

ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ПИРАНОПИРИДОНОВ
С ТРИПТАМИНОВЫМ ФРАГМЕНТОМН.М. ПРЖЕВАЛЬСКИЙ¹, Л.В. АНИКИНА², А.А. ГЛОБА²,
Г.П. ТОКМАКОВ¹, Р.К. ЛАЙПАНОВ¹, Д.А. ВЕРШИНКИН¹

(¹Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева;
²Институт физиологически активных веществ ФГБУН «Федеральный исследовательский
центр проблем химической физики и медицинской химии РАН»)

Синтезированы новые пирано[3,2-с]пиридоны **III 5, 10, 15, 18** трехкомпонентной реакцией пиридонотриптаминов **I**, ароматических альдегидов **II** и нитрила малоновой кислоты. Пиридонотриптамины **I** получены взаимодействием триптаминов, синтезированных по реакции Грандберга из арилгидразинов и γ -галогенкарбонильных соединений, с 4-гидрокси-6-метил-2H-пиран-2-оном. Ароматические альдегиды **II 1, 5, 6, 9** являются коммерческими соединениями. Кипячение смеси указанных компонентов **I** и **II** с нитрилом малоновой кислоты в мольном соотношении 1:1,1:1,1 в присутствии триэтиламина в этиловом спирте приводит к целевым соединениям **III 5, 10, 15, 18** с выходом 44–75%. Структура пирано[3,2-с]пиридонов **III 5, 10, 15, 18** доказана методом ЯМР ¹H и подтверждена данными элементного анализа. Соединения **III 1–4, 6–9, 11–14, 16** и **17** синтезированы ранее по аналогичной методике.

Цитотоксичность синтезированных соединений **III 1–18** *in vitro* была определена по МТТ-тесту на культуре клеток человека А549 (карцинома легкого) и НСТ116 (карцинома кишечника). В качестве препаратов сравнения использовали камптотецин и даунорубицин. Значение концентрации, вызывающее 50%-ное ингибирование роста популяции клеток (IC_{50}), было определено на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9. Лучшие результаты по отношению к культурам А549 и НСТ116 показали соединения **III 3** ($R^1=R^2=Br$, $Ar=2,5$ -ди-ОМе-С₆H₃), **III 4** ($R^1=R^2=Br$, $Ar=4$ -F-С₆H₄), **III 6** ($R^1=Me$, $R^2=Br$, $Ar=2,4,5$ -три-ОМе-С₆H₂), **III 13** ($R^1=R^2=Br$, $Ar=Ph$), **III 14** ($R^1=R^2=Br$, $Ar=2,3$ -ди-ОМе-С₆H₃) и **III 16** ($R^1=R^2=Br$, $Ar=Pu$). Влияние наиболее активных соединений **III 3** и **III 4** на клеточный цикл и апоптоз было исследовано на культуре клеток Jurkat (Т-лимфобластный лейкоз человека). Соединения **III 3** и **III 4** по отношению к линии Jurkat в ресазурин-тесте проявили заметную цитотоксичность: $1,47 \pm 0,06$ и $4,56 \pm 0,19$ мкМ соответственно, сравнимую с цитотоксичностью препарата сравнения камптотецина $1,24 \pm 0,05$ мкМ. На основании полученных методом проточной цитометрии результатов предполагается, что эффект проявляется в некотором (возможно, обратимом) аресте клеточного цикла в пресинтетическую фазу.

Ключевые слова: ароматические альдегиды, индолы, пиранопиридоны, пиридоны, пиридонотриптамины, триптамины, цитотоксичность, МТТ-тест, апоптоз, клеточный цикл.

Введение

В течение ряда лет проводятся исследования, посвященные синтезу и изучению биологической активности производных индола, содержащих в молекуле фармакофорные триптаминовый и пиранопиридоновый фрагменты [6–9]. Известно,

что система пирано[3,2-с]пиридонов присутствует во многих природных веществах с широким спектром биологической активности [19, 20]. Также хорошо известна разнообразная биологическая активность многочисленных производных триптамина, имеющих скелет индола [2, 12, 13, 15, 16, 18, 21, 23, 28–31].

В последние годы исследователи обнаружили, что галлюциноген псилоцибин можно использовать для лечения депрессии [30]. Мелатонин ингибирует развитие рака легких [16], мелатонин и другие производные индола проявляют противовирусную активность против свиного короновируса [31], являются ингибиторами вируса гепатита В [28]. Метаболиты триптофана оказывают влияние на регуляцию роста клеток рака простаты [23], производные триптамина являются противоопухолевыми агентами [29], обнаруживают токсичность в концентрациях, содержащихся в пищевых продуктах [18]. Аналоги изокриптолепина являются потенциальными противораковыми веществами [12], производные пауллона обладают наномолярной активностью к ряду злокачественных опухолей [13].

В работах [5, 6] описано более 50 синтезированных соединений **III**, с помощью программы PASS [26] получены результаты, предсказывающие их разнообразную биологическую активность. Оказалось, что эти соединения могут проявлять более 100 видов биоактивности с вероятностью P_a от 0.039 до 0.712. С наибольшей вероятностью ($P_a \geq 0.30$) для пирано[3,2-с]пиридонов с триптаминовым фрагментом **III** возможно проявление цитотоксической активности. Наивысшая активность предсказана для соединений **III 1, 2, 7**, содержащих атомы брома в индольном кольце и в пиранопиридоновой части молекулы [9]. Предварительные результаты испытаний ряда соединений **III** на цитотоксическую активность опубликованы в сборнике тезисов [5].

Результаты и их обсуждение

Результаты химических исследований. Развивая эти исследования, мы синтезировали новые пиранопиридонотриптамины **III 5, 10, 15** и **18**, содержащие атом хлора в арильном кольце пиранового фрагмента и метоксигруппу в индольном ядре (**III 5**), триметиленовую цепочку в структуре индола (**III 10**), 2 атома брома и тиометильную группу в индольном ядре и пирановом цикле, соответственно (**III 15**), и триметоксизамещенный арильный цикл в положении 4'- молекулы (**III 18**). Выбор соединений **III 5** и **III 18** обусловлен предсказываемой высокой цитотоксической активностью веществ с атомами галогена, молекула **III 10** представляет интерес геометрией, отличающей ее от других структур **III**, пиранопиридонотриптами **III 18** имеет триметоксиарильный радикал, аналогичный содержащемуся в известном противораковом препарате подофиллотоксине.

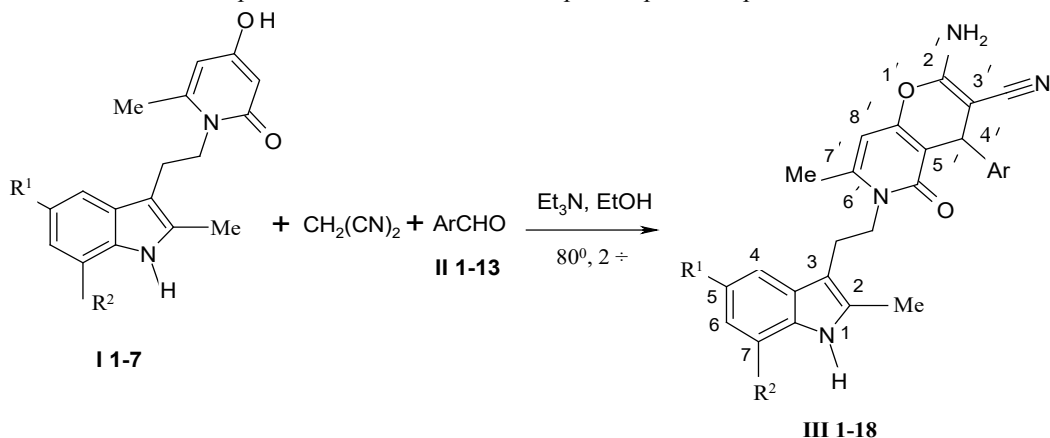
Пиридонотриптамины **I 1, 3, 5, 7** получали из триптаминов, синтезированных по реакции Грандберга [3], и 4-гидрокси-6-метил-2*H*-пиран-2-она [4].

Трехкомпонентную реакцию (схема) проводили при нагревании смеси пиридонотриптаминов **I**, ароматических альдегидов **II** и малонитрила в мольном соотношении 1:1,1:1,1 в этиловом спирте в присутствии триэтиламина. Продукты **III 5, 10, 15, 18** образуются в кристаллическом виде. Выход соединений **III 5, 10, 15, 18** составляет 44, 55, 75 и 57% соответственно. Структура пиранопиридонотриптаминов **III 5, 10, 15, 18** доказана методом ^1H ЯМР и подтверждена данными элементного анализа (см. экспериментальную часть). Спектры ЯМР ^1H соединений **III 5, 10, 15, 18** (нумерация атомов соединений **III 5, 15, 18** приведена на схеме, соединения **III 10** – на рисунке 1, названия веществ см. в экспериментальной части) характеризуются наличием сигналов протонов индольного ядра и арильного ядра, находящегося

в положении 4' пиранопиридинового фрагмента. Особенностью спектров веществ **III 5, 10, 15, 18** является неэквивалентность протонов групп CH₂, что обусловлено присутствием в молекулах хирального центра C*-4' [9]. В экспериментальной части дан детальный анализ спектров ЯМР ¹H веществ **III 5, 10, 15, 18**.

На схеме приведены также структуры соединений **III 1–4, 6–9, 11–18**, синтезированных ранее и использованных в данной работе в качестве объектов биоиспытаний. Названия этих веществ и ссылки на методики получения даны в экспериментальной части.

Схема. Трехкомпонентный синтез пиранопиридонотриптаминов III



- I:** 1 R¹=R²=H; 2 R¹=H, R²=Br; 3 R¹=R²=Br; 4 R¹=Br, R²=H;
 5 R¹=OMe, R²=H; 6 R¹=Me, R²=Br; 7 (рис. 1).
- II:** (Ar): 1 C₆H₅; 2 2-фурил; 3 2,5-ди-OMe-C₆H₃; 4 4-F-C₆H₄; 5 2-Cl-C₆H₄;
 6 2,4,5-три-OMe-C₆H₂; 7 4-Br-C₆H₄; 8 2-(5-метилфурил); 9 4-SMe-C₆H₄;
 10 2,3-ди-Cl-C₆H₃; 11 2,3-ди-OMe-C₆H₃; 12 4-пиридил; 13 4-OMe-C₆H₄.
- III:** (R¹, R², Ar): 1 Br, H, C₆H₅; 2 Br, H, 2-фурил; 3 Br, Br, 2,5-ди-OMe-C₆H₃;
 4 Br, Br, 4-F-C₆H₄; 5 OMe, H, 2-Cl-C₆H₄; 6 Me, Br, 2, 4, 5-три-OMe-C₆H₂;
 7 H, H, 4-Br-C₆H₄; 8 H, H, C₆H₅; 9 H, Br, 2-(5-метилфурил); 10 (рис. 1);
 11 H, H, 4-SMe-C₆H₄; 12 Me, Br, 2,3-ди-Cl-C₆H₃; 13 Br, Br, C₆H₅;
 14 Br, Br, 2,3-ди-OMe-C₆H₃; 15 Br, Br, 4-SMe-C₆H₄; 16 Br, Br, 4-пиридил;
 17 Br, Br, 4-OMe-C₆H₄; 18 H, H, 2,4,5-три-OMe-C₆H₂.

Важным аргументом при выборе пиранопиридонов **III 1–18** для испытаний на цитотоксическую активность явилось их структурное сходство с известными противораковыми препаратами камптотецином и подофиллотоксином (рис. 1). Набор заместителей в пиридонотриптаминах **I 1–7** и ароматических альдегидах **II 1–13** объясняется стремлением получить соединения **III**, содержащие в молекуле атомы и группировки, которые входят в биологически активные природные и синтетические вещества [8].

Экспериментальная химическая часть. Спектры ЯМР ¹H записаны на приборе Bruker-AV-300 (300 МГц) в ДМСО-d₆, внутренний стандарт ТМС. Элементный анализ выполнен на CHN-анализаторе Carlo Erba 1106. Температура плавления определена в незапаянных капиллярах в электронагреваемом блоке.

Контроль за ходом реакций и чистотой соединений осуществляли методом ТСХ на пластинах Silufol-254: элюент бутанол – уксусная кислота – вода, 7:1:1, проявление – парами иода или УФ-светом.

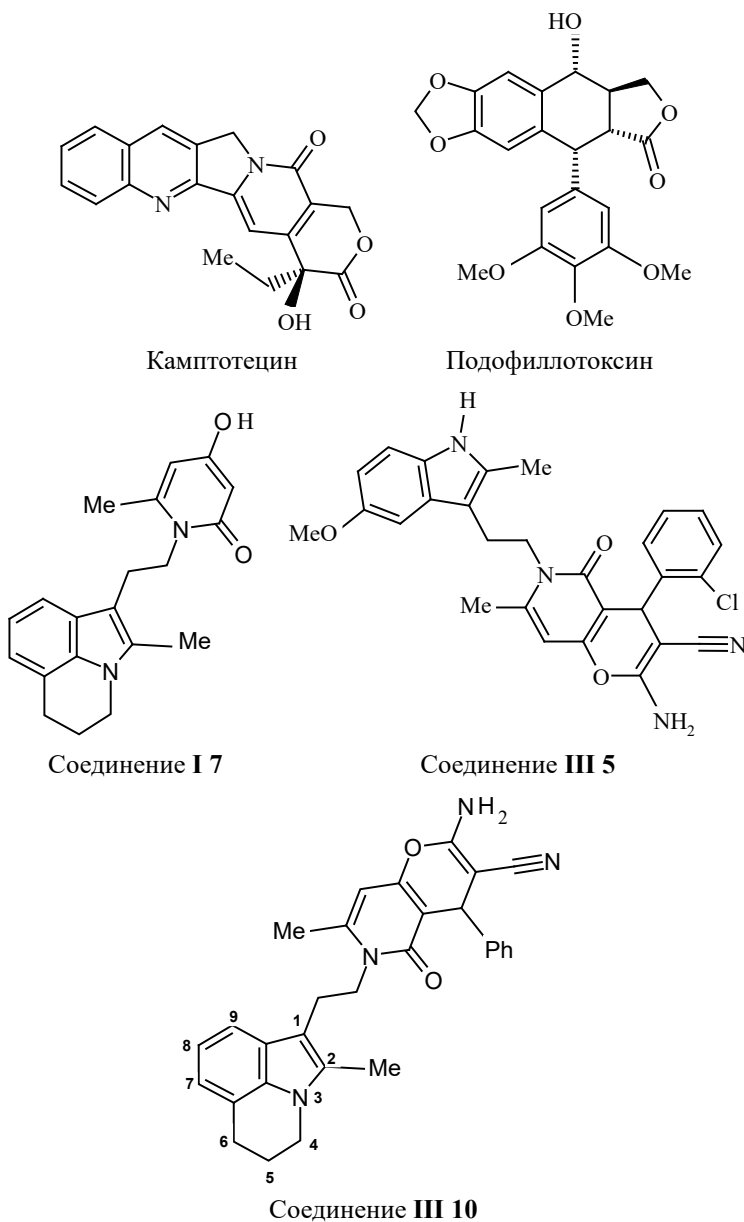


Рис. 1. Камптотецин, подофиллотоксин и соединения I 7, III 5 и III 10

Пиридонотриптамы I 1, 3, 5, 7 синтезированы по методике [4].

Ароматические альдегиды II 1, 5, 6, 9 являются коммерческими реагентами («Aldrich»).

Соединения III 1–4, 6–9, 11–14, 16, 17, синтезированы ранее (ссылка на статью – после названия) и протестированы на цитотоксическую активность в данной работе. Соединения III 5, 10, 15, 18 синтезированы и протестированы в данной работе.

2'-Амино-6'-[2-(5-бром-2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-7'-метил-5'-оксо-4'-фенил-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-*c*]пиридин-3'-карбонитрил (III 1) [6].

2'-Амино-6'-[2-(5-бром-2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-7'-метил-5'-оксо-4'-(2-фурил)-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-*c*]пиридин-3'-карбонитрил (III 2) [6].

2'-Амино-6'-[2-(5,7-дибром-2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-4'-(2,5-диметоксифенил)-7'-метил-5'-оксо-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-с]пиридин-3'-карбонитрил (III 3) [6].

2'-Амино-6'-[2-(5,7-дибром-2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-7'-метил-5'-оксо-4'-(4-фторфенил)-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-с]пиридин-3'-карбонитрил (III 4) [6].

2'-Амино-7'-метил-6'-[2-(2-метил-5-метокси-1*H*-индол-3-ил)этил]-5'-оксо-4'-(2-хлорфенил)-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-с]пиридин-3'-карбонитрил (III 5).

В колбу на 10 мл помещали 0.16 г (0.5 ммоль) пиридинона **I 5**, 0.08 г (0.55 ммоль) альдегида **II 5**, 0.036 г (0.55 ммоль) малононитрила, 0.2 мл триэтиламина, 4 мл EtOH, и реакционную смесь кипятили с обратным холодильником в течение 2 ч. Через 15–20 мин первоначально нерастворимые компоненты переходили в раствор, и к концу первого часа начинал выпадать осадок (продукт **III 5**). Смесь охлаждали, разбавляли равным объемом Et₂O и оставляли для полной кристаллизации на 12 ч. Осадок отфильтровывали, промывали на фильтре Et₂O и перекристаллизовывали из EtOH. Получали 0.11 г (44%) соединения **III 5**, т. пл. 271–273 °С. Спектр ЯМР ¹H (293 К, δ, м.д., J/Гц): 1.95, 2.01 (оба с, по 3 H, 7'-Me, 2-Me); 2.74–2.83 (м, 2 H, CH₂CH₂N); 3.68 (с, 3 H, 5-OMe); 3.79–3.89, 3.89–3.99 (оба м, по 1 H, CH₂CH₂N); 4.90 (с, 1 H, 4'-H); 5.90 (с, 1 H, 8'-H); 6.57 (дд, 1 H, 6-H, J_{орто}=8.7, J_{мета}=2.3); 6.90 (д, 1 H, 4-H, J_{мета}=2.3); 7.00 (уш. с, 2 H, 2'-NH₂); 7.05 (д, 1 H, 7-H, J_{орто}=8.7); 7.08 [дд, 1 H, 4'-(2-ClC₆H₄), J_{орто}=7.7, J_{мета}=1.4]; 7.15–7.24 [м, 2 H, 4'-(2-ClC₆H₄)]; 7.35 [дд, 1 H, 4'-(2-ClC₆H₄), J_{орто}=7.4, J_{мета}=1.4]; 10.51 (уш. с, 1 H, 1-H). Найдено, %: С, 67.45; Н, 5.28; N, 11.31. C₂₈H₂₅ClN₄O₃. Вычислено, %: С, 67.13; Н, 5.03; N, 11.18.

2'-Амино-6'-[2-(5,7-дибром-2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-7'-метил-5'-оксо-4'-(2,4,5-триметоксифенил)-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-с]пиридин-3'-карбонитрил (III 6) [6].

2'-Амино-4'-(4-бромфенил)-7'-метил-6'-[2-(2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-5'-оксо-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-с]пиридин-3'-карбонитрил (III 7) [6].

2'-Амино-7'-метил-6'-[2-(2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-5'-оксо-4'-фенил-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-с]пиридин-3'-карбонитрил (III 8) [8].

2'-Амино-6'-[2-(7-бром-2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-7'-метил-4'-[2-(5-метилфурил)]-5'-оксо-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-с]пиридин-3'-карбонитрил (III 9) [6].

2'-Амино-7'-метил-6'-[2-(2-метил-5,6-дигидро-4*H*-пирроло[3,2,1-*ij*]хиолин-1-ил)-этил]-5'-оксо-4'-фенил-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-с]пиридин-3'-карбонитрил (III 10).

В результате реакции, аналогичной синтезу **III 5**, из 0.16 г (0.5 ммоль) пиридинона **I 7**, 0.036 г (0.55 ммоль) малононитрила и 0.06 г (0.55 ммоль) бензальдегида получили 0.14 г (55%) соединения **III 10**, т. пл. 260–262 °С. Спектр ЯМР ¹H (293 К, δ, м.д., J/Гц): 1.99–2.30 (м, 2 H, 5-CH₂); 2.14, 2.17 (оба с, по 3 H, 7'-Me, 2-Me); 2.75–3.03 (м, 4 H, CH₂CH₂N и 6-CH₂); 3.80–4.10 (м, 4 H, CH₂CH₂N и 4-CH₂); 4.44 (с, 1 H, 4'-H); 5.98 (с, 1 H, 8'-H); 6.75 (д, 1 H, 7-H, J=7.7); 6.87 (т, 1 H, 8-H, J=7.7); 7.01 (уш. с, 2 H, 2'-NH₂); 7.10–7.26 (м, 5 H 4'-Ph); 7.31(д, 1 H, 9-H, J=7.7). Найдено, %: С, 75.14; Н, 5.88; N, 11.51. C₃₀H₂₈N₄O₂. Вычислено, %: С, 75.42; Н, 5.92; N, 11.76.

2'-Амино-7'-метил-6'-[2-(2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-4'-(4-метилтиофенил)-5'-оксо-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-с]пиридин-3'-карбонитрил (III 11) [8].

2'-Амино-6'-[2-(7-бром-2,5-диметил-1*H*-индол-3-ил)этил]-4'-(2,3-дихлорфенил)-7'-метил-5'-оксо-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-с]пиридин-3'-карбонитрил (III 12) [6].

2'-Амино-6'-[2-(5,7-дибром-2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-7'-метил-5'-оксо-4'-фенил-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-*c*]пиридин-3'-карбонитрил (III 13) [6].

2'-Амино-6'-[2-(5,7-дибром-2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-4'-(2,3-диметоксифенил)-7'-метил-5'-оксо-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-*c*]пиридин-3'-карбонитрил (III 14) [6].

2'-Амино-6'-[2-(5,7-дибром-2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-7'-метил-4'-(4-метилтиофенил)-5'-оксо-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-*c*]пиридин-3'-карбонитрил (III 15).

В результате реакции, аналогичной синтезу III 5, из 0.23 г (0.5 ммоль) пиридинона I 3, 0.036 г (0.55 ммоль) малононитрила и 0.08 г (0.055 ммоль) альдегида II 9 получили 0.24 г (75%) соединения III 15, т. пл. 270–272 °С. Спектр ЯМР ¹H (323 К, δ, м.д., J/Гц): 2.01, 2.15, 2.44 (все с, по 3 H, 7'-Me, 2-Me, MeS); 2.79–2.95 (м, 2 H, CH₂CH₂N); 3.82–4.08 (м, 2 H, CH₂CH₂N); 4.40 (с, 1 H, 4'-H); 5.91 (с, 1 H, 8'-H); 6.90 (уш. с, 2 H, 2'-NH₂); 7.16, 7.20 (оба д, по 2 H, 4'-(4-MeSC₆H₄), J=8.1); 7.31, 7.51 (оба с, по 1 H, 6-H, 4-H); 11.10 (уш. с, 1 H, 1-H). Найдено, %: C, 52.70; H, 3.63; N, 8.58. C₂₈H₂₄Br₂N₄O₂S. Вычислено, %: C, 52.52; H, 3.78; N, 8.75.

2'-Амино-6'-[2-(5,7-дибром-2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-7'-метил-5'-оксо-4'-(4-пиридил)-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-*c*]пиридин-3'-карбонитрил (III 16) [6].

2'-Амино-6'-[2-(5,7-дибром-2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-7'-метил-4'-(4-метоксифенил)-5'-оксо-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-*c*]пиридин-3'-карбонитрил (III 17) [6].

2'-Амино-7'-метил-6'-[2-(2-метил-1*H*-индол-3-ил)этил]-5'-оксо-4'-(2,4,5-триметоксифенил)-5',6'-дигидро-4'*H*-пирано[3,2-*c*]пиридин-3'-карбонитрил (III 18).

В результате реакции, аналогичной синтезу III 5, из 0.14 г (0.5 ммоль) пиридинона I 1, 0.036 г (0.55 ммоль) малононитрила и 0.11 г (0.55 ммоль) альдегида II 6 получили 0.15 г (57%) соединения III 18, т. пл. 198–200 °С. Спектр ЯМР ¹H (323 К, δ, м.д., J/Гц): 2.02, 2.15 (оба с, по 3 H, 7'-Me, 2-Me); 2.79–2.95 (м, 2 H, CH₂CH₂N); 3.65, 3.74, 3.77 [все с, по 3 H, 4'-(MeO)₃C₆H₂]; 3.83–4.10 (м, 2 H, CH₂CH₂N); 4.62 (с, 1 H, 4'-H); 5.89 (с, 1 H, 8'-H); 6.57, 6.63 [оба с, по 1 H, 4'-(MeO)₃C₆H₂]; 6.66 (уш. с, 2 H, 2'-NH₂); 6.88–7.00 (м, 2 H, 5-H, 6-H); 7.21 (д, 1 H, 7-H, J = 7.6); 7.40 (д, 1 H, 4-H, J = 7.6); 10.60 (уш. с, 1 H, 1-H). Найдено, %: C, 68.61; H, 5.78; N, 10.75. C₃₀H₃₀N₄O₅. Вычислено, %: C, 68.43; H, 5.74; N, 10.64.

Выводы

Синтезировано 4 новых пиранопиридонов с триптаминовым фрагментом III. Структура соединений III 5, 10, 15 и 18 доказана методом ЯМР ¹H и подтверждена данными элементного анализа. Выбор указанных соединений обусловлен наличием в молекулах атомов галогена (Br, Cl), метоксигрупп, триметиленовой цепочки в индольной части молекулы и их структурным сходством с известными природными и синтетическими цитотоксическими препаратами.

Результаты биологических исследований. Все синтезированные соединения III 1–18 были подвергнуты тесту *in vitro* на определение их цитотоксичности в отношении культур опухолевых клеток человека. Были выбраны клеточные культуры, относящиеся к особо эпидемиологически значимым видам онкологических заболеваний человека: карцинома легкого (A549) и карцинома кишечника (HCT116) [1]. МТТ-тест, лежащий в основе определения цитотоксичности, основан на измерении количества живых, активно метаболизирующих клеток, в культуральной среде после воздействия соединений. Митохондриальные оксидоредуктазы живых клеток

способны восстанавливать тетразолиевый краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолия бромид (МТТ) в нерастворимый формазан пурпурного цвета, который остается в лунках в составе клеток и после замещения культуральной среды на диметилсульфоксид (ДМСО) растворяется в последнем с образованием пурпурного окрашивания, интенсивность которого пропорциональна количеству живых клеток в лунке.

Результаты эксперимента приведены в таблице.

Согласно полученным результатам можно с уверенностью сказать, что для проявления цитотоксичности в группе исследованных пиранопиридонотриптаминов **III** наибольшее значение имеют наличие и число атомов брома в молекуле (в триптаминовом или пиранопиридоновом фрагменте). Среди соединений, не содержащих бром (соединения **III 5, III 8, III 10, III 11, III 18**), нет ни одного соединения со значением полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC_{50}) ниже 100 мкМ, что традиционно трактуется как отсутствие цитотоксического эффекта. При введении одного атома брома в молекулу (соединения **III 1, III 2, III 6, III 7, III 9, III 12**) IC_{50} снижается до 6–100 мкМ, причем соединения с ароматическим фурильным радикалом в пиранопиридоновом фрагменте (**III 2, III 9**) проявляют большую цитотоксичность по сравнению с соединением **III 1**, имеющим фенильный радикал. В случае двух атомов брома в триптаминовом фрагменте все 7 соединений **III 3, 4, 13–17** обладают цитотоксичностью, причем 5 из них имеют IC_{50} около 20 мкМ, что приближает их к цитотоксичности, проявленной препаратом сравнения камптотецином.

Влияние числа атомов брома в триптаминовом фрагменте на цитотоксичность выявлено на примере соединений, имеющих один и тот же заместитель в положении 4' пиранопиридонового фрагмента. Вещества **III 1, 8, 10, 13** имеют одинаковый радикал 4'-фенил. Соединения **III 8** и **III 10** не содержат атомов брома и лишены цитотоксичности (IC_{50} выше 100 мкМ), при наличии одного атома брома в соединении **III 1** IC_{50} уже ниже 100 мкМ, а при двух атомах брома (соединение **III 13**) имеет IC_{50} около 20 мкМ, что сравнимо с эталоном – камптотецином. В молекулах **III 6** и **III 18** присутствует радикал (2, 4, 5-три-ОМе-С₆H₂)-4'. Сравнение цитотоксичности к НСТ116 соединений **III 6** (есть атом брома) и **III 18** (атом брома отсутствует) показывает высокую активность у первого (6,17±0,11) и отсутствие ее у второго (284±5,19).

Наиболее активные соединения содержат два атома брома (**III 3, III 4, III 13, III 14, III 16**). Наивысшую активность в отношении карциномы НСТ116 показало вещество **III 3**, существенно превосходя активность эталона сравнения – камптотецина.

На основании проведенного эксперимента были выбраны два соединения, проявившие максимальную цитотоксичность – **III 3** и **III 4**, – с целью изучения вероятных механизмов, лежащих в основе их противоопухолевого действия: влияния на апоптоз и клеточный цикл. Поскольку данные исследования проводятся с помощью проточной цитометрии, более удобными для работы с методической точки зрения были культуры клеток, растущих суспензионно в культуральной среде (см. методику биологических исследований). Поэтому в качестве опухолевой культуры клеток для данных тестов была выбрана клеточная культура Jurkat (острая Т-клеточная лейкемия).

Для определения эффективных доз соединений в отношении опухолевой линии клеток Jurkat цитотоксичность была определена с помощью ресазурин-теста. Митохондриальные и цитоплазматические оксидоредуктазы живых клеток способны восстанавливать синий краситель ресазурин (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он-10-оксида натрия соль) до розово-фиолетового резорфурина, обладающего флуоресценцией в желто-зеленой области спектра. Интенсивность флуоресценции резорфурина прямо пропорциональна количеству живых клеток в лунке.

Цитотоксичность пиранопиридонотриптаминов в МТТ-тесте

Соединение III	IC ₅₀ , мкМ	
	A549 (карцинома легкого человека)	HCT116 (карцинома кишечника человека)
1	98,86±3,61	44,01±8,71
2	33,11±0,60	29,56±0,90
3	21,46±2,92	4,88±0,63
4	20,85±0,31	21,63±0,74
5	303,11±26,04	236,20±10,52
6	70,12±1,44	6,17±0,11
7	107,15±3,74	89,05±2,40
8	109,39±2,14	177,75±10,19
9	75,06±11,55	38,05±4,49
10	254,30±13,05	214,26±9,71
11	232,17±10,33	225,25±10,17
12	268,00±9,78	73,90±5,62
13	18,28±0,33	20,68±1,07
14	22,53±0,53	16,55±0,35
15	58,48±0,33	110,78±6,07
16	21,60±0,62	26,32±1,26
17	38,59±0,44	122,83±4,68
18	212,63±8,76	284,69±5,19
Камптотецин	8,87±0,02	12,34±0,50
Даунорубицин	0,51±0,01	0,24±0,01

Соединения III 3 и III 4 в тесте с ресазурином продемонстрировали высокую цитотоксичность: IC₅₀ составила 1,47±0,06 мкМ для соединения III 3 и 4,56±0,19 мкМ для соединения III 4. IC₅₀ препаратов сравнения были определены в данном эксперименте как 1,24±0,05 мкМ для камптотецина (ингибитор топоизомеразы I) и 0,011±0,001 мкМ для даунорубицина (интеркалятор, ингибитор

топоизомеразы II). В дальнейших экспериментах мы использовали эти соединения и препараты сравнения в дозах, близких к их IC_{50} в отношении к культуре клеток Jurkat: 1 мкМ для соединения III 3, 5 мкМ для соединения III 4, 1 мкМ для камптотецина и 0,01 мкМ для даунорубицина.

Апоптоз – это тщательно регулируемый процесс гибели клеток, который является нормальной частью ее развития. Факторы, участвующие в регуляции клеточной гибели, в настоящее время рассматриваются в качестве основных мишеней противоопухолевого воздействия, а характер апоптотических реакций может служить маркером эффективности рациональной химиотерапии и помогать в ее выборе. Апоптоз отличается характерными морфологическими и биохимическими изменениями клетки, в том числе уплотнением и фрагментацией хроматина, «усадкой» цитоплазмы и потерей мембраной асимметрии. Последняя особенность связана с транслокацией фосфатидилсерина на внешней поверхности цитоплазматической мембраны апоптотической клетки [14]. Чтобы определить, была ли активность выбранных соединений связана с индукцией апоптоза, нами использовались рекомбинантный аннексин V, который имеет высокое сродство к фосфатидилсерину, конъюгированный с красителем APC, и краситель SYTOX® Blue (который легко проникает в клетки с нарушенными плазматическими мембранами) [10].

На рисунке 2 представлены популяции клеток, находящихся в процессе апоптоза или некроза через 24, 48 и 72 ч после воздействия исследуемых соединений или препаратов сравнения.

Анализируя количество клеток, находящихся в различных стадиях жизненного цикла, видим влияние на апоптоз такого известного индуктора апоптоза, как камптотецин (CPT). Процент клеток, находящихся в стадии раннего апоптоза, по отношению ко всем клеткам популяции постепенно растет: от 20% через 24 ч воздействия к 33% через 48 ч воздействия и достигает 48% через 72 ч воздействия камптотецина в дозе 1 мкМ.

Даунорубицин (DNR) является известным интеркалирующим агентом и в нашем эксперименте он, примененный в дозе 0,01 мкМ, повышал фракцию лишь немного апоптотических, а больше – некротических клеток к 72 ч после воздействия: до 7 и 10% соответственно.

Исследуемые нами соединения не оказывают выраженного влияния на индукцию апоптоза. Результаты при их воздействии на опухолевые клетки практически равны данным контрольной группы клеток, не подвергшейся воздействию. В случае соединения III-3 можно отметить только немного более высокий процент клеток, находящихся в стадии некроза или позднего апоптоза, через 72 ч воздействия: 8% против 2% в контрольной группе.

Нарушения в системе контроля клеточного цикла – одна из основных причин образования злокачественных опухолей. Мутации в генах регуляторных белков клеточного цикла приводят к бесконтрольному делению клеток, дальнейшему накоплению мутаций в клетках, появлению и размножению анеуплоидных клеток с ненормальным содержанием хромосом. В свою очередь, действие многих противоопухолевых препаратов сопровождается замедлением или блокадой клеточного цикла.

Измерение содержания ДНК позволяет изучать клеточные популяции в различных фазах клеточного цикла, а также проводить анализ пloidности ДНК. В конкретной популяции клетки распределяются по трем основным фазам клеточного цикла: фаза G0/G1 (один набор парных хромосом на клетку); фаза S (синтез ДНК с переменным количеством ДНК); фаза G2/M (два набора парных хромосом на клетку до деления клетки) [17].

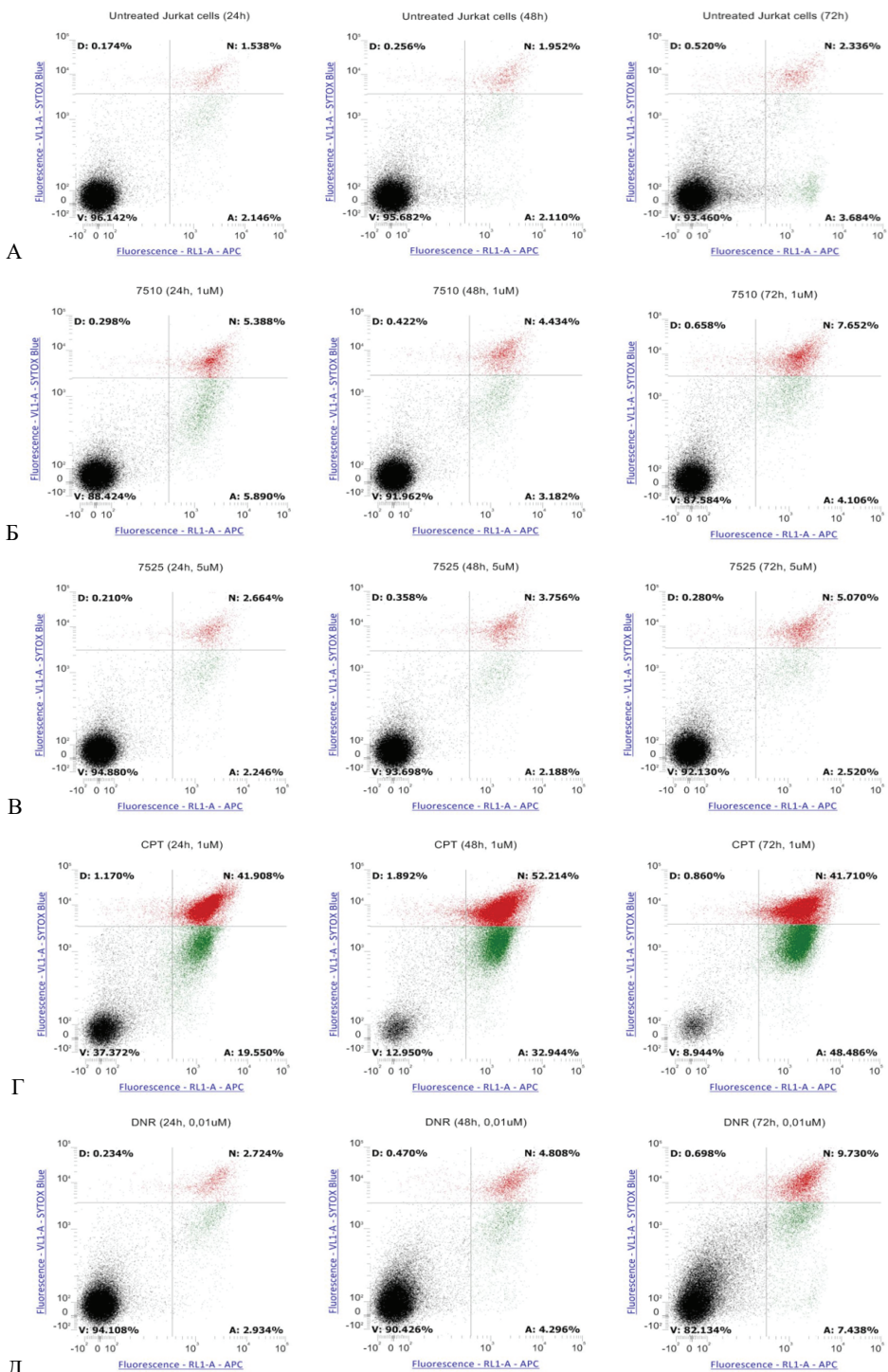


Рис. 2. Дотограммы популяций клеток необработанных (А) после воздействия соединения **III 3** (Б), соединения **III 4** (В) или препаратов сравнения камптотецина (Г) и даунорубина (Д) через 24, 48 и 72 ч (на дотограммах в сегментах указаны проценты популяций клеток, где А – апоптотические клетки, V – жизнеспособные, N – некротические, D – поврежденные клетки, или продукты лизиса)

На рисунке 3 представлены популяции клеток, находящихся в трех основных фазах клеточного цикла, через 24, 48 и 72 ч после воздействия исследуемых соединений или препаратов сравнения.

Для контрольной группы разделение клеток было следующим: в фазе G0 (вне клеточного цикла) находится около 2% всех клеток (что нормально для постоянно делящихся опухолевых клеток); в фазе G0/G1 (пресинтетической) – около 50% всех клеток; в S-фазе (синтетической, удвоения ДНК) – около 30% всех клеток; в постсинтетической фазе G2/M – около 18% всех клеток.

В случае с камптотецином (СРТ) в дозе 1 мкМ на протяжении всего эксперимента наблюдался арест клеточного цикла в фазе G0/G1 (57–79% всей клеточной популяции), клетки не входили в стадию удвоения ДНК, и количество клеток, находящихся в фазе постсинтетической G2/M, составляло не выше 5%.

В случае с даунорубицином (DNR) в дозе 0,01 мкМ арест клеточного цикла происходил на стадии удвоения ДНК. Даунорубицин как известный интеркалятор встраивается между парами азотистых оснований и ингибирует топоизомеразу II, которая должна расплетать нити ДНК в процессе репликации. При воздействии на опухолевые клетки даунорубицином наблюдалось накопление клеток в S-фазе, а особенно в G2/M фазе (до 63% всей клеточной популяции). На фоне этого эффекта популяция клеток пресинтетической фазы значительно обедняется (18–36% от всей популяции клеток).

Соединения III 3 и III 4 в дозах 1 и 5 мкМ соответственно не оказывают действия в первые сутки применения, однако после 48 ч воздействия вызывают арест клеточного цикла в фазе G0/G1, не позволяя клеткам перейти к репликации ДНК. В случае соединения III 3 это составляет 61% клеток популяции, в случае соединения III 4 – 68% клеток популяции, в то время как в контрольной группе количество клеток в пресинтетической фазе цикла составляет 50%.

Экспериментальная биологическая часть. Культуры клеток человека A549 (карцинома легкого, ATCC®CCL-185™) и HCT116 (карцинома кишечника, ATCC®CCL-247™) выращивали в среде DMEM (PanEco, Moscow, Russia), Jurkat (острая Т-клеточная лейкемия, ATCC®TIB-152™) в среде RPMI-1640 (Gibco, Scotland, UK) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ThermoFisher Scientific, Paisley, UK), 2мМ L-глутамин (PanEco, Moscow, Russia) и 1% гентамицина (ОАО Дальхимфарм, Россия) в качестве антибиотика при 37 °С и 5% CO₂ во влажной атмосфере.

Цитотоксичность всех синтезированных соединений была определена по МТТ-тесту [14]. Клетки были посеяны в концентрации $1 \cdot 10^4$ клеток/200 мкл в 96-луночный планшет и культивировались при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO₂. После 24 ч инкубации к культурам клеток были добавлены различные концентрации тестируемых соединений (от 100 до 1,56 мкМ), и далее клетки культивировались в тех же условиях в течение 72 ч. Каждая концентрация была выполнена в трех опытных пробах. Все вещества были растворены в ДМСО, конечная концентрация ДМСО в лунке не превышала 0,1% и не была токсичной для клеток.

В качестве контрольных выступали лунки, в которые добавляли растворитель в конечной концентрации 0,1%. После инкубации в каждую лунку было добавлено 20 мкл МТТ (5 мг/мл), и планшеты инкубировались еще в течение 2 ч. Затем из планшетов была удалена среда, и в каждую лунку добавили 100 мкл ДМСО для растворения образовавшихся кристаллов формазана. С помощью планшетного анализатора Cytation3 (BioTek Instruments, Inc) определяли оптическую плотность при 536 нм [28].

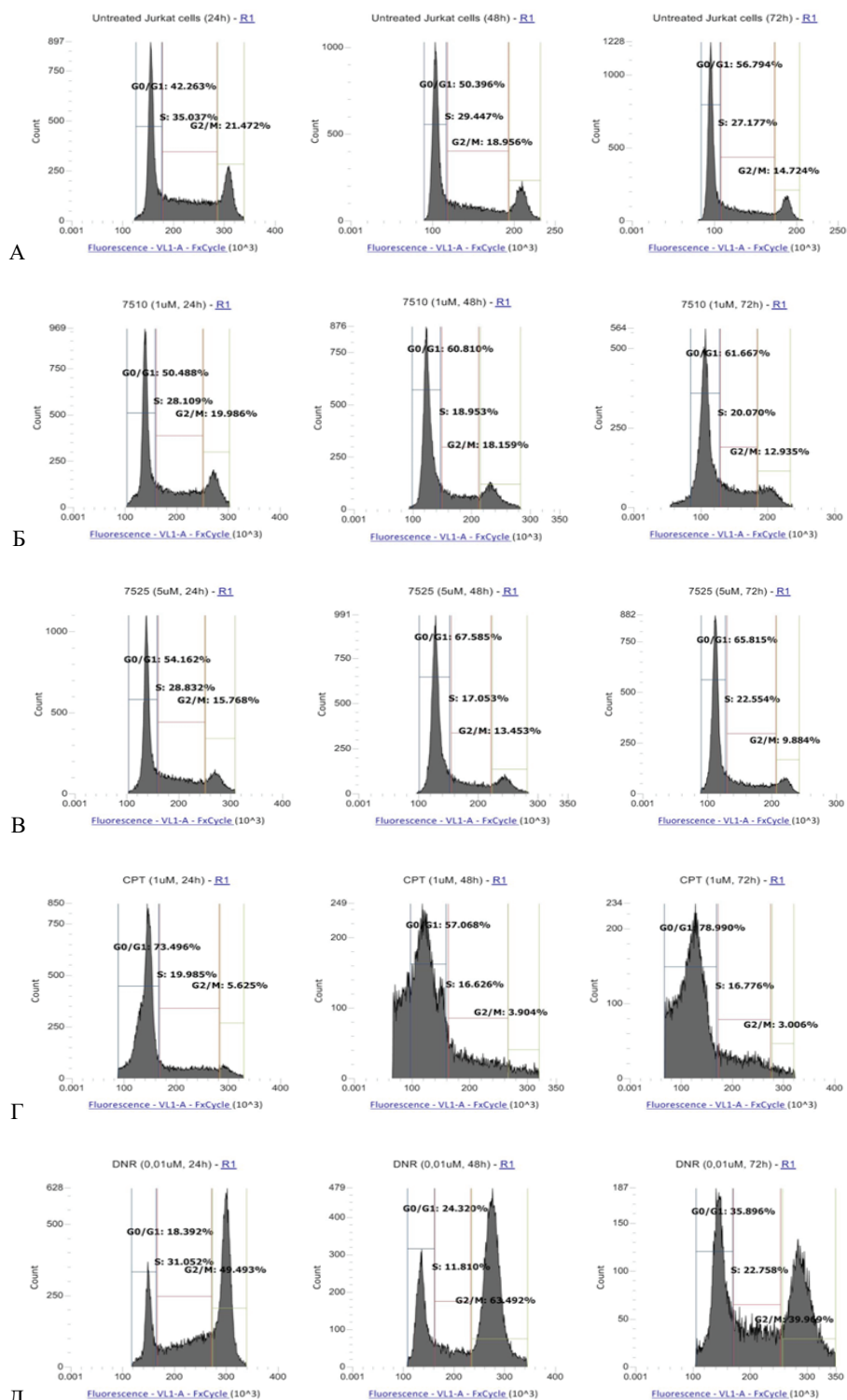


Рис. 3. Гистограммы популяций клеток, находящихся в различных фазах клеточного цикла: необработанных (А), после воздействия соединения III 3 (Б), соединения III 4 (В) или препаратов сравнения камптотецина (Г) и даунорубицина (Д) – через 24, 48 и 72 ч

Цитотоксичность соединений **III-3** и **III-4** дополнительно определяли с помощью ресазурина-теста [25]. Клетки были посеяны в концентрации $6 \cdot 10^4$ клеток/200 мкл в 96-луночный планшет и культивировались при 37 °С во влажной атмосфере с 5%-ным CO₂ с различными концентрациями тестируемых соединений (от 100 до 1,56 мкМ) в течение 72 ч. Каждая концентрация была выполнена в трех опытных пробах. Все вещества были растворены в ДМСО, конечная концентрация ДМСО в лунке не превышала 0,1% и не была токсичной для клеток. В качестве контрольных выступали лунки, в которые добавляли растворитель ДМСО в конечной концентрации 0,1%. После инкубации в каждую лунку было добавлено 20 мкл ресазурина (7-гидрокси-3Н-феноксазин-3-он-10-оксида натриевой соли с конечной концентрацией 50 мкМ), и планшеты дополнительно инкубировали в течение 2 ч. Флуоресценцию восстановленного резорфуфина определяли с помощью планшетного анализатора Cytation3 (BioTek) при длине волны возбуждения 550 нм, эмиссии 585 нм [11].

В качестве количественного критерия цитотоксичности тестируемых соединений был использован индекс IC₅₀. Значение концентрации, вызывающее 50%-ное ингибирование роста популяции клеток (IC₅₀), было определено на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9. За 100%-ную принимали выживаемость клеток, инкубированных без исследуемых соединений (контроль).

Для детектирования апоптоза в клетках использовали метод проточной цитометрии. Оценивали экстернализацию фосфатидилсерина с помощью теста с аннексином V, а для определения некротической популяции использовали краситель SYTOX Blue [22]. Клетки сеяли в 12-луночный планшет (1×10^6 клеток в 1000 мкл), добавляли растворы исследуемых соединений и препаратов сравнения в дозах, близких к IC₅₀, и инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч. Пробы были подготовлены в соответствии с инструкцией производителя реагентов к набору реагентов Annexin V, APC Ready Flow™ Reagent (Invitrogen by ThermoFisher Scientific, USA), а затем проанализированы с помощью проточного цитометра Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer при использовании 638 и 405 нм лазеров с 670/14 и 440/50 полосовыми фильтрами соответственно, по достижении 50 000 событий со стандартной скоростью потока 100 мкл/мин [10].

Оценку влияния исследуемых соединений на клеточный цикл проводили с использованием проточной цитофлуориметрии путем измерения содержания ДНК в клетках [27]. Клетки сеяли в 12-луночный планшет (1×10^6 клеток в 1000 мкл), добавляли растворы исследуемых соединений и препаратов сравнения в дозах, близких к IC₅₀, затем инкубировали в течение 24, 48 и 72 ч. Клеточный материал был подготовлен в соответствии с инструкцией производителя реагента к набору реагентов FxCycle™ Violet stain (Molecular Probes by Life Technologies, USA). Клетки фиксировали холодным этанолом (70%) в течение 15 мин и отмывали фосфатно-солевым буфером. Затем анализировали с помощью проточного цитометра Attune NxT Acoustic Focusing Cytometer, используя 405 нм лазер с 440/50 полосовым фильтром, по достижении 50 000 событий со стандартной скоростью потока 12,5 мкл/мин [10].

Выводы

Ряд исследованных пиранопиридонотриптаминов обладает цитотоксичностью по отношению к опухолевым культурам клеток человека A549 и HCT116. Для проявления цитотоксичности наибольшее значение имеют наличие и число атомов брома в триптаминовом фрагменте.

Пиранопиридонотриптамины, не содержащие бром, демонстрируют отсутствие цитотоксического эффекта. При введении одного атома брома в индольное ядро пиранопиридонотриптамины начинают проявлять цитотоксичность, а в случае двух атомов брома в триптаминовом фрагменте все 7 соединений обладают цитотоксичностью, близкой или даже превышающей цитотоксичность препарата сравнения камптотецина.

Два соединения с цитотоксичностью, близкой к цитотоксичности камптотецина, **III 3** и **III 4**, оказывают примерно равный ему эффект воздействия на клеточный цикл, вызывая арест его в пресинтетической фазе. Однако данные соединения не обладают влиянием на апоптоз, присущий камптотецину, при исследовании в тесте с Аннексином V.

Биологическая часть работы выполнена в рамках Государственного задания ИФАВ РАН 2023 г. (тема № FFSN-2021–0013 «Природные биологически активные вещества и их аналоги»).

Библиографический список

1. Аникина Л.В., Семаков А.В., Пухов С.А., Афанасьева С.В., Клочков С.Г. Сравнение цитотоксичности двух антрациклиновых антибиотиков в отношении нормальных и опухолевых линий клеток // *Современные проблемы науки и образования*. – 2016. – № 2. – URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=24159>.
2. Бидыло Т.И., Юровская М.А. Синтез триптаминов по Фишеру с использованием синтетических предшественников и скрытых форм аминобутанала (обзор) // *Химия гетероциклических соединений*. – 2008. – № 4. – С. 493–538. <https://doi.org/10.1039/B911516C>.
3. Лайпанов Р.К., Токмаков Г.П., Денисов П.Д., Пржевальский Н.М. Синтез триптаминов по Грандбергу для мультикомпонентных реакций // *Известия ТСХА*. – 2012. – Вып. 5. – С. 123–129.
4. Лайпанов Р.К., Токмаков Г.П., Пржевальский Н.М. Синтез новых биологически активных производных пиридонов-2 с фрагментом триптамина // *Известия ТСХА*. – 2014. – Вып 4. – С. 90–101.
5. Пржевальский Н.М., Аникина Л.В., Глоба А.А., Токмаков Г.П., Лайпанов Р.К., Вершинкин Д.А. Цитотоксическая активность новых производных триптаминов // *Сборник тезисов докладов Всероссийского конгресса по химии гетероциклических соединений «KOST-2021»*, г. Сочи, 12–16 октября 2021 г. – 2021. – С. 263. – URL: https://kpfu.ru/staff_files/F764429877/Abstracts_KOST2021_final.pdf.
6. Пржевальский Н.М., Лайпанов Р.К., Токмаков Г.П., Лукина И.В., Вершинкин Д.А., Тафеенко В.А. Синтез новых потенциально биологически активных пиранопиридонов с фрагментом триптамина // *Известия Академии наук. Серия «Химическая»*. – 2021. – № 3. – С. 555–561. <https://doi.org/10.1007/s11172-021-3124-4>.
7. Пржевальский Н.М., Лайпанов Р.К., Токмаков Г.П., Нам Н.Л. Реакция Грандберга в синтезе биологически активных соединений // *Известия Академии наук. Серия «Химическая»*. – 2016. – № 7. – С. 1709–1715. <https://doi.org/10.1007/s11172-016-1499-4>.
8. Пржевальский Н.М., Лайпанов Р.К., Токмаков Г.П., Рожкова Е.Н. Трехкомпонентный синтез новых производных пирано[3,2-с]пиридонов // *Известия ТСХА*. – 2015. – Вып. 6. – С. 67–78.
9. Пржевальский Н.М., Лайпанов Р.К., Токмаков Г.П., Рожкова Е.Н. Синтез потенциально цитотоксических бромпроизводных пирано[3,2-с]пиридонов // *Известия ТСХА*. – 2017. – Вып. 3. – С. 146–158.
10. Пухов С.А., Аникина Л.В., Ларин А.А., Феритат Л.Л., Куликов А.С., Махова Н.Н. Цитотоксический эффект гетерилфуроксанов и индукция апоптоза в культуре

клеток хронической миелоидной лейкемии K562 // Известия Академии наук. Серия «Химическая». – 2019. – № 1. – С. 158–162.

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

12. Aksenov N.A., Aksenov A.V., Kornienko A., Carvalho A., Mathieu V., Aksenov D.A., Ovcharov S.V., Griaznov G.D., Rubin M.A. Nitroalkane based approach to one-pot three-component synthesis of isocryptolepine and its analogs with potent anticancer activities // RSC Advances. – 2018. – № 8. – Pp. 36980–36986. <https://doi.org/10.1039/C8RA08155G>.

13. Aksenov D.A., Akulova A.S., Aleksandrova E.A., Aksenov N.A., Leontiev A.V., Aksenov A.V. An effective synthesis of previously unknown 7-aryl substituted paullones // Molecules. – 2023. – Vol. 28, № 5. – P. 2324. <https://doi.org/10.3390/molecules28052324>.

14. Allen R.T., Hunter W.J., Agrawal D.K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis // Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. – 1997. – Vol. 37, № 5. – Pp. 215–228. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(97\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(97)00033-6).

15. Barceloux D.G. Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized Chemicals and Psychoactive Plants // John Wiley & Sons. – Inc. 2012. Chapter. 11. Tryptamine designer drugs. – Pp. 193–199. <https://doi.org/10.1002/9781118105955.ch11>.

16. Chen X., Hao B., Li D., Reiter R.J., Bai Y., Abay B., Chen G., Lin S., Zheng T., Ren Y., Xu X., Li M., Fan L. Melatonin inhibits lung cancer development by reversing the Warburg effect via stimulating the SIRT3/PDH axis // Journal of Pineal Research. – 2021. – Vol. 71, № 2. – P. e12755. <https://doi.org/10.1111/jpi.12755>.

17. Darzynkiewicz Z., Bender E., Smolewski P. Flow cytometry in analysis of cell cycle and apoptosis // Seminars in Hematology. – 2001. – Vol. 38, № 2. – Pp. 179–193. [https://doi.org/10.1016/s0037-1963\(01\)90051-4](https://doi.org/10.1016/s0037-1963(01)90051-4).

18. Del Rio B., Redruello B., Fernandez M., Martin M.C., Ladero V., Alvarez M.A. The biogenic amine tryptamine, unlike β -phenylethylamine, shows in vitro cytotoxicity at concentrations that have been found in foods // Food Chemistry. – 2020. – Vol. 331. – P. 127303. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127303>.

19. Gorobets N.Yu., Yousefi B.H., Belaj F., Kappe C.O. Rapid microwave-assisted solution phase synthesis of substituted 2-pyridone libraries // Tetrahedron. – 2004. – Vol. 60, № 39. – Pp. 8633–8644. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2004.05.100>.

20. Jessen H.J., Gademann K. 4-Hydroxy-2-pyridone alkaloids: Structures and synthetic approaches // Natural Product Reports. – 2010. – Vol. 27, № 8. – Pp. 1168–1185. <https://doi.org/10.1039/B911516C>.

21. Kochanowska-Karamyan A.J., Hamman M.T. Marine Indole Alkaloids: Potential New Drug Leads for the Control of Depression and Anxiety // Chemical Reviews. – 2010. – Vol. 110, № 8. – Pp. 4489–4497. <https://doi.org/10.1021/cr900211p>.

22. Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., Annexin M.N. van Oers. V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis // Blood. – 1994. – Vol. 84, № 5. – Pp. 1415–1420. <https://doi.org/10.1182/blood.V84.5.1415.1415>.

23. Li Z., Ding B., Ali M.R.K., Zhao L., Zang X., Lv Z. Dual Effect of Tryptamine on Prostate Cancer Cell Growth Regulation: A Pilot Study // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – Vol. 23, № 19. – P. 11087. <https://doi.org/10.3390/ijms231911087>.

24. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay // Journal of Immunological Methods. – 1983. – Vol. 65, № 1–2. – Pp. 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).

25. O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F. Investigation of Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity // *European Journal of Biochemistry*. – 2000. – Vol. 267, № 17. – Pp. 5421–5426. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>.

26. Poroikov V. Computer-assisted prediction and design of Multitargeted drugs // *Invited abstracts. Medicinal Chemistry Research*. – 2010. – Vol. 19 (Suppl 1). – P. s30. <http://dx.doi.org/10.1007/s00044-010-9296-3>.

27. Pozarowski P., Darzynkiewicz Z. Analysis of cell cycle by flow cytometry // *Methods in Molecular Biology*. – 2004. – Vol. 281. – Pp. 301–311. <https://doi.org/10.1385/1-59259-811-0:301>.

28. Qu S.-J., Wang G.-F., Duan W.-H., Yao S.-Y., Zuo J.-P., Tan C.-H., Zhu D.-Y. Tryptamine derivatives as novel non-nucleosidic inhibitors against hepatitis B virus // *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. – 2011. – Vol. 19, № 10. – Pp. 3120–3127. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.04.004>.

29. Simonetti G., Boga C., Durante J., Micheletti G., Telese D., Caruana P., Rorà A.G.L., Mantellini F., Bruno S., Martinelli G., Calonghi N. Synthesis of Novel Tryptamine Derivatives and Their Biological Activity as Antitumor Agents // *Molecules*. – 2021. – Vol. 26, № 3. – P. 683. <https://doi.org/10.3390/molecules26030683>.

30. Vargas A.S., Luis Á., Barroso M., Gallardo E., Pereira L. Psilocybin as a New Approach to Treat Depression and Anxiety in the Context of Life-Threatening Diseases. A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials // *Biomedicines*. – 2020. – Vol. 8, № 9. – P. 331. <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090331>.

31. Zhai X., Wang N., Jiao H., Zhang J., Li C., Ren W., Reiter R.J., Su S. Melatonin and other indoles show antiviral activities against swine coronaviruses in vitro at pharmacological concentrations // *Journal of Pineal Research*. – 2021. – Vol. 71, № 2. – P. e12574. <https://doi.org/10.1111/jpi.12754>.

CYTOTOXICITY OF PYRANOPYRIDONES WITH TRYPTAMINE FRAGMENT

N.M. PRZHEVALSKIY¹, L.V. ANIKINA², A.A. GLOBA²,
G.P. TOKMAKOV¹, R.K. LAYPANOV¹, D.A. VERSHINKIN¹

(¹ Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy,

²Institute of Physiologically Active Substances of the Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of the Russian Academy of Sciences)

*New derivatives of pyrano[3,2-c]pyridones **III 5, 10, 15, 18** were synthesised by three-component reaction of pyridonotryptamines **I**, aromatic aldehydes **II** and malononitril. Pyridonotryptamines **I** were synthesised by reaction of tryptamines (these compounds were obtained by Grandberg reaction of arylhydrazines with γ -halogencarbonyl compounds) with 4-hydroxy-6-methyl-2H-pyran- 2-on. The aromatic aldehydes **II 1, 5, 6, 9** are commercially available compounds. Boiling a mixture of compounds **I, II** and malononitril (molar ratio 1:1.1:1.1) in ethyl alcohol in the presence of triethylamine gives the target compounds **III 5, 10, 15, 18**. The product yields 44–75%. The structure of pyrano[3,2-c]pyridones with tryptamine fragment **III** (four compounds) was proved by ¹H NMR and confirmed by elemental analysis. Compounds **III 1–4, 6–9, 11–14, 16** and **17** were synthesised earlier by a similar procedure.*

*The cytotoxicity of the synthesised compounds **III 1–18** was determined in vitro using the MTT test on human cell cultures A549 (lung carcinoma) and HCT116 (colorectal carcinoma). Camptothecin and daunorubicin were used as reference drugs. The value of the concentration inducing 50% inhibition of the cell growth (IC₅₀, μ M) was determined from the dose-response curves*

using GraphPad Prism 9 software. Compounds **III 3** ($R^1=R^2=Br$, $Ar=2,5\text{-di-OMe-C}_6\text{H}_3$), **III 4** ($R^1=R^2=Br$, $Ar=4\text{-F-C}_6\text{H}_4$), **III 6** ($R^1=Me$, $R^2=H$, $Ar=2,4,5\text{-tris-OMe-C}_6\text{H}_2$), **III 13** ($R^1=R^2=Br$, $Ar=Ph$), **III 14** ($R^1=R^2=Br$, $Ar=2,3\text{-di-OMe-C}_6\text{H}_3$) and **III 16** ($R^1=R^2=Br$, $Ar=Py$) showed the best results for A549 and HCT116 cultures. The effect of the most active compounds **III 3** and **III 4** on the cell cycle and apoptosis was studied on Jurkat cell culture (human acute T-cell leukemia). Compounds **III 3** and **III 4** showed significant cytotoxicity against the Jurkat line in the resazurin test – 1.47 ± 0.06 and 4.56 ± 0.19 μM , respectively, comparable to the cytotoxicity of the reference drug camptothecin of 1.24 ± 0.05 μM . Based on the flow cytometry results, it is suggested that the effect is manifested by some (possibly reversible) cell cycle arrest in the presynthetic phase.

Key words: aromatic aldehydes, indoles, pyranopyridones, pyridones, pyridonotryptamines, tryptamines, cytotoxicity, MTT test, apoptosis, cell cycle.

References

1. Anikina L.V., Semakov A.V., Pukhov S.A., Afanas'eva S.V., Klochkov S.G. Comparison of Cytotoxicity of Two Anthracycline Antibiotics against Normal and Tumour Cell Lines. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016; No 2. URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=24159> (In Rus.)
2. Bidylo T.I., Urovskaya M.A. Synthesis of Tryptamines by the Fisher Method Using Synthetic Precursor and Latent Forms of Amino-Butanal (Review). *Khimiya geterotsiklicheskih soedineniy*. 2008; 4: 493–538. URL: <https://doi.org/10.1039/B911516C> (In Rus.)
3. Laypanov R.K., Tokmakov G.P., Denisov P.D., Przhevalskiy N.M. Grandberg Synthesis of Tryptamines for Multicomponent Reactions. *Izvestiya TSKhA*. 2012; 5: 123–129. (In Rus.)
4. Laypanov R.K., Tokmakov G.P., Przhevalskiy N.M. Synthesis of New Biologically Active Pyridone-2 Derivatives with a Tryptamine Fragment. *Izvestiya TSKhA*. 2014; 4: 90–101. (In Rus.)
5. Przhevalskiy N.M., Anikina L.V., Globa A.A., Tokmakov G.P., Laypanov R.K., Vershinkin D.A. Cytotoxic Activity of New Derivatives of Tryptamines. *Sbornik tezisev dokladov Vserossiyskogo kongressa po khimii geterotsiklicheskih soedineniy "KOST-2021"*. Sochi. 12–16 oktyabrya 2021 g. 2021: 263. URL: https://kpfu.ru/staff_files/F764429877/Abstracts_KOST2021_final.pdf. (In Rus.)
6. Przhevalskiy N.M., Laypanov R.K., Tokmakov G.P., Lukina I.V., Vershinkin D.A., Tafeenko V.A. Synthesis of New Potentially Biologically Active Pyranopyridones with Tryptamine Fragment. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya Chimicheskaya*. 2021; 3: 555–561. URL: <https://doi.org/10.1007/s11172-021-3124-4>. (In Rus.)
7. Przhevalskiy N.M., Laypanov R.K., Tokmakov G.P., Nam N.L. Grandberg Reaction in the Synthesis of Biological Active Compounds. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya Khimicheskaya*. 2016; 7: 1709–1715. URL: <https://doi.org/10.1007/s11172-016-1499-4>. (In Rus.)
8. Przhevalskiy N.M., Laypanov R.K., Tokmakov G.P., Rozhkova E.N. Three-Component Synthesis Of Novel Pyrano[3,2-C]Pyridone Derivatives. *Izvestiya TSKhA*. 2015; 6: 67–78. (In Rus.)
9. Przhevalskiy N.M., Laypanov R.K., Tokmakov G.P., Rozhkova E.N. Synthesis of Potentially Cytotoxic Bromo Derivatives of Pyrano[3,2-C]Pyridines. *Izvestiya TSKhA*. 2017; 3: 146–158. (In Rus.)
10. Pukhov S.A., Anikina L.V., Larin A.A., Fershtat L.L., Kulikov A.S., Makhova N.N. Cytotoxic Effect of Heterylfuroxanes and Induction of Apoptosis in Chronic

- Myeloid Leukaemia K562 Cell Culture. *Izvestiya Akademii nauk. Seriya Khimicheskaya*. 2019; 1: 158–162. (In Rus.)
11. *Pukhov S.A., Neganova M.E., Anikina L.V., Shevtsova E.F., Afanas'eva S.V., Klochkov S.V.* Inhibition of Breast Adenocarcinoma Cell Growth by Epoxyalantolactone and Its Derivatives. *Fundamental'nye issledovaniya*. 2014; 9: 1988–1992. (In Rus.)
 12. *Aksenov N.A., Aksenov A.V., Kornienko A., De Carvalho A., Mathieu V., Akse-
nov D.A., Ovcharov S.V., Griaznov G.D., Rubin M.A.* Nitroalkane based approach to one-pot
three-component synthesis of isocryptolepine and its analogs with potent anticancer activi-
ties. *RSC Advances*. 2018; 8: 36980–36986. URL: <https://doi.org/10.1039/C8RA08155G>
 13. *Aksenov D.A., Akulova A.S., Aleksandrova E.A., Aksenov N.A., Leontiev A.V.,
Aksenov A.V.* An effective synthesis of previously unknown 7-aryl substituted paullones.
Molecules. 2023; 28; 5: 2324. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules28052324>
 14. *Allen R.T., Hunter W.J., Agrawal D.K.* Morphological and biochemical characte-
rization and analysis of apoptosis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*.
1997; 37; 5: 215–228. URL: [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(97\)00033-6](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(97)00033-6)
 15. *Barceloux D.G.* Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized Chemicals
and Psychoactive Plants. John Wiley & Sons, Inc.: 2012. Chapter 11. Tryptamine designer
drugs. Pp. 193–199. URL: <https://doi.org/10.1002/9781118105955.ch11>
 16. *Chen X., Hao B., Li D., Reiter R.J., Bai Y., AbayB., ChenG., Lin S., Zheng T.,
Ren Y., Xu X., Li M., Fan L.* Melatonin inhibits lung cancer development by reversing
the Warburg effect via stimulating the SIRT3/PDH axis. *Journal of Pineal Research*. 2021;
71; 2: e12755. URL: <https://doi.org/10.1111/jpi.12755>
 17. *Darzynkiewicz Z., Bender E., Smolewski P.* Flow cytometry in analy-
sis of cell cycle and apoptosis. *Seminars in Hematology*. 2001; 38; 2: 179–193. URL:
[https://doi.org/10.1016/s0037-1963\(01\)90051-4](https://doi.org/10.1016/s0037-1963(01)90051-4)
 18. *Del Rio B., Redruello B., Fernandez M., Martin M.C., Ladero V., Alvarez M.A.*
The biogenic amine tryptamine, unlike β -phenylethylamine, shows in vitro cytotoxicity
at concentrations that have been found in foods. *Food Chemistry*. 2020; 331: 127303. URL:
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127303>
 19. *Gorobets N.Yu., Yousefi B.H., Belaj F., Kappe C.O.* Rapid microwave-assisted
solution phase synthesis of substituted 2-pyridone libraries. *Tetrahedron*. 2004; 60: 8633.
URL: <https://doi.org/10.1007/s11172-016-1499-4>
 20. *Jessen H.J., Gademann K.* 4-Hydroxy-2-pyridonealkaloids: Structures and synthe-
tic approaches. *Natural Product Reports*. 2010; 27: 1168–1185. URL: <https://doi.org/10.1039/B911516C>
 21. *Kochanowska-Karamyan A.J., Hamman M.T.* Marine Indole Alcaloids: Poten-
tial New Drug Leads for the Control of Depression and Anxiety. *Chemical Reviews*. 2010;
110; 8: 4489–4497. URL: <https://doi.org/10.1021/cr900211p>
 22. *Koopman G., Reutelingsperger C.P., Kuijten G.A., Keehnen R.M., Pals S.T., van
Oers M.N.* Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B
cells undergoing apoptosis. *Blood*. 1994; 84; 5: 1415–1420.
 23. *Li Z., Ding B., Ali M.R.K., Zhao L., Zang X., Lv Z.* Dual Effect of Tryptamine
on Prostate Cancer Cell Growth Regulation: A Pilot Study. *International Journal of Mole-
cular Sciences*. 2022.; 23; 19: 11087. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms231911087>
 24. *Mosmann T.* Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: applica-
tion to proliferation and cytotoxicity assay. *Journal of Immunological Methods*. 1983; 65;
1–2: 55–63. URL: [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
 25. *O'Brien J., Wilson I., Orton T., Pognan F.* Investigation of Alamar Blue (resazurin)
fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European Journal of Bio-
chemistry*. 2000; 267; 17: 5421–5426. URL: <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01606.x>

26. *Poroikov V.* Computer-assisted prediction and design of Multitargeted drugs. Invited abstracts. *Medicinal Chemistry Research*. 2010; 19(1): 30. URL: <https://dx.doi.org/10.1007/s00044-010-9296-3>

27. *Pozarowski P., Darzynkiewicz Z.* Analysis of cell cycle by flow cytometry. *Methods in Molecular Biology*. 2004; 281: 301–311. URL: <https://doi.org/10.1385/1-59259-811-0:301>

28. *Qu S.-J., Wang G.-F., Duan W.-H., Yao S.-Y., Zuo J.-P., Tan C.-H., Zhu D.-Y.* Tryptamine derivatives as novel non-nucleosidic inhibitors against hepatitis B virus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2011; 19; 10: 3120–3127. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2011.04.004>

29. *Simonetti G., Boga C., Durante J., Micheletti G., Telese D., Caruana P., di Rorà A.G.L., Mantellini F., Bruno S., Martinelli G., Calonghi N.* Synthesis of Novel Tryptamine Derivatives and Their Biological Activity as Antitumor Agents. *Molecules*. 2021; 26: 3: 683. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules26030683>

30. *Vargas A.S., Luis Á., Barroso M., Gallardo E., Pereira L.* Psilocybin as a New Approach to Treat Depression and Anxiety in the Context of Life-Threatening Diseases. A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *Biomedicines*. 2020; 8; 9: 331. URL: <https://doi.org/10.3390/biomedicines8090331>

31. *Zhai X., Wang N., Jiao H., Zhang J., Li C., Ren W., Reiter R.J., Su S.* Melatonin and other indoles show antiviral activities against swine coronaviruses in vitro at pharmacological concentrations. *Journal of Pineal Research*. 2021; 71; 2: e12574. URL: <https://doi.org/10.1111/jpi.12754>

Пржевальский Николай Михайлович, д-р хим. наук, профессор кафедры химии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевский пр-д, 2/4; e-mail: prjevalski@mail.ru; тел.: (903) 681–48–23

Аникина Лада Владимировна, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории природных соединений Института физиологически активных веществ РАН; 142432, Российская Федерация, Московская область, Черноголовка, Северный пр-д, 1; e-mail: anikina1970@gmail.com; тел.: (919) 712–01–70

Глоба Анастасия Алексеевна, младший научный сотрудник лаборатории природных соединений Института физиологически активных веществ РАН; 142432, Российская Федерация, Московская область, Черноголовка, Северный пр-д, 1

Токмаков Геннадий Петрович, канд. хим. наук, профессор кафедры химии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевский пр-д, 2/4

Лайпанов Рустам Казиевич, соискатель кафедры химии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева; 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевский пр-д, 2/4

Вершинкин Данила Александрович, научный сотрудник УН ЦКП «Сервисная лаборатория комплексного анализа химических соединений»; 127434, Российская Федерация, г. Москва, Тимирязевский пр-д, 2/4

Nikolay M. Przhevalskiy, DSc (Chem), Professor of the Department of Chemistry, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation; phone: (903) 681–48–23; E-mail: prjevalski@mail.ru)

Lada V. Anikina, CSc (Bio), Leading Research Associate, Laboratory of Natural Compounds, Institute of Physiologically Active Substances of the Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of the Russian Academy

of Sciences (1-iy Severniy Passage, Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russian Federation; phone: (919) 712-01-70; E-mail: anikina1970@gmail.com)

Anastasiya A. Globa, Junior Research Associate, Laboratory of Natural Compounds, Institute of Physiologically Active Substances of the Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of the Russian Academy of Sciences (1-iy Severniy Passage, Chernogolovka, Moscow region, 142432, Russian Federation)

Gennadiy Petrovich Tokmakov, DSc (Chem), Professor of the Department of Chemistry, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation)

Rustam K. Laypanov, external post-graduate student, Department of Chemistry, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation)

Danila A. Vershinkin, Research Associate, Service Laboratory for Complex Analysis of Chemical Compounds, Russian State Agrarian University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (49, Timiryazevskaya Str., Moscow, 127434, Russian Federation)