 84.
206. Wang, X. Studies of the mechanism by which increased spermidine/spermine N1-acetyltransferase activity increases susceptibility to skin carcinogenesis / X. Wang, D. J. Feith, P. Welsh [et al.] // *Carcinogenesis*. – 2007. – Vol. 28(11). – P. 2404–2411. – doi: 10.1093/carcin/bgm162.
207. Wang, X. Targeting monoamine oxidase A for T cell-based cancer immunotherapy / X. Wang, B. Li, Y. J. Kim [et al.] // *Sci. Immunol.* – 2021. – Vol. 6(59): eabh2383. – doi: 10.1126/sciimmunol.abh2383.

208. Wang, Y. Mammalian polyamine catabolism: a therapeutic target, a pathological problem, or both? / Y. Wang, R. A. Jr. Casero // *J. Biochem.* – 2006. – Vol. 139(1). – P. 17–25. doi: 10.1093/jb/mvj021.
209. Weeks, R. S. Novel lysine-spermine conjugate inhibits polyamine transport and inhibits cell growth when given with DFMO / R. S. Weeks, S. M. Vanderwerf, C. L. Carlson [et al.] // *Exp. Cell. Res.* – 2000. – Vol. 261(1). – P. 293–302. – doi: 10.1006/excr.2000.5033.
210. Wei, W. Synergistic antitumor efficacy of gemcitabine and cisplatin to induce ferroptosis in pancreatic ductal adenocarcinoma via Sp1-SAT1-polyamine metabolism pathway / W. Wei, Y. Lu, Q. Hu [et al.] // *Cell Oncol. (Dordr.)*. – 2023. – doi: 10.1007/s13402-023-00870-1.
211. Wei, Z. X. Effects of spermidine on cell proliferation, migration, and inflammatory response in porcine enterocytes / Z. X. Wei, L. Cai, X. M. Zhao [et al.] // *Front. Biosci. (Landmark Ed.)*. – 2022. – Vol. 27(6): 194. – doi: 10.31083/j.fbl2706194.
212. White, E. The role for autophagy in cancer / E. White // *J. Clin. Invest.* – 2015. – Vol. 125(1). – P. 42–46. – doi: 10.1172/JCI73941.
213. Wiener, H. Structural determination of paraffin boiling points / H. Wiener // *J. Am. Chem. Soc.* – 1947. – Vol. 69(1). – P. 17-20. doi: 10.1021/ja01193a005.
214. Wolchok, J. D. Overall survival with combined nivolumab and Ipilimumab in advanced melanoma / J. D. Wolchok, V. Chiarion-Sileni, R. N. Gonzalez [et al.] // *Engl. J. Med.* – 2017. – Vol. 377(14). – P. 1345–1356. – doi: 10.1056/NEJMoa1709684.
215. Wu, J. B. Monoamine oxidase A mediates prostate tumorigenesis and cancer metastasis / J. B. Wu, C. Shao, X. Li [et al.] // *J. Clin. Invest.* – 2014. – Vol. 124(7). – P. 2891–1908. – doi: 10.1172/JCI70982.
216. Wu, R. De novo synthesis and salvage pathway coordinately regulate polyamine homeostasis and determine T cell proliferation and function / R. Wu, X. Chen, S. Kang [et al.] // *Sci. Adv.* – 2020. – Vol. 6(51): eabc4275. – doi: 10.1126/sciadv.abc4275.



217. Xuan, M. Polyamines: their significance for maintaining health and contributing to diseases / M. Xuan, X. Gu, J. Li [et al.] // *Cell Commun. Signal.* – 2023. – Vol. 21(1): 348. – doi: 10.1186/s12964-023-01373-0.

218. Yamashita, T. Role of polyamines at the G1/S boundary and G2/M phase of the cell cycle / T. Yamashita, K. Nishimura, R. Saiki [et al.] // *Int. J. Biochem. – Cell Biol.* – 2013. – Vol. 45(6). – P. 1042–1050. – doi: 10.1016/j.biocel.2013.02.021.

219. Yang, J. L. Cycloartane-type triterpenoids and sesquiterpenoids from the resinous exudates of *Commiphora opobalsamum* / J. L. Yang, Y. P. Shi // *Phytochemistry.* – 2012. – Vol. 76. – P. 124–132. – doi: 10.1016/j.phytochem.2012.01.004.

220. Yang, Y. C. Monoamine oxidase B expression correlates with a poor prognosis in colorectal cancer patients and is significantly associated with epithelial-to-mesenchymal transition-related gene signatures / Y. C. Yang, M. H. Chien, T. C. Lai [et al.] // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. – Vol. 21(8): 2813. – doi: 10.3390/ijms21082813.

221. Yang, Y. Induction of autophagy by spermidine is neuroprotective via inhibition of caspase 3-mediated Beclin 1 cleavage / Y. Yang, S. Chen, Y. Zhang [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2017. – Vol. 8(4): e2738. – doi: 10.1038/cddis.2017.161.

222. Yee, W. T. Information theory of molecular properties. I. A theoretical study of the information content of organic molecules / W. T. Yee, K. Sakamoto, Y. J. Ihaya // *Rept. Univ. Electrocomm.* – 1977. – Vol. 27. – P. 53–63.

223. Yu, C. H. Uncovering protein polyamination by the spermine-specific antiserum and mass spectrometric analysis / C. H. Yu, C. C. Chou, Y. J. Lee [et al.] // *Amino Acids.* – 2015. – Vol. 47(3). – P. 469–481. – doi: 10.1007/s00726-014-1879-8.

224. Yue, F. Spermidine prolongs lifespan and prevents liver fibrosis and hepatocellular carcinoma by activating MAP1S-mediated autophagy / F. Yue, W. Li, J. Zou [et al.] // *Cancer Res.* – 2017. – Vol. 77(11). – P. 2938–2951. – doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-3462.

225. Yunna, C. Macrophage M1/M2 polarization / C. Yunna, H. Mengru, W. Lei [et al.] // *Eur. J. Pharmacol.* – 2020. – Vol. 877: 173090. – doi: 10.1016/j.ejphar.2020.173090.

226. Yurdagul, A. Jr. Macrophage metabolism of apoptotic cell-derived arginine promotes continual efferocytosis and resolution of injury / A. Jr. Yurdagul, M. Subramanian, X. Wang [et al.] // *Cell. Metab.* – 2020. – Vol. 31(3). – P. 518–533.e10. – doi: 10.1016/j.cmet.2020.01.001.

227. Zhang, P. Therapeutic targeting of tumor-associated myeloid cells synergizes with radiation therapy for glioblastoma / P. Zhang, J. Miska, C. Lee-Chang [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2019. – Vol. 116(47). – P. 23714–23723. – doi: 10.1073/pnas.1906346116.

228. Zhdanov, D. D. Rhodospirillum rubruml-asparaginase targets tumor growth by a dual mechanism involving telomerase inhibition / D. D. Zhdanov, V. S. Pokrovsky, M. V. Pokrovskaya [et al.] // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2017. – Vol. 492(2). – P. 282–288. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.08.078.

229. Zou, Z. Induction of reactive oxygen species: an emerging approach for cancer therapy / Z. Zou, H. Chang, H. Li [et al.] // *Apoptosis.* – 2017. – Vol. 22(11). – P. 1321–1335. doi: 10.1007/s10495-017-1424-9.

230. Zwihaft, Z. Circadian clock control by polyamine levels through a mechanism that declines with age / Z. Zwihaft, R. Aviram, M. Shalev [et al.] // *Cell Metab.* – 2015. – Vol. 22(5). – P. 874–85. – doi: 10.1016/j.cmet.2015.0

## БЛАГОДАРНОСТИ

- Покровскому В.С. (д.м.н.) – за содействие в проведении исследований и поддержку в период освоения программы аспирантуры;
- Жданову Д.Д. (д.б.н.) – за организацию и содействие в проведении исследований на клеточных линиях;
- Хлебникову А.И. (д.х.н.) – за помощь в применении методики докинга;
- Комаровой М.В. (д.ф-м.н.) – за помощь в проведении статистической обработки полученных результатов;
- Солдатенкову А.Т. (д.х.н.) и Левову А.Н. (к.х.н.) – за синтез и предоставление химических соединений для тестирования, а также ценные рекомендации;
- Попову П.И. (к.б.н.) – за консультации по ККСА;
- Плосконос М.В. (д.б.н.), Неборак Е.В. (к.б.н.) – за помощь в подготовке публикаций и обмен опытом.