

УДК 547.756,577.19,577.29,616-006.484

ВЛИЯНИЕ 3-АЦЕТИЛ-5-ГИДРОКСИ-2-МЕТИЛИНДОЛА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И МЕТАБОЛИЗМ КЛЕТОК ГЛИОМЫ

**Я. В. ПАНАДА¹⁾, В. А. КЛОПОВА¹⁾, Т. А. КУЛАГОВА²⁾,
Я. В. ФАЛЕТРОВ^{1), 3)}, М. С. ХОРЕЦКИЙ¹⁾, Н. С. ФРОЛОВА¹⁾,
С. В. КОРЕНЬ⁴⁾, Е. Г. ФОМИНА⁴⁾, В. М. ШКУМАТОВ^{1), 3)}**

¹⁾Научно-исследовательский институт физико-химических проблем БГУ,
ул. Ленинградская, 14, 220006, г. Минск, Беларусь

²⁾Институт ядерных проблем БГУ, ул. Бобруйская, 11, 220006, г. Минск, Беларусь

³⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

⁴⁾Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии,
ул. Филимонова, 23, 220114, г. Минск, Беларусь

Получен 3-ацетилированный аналог 5-гидроксииндола. Изучено его влияние на функции клеток глиомы крысы линии С6. Выявлено, что 3-ацетил-5-гидрокси-2-метилиндола в концентрации 10 мкмоль/л вызывает резкое уменьшение митохондриального мембранного потенциала, стимулирует процессы аутофагии и снижает проли-

Образец цитирования:

Панада ЯВ, Клопова ВА, Кулагова ТА, Фалетров ЯВ, Хорецкий МС, Фролова НС, Корень СВ, Фомина ЕГ, Шкуматов ВМ. Влияние 3-ацетил-5-гидрокси-2-метилиндола на пролиферацию и метаболизм клеток глиомы. *Журнал Белорусского государственного университета. Химия*. 2022; 1:43–52.

<https://doi.org/10.33581/2520-257X-2022-1-43-52>

For citation:

Panada JU, Klopava VA, Kulahava TA, Faletrov YV, Horetski MS, Frolova NS, Koran SV, Fomina EG, Shkumatov VM. Influence of 3-acetyl-5-hydroxy-2-methylindole on glioma cell proliferation and metabolism. *Journal of the Belarusian State University. Chemistry*. 2022;1:43–52. Russian.

<https://doi.org/10.33581/2520-257X-2022-1-43-52>

Авторы:

Ян Владимирович Панада – младший научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов.

Валерия Андреевна Клопова – стажер младшего научного сотрудника лаборатории биохимии лекарственных препаратов.

Татьяна Александровна Кулагова – кандидат биологических наук; ведущий научный сотрудник лаборатории наноэлектромagnetизма.

Ярослав Вячеславович Фалетров – кандидат химических наук, доцент; ведущий научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов¹⁾, доцент кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета³⁾.

Матвей Сергеевич Хорецкий – младший научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов.

Нина Степановна Фролова – научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов.

Сергей Викторович Корень – научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточной биотехнологии.

Елена Георгиевна Фомина – кандидат биологических наук; заведующий лабораторией иммунологии и клеточной биотехнологии.

Владимир Макарович Шкуматов – член-корреспондент НАН Беларуси, доктор биологических наук, профессор; главный научный сотрудник лаборатории биохимии лекарственных препаратов¹⁾, профессор кафедры высокомолекулярных соединений химического факультета³⁾.

Authors:

Jan U. Panada, junior researcher at the laboratory of biochemistry of drugs.

panada@bsu.by

Valeriya A. Klopava, junior researcher trainee at the laboratory of biochemistry of drugs.

bsu.valeria.kl@gmail.com

Tatsiana A. Kulahava, PhD (biology); leading researcher at the laboratory of nanoelectromagnetism.

tatyana_kulagova@tut.by

Yaroslav V. Faletrov, PhD (chemistry), docent; leading researcher at the laboratory of biochemistry of drugs^a and associate professor at the department of macromolecular compounds, faculty of chemistry^c.

yaroslav82@tut.by

Matvey S. Horetski, junior researcher at the laboratory of biochemistry of drugs.

matvey.horetski@gmail.com

Nina S. Frolova, researcher at the laboratory of biochemistry of drugs.

frolova_n_2006@bk.ru

Siarhei V. Koran, researcher at the laboratory for immunology and cell biotechnology.

korensv@tut.by

Elena G. Fomina, PhD (biology); head of the laboratory for immunology and cell biotechnology.

feg1@tut.by

<https://orcid.org/0000-0003-3028-1176>

Vladimir M. Shkumatov, corresponding member of the National Academy of Sciences of Belarus, doctor of science (biology), full professor; chief researcher at the laboratory of biochemistry of drugs^a and professor at the department of macromolecular compounds, faculty of chemistry^c.

biopharm@bsu.by

ферацию клеток глиомы. Предположено, что 3-ацетил-5-гидрокси-2-метилиндо́л обладает таким же механизмом действия, как и ингибитор клеточного дыхания ротенон.

Ключевые слова: 5-гидроксииндол; глиома; аутофагия; митохондриальный трансмембранный потенциал; ротенон.

Благодарность. Данная работа была выполнена при финансовой поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (грант № X20M-113).

INFLUENCE OF 3-ACETYL-5-HYDROXY-2-METHYLINDOLE ON GLIOMA CELL PROLIFERATION AND METABOLISM

J. U. PANADA^a, V. A. KLOPAVA^a, T. A. KULAHAVA^b,
Y. V. FALETROV^{a, c}, M. S. HORETSKI^a, N. S. FROLOVA^a,
S. V. KORAN^d, E. G. FOMINA^d, V. M. SHKUMATOV^{a, c}

^aResearch Institute for Physical Chemical Problems, Belarusian State University,
14 Lieninhradskaja Street, Minsk 220006, Belarus

^bInstitute for Nuclear Problems, Belarusian State University,
11 Babrujskaja Street, Minsk 220006, Belarus

^cBelarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^dRepublican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology,
23 Filimonava Street, Minsk 220114, Belarus

Corresponding author: V. M. Shkumatov (biopharm@bsu.by)

A 3-acetyl analogue of 5-hydroxyindole was synthesised and evaluated for its effects on rat C6 glioma cell functions. It was found that 3-acetyl-5-hydroxy-2-methylindole at 10 $\mu\text{mol/L}$ led to a sharp reduction of mitochondrial membrane potential, induction of autophagy and decrease of proliferation of C6 glioma cells. The compound's effect was comparable to that of rotenone, an inhibitor of cell respiration.

Keywords: 5-hydroxyindole; glioma; autophagy; mitochondrial transmembrane potential; rotenone.

Acknowledgements. This work was supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grant No. X20M-113).

Введение

Глиомы и глиобластомы человека – одни из наиболее распространенных вариантов злокачественных опухолей головного мозга, которые характеризуются высокой смертностью и труднодоступностью для терапии [1]. Ввиду необходимости систематического лечения с одновременным применением хирургических, радио- и химиотерапевтических методов терапия глиом и глиобластом остается малоэффективной. Актуальной является проблема поиска новых химиотерапевтических препаратов для лечения глиом. Известно, что метаболиты 5-гидрокситриптофана: 5-гидроксииндол, *N*-ацетилсеротонин и 5-гидроксииндолацетат – выполняют важные регуляторные, антиоксидантные и нейропротекторные функции в мозге при нормальных условиях и при патологии [2; 3]. Для различных типов опухолей, в том числе трансформированных клеток предстательной и молочной желез, печени, кишечника и головного мозга, характерны нарушения в метаболизме серотонина (5-гидрокситриптамин, 5-НТ) и клеточной сигнализации, опосредованной рецепторами 5-НТ, что способствует развитию устойчивости опухолевых клеток к лечению [4; 5]. Показано, что ингибирование и селективное модулирование рецепторов 5-НТ индуцируют усиление восприимчивости к химиотерапии и гибель опухолевых клеток [6; 7]. Таким образом, создание модифицированных производных 5-гидроксииндолов, выполняющих роль либо антагонистов рецепторов 5-НТ, либо антиметаболитов 5-гидрокситриптофана, является перспективным для противоопухолевой терапии глиом. В настоящей работе получено 3-ацетилпроизводное 5-гидроксииндола и изучено его влияние на пролиферацию и метаболические функции клеток глиомы крысы линии С6.

Материалы и методы исследования

Реагенты. В ходе исследования использовали следующие реагенты: ацетилацетон (98 %; *Sigma*, США); бензохинон (98 %; *Sigma*); концентрированный водный раствор NH_3 (25 % по массе; «Экос-1», Россия); нитрометан (98 %; *Alfa Aesar*, США). В качестве буферных растворов применяли HEPES-буфер (pH 7,3; 131 ммоль/л NaCl, 5 ммоль/л KCl, 1,3 ммоль/л CaCl_2 , 1,3 ммоль/л MgSO_4 , 6 ммоль/л глюкозы, 20 ммоль/л HEPES) и фосфатный буфер (pH 7,3; 137 ммоль/л NaCl, 2,7 ммоль/л KCl, 10,1 ммоль/л Na_2HPO_4 , 1,4 ммоль/л KH_2PO_4). Реагенты для растворов поставлялись производителем «Анализ Х» (Минск, Беларусь). Все растворители перегонялись перед использованием. Масс-спектры ионизации электрораспылением (ESI-MS) получили на оборудовании Shimadzu LCMS-2020 (Япония) либо Agilent 6530 Accurate Mass Q-TOF LC/MS System (США) в режиме ионизации электроспреем. IR-анализ проводился на приборе Bruker Alpha (ячейка ATR-DI; США) в диапазоне от 4000 до 400 см^{-1} .

Синтез 3-ацетил-5-гидрокси-2-метилиндола (5-НИЕТ). Схема синтеза 5-НИЕТ представлена на рис. 1.

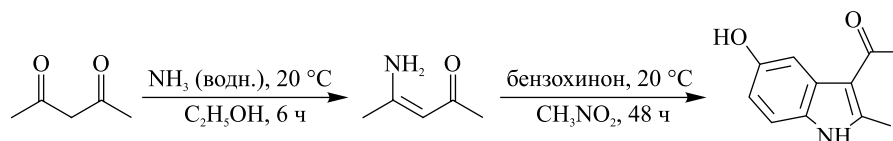


Рис. 1. Схема синтеза 5-НИЕТ

Fig. 1. Synthesis of 5-HIET

Синтез 5-НИЕТ проводили в две стадии, состоящие в получении соответствующего енамина и использовании последнего в реакции Неницеску:

1) *синтез 4-аминопент-3-ен-2-она.* К 0,5 мл ацетилацетона в 1 мл этанола, охлажденного до $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, по каплям добавляли 0,67 мл концентрированного аммиака. Реакционную смесь медленно нагревали до комнатной температуры и выдерживали при постоянном перемешивании. По прошествии 4 ч смесь частично упарили под вакуумом и проэкстрагировали диэтиловым эфиром. Выход вещества составил 80 %;

2) *синтез 5-НИЕТ.* К раствору 77,6 мг свежесублимированного бензохинона ($7,19 \cdot 10^{-4}$ моль) в 0,5 мл нитрометана медленно добавляли 75 мг 4-аминопент-3-ен-2-она ($7,57 \cdot 10^{-4}$ моль) в 0,5 мл нитрометана. Смесь выдерживали 48 ч в затемненной посуде при комнатной температуре. Ход реакции оценивали с помощью тонкослойной хроматографии с проявлением УФ-светом (254 нм). После расходования бензохинона реакционную смесь упарили под вакуумом и подвергли разделению с использованием колоночной хроматографии (элюент: CHCl_3 — $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ в соотношении 19 : 1 по объему). Выход вещества составил 24 % (белый порошок со слабым серым оттенком). ESI-MS: для $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{NO}_2$ $[\text{M} + \text{H}]^+$ расчетные значения сигнала составили 190,218, экспериментальные значения m/z – 190,231; для $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{NO}_4$ $[\text{M} + 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ расчетные значения равнялись 226,11, экспериментальные значения m/z – 226,05. IR-спектроскопия, см^{-1} : 3200–3100 (O—H, фенол), 2950–2830 (C—H), 1687 (C=O, арилкетон), 1650–1630 (C=C, ароматическая), 1552 (C=C, ароматическая), 1454 (C=C, ароматическая), 1380 (деформация O—H), 1348 (ароматическая), 1209 (C—O, фенол).

Культивирование клеток глиомы крысы линии С6. Культуру клеток глиомы крысы линии С6, полученную из коллекции культур клеток человека и животных Республиканского научно-практического центра эпидемиологии и микробиологии (Минск, Беларусь), культивировали в среде DMEM/F-12 (*Sigma Chemical*, США) с добавлением 10 % бычьей эмбриональной сыворотки HyClone (США) и гентамицина в концентрации 40 мкг/мл («Белмедпрепараты», Беларусь). Культивирование клеток проводили в атмосфере, содержащей 5 % CO_2 , при температуре $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Клетки в культуре с синтезированными соединениями инкубировали в вышеуказанных условиях на протяжении 1–24 ч, используя диметилсульфоксид (ДМСО) в качестве контроля. Конечная концентрация ДМСО в культуре не превышала 0,1 %. Снятие клеток с подложки осуществляли путем 2-минутной инкубации в присутствии 0,025 % раствора трипсина (*Sigma-Aldrich*, Германия). Клетки отделяли путем центрифугирования при 185 g, промывали HEPES-буфером и ресуспендировали в необходимом буферном растворе из расчета 10^6 клеток на 1 мл.

Культивацию дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* (штамм YEp5117 α) осуществляли по методике, описанной в работе [8].

Исследование пролиферации клеток. Для исследования пролиферации клеток глиомы С6 применяли метод флуориметрии с использованием интеркалирующего соединения иодида пропидия (PI; *Sigma-Aldrich*). После 24 ч инкубации в присутствии изучаемых соединений клетки глиомы С6 подвергали трипсинизации и ресуспендировали в 2 мл буферного раствора. К суспензии добавляли 30 мкл PI концентрацией 4 мкмоль/л при перемешивании и регистрировали интенсивность сигнала F_1 ($\lambda_{\text{ex}} = 530\text{ нм}$,

$\lambda_{\text{cm}} = 645$ нм), после чего разрушали клетки с помощью 0,1 % Triton X-100 и регистрировали значение F_2 . Индекс пролиферации $\frac{N}{N_0}$ (в %) рассчитывали по формуле

$$\frac{N}{N_0} = \frac{F_2 - F_1}{F_2^0 - F_1^0} \cdot 100,$$

где индексом 0 обозначены контрольные образцы, содержащие только ДМСО.

Исследование цитотоксичности по отношению к клеткам дрожжей. К 100 мкл суспензии дрожжей, содержащих исследуемые соединения, добавили 10 мкл раствора хлорида нитросинего тетразолия в дистиллированной воде (5 мг/мл). Образцы выдерживали на протяжении 3 ч при 30 °С и при механическом перемешивании со скоростью 200 об/мин. По окончании инкубации клетки осаждали посредством центрифугирования при 3000 g на протяжении 5 мин и разрушали путем добавления 0,1 моль/л HCl и 0,1 % Triton X-100 в 1 мл изопропанола. Оптическая плотность лизатов измерялась при 520 нм.

Исследование митохондриального трансмембранного потенциала. Суспензию клеток инкубировали в присутствии 2 мкмоль/л JC-1 в темноте при 37 °С на протяжении 15 мин. После инкубации клетки осаждали с помощью центрифугирования, промывали используемым буфером и ресуспендировали. Добавление веществ проводили непосредственно перед началом измерения. Изменение митохондриального потенциала определяли по соотношению интенсивности флуоресценции JC-1 при двух длинах волн ($\lambda_{\text{ex}} = 490$ нм, $\lambda_{\text{em},1} = 530$ нм, $\lambda_{\text{em},2} = 590$ нм). В качестве положительных контролей применяли ротенон и антимицин А (99 %; *Sigma*) в концентрации 10 мкмоль/л.

Исследование образования активных форм кислорода в клетках. Для изучения образования активных форм кислорода в цитозоле клеток использовали метод флуориметрии с применением флуоресцентного зонда диацетата 2',7'-дихлорфлуоресцеина ($\text{H}_2\text{DCF-DA}$; *Molecular Probes*, США). Клетки в суспензии инкубировали в присутствии 1 мкмоль/л $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ при 37 °С на протяжении 30 мин. Несвязанный краситель удалили путем центрифугирования, затем клетки перевели в HEPES-буфер (10^6 клеток на 1 мл). Перед началом измерений окрашенные клетки инкубировали в присутствии исследуемых соединений на протяжении 10 мин. Интенсивность флуоресценции измеряли при $\lambda_{\text{ex}} = 488$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 530$ нм.

Исследование процессов аутофагии в клетках. Клетки глиомы С6 в монослое инкубировали в присутствии исследуемых веществ на протяжении 3 ч и снимали с подложки по методике, описанной выше. К суспензии клеток глиомы С6 в HEPES-буфере добавили раствор монодансилкадаверина (MDC; 99 %; *Sigma*) в ДМСО в расчете на конечную концентрацию 50 мкмоль/л. После 15 мин инкубации в темноте при 37 °С клетки центрифугировали, промывали используемым буфером, повторно центрифугировали и ресуспендировали из расчета 10^6 клеток на 1 мл. Количество накопленного красителя оценивали с помощью флуориметрии ($\lambda_{\text{ex}} = 340$ нм, $\lambda_{\text{em}} = 430$ нм) относительно образца, содержащего только ДМСО. В качестве положительного контроля использовали дексаметазон (*Sigma*) в концентрации 10 мкмоль/л.

Квантово-химический расчет энергии сродства к электрону. Для оценки вероятности непосредственной конкуренции за электрон между 5-НЕТ и убихиноном Q10 (CoQ10) проводили расчет энергии сродства к электрону. Молекулярные геометрии оптимизировали с помощью функционала B3PW91 [9–11], коррекции дисперсионных взаимодействий D3BJ [12], базисного набора ma-def2-SVP [13; 14] в программе ORCA (версия 4.2.1) [15; 16] для газовой фазы. Использованный функционал хорошо подходит для воспроизведения геометрий и описания свойств анионов органических молекул [17]. В целях подтверждения соответствия найденных молекулярных геометрий энергетическому минимуму и нахождения энергии нулевых колебаний выполнялся расчет частот молекулярных колебаний аналогичным методом. Для более точного учета электронная энергия оптимизированных структур вычислялась с помощью функционала B3PW91, коррекции дисперсионных взаимодействий D3BJ, базисного набора ma-def2-TZVP и расширенной интеграционной сетки (integration grid, lebedev 590 angular points, radial integral accuracy 5,34) [18–20]. Адиабатическая энергия сродства к электрону (ϵ) рассматривалась как разность энергий нейтральной и ионизированной форм с учетом энергии нулевых колебаний [17]:

$$\epsilon = E_{A, \text{ma-def2-TZVP}} - E_{A^-, \text{ma-def2-TZVP}} + \Delta ZPVE_{\text{ma-def2-SVP}},$$

где $E_{A, \text{ma-def2-TZVP}}$ – электронная энергия нейтральной молекулы; $E_{A^-, \text{ma-def2-TZVP}}$ – электронная энергия аниона; $\Delta ZPVE_{\text{ma-def2-SVP}}$ – разница энергий нулевых колебаний нейтральной молекулы и соответствующего аниона.

Молекулярный докинг. При моделировании лиганд-белковых взаимодействий использовали структуры белка, депонированные в базе RCSB PDB. Построение лигандов и обработку результатов осуществляли с помощью программных пакетов PyMol (версия 1.5.0.1). Вычисления выполнены в программе AutoDock Vina (версия 1.1.2) [21]. Расчет энергии связывания проводили с использованием модели жесткой структуры белков и с применением исходных параметров оценочной функции. Конформационное пространство имело форму куба со стороной 30 Å.

Результаты и их обсуждение

Влияние 5-НЕТ на пролиферацию клеток глиомы крысы линии С6. Установлено, что после 24 ч инкубации 5-НЕТ в концентрации 10 мкмоль/л не оказывает цитотоксического воздействия на клетки глиомы С6, поскольку интенсивность флуоресценции суспензии клеток в присутствии PI не изменяется по сравнению с контролем, т. е. целостность клеток не нарушается. В то же время после 24 ч инкубации в присутствии препарата зарегистрировано снижение количества клеток в культуре на $(36 \pm 7) \%$, что свидетельствует об уменьшении пролиферативной активности (рис. 2). Однако в аналогичных условиях триптамин, не содержащий 3-ацетильной группы или 5-гидроксигруппы, уменьшает пролиферацию только на $(21 \pm 9) \%$ [8]. Поскольку снижение пролиферации под действием 5-НЕТ не вызвано некрозом клеток, можно предполагать, что данный эффект обусловлен либо угнетением клеточного деления, либо индукцией гибели клеток по механизму апоптоза или аутофагии.

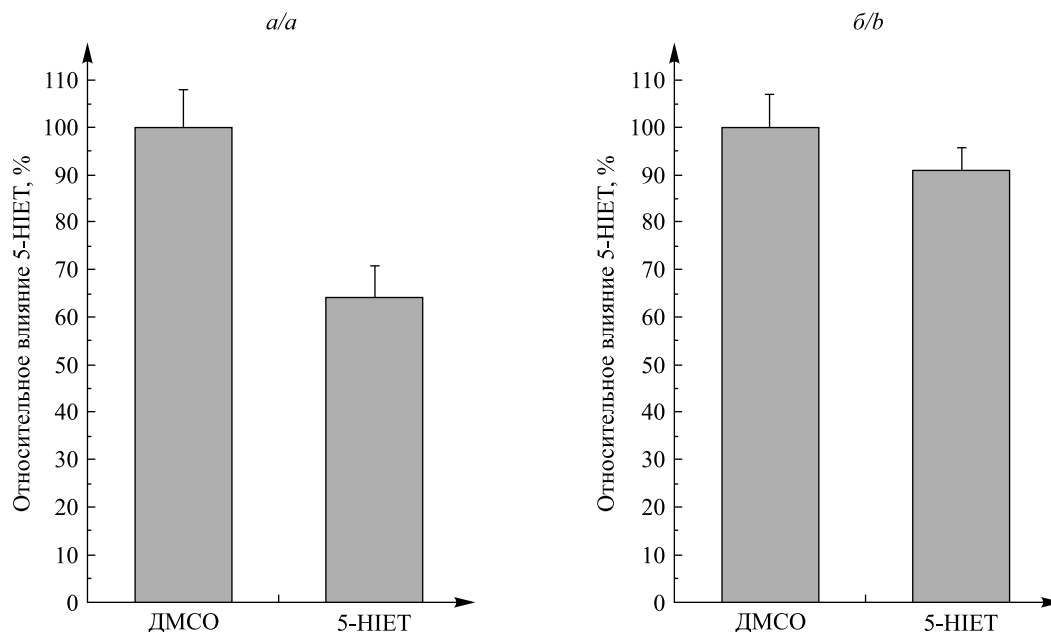


Рис. 2. Сравнительное влияние 5-НЕТ в концентрации 10 мкмоль/л на пролиферацию клеток глиомы С6 (а) и дрожжей *S. cerevisiae* (б)

Fig. 2. Relative effect of 5-NET in concentration of 10 $\mu\text{mol/L}$ on proliferation of C6 glioma cells (a) and *S. cerevisiae* yeast (b)

Для выявления селективности действия 5-НЕТ на опухолевые клетки было проведено исследование влияния этого соединения на рост дрожжей *S. cerevisiae* (см. рис. 2). Определено, что в присутствии 10 мкмоль/л 5-НЕТ рост дрожжей составляет $(91 \pm 5) \%$ относительно контроля (24 ч инкубации). Также обнаружено, что после 24 ч инкубации 5-НЕТ в концентрации 10 мкмоль/л не оказывает значительного воздействия на жизнеспособность дрожжей $((97 \pm 2) \%)$ относительно контроля, содержащего только ДМСО).

Влияние 5-НЕТ на митохондриальный мембранный потенциал (ММП). Как показано на рис. 3, при добавлении 10 мкмоль/л 5-НЕТ в суспензию клеток глиомы С6 наблюдается резкое снижение ММП. Скорость падения замедляется после 2 мин инкубации на значении ММП $(65 \pm 4) \%$ относительно контроля, затем наблюдается медленное снижение до $(32 \pm 4) \%$ после 30 мин инкубации (против $(84 \pm 6) \%$ в контрольном образце).

Из рис. 3 видно, что профиль изменения митохондриального потенциала для 5-НЕТ сопоставим с таковым для ротенона, представляющего собой специфический ингибитор комплекса I дыхательной цепи митохондрий (NADH-убихиноноксидоредуктаза). Структуры обоих соединений имеют схожий арилкетонный фрагмент (3-ацетилиндол – в случае 5-НЕТ, изофлавоновое кольцо – в случае ротенона). Поскольку ингибирующее действие по отношению к NADH- и NADPH-зависимым дегидрогеназам и белкам дыхательной цепи также характерно и для других арилкарбонильных соединений, например 4-гидрокси-3-метоксиацетофенона (апоцинин) и производных халконов [22–25], можно предположить, что механизм действия 5-НЕТ аналогичен таковому для ротенона.

В целях выявления селективности действия 5-НІЕТ исследовали его влияние на работу митохондрий в дрожжах *S. cerevisiae*. Как показано на рис. 4, на протяжении 10 мин инкубации в присутствии 5-НІЕТ изменения в соотношении интенсивностей флуоресценции митохондриального зонда при 530 и 590 нм относительно контроля не были зарегистрированы, что свидетельствует об отсутствии нарушения функции митохондрий.

Следует отметить, что результаты относительного влияния 5-НІЕТ на пролиферацию и работу митохондрий в клетках глиомы С6 и *S. cerevisiae* сопоставимы с аналогичными результатами, описанными в литературе для других арилкарбонильных соединений, например терпеноида β -лапахона [26–28]. В частности, β -лапахон в концентрации 8 мкмоль/л снижает рост *S. cerevisiae*, опухолевых клеток MCF-7 и MDA-MB-231 на 4; 80 и 40 % соответственно, тогда как статистически значимое снижение ММП отмечается в дрожжах и опухолевых клетках при концентрациях 1 мкмоль/л и 0,41 ммоль/л соответственно.

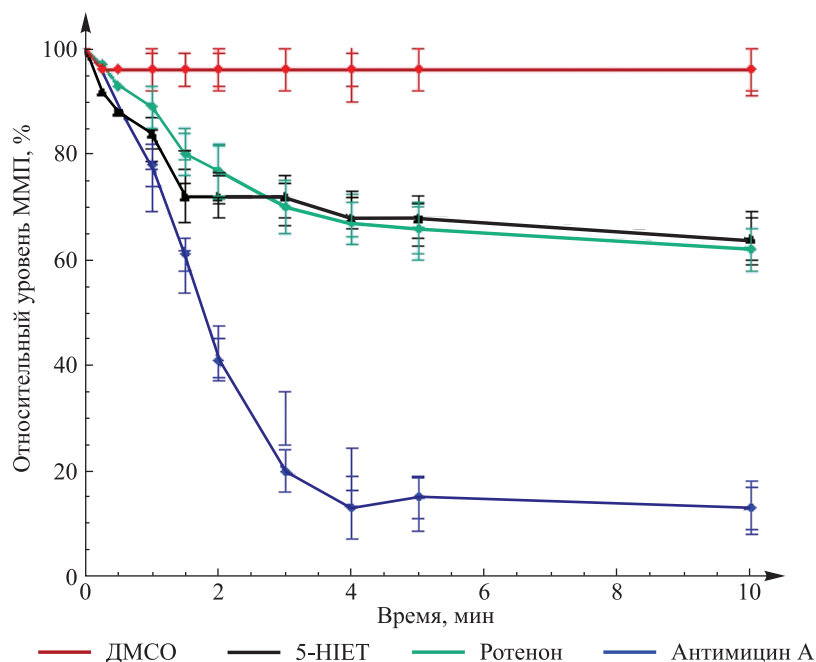


Рис. 3. Влияние 5-НІЕТ на ММП клеток глиомы С6

Fig. 3. Effect of 5-NIET on the mitochondrial membrane potential of C6 glioma cells

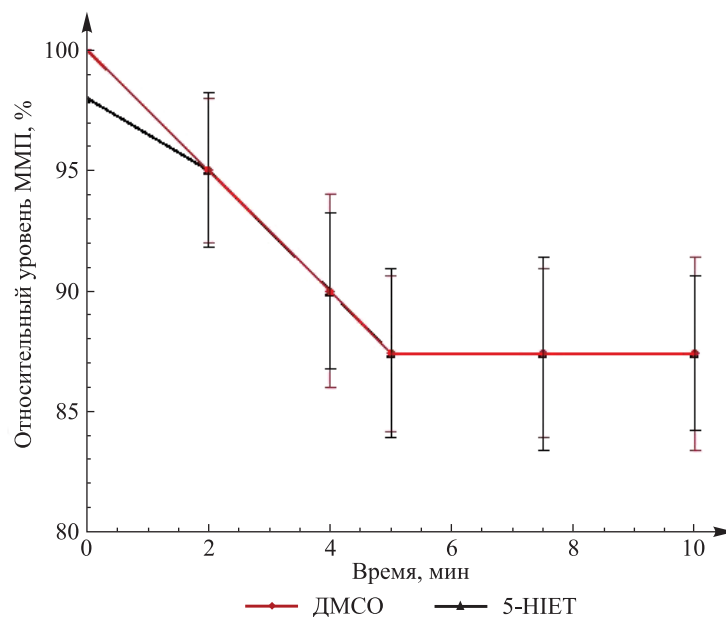


Рис. 4. Влияние 5-НІЕТ на ММП *S. cerevisiae*

Fig. 4. Effect of 5-NIET on the mitochondrial membrane potential of *S. cerevisiae*

Влияние 5-НИЕТ на редокс-процессы и уровень активных форм кислорода. При кратковременной инкубации клеток глиомы С6 в присутствии 10 мкмоль/л 5-НИЕТ наблюдалось значительное увеличение интенсивности флуоресценции DCF относительно контрольного образца, что свидетельствует о внутриклеточном образовании H_2O_2 (рис. 5). С учетом описанного выше нарушения работы митохондрий можно предположить, что 5-НИЕТ вызывает разобщение цепи переноса электронов и образование активных форм кислорода за счет ингибирования комплекса I.

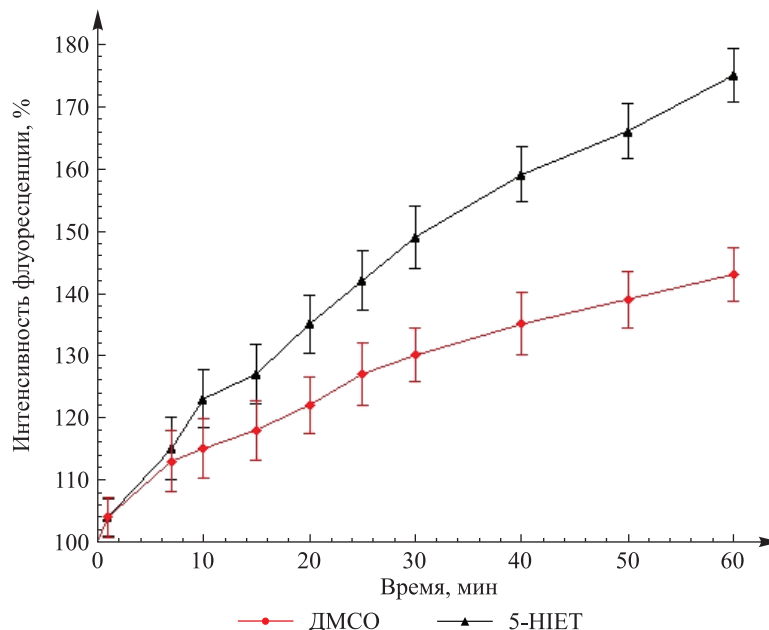


Рис. 5. Влияние 10 мкмоль/л 5-НИЕТ на образование H_2O_2 в клетках глиомы С6

Fig. 5. Effect of 10 $\mu\text{mol/L}$ 5-NIET on H_2O_2 levels in C6 glioma cells

Влияние 5-НИЕТ на процесс аутофагии. После инкубации клеток глиомы С6 в присутствии 10 мкмоль/л 5-НИЕТ на протяжении 3 ч и последующего окрашивания MDC наблюдалось повышение флуоресценции до (138 ± 6) % относительно контроля (рис. 6). В то же время клетки при инкубации в присутствии индуктора аутофагии дексаметазона в концентрации 10 мкмоль/л показывают увеличение интенсивности флуоресценции MDC на (176 ± 3) %.

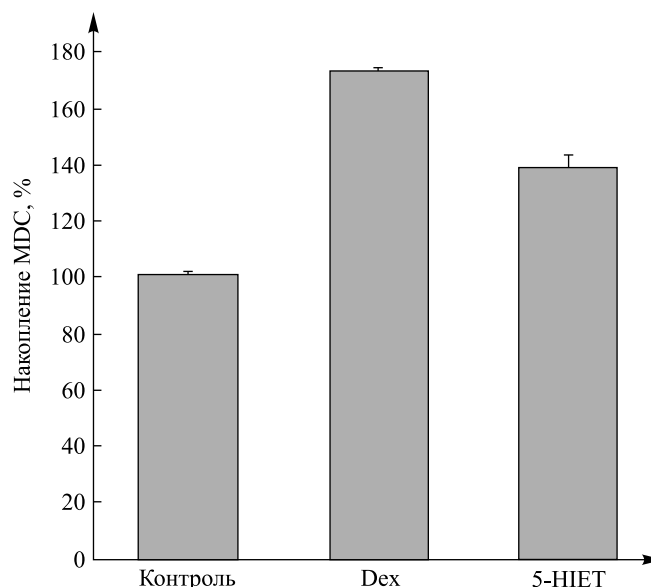


Рис. 6. Влияние 5-НИЕТ на процессы аутофагии в клетках глиомы С6

Fig. 6. Effect of 5-NIET on autophagy processes in C6 glioma cells

Квантово-химический расчет энергии сродства к электрону. Результаты расчетов представлены в табл. 1. Согласно расчетам 3-ацетильная группа 5-ННЕТ является более слабым акцептором электронов по сравнению с убихиноном. Данный результат позволяет предположить, что механизм действия 5-ННЕТ и повышенное образование H_2O_2 в присутствии 5-ННЕТ не связаны с непосредственным оттягиванием электронов из электрон-транспортной цепи.

Таблица 1

Расчетные адиабатические энергии сродства соединений к электрону

Table 1

Predicted adiabatic electron affinity for evaluated compounds

Соединение	ϵ , эВ	ϵ , кДж/моль
5-Гидроксииндол	–0,541	–52,2
5-ННЕТ	0,014	37,8
Убихинон Q10	2,072	199,0

Молекулярный докинг. Результаты расчетов представлены в табл. 2. В качестве моделей были использованы кристаллографические структуры митохондриального комплекса I, связанного с лигандами, в том числе с убихиноном Q10, ротеноном и некоторыми другими низкомолекулярными соединениями. В целом энергии связывания 5-ННЕТ сопоставимы с рассчитанными энергиями для ротенона или уступают им в пределах 1 ккал/моль. Таким образом, при докинге с использованием модели жесткой структуры белка 5-ННЕТ представляет собой более слабый лиганд, чем ротенон или убихинон.

Таблица 2

Расчетные энергии взаимодействия лигандов с сайтом связывания убихинона митохондриального комплекса I, ккал/моль

Table 2

Predicted interaction energies between ligands and mitochondrial complex I ubiquinone binding site, kcal/mol

Код структуры белка	CoQ10	Ротенон	5-ННЕТ
5xtd	–6,4*	–7,5	–6,4*
6g2j	–7,9	–8,9	–7,7
6g72	–10,0	–9,2	–6,6
6zka	–9,3	–7,5	–7,1
6zkc	–8,3	–8,6	–6,7
6zkl	–9,2	–9,0	–7,2
6zkm	–8,5	–8,7	–7,4
7b93	–7,9	–8,1	–7,1

*Расчетное расположение лиганда не соответствует сайту связывания убихинона белка.

Следует отметить, что, несмотря на более низкую суммарную энергию связывания по сравнению с убихиноном Q10 или ротеноном, относительное расположение 5-ННЕТ в сайте связывания убихинона позволяет последнему образовывать две потенциальные водородные связи с остатками THR21 и ASP51, а также вступать в стекинговые π – π -взаимодействия с фенильным кольцом PHE224 (рис. 7 и 8). Данное наблюдение может быть использовано при дальнейшей структурной модификации 5-ННЕТ в целях оптимизации его биологической активности.

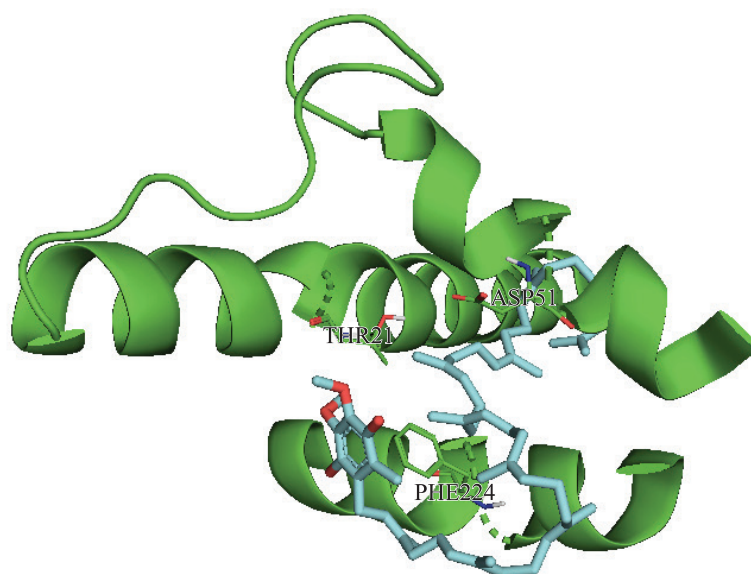


Рис. 7. Расчетное расположение убихинона Q10 в сайте связывания убихинона комплекса I (код структуры белка 7b93)

Fig. 7. Predicted localisation of ubiquinone Q10 in complex I ubiquinone binding site (PDB code 7b93)

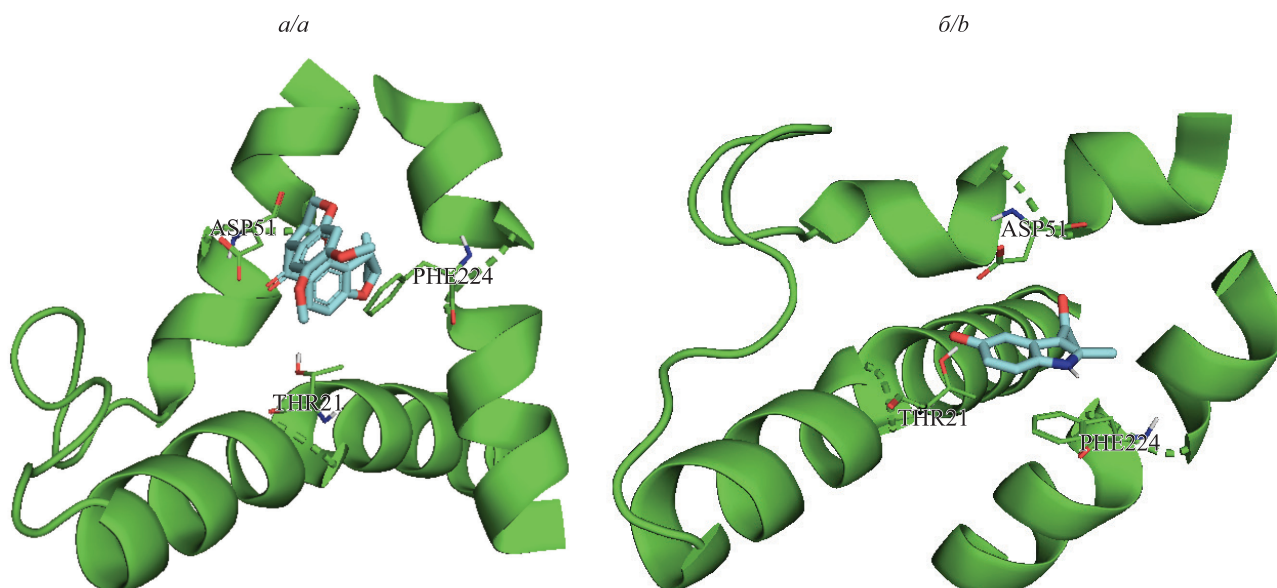


Рис. 8. Расчетное расположение ротенона (а) и 5-НІЕТ (б) в сайте связывания убихинона комплекса I

Fig. 8. Predicted localisation of rotenone (a) and 5-HIET (b) in complex I ubiquinone binding site

Заключение

В ходе работы было получено 3-ацетилпроизводное 5-гидроксииндола и изучено его влияние на пролиферацию и метаболические процессы в клетках глиомы крысы линии С6, представляющей собой одну из моделей для исследования глиобластом. Обнаружено, что при действии на клетки синтезированное соединение в концентрации 10 мкмоль/л существенно снижает пролиферацию, нарушает работу митохондрий, приводит к повышенному образованию внутриклеточного H_2O_2 и индуцирует аутофагию. Также высказано предположение, что соединение действует по механизму ингибирования NADH-зависимой убихинонредуктазы (митохондриальный комплекс I), характерному для соединений ацетофенонового ряда, в частности для ротенона. Ввиду более высокой относительной токсичности

по отношению к клеткам глиомы С6 и преимущественной локализации метаболизма 5-гидроксииндолов в тканях головного мозга 3-ацетилпроизводное 5-гидроксииндола представляет интерес как потенциальный агент для терапии глиомы и глиобластомы.

Библиографические ссылки / References

1. Patel AP, Fisher JL, Nichols E, Abd-Allah F, Abdela J, Abdelalim A, et al. Global, regional, and national burden of brain and other CNS cancer, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Neurology*. 2019;18(4):376–393. DOI: 10.1016/S1474-4422(18)30468-X.
2. Bae SJ, Lee JS, Lee EK, Kim JM, Choi J, Heo H-S, et al. The anti-apoptotic action of 5-hydroxyindole: protection of mitochondrial integrity. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2010;33(4):550–555. DOI: 10.1248/bpb.33.550.
3. Pavlides S, Tsigos A, Migneco G, Whitaker-Menezes D, Chiavarina B, Flomenberg N, et al. The autophagic tumor stroma model of cancer. *Cell Cycle*. 2010;9(17):3485–3505. DOI: 10.4161/cc.9.17.12721.
4. Yoo J-M, Lee BD, Sok D-E, Ma JY, Kim MR. Neuroprotective action of N-acetyl serotonin in oxidative stress-induced apoptosis through the activation of both TrkB/CREB/BDNF pathway and Akt/Nrf2/antioxidant enzyme in neuronal cells. *Redox Biology*. 2017;11:592–599. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.034.
5. Karmakar S, Lal G. Role of serotonin receptor signaling in cancer cells and anti-tumor immunity. *Theranostics*. 2021;11(11):5296–5312. DOI: 10.7150/thno.55986.
6. Lu Q, Ding Y, Li Y, Lu Q. 5-HT receptor agonist valerenic acid enhances the innate immunity signal and suppresses glioblastoma cell growth and invasion. *International Journal of Biological Sciences*. 2020;16(12):2104–2115. DOI: 10.7150/ijbs.44906.
7. Suzuki S, Yamamoto M, Sanomachi T, Togashi K, Sugai A, Seino S, et al. Brexpiprazole, a serotonin-dopamine activity modulator, can sensitize glioma stem cells to osimertinib, a third-generation EGFR-TKI, via survivin reduction. *Cancers*. 2019;11(7):947. DOI: 10.3390/cancers11070947.
8. Panada J, Klopava V, Kulahava T, Frolova N, Faletrov Y, Shkumatov V. New 3 β -hydroxysteroid-indolamine conjugates: design, synthesis and inhibition of C6 glioma cell proliferation. *Steroids*. 2020;164:108728. DOI: 10.1016/j.steroids.2020.108728.
9. Becke AD. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Physical Review A*. 1988;38(6):3098. DOI: 10.1103/PhysRevA.38.3098.
10. Becke AD. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *Journal of Chemical Physics*. 1993;98(7):5648. DOI: 10.1063/1.464913.
11. Dobson JF, Vignale G, Das MP. *Electronic density functional theory*. Boston: Springer US; 1998. 396 p. DOI: 10.1007/978-1-4899-0316-7.
12. Tsuzuki S, Uchimaru T. Accuracy of intermolecular interaction energies, particularly those of hetero-atom containing molecules obtained by DFT calculations with Grimme's D2, D3 and D3BJ dispersion corrections. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2020;22(39):22508–22519. DOI: 10.1039/D0CP03679J.
13. Weigend F, Ahlrichs R. Balanced basis sets of split valence, triple zeta valence and quadruple zeta valence quality for H to Rn: design and assessment of accuracy. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2005;7(18):3297–3305. DOI: 10.1039/b508541a.
14. Zheng J, Xu X, Truhlar DG. Minimally augmented Karlsruhe basis sets. *Theoretical Chemistry Accounts*. 2011;128(3):295–305. DOI: 10.1007/s00214-010-0846-z.
15. Neese F. The ORCA program system. *WIREs Computational Molecular Science*. 2012;2(1):73–78. DOI: 10.1002/wcms.81.
16. Neese F. Software update: the ORCA program system, version 4.0. *WIREs Computational Molecular Science*. 2018;8(1):e1327. DOI: 10.1002/wcms.1327.
17. Borioni JL, Puiatti M, Vera DMA, Pierini AB. In search of the best DFT functional for dealing with organic anionic species. *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2017;19(13):9189. DOI: 10.1039/C6CP06163J.
18. Boerrigter PM, Velde GT, Baerends JE. Three-dimensional numerical integration for electronic structure calculations. *International Journal of Quantum Chemistry*. 1988;33(2):87–113. DOI: 10.1002/qua.560330204.
19. Treutler O, Ahlrichs R. Efficient molecular numerical integration schemes. *Journal of Chemical Physics*. 1995;102(1):346. DOI: 10.1063/1.469408.
20. Becke AD. A multicenter numerical integration scheme for polyatomic molecules. *Journal of Chemical Physics*. 1988;88(4):2547. DOI: 10.1063/1.454033.
21. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*. 2010;31(2):455–461. DOI: 10.1002/jcc.21334.
22. Ghosh A, Langley MR, Harischandra DS, Neal ML, Jin H, Anantharam V, et al. Mitoapocynin treatment protects against neuroinflammation and dopaminergic neurodegeneration in a preclinical animal model of Parkinson's disease. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*. 2016;11(2):259–278. DOI: 10.1007/s11481-016-9650-4.
23. Mullarky E, Xu J, Robin AD, Huggins DJ, Jennings A, Noguchi N, et al. Inhibition of 3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH) by indole amides abrogates de novo serine synthesis in cancer cells. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2019;29(17):2503–2510. DOI: 10.1016/j.bmcl.2019.07.011.
24. Hossain M, Das U, Dimmock JR. Recent advances in α,β -unsaturated carbonyl compounds as mitochondrial toxins. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019;183:111687. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.111687.
25. Noser AA, Abdelmonsef AH, El-Naggar M, Salem MM. New amino acid schiff bases as anticancer agents via potential mitochondrial complex I-associated hexokinase inhibition and targeting AMP-protein kinases/mTOR signaling pathway. *Molecules*. 2021;26(17):5332. DOI: 10.3390/molecules26175332.
26. de Moraes DC, Cardoso KM, Domingos LTS, Pinto MCFR, Monteiro RQ, et al. β -Lapachone enhances the antifungal activity of fluconazole against a Pdr5p-mediated resistant *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2020;51(3):1051–1060. DOI: 10.1007/s42770-020-00254-9.
27. Yang Y, Zhou X, Xu M, Piao J, Zhang Y, Lin Z, et al. β -Lapachone suppresses tumour progression by inhibiting epithelial-to-mesenchymal transition in NQO1-positive breast cancers. *Scientific Reports*. 2017;7:2681. DOI: 10.1038/s41598-017-02937-0.
28. Bang W, Jeon Y-J, Cho JH, Lee RH, Park S-M, Shin J-C, et al. β -Lapachone suppresses the proliferation of human malignant melanoma cells by targeting specificity protein 1. *Oncology Reports*. 2016;35(2):1109–1116. DOI: 10.3892/or.2015.4439.

Получена 14.11.2021 / исправлена 23.11.2021 / принята 09.12.2021.
Received 14.11.2021 / revised 23.11.2021 / accepted 09.12.2021.