

СИНТЕЗ И ВЛИЯНИЕ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ И РЕДОКС-СОСТОЯНИЕ КЛЕТОК ГЛИОМЫ КРЫСЫ ЛИНИИ С6 НОВЫХ ИНДОЛСОДЕРЖАЩИХ ПРОИЗВОДНЫХ БЕНЗО[*f*]КУМАРИНА

© 2024 г. Т.А. Кулагова^а, В.А. Шумский^б, И.В. Минеева^{с,*}

^а НИУ Институт ядерных проблем БГУ, Беларусь, 220006 Минск, ул. Бобруйская, 11

^б ГНУ Институт биофизики и клеточной инженерии НАН Беларуси,
Беларусь 220072 Минск, ул. Академическая, 27

^с Белорусский государственный университет, Беларусь, 220030 Минск, просп. Независимости, 4
*e-mail: i.mineyeva@yandex.ru

Поступила в редакцию 21.10.2023 г.

После доработки 10.11.2023 г.

Принята к публикации 12.11.2023 г.

Впервые проведена модификация 2-ацетил-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-она и 2-[(2*E*)-3-фенилпроп-2-еноил]-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-она за счет взаимодействия с индолом. Установлено, что полученные производные бензо[*f*]кумарина проявляют антиоксидантные свойства в модельных системах — взаимодействуют с пероксидом водорода, гипохлоритом натрия и регулируют редокс-состояние клеток глиомы крысы линии С6, что проявляется снижением концентрации внутриклеточного пероксида водорода и повышением уровня восстановленного глутатиона. В присутствии экзогенного пероксида водорода синтезированные соединения бензо[*f*]кумаринов оказывают протекторное действие на клетки, выступая в роли антиоксидантов и восстанавливая редокс-баланс. Выявлено, что 2-[3-(1*H*-индол-3-ил)-3-фенилпропаноил]-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-он в микромолярных концентрациях ингибирует пролиферативную активность клеток глиомы крысы линии С6 на 25–35%.

Ключевые слова: 2-ацетил-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-он, 2-[(2*E*)-3-фенилпроп-2-еноил]-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-он, 2-(1,1-ди-1*H*-индол-3-илэтил)-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-он, 2-[3-(1*H*-индол-3-ил)-3-фенилпропаноил]-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-он, антиоксиданты, индол, анализ *in silico*, флуориметрия, хемилюминесценция

DOI: 10.31857/S0514749224060081, EDN: QZKOQC

ВВЕДЕНИЕ

Бензо[*f*]кумарины являются интересными и необычными структурными компонентами многих натуральных продуктов и биологически активных соединений [1–7], демонстрирующих разнообразные виды активности [8–10]: противоопухолевой [1, 5, 6], противовоспалительной [2], противовирусной [3], противомикробной [4]. Бензо[*f*]кумарины очень разнятся по структуре ввиду большого числа различных боковых

групп в их базовом остоле, которые в свою очередь могут влиять на их биологическую активность. Более того, уникальная структура способствует их взаимодействию с широким спектром ферментов и рецепторов благодаря слабым взаимодействиям, поэтому бензо[*f*]кумарины представляют значительный интерес в качестве лекарственных средств [7, 9, 10].

Благодаря уникальным оптическим свойствам производные бензо[*f*]кумарина широко

применяются в качестве матрицы (базового компонента) для синтеза органических красителей и флуорофоров [11, 12]. Бензо[*f*]кумарины обладают длинами волн возбуждения и испускания в видимом диапазоне, высокой химической и фотоустойчивостью, а также высокой биологической совместимостью, что делает их перспективными для биологического применения, например, в биоимиджинге [13, 14].

Индолы представляют собой важный класс привилегированных структур и широко распространены во многих натуральных продуктах и фармацевтических препаратах [15–17]. Индол и его аналоги обладают широким спектром биологической активности [18–25], включая выраженное противораковое [18, 19], противовирусное [20], противовоспалительное и обезболивающее [21, 25], антигипертензивное [22], противоастматическое [23], противотуберкулезное действие [24].

Ранее по данным литературы было реализовано несколько основных направлений модификации кумаринов индолом (схема 1) [26–34].

Поэтому получение новых гибридных производных бензо[*f*]кумаринов и индолов представ-

ляет существенный научный и практический интерес для биомедицинских исследований, биохимии, фармацевтики.

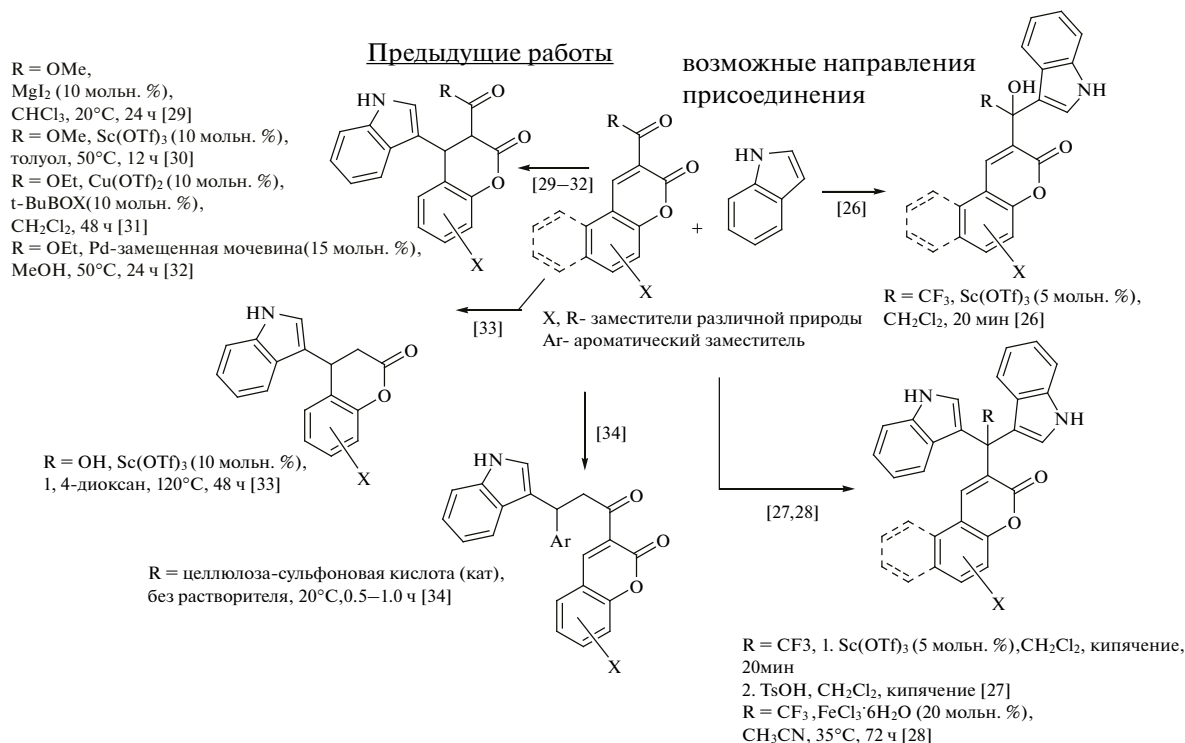
Целью данной работы стали реализация неизученного ранее селективного 1,2- и 1,4-присоединения индола (**1**) к бензо[*f*]кумаринам **2** и **3**, что может повлиять на профиль биологической активности соединения в целом (схема 2), при действии йода как дешевого и доступного катализатора в выбранном растворителе, что ранее также не осуществлялось; подбор оптимальных условий реакции, а также исследование влияния данных соединений на пролиферацию и редокс-состояние клеток глиомы крысы линии С6.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

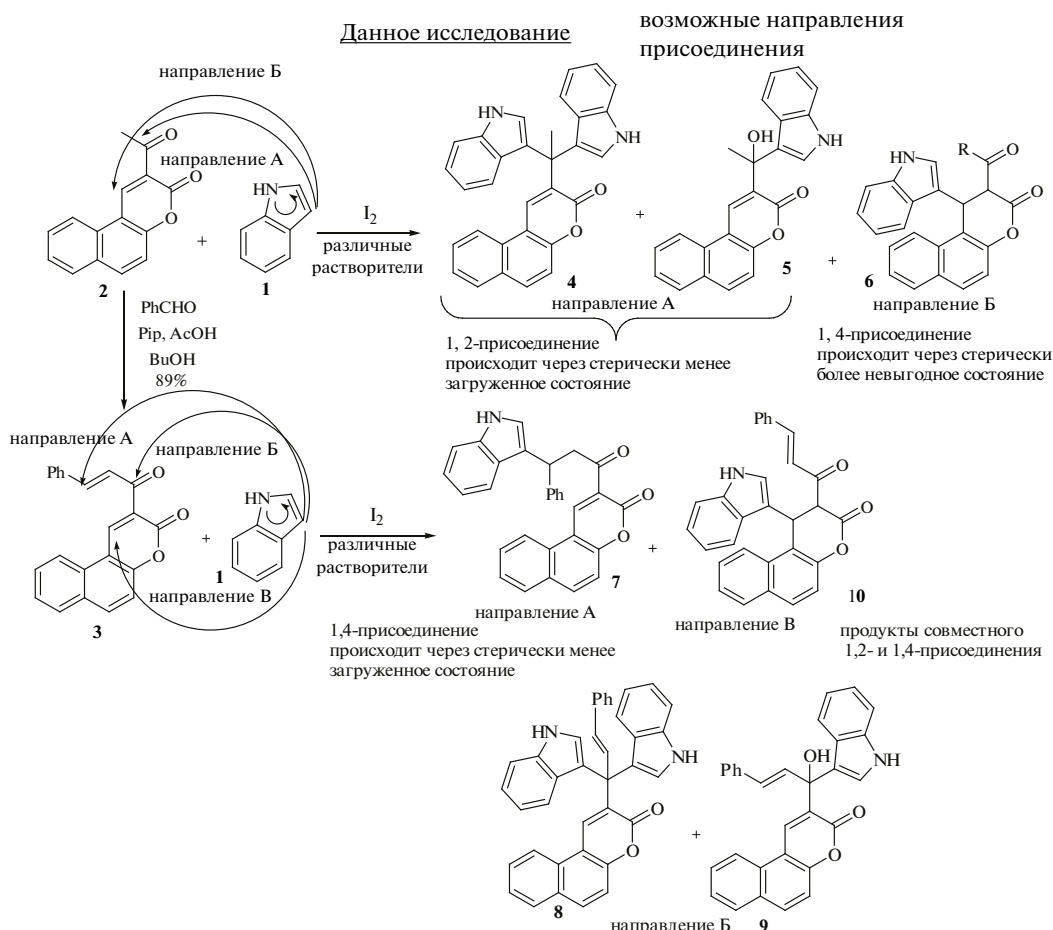
Для проведения данного исследования бензо[*f*]кумарин **2**, полученный из 2-оксинафтойного альдегида стандартным образом [35], реакцией Кляйзена–Шмидта был трансформирован в бензо[*f*]кумарин **3** [36, 37].

Ранее для осуществления 1,2-присоединения индолов к кетонам применяли йод без

Схема 1



Данное исследование



и получен исключительно продукт **7** 1,4-присоединения, выход которого представлен в табл. 2.

Таким образом, в ходе проведенных исследований были получены 2 новых производных бензо[*f*]кумарина **4** и **7**. Наличие сопряженных кратных связей, характерных для большинства антиоксидантов, свидетельствует о возможности синтезированных соединений участвовать в редокс-реакциях. Было изучено влияние производных бензо[*f*]кумарина на свободно-радикальные процессы в модельных системах. Регистрировали интенсивность люминолзависимой хемилюминесценции (ХЛ) после добавления веществ к следующим модельным системам: «Н₂О₂–люминол», «NaOCl–люминол» и «пероксидаза хрена (ПХ) –Н₂О₂–люминол».

Согласно представленным в табл. 3 данным, при добавлении исходных и синтезированных производных бензо[*f*]кумарина 2–4, 7

Таблица 1. Влияние условий реакции 1,2-присоединения индола (**1**) к бензо[*f*]кумарину **2** при действии йода в различных растворителях^a на выход продуктов

Эксперимент	Растворитель	Выход продуктов реакции, %	
		комнатная температура	кипение
1	Et ₂ O	4 (7), 5 (25)	5 (28)
2	CH ₂ Cl ₂	4 (100)	4 (72)
3	CHCl ₃	4 (10), 5 (18)	4 (2), 5 (10)
4	CCl ₄	4 (8), 5 (16)	5 (10)
5	EtOAc	4 (10), 5 (17)	5 (6)
6	ТГФ	4 (40), 5 (56)	5 (14)
7	CH ₃ CN	4 (20), 5 (31)	5 (60)
8	толуол	4 (10), 5 (11)	– ^b
9	MeOH	4 (26), 5 (28)	82
10	EtOH	5 (29)	– ^b
11	<i>i</i> -PrOH	4 (3), 5 (23)	– ^b
12	H ₂ O	0	– ^b
13	ДМСО	0	– ^b
14	ДМФА	0	– ^b
15	1,2-дихлорэтан	4 (100)	4 (20)
16	AcOH	4 (13), 5 (10), 6 (10)	4 (7), 5 (40)
17	AcOH ^г	0	6 (30)
18	1,4-диоксан	4 (20), 5 (61)	5 (4)

^a Во всех экспериментах использовали 0.5 ммоль бензо[*f*]кумарина **2**, 1.0 ммоль индола (**1**), 4 мл растворителя и 0.05 ммоль йода;^b смесь неуставленного состава;^c Эксперимент не проводился;^г Без катализатора.

в концентрациях 10^{–5} и 10^{–6} моль/л в системы «NaOCl–люминол» и «H₂O₂–люминол» происходит значительное снижение интегральной интенсивности люминолзависимой ХЛ, что свидетельствует о взаимодействии исследованных соединений с окислителями и проявлении ими антиоксидантных свойств.

При этом в системе, содержащей фермент ПХ, катализирующий окисление субстратов пероксидом водорода, бензо[*f*]кумарины проявляли слабую антиоксидантную активность. Из данных, представленных в табл. 3, видно, что максимальное уменьшение свободнорадикальных продуктов реакции зарегистрировано под влиянием соединения **7** в концентрации 10^{–5} моль/л. Можно предположить, что константа

взаимодействия исследуемых бензо[*f*]кумаринов с H₂O₂ более низкая, чем у H₂O₂ с ПХ. Таким образом, синтезированные новые производные бензо[*f*]кумарина **4** и **7** являются потенциальными антиоксидантами в биосистемах и способны регулировать уровень активных форм кислорода и хлора, практически не вмешиваясь в работу ферментных редокс-систем.

Для выявления возможности проникновения исследуемых веществ **2–4**, **7** в клетку оценивали эффективность их пассивной диффузии через липидный бислой. Исследование проводили при помощи сервиса PerMM [47], который позволяет на основании 3D структуры исследуемой молекулы предсказать проницаемость мембраны для нее.

Таблица 2. Влияние условий реакции 1,4-присоединения индола (**1**) к бензо[*f*]кумарину **3** при действии йода в различных растворителях^а на выход продукта **7**

Эксперимент	Растворитель	Выход продукта 7 , %	
		комнатная температура	кипячение
1	CH ₂ Cl ₂	82	72
2	ТГФ	46	14
3	CH ₃ CN	51	56
4	толуол	21	4
5	MeOH	– ^в	51
6	1,2-дихлорэтан	70	– ^г
7	AcOH	13	41
8	1,4-диоксан	68	– ^г

^а Во всех экспериментах использовали 0.25 ммоль бензо[*f*]кумарина, 0.25 ммоль индола (**1**), 2 мл растворителя и 0.02 ммоль йода;

^б Во всех экспериментах использовали 10 мол. % йод в качестве катализатора;

^в Эксперимент не проводили, так как в данных условиях соединение **3** нерастворимо;

^г Эксперимент не проводили.

Таблица 3. Интегральная интенсивность ХЛ в модельных системах в присутствии производных бензо[*f*]кумаринов **2–4**, **7**

Соединение	Интегральная интенсивность ХЛ, % от контроля ^а					
	концентрация соединения					
	10 ^{–5} моль/л			10 ^{–6} моль/л		
	NaOCl	H ₂ O ₂	ПХ -H ₂ O ₂	NaOCl	H ₂ O ₂	ПХ -H ₂ O ₂
2	11 ± 3	19 ± 2	91 ± 7	7 ± 2	38 ± 4	95 ± 5
3	9 ± 1	7 ± 1	86 ± 7	7 ± 1	11 ± 2	97 ± 5
4	5 ± 3	50 ± 6	85 ± 7	6 ± 3	62 ± 6	87 ± 6
7	4 ± 2	20 ± 4	42 ± 9	6 ± 2	61 ± 7	86 ± 7

^а Концентрация веществ: NaOCl — 2·10^{–5} моль/л, H₂O₂ — 10^{–3} моль/л, люминола — 5·10^{–4} моль/л, ПХ — 5·10^{–9} г/мл. Данные представлены в % от контроля, принятого за 100%.

В табл. 4 приведены основные параметры, полученные в процессе моделирования, проникновения производных бензо[*f*]кумарина **2–4**, **7** через модельную мембрану, мембрану клеток колоректальной аденокарциномы человека (Caco-2) и гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Видно, что логарифмы коэффициентов проницаемости для моделей 3 различных мембран имеют значение, превышающее –4.35, следовательно, все изучаемые производные бензо[*f*]кумаринов способны проникать через мембрану клеток и участвовать во внутриклеточной регуляции. Также стоит отметить, что соединение **7** показало большую по модулю энергию связывания и высокую проникающую способность для всех 3 типов мембран.

Для выявления биологических эффектов синтезированных соединений были проведены исследования на клетках глиомы крысы линии С6. Исследуемые соединения **2–4**, **7** добавляли к клеткам глиомы в концентрации 10^{–5} и 10^{–6} моль/л. Поскольку через 30 мин инкубирования клетки сохраняли свою целостность, то есть вещества не оказывали цитотоксического

действия на клетки, было оценено количество клеток в культуре после 24 ч инкубирования с соединениями **2–4**, **7**. Данные представлены в табл. 5. В контрольных образцах пролиферативная активность равна $100 \pm 8\%$. Исследуемые бензо[*f*]кумарины **2–4** преимущественно не обладают угнетающим действием на пролиферативную активность клеток глиомы. Количество клеток остается в пределах контрольных значений. Снижение пролиферативной активности зарегистрировано только для вещества **7**: на $35 \pm 10\%$ и $25 \pm 9\%$ в концентрации 10^{-5} и 10^{-6} моль/л, соответственно.

Поскольку вещество **7** вызывает снижение пролиферативной активности клеток глиомы, а также проявляет антиоксидантные свойства в модельных системах, а вещество **4** взаимодействует с пероксидом водорода и гипохлоритом, не модифицируя при этом пролиферацию, была проведена оценка влияния производных бензо[*f*]кумарина на редокс-состояние клеток — баланс внутриклеточной концентрации окислителей

и восстановителей. Редокс-состояние клеток можно оценить по скорости утилизации экзогенного пероксида водорода, а также по количеству основного внутриклеточного антиоксиданта — восстановленного глутатиона (GSH) [48–50].

При использовании монохлорбимана (MCB), который, взаимодействуя с GSH, образует люминесцирующее соединение — глутатионил-конъюгаты MCB [51], установлено, что уровень внутриклеточного GSH увеличивается на $15 \pm 8\%$ и $40 \pm 10\%$ при инкубировании клеток с соединениями **4** и **7** (табл. 6).

Уровень пероксида водорода в клетках глиомы регистрировали флуоресцентным методом с использованием флуоресцентного зонда 2,7-дихлорфлуоресцеинадиацетата (H_2DCF). В цитоплазме клеток зонд деэстерифицируется под действием внутриклеточных эстераз, превращаясь в дихлорфлуоресцеин (DCF), который при взаимодействии с гидропероксидами и, главным образом, гидропероксидом

Таблица 4. Теоретически рассчитанные значения свободной энергии связывания и логарифмов коэффициентов проницаемости различных мембран для синтезированных производных бензо[*f*]кумарина^a **2–4**, **7**

Соединение	Свободная энергия связывания, ккал/моль	log коэффициента проницаемости плазматической мембраны	log коэффициента проницаемости ГЭБ	log коэффициента проницаемости Сасо-2 ^б
2	–4.09	0.30	–2.79	–3.40
3	–6.80	2.35	–2.07	–2.88
4	–6.23	0.20	–2.83	–3.43
7	–8.50	1.80	–2.26	–3.02

^a pH = 7.35, T = 37 °C; значения logP > –4.35 указывают на способность вещества к пассивному транспорту через соответствующие мембраны [47];

^б данные, относящиеся к мембране клеток колоректальной аденокарциномы человека.

Таблица 5. Пролиферативная активность клеток глиомы крысы линии С6 при культивировании в течение 24 ч с производными бензо[*f*]кумарина **2–4**, **7**

Соединение	Пролиферативная активность, % от контроля	
	10^{-5} моль/л	10^{-6} моль/л
2	108 ± 25	107 ± 14
3	106 ± 14	105 ± 11
4	100 ± 6	93 ± 5
7	65 ± 10	75 ± 9

водорода флуоресцирует [52, 53]. По скорости возрастания интенсивности флуоресценции можно судить о количестве внутриклеточного пероксида водорода [48, 52, 53]. Как видно из табл. 6, при инкубировании клеток с веществами **4** и **7** уровень внутриклеточного пероксида водорода снижается. Для соединения **7** этот параметр уменьшается на $60 \pm 4\%$. Следовательно, бензо[*f*]кумарин **7** и в незначительной степени бензо[*f*]кумарин **4** регулируют внутриклеточное редокс-состояние: выполняют в клетке антиоксидантные функции — взаимодействуют с пероксидом водорода, снижая его внутриклеточную концентрацию и повышая уровень восстановленного глутатиона.

Одним из окислителей, которые в зависимости от концентрации регулируют функциональную активность клеток, является пероксид водорода [54, 55]. При добавлении его к клеткам он проникает внутрь и вмешивается в процессы внутриклеточной сигнализации, индуцируя либо окислительный стресс, либо модификацию функциональной активности клеток [56]. Нами проведено исследование роли синтезированных соединений **4** и **7** в условиях окислительного стресса клеток, вызванного пероксидом водорода в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. Из данных, представленных в табл. 6, видно, что при добавлении пероксида водорода к клеткам глиомы линии С6 увеличивается интенсивность флуоресценции DCF и снижается интенсивность флуоресценции MCB. Это свидетельствует о проникновении H_2O_2 в клетки и его утилизации основным антиоксидантом GSH, концентрация которого уменьшается вследствие окисления. При этом в течение 30 мин клетки не повреждаются (установлено по окраске трипановым синим).

При сочетанном действии пероксида водорода и соединений **4** и **7** зарегистрировано снижение уровня окислителя в клетках и небольшое увеличение интенсивности люминесценции MCB (табл. 6). Это указывает на частичную нейтрализацию экзогенного окислителя при участии соединений **4** и **7**. Можно предполагать, что бензо[*f*]кумарины **4** и **7** либо взаимодействуют с внутриклеточным пероксидом водорода, либо являются донорами электронов

для окисленного глутатиона, то есть могут его восстанавливать. Наибольший антиоксидантный эффект зарегистрирован для соединения **7**.

Изменения параметров редокс-состояния влияет на редокс-зависимую внутриклеточную передачу сигналов и сопровождает нормальное (пролиферация, дифференцировка, апоптоз, аутофагия) и патологическое (старение, канцерогенез) функционирование клеток. Внутриклеточное редокс-состояние можно регулировать, изменив как концентрацию окислителей, так и концентрацию восстановителей (антиоксидантов) в клетках, индуцируя окислительный или восстановительный стресс [56, 57]. Большинство методов противоопухолевой терапии направлены на повышение концентрации активных форм кислорода и модификацию ими биологически важных макромолекул [57, 58]. Однако добавление к клеткам восстановителей-антиоксидантов (тимохинон, ресвератрол, кумарин и др.) также вызывает гибель опухолевых клеток.

Таким образом, фармакологическая коррекция редокс-состояния опухолевых клеток является перспективным подходом для повышения эффективности противоопухолевой терапии. Можно предположить, что исследуемые соединения **4** и **7** за счет повышения уровня восстановителей в клетках способны сдвигать редокс-состояние клетки в область преобладания восстановителей и таким образом вызывать клеточную гибель.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Использованные в работе реактивы и растворители имели квалификацию «ч.» и «ч.д.а.». Очищали и сушили растворители в соответствии с методами из литературы [59]. Оценку индивидуальности синтезируемых веществ и наблюдение за ходом проводимых реакций осуществляли методом ТСХ на пластинках «Sorbfil». В качестве элюента использовали смеси растворителей петролейный эфир—этилацетат в различных соотношениях. Спектры ЯМР 1H и ^{13}C 5–10%-ных растворов соединений в ДМСО- d_6 получены на приборе Bruker Avance-500 (Германия) с рабочими частотами 500 и 125 МГц соответственно. ИК

Таблица 6. Редокс-процессы в клетках глиомы крысы линии С6 при действии пероксида водорода и производных бензо[*l*]кумарина **4** и **7**

Образец	Уровень GSSH ^a	Уровень внутриклеточного H ₂ O ₂ ⁶
Контроль	100 ± 6	100 ± 7
Соединение 4	115 ± 8	85 ± 5
Соединение 7	140 ± 10	40 ± 4
H ₂ O ₂	69 ± 7	119 ± 6
Соединение 4 + H ₂ O ₂	78 ± 5	92 ± 6
Соединение 7 + H ₂ O ₂	88 ± 6	53 ± 6

^a Интенсивность флуоресценции МСВ, выраженная в % от контроля⁶ Скорость возрастания интенсивности флуоресценции DCF, выраженная в % от контроляКонцентрация веществ: H₂O₂ — 5·10⁻⁴ моль/л, бензо[*l*]кумарин — 10⁻⁵ моль/л

спектры записаны на спектрофотометре Bruker FT — IR Alpha (Германия). Элементный анализ выполнен на элементном CHNS анализаторе Thermo Flash 2000 (Великобритания).

Анализ проницаемости соединений через фосфолипидные мембраны *in silico* проведен согласно [47] при помощи сервиса PerMM (Permeability of Molecules across Membranes).

Для изучения взаимодействия производных бензокумарина со свободнорадикальными продуктами были исследованы следующие модельные системы: «H₂O₂—люминол», «NaOCl—люминол» и «пероксидаза хрена (ПХ)—H₂O₂—люминол». Использовали ПХ, люминол производства «Sigma-Aldrich» (США). Концентрации участвующих веществ составляли: 10⁻³ моль/л H₂O₂, 2·10⁻⁵ моль/л NaOCl, 5·10⁻⁹ г/л ПХ, 5·10⁻⁴ моль/л люминола. Интенсивность протекания окислительно-восстановительных процессов в модельных системах изучали методом хемилюминесценции (ХЛ) с применением компьютеризированного измерительного комплекса, включающего биохемилюминометр БХЛ-1 (Минск, Беларусь) и систему регистрации и обработки сигналов Unichrom (Беларусь). Измерения проводили в фосфатно-солевом буфере (PBS, pH = 7.4) при T = 37°C. Определяли интегральную интенсивность ХЛ как площадь под кинетической кривой за 3 мин для первой и второй систем, за 5 мин для третьей системы.

Фосфатно-солевой буфер PBS включал 137 ммоль/л NaCl, 2.7 ммоль/л KCl, 1.3 ммоль/л

MgSO₄·7H₂O, 8 ммоль/л Na₂HPO₄·12H₂O, 1.3 ммоль/л CaCl₂, 1.5 ммоль/л KH₂PO₄ и 6 ммоль/л глюкозы, все компоненты для приготовления буфера производства «Анализ-Х» (Беларусь).

Клетки глиомы крысы линии С6, полученные из коллекции культур ГУ НИИ эпидемиологии и микробиологии (Минск), культивировали в среде Игла DMEM («Sigma», США) с добавлением 10%-ной фетальной бычьей сыворотки (ФБС) («HyClone», США) и 10⁻⁴ г/мл гентамицина (ОАО «Белмедпрепараты», Беларусь). Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при температуре 37°C. Количество клеток при пересеве составляло 10⁵ клеток в 1 мл. К клеткам глиомы крысы линии С6 на вторые сутки роста добавляли растворы производных бензо[*l*]кумарина в различных концентрациях и культивировали в течение следующих 24 ч. Контрольные образцы культивировали 24 ч в присутствии ДМСО (не более 0.1%). Клетки снимали с поверхности культуральных флаконов 25%-ным раствором трипсина («Gibco», Thermo Scientific, США), суспензировали в PBS и производили подсчет количества клеток с использованием камеры Горяева.

Оценку утилизации пероксида водорода клетками проводили флуоресцентным методом на спектрофлуориметре (СМ2200 «Солар», Беларусь) с использованием флуоресцентного зонда 2,7-дихлорфлуоресцеинадиацетата

(H₂DCF-DA, Molecular Probes Inc., США). Клетки в суспензии в PBS инкубировали при $T = 37^\circ\text{C}$ с исследуемыми бензо[*l*]кумаринами **4**, **7** в течение 30 мин. Затем в суспензию клеток вносили раствор 10^{-6} моль/л H₂DCF-DA, инкубировали при температуре 37°C в течение 30 мин. После этого клетки отмывали PBS центрифугированием, число клеток в пробе составляло 1.5 млн в 1 мл. Регистрировали кинетику изменения интенсивности флуоресценции DCF ($\lambda_{\text{возб.}} = 488$ нм, $\lambda_{\text{рег.}} = 530$ нм) после добавления к клеткам пероксида водорода ($5 \cdot 10^{-4}$ моль/л). Скорость увеличения интенсивности флуоресценции пропорциональна концентрации внутриклеточного пероксида водорода.

Для оценки уровня внутриклеточного восстановленного глутатиона использовали монохлорбиман (МСВ) («Sigma», США). Клетки в монослое отмывали от культуральной среды, добавляли PBS и в течение 30 мин инкубировали при $T = 37^\circ\text{C}$ с исследуемыми бензо[*l*]кумаринами **4**, **7** и/или пероксидом водорода в концентрации $5 \cdot 10^{-4}$ моль/л. После инкубации клетки отмывали, ресуспендировали в PBS (1.5 млн/мл) и помещали в кювету. В кювету также добавляли МСВ в концентрации $5 \cdot 10^{-5}$ моль/л. Регистрировали интенсивность флуоресценции глутатионил-конъюгатов МСВ (I^{mcb}) при возбуждении на длине волны 390 нм и регистрации при 480 нм.

При математической обработке результатов определяли среднюю величину для группы независимых измерений (более 3). Полученные данные представлены как среднее значение $\pm$ произведение стандартного отклонения и коэффициента Стьюдента для соответствующего количества измерений (доверительная вероятность $p = 0.95$).

2-(1,1-Ди-1*H*-индол-3-илэтил)-3*H*-бензо[*l*]хромен-3-он (4**).** К раствору 119.0 мг (0.50 ммоль) бензокумарина **2**, 117.0 мг (1.00 ммоль) индола (**1**) в 4 мл растворителя (CH₂Cl₂, 1,2-дихлорэтан) прибавляли 12.5 мг йода (0.05 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре 12 ч до полной конверсии субстрата. Реакционную смесь разбавляли 10 мл этанола, выпавший желтый осадок отфильтровывали и сушили на воздухе. Выход 228 мг (100%, в CH₂Cl₂), 228 мг (100%, в 1,2-дихлорэтаноле).

ИК спектр, ν , см⁻¹: 3455 ш (N—H), 3365 ш (N—H), 1709 о.с (C=O), 1131 с (C—O). Спектр ЯМР ¹H, δ , м.д.: 2.39 с (3H, CH₃), 6.79 т (2H, J 7.3 Гц, =CH_{аром индол}), 6.95 уш.с (2H, =CHNH), 7.04 т (2H, J 7.3 Гц, =CH_{аром индол}), 7.29 д (2H, J 8.1 Гц, CH=CH_{аром индол}), 7.38 д (1H, J 8.2 Гц, =CH_{аром кумарин}), 7.43 д (2H, J 8.1 Гц, CH=CH_{аром индол}), 7.59–7.46 м (3H, =CH_{аром кумарин}), 8.03 д (1H, J 7.7 Гц, =CH_{аром кумарин}), 8.13 д (1H, J 9.0 Гц, =CH_{аром кумарин}), 8.45 с (1H, CH=CC=O), 10.96 с (2H, NH). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м.д.: 25.59, 43.15, 111.88 (2 C), 112.19, 116.30, 118.29 (2 C), 119.57, 120.44, 120.56 (4 C), 124.20 (2 C), 125.65 (2 C), 125.74, 128.22, 128.66, 129.04, 129.80, 132.05, 132.20, 135.50 (2 C), 136.99 (2 C), 152.50, 158.85. Найдено, %: C 82.15; H 4.80. C₃₁H₂₂N₂O₂. Вычислено, %: C 81.92; H 4.88.

2-[3-(1*H*-Индол-3-ил)-3-фенилпропано-ил]-3*H*-бензо[*l*]хромен-3-он (7**).** К раствору 81.5 мг (0.250 ммоль) бензокумарина **3**, 58.5 мг (0.250 ммоль) индола (**1**) в 2 мл растворителя (CH₂Cl₂, 1,2-дихлорэтан, 1,4-диоксан) прибавляли 6.3 мг йода (0.025 ммоль) и перемешивали при комнатной температуре 12 ч до полной конверсии субстрата. Реакционную смесь разбавляли 6 мл этанола, выпавший желтый осадок отфильтровывали и сушили на воздухе. Выход 91 мг (82%, в CH₂Cl₂), 78 мг (70%, в 1,2-дихлорэтаноле), 75 мг (68%, в 1,4-диоксане).

ИК спектр, ν , см⁻¹: 3443 ш (N—H), 1738 о.с (C=O), 1729 о.с (C=O), 1173 ср. (C—O), 1101 ср. (C—O). Спектр ЯМР ¹H, δ , м.д.: 4.00 д.д (1H, J_1 17.1 Гц, J_2 7.5 Гц, O=CCH₂CH), 4.07 д.д (1H, J_1 17.1 Гц, J_2 7.5 Гц, O=CCH₂CH), 5.05 т (1H, J 7.5 Гц, O=CCH₂CH), 7.01 т (1H, J 7.5 Гц, =CH_{аром индол}), 7.09–7.14 м (3H, =CH_{аром индол}, Ph), 7.31–7.21 м (3H, Ph, =CHNH, =CH_{аром кумарин}), 7.41 д (2H, J 7.3 Гц, 2 Ph), 7.46 д (1H, J 9.0 Гц, C=CH_{аром индол}), 7.50 д (1H, J 8.1 Гц, C=CH_{аром индол}), 7.59 т (1H, J 7.5 Гц, =CH_{аром кумарин}), 7.70 т (1H, J 7.5 Гц, =CH_{аром кумарин}), 7.90 д (1H, J 8.1 Гц, =CH_{аром кумарин}), 8.00 с (1H, CH=CC=O), 8.08 д (1H, J 9.0 Гц, =CH_{аром кумарин}), 8.23 д (1H, J 8.1 Гц, =CH_{аром кумарин}), 9.10 уш.с (1H, NH). Спектр ЯМР ¹³C, δ , м.д.: 37.88, 48.29, 111.87, 112.79, 116.83, 118.18, 118.81, 119.16, 121.56, 122.37, 122.67, 123.57, 126.42, 126.78, 127.05, 128.16 (2C), 128.68

(2 С), 129.55, 129.64, 129.69, 130.26, 136.71, 136.85, 142.87, 145.43, 155.66, 158.87, 196.52. Найдено, %: С 81.49; Н 4.69. $C_{30}H_{21}NO_3$. Вычислено, %: С 81.25; Н 4.77.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе реакции 1,2-присоединения индола к 2-ацетил-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-ону и 1,4-присоединения к 2-[(2*E*)-3-фенилпроп-2-еноил]-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-ону получены новые производные бензо[*f*]кумарина, которые проявляют антиоксидантные свойства — взаимодействуют с пероксидом водорода и гипохлоритом натрия в модельных системах.

Выявлено, что 2-[3-(1*H*-индол-3-ил)-3-фенилпропаноил]-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-он в микромолярных концентрациях ингибирует пролиферативную активность клеток глиомы крысы линии С6 на 25–35%.

Установлено, что добавление 2-(1,1-ди-1*H*-индол-3-илэтил)-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-она (**4**) и 2-[3-(1*H*-индол-3-ил)-3-фенилпропаноил]-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-она (**7**) к клеткам приводит к модификации редокс-состояния, в результате которой снижается концентрация внутриклеточного пероксида водорода и повышается уровень восстановленного глутатиона. В условиях окислительного стресса — в присутствии экзогенного пероксида водорода — синтезированные соединения бензо[*f*]кумаринов оказывают протекторное действие на клетки, выступая в роли антиоксидантов и восстанавливая редокс-баланс.

На основании полученных данных можно предположить, что синтезированный 2-[3-(1*H*-индол-3-ил)-3-фенилпропаноил]-3*H*-бензо[*f*]хромен-3-он является перспективным соединением для исследования с целью применения в качестве антиоксиданта и противоопухолевого препарата.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке ГПНИ (№ гос. регистрации 20240340, 20211462, 20212310), проекта БРФФИ (№ гос. регистрации 20231239).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Кулагова Татьяна Александровна, ORCID ID: 0000-0002-1113-7323

Минеева Ирина Владимировна, ORCID ID: 0000-0002-6422-1967

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jimenez F.A., Lopez-Gonzalez J.S., Nieto-Rodriguez A., Velasco-Velazquez M.A., Molina-Guarneros J.A., Mendoza-Patino N., Garcia-Mondragon M.J., Elizalde-Galvan P., Leon-Cedeno F., Mandoki J. *J. Lung Cancer*. **2001**, 34, 2, 185–194. doi 10.1016/S0169-5002(01)00263-X
2. Kontogiorgis C.A., Hadjipavlou-Litina D.J. *J. Med. Chem.* **2005**, 48 (20), 6400–6408. doi 10.1021/jm0580149
3. Nawrot-Modranka J., Mawrot E., Graczyk J. *Eur. J. Med. Chem.* **2006**, 41 (11), 1301–1309. doi
4. Vijesh A.M., Arun M., Isloor A.M., Prabhu V., Ahmad S., Malladi S. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, 45, 11, 5460–5464. doi 10.1016/j.ejmech.2010.07.048
5. Cai Z.Y., Yang Y., Liu X.H., Qi X.B. *Lett. Drug Des. Discov.* **2010**, 7, 9, 640–643. doi 10.2174/157018010792929540
6. Dong Y., Nakagawa-Goto K., Lai C.Y., Morris-Natschke S.L., Bastow K.F., Lee K.H. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 14, 4085–4087. doi 10.1016/j.bmcl.2010.05.079
7. Sandhu S., Bansal Y., Silakari O., Bansal G. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, 22, 15, 3806–3814. doi 10.1016/j.bmc.2014.05.032
8. Khan K.M., Saify Z.S., Khan M.Z., Zia-Ullah M.I., Atta-Ur-Rahman C., Perveen S., Chohan Z.H., Supuran C.T. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2004**, 19, 4, 373–379. doi 10.1080/14756360409162453
9. Neyts J., Cleucq E., Singha R., Chang Y.H., Das A.R., Chakraborty S.K., Hong S.C., Tsay S.C., Hsu M.H., Hwu J.R.J. *Med. Chem.* **2009**, 52, 5, 1486–1490. doi 10.1021/jm801240d
10. Keri R.S., Sasidhar B.S., Nagaraja B.M., Santos M.A. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 100, 257–269. doi 10.1016/j.ejmech.2015.06.017

11. Zhao Y., Zheng Q., Dakin K., Xu K., Martinez M.L., Li W.H.J. *Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 14, 4653–4663. doi 10.1021/ja036958m
12. Lee K.S., Kim H.J., Kim G.H., Shin I., Hong J. *Org. Lett.* **2008**, *10*, 1, 49–51. doi 10.1021/ol7025763
13. Kim D., Sambasivan S., Nam H., Kim K.H., Kim J.Y., Joo T., Lee K.-H., Kim K.-T., Ahn K.H. *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 54, 6833–6835. doi 10.1039/C2CC32424E
14. Yang Z., Cao J., He Y., Yang J.-H., Kim T., Peng X., Kim J.S. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43*, 13, 4563–4601. doi 10.1039/C4CS00051J
15. Hibino S., Chozi T. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, *18*, 66–87. doi 10.1039/B004055J
16. Somei M., Yamada F. *Nat. Prod. Rep.* **2004**, *21*, 278–311. doi 10.1039/B212257J
17. Humphrey G.R., Kuethe J.T. *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 7, 2875–2911. doi 10.1021/cr0505270
18. Gribble G.W.J. *Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **2000**, *10* doi 10.1039/A909834H
19. Lounasmaa M., Tolvanen A. *Nat. Prod. Rep.* **2000**, *17*, 175–191. doi 10.1039/A809402K
20. Cacchi S., Fabrizi G. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 7, 2873–2920. doi 10.1021/cr040639b
21. Bandini M., Eichholzer A. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 51, 9608–9644. doi 10.1002/anie.200901843
22. Kochanowska-Karamyan A.J., Hamann M.T. *Chem. Rev.* **2010**, *110*, 8, 4489–4497. doi 10.1021/cr900211p
23. Shiri M. *Chem. Rev.* **2012**, *112*, 6, 3508–3549. doi 10.1021/cr2003954
24. Chadha N., Silakari O. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *134*, 159–184. doi 10.1016/j.ejmech.2017.04.003
25. Leitch J.A., Bhonoah Y., Frost C.G. *ACS Catal.* **2017**, *7*, 9, 5618–5627. doi 10.1021/acscatal.7b01785
26. Shi L., Liu Y., Wang C., Yuan X., Liu X., Wu L., Pan Z., Yu Q., Xu C., Yang G. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 24, 13929–13935. doi 10.1039/d0ra01237h
27. Yuan X., Wu L., Xu C., Pan Z., Shi L., Yang G., Wang C., Fan S. *Tetrahedron Lett.* **2019**, *60*, 52, 151329. doi 10.1016/j.tetlet.2019.151329
28. Wang W., Zhu Y., Guo S., Wang Q., Bu Z. *Org. Biomol. Chem.* **2016**, *14*, 19, 4420–4425. doi 10.1039/C6OB00515B
29. Feofanov M.N., Anokhin M.V., Averin A.D., Beletskaya I.P. *Synthesis.* **2017**, *49*, 22, 5045–5058. doi 10.1055/s-0036-1589068
30. Jennings J.J., Bhatt C.P., Franz A.K. *J. Org. Chem.* **2016**, *81*, 15, 6211–6222. doi 10.1021/acs.joc.6b00541
31. Desyatkin V.G., Beletskaya I.P. *Synthesis.* **2017**, *49*, 18, 4327–334. doi 10.1055/s-0036-1589024
32. Nickerson D.M., Mattson A.E. *Chem. Eur. J.* **2012**, *18*, 27, 8310–8314. doi 10.1002/chem.201201206
33. Xiao J., Shao Z., Xu L., Wang L., Wei H. *Org. Biomol. Chem.* **2014**, *12*, 14, 2185–2188. doi 10.1039/C3OB42582G
34. Gholap S.S., Deshmukh U.P., Tambe M.S. *Iran. J. Catal.* **2013**, *3*, 3, 171–176.
35. Bogdal D. *J. Chem. Res.* **1998**, *8*, 468–469. doi 10.1039/A801724G
36. Dixit P., Tripathi A.C., Saraf S.K. *J. Heterocycl. Chem.* **2013**, *50*, 6, 1431–1436. doi 10.1002/jhet.1772
37. Dholariya H.R., Patel K.S., Patel J.C., Patel A.K., Patel K.D. *Med. Chem. Res.* **2013**, *22*, 5848–5860. doi 10.1007/s00044-013-0576-6
38. Singh N., Singh K.N. *Synlett.* **2012**, *23*, 14, 2116–2120. doi 10.1055/s-0032-1316684
39. Yadav R.N., Banik I., Banik B.K.J. *Ind. Chem. Soc.* **2018**, *95*, 11, 1397–1399.
40. Bandgar B.P., Shaikh K.A. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 9, 1959–1961. doi 10.1016/S0040-4039(03)00032-7
41. Zhou X.-Y., Chen X. *Lett. Org. Chem.* **2021**, *18*, 8, 604–610. doi 10.2174/1570178617999201012181016
42. Banik B.K., Fernandez M., Alvarez C. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 14, 2479–2482. doi 10.1016/j.tetlet.2005.02.044
43. Reddy B.V.S., Rajeswari N., Sarangapani M., Reddy G.R., Madan Ch., Kumar K.P., Rao M.S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 21, 6510–6514. doi 10.1016/j.bmcl.2011.08.075
44. Von Der Heiden D., Bozkus S., Klusmann M., Breugst M.J. *Org. Chem.* **2017**, *82*, 8, 4037–4043. doi 10.1021/acs.joc.7b00445
45. Wang S.-Y., Ji S.-J., Loh T.-P. *Synlett.* **2003**, *15*, 2377–2379. doi 10.1055/s-2003-42105
46. Pal R., Gupta A.D., Mallik A.K. *ISRN Org. Chem.* **2012**, 674629. doi 10.5402/2012/674629

47. Lomize A.L., Hage J.M., Schnitzer K., Golobokov K., LaFaive M.B., Forsyth A.C., Pogozheva I.D. *J. Chem. Inf. Model.* **2019**, *59*, 7, 3094–3099. doi 10.1021/acs.jcim.9b00225.
48. Makino N., Mochizuki Y., Bannai S., Sugita Y. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 2, 1020–1025. doi 10.1016/S0021-9258(17)42214-9
49. Крылова Н.Г., Кулагова Т.А., Корень С.В., Семенкова Г.Н. *Цитология.* **2017**, *59*, 2, 109–116 [Krylova N.G., Kulahova T.A., Koren S.V., Semenkova G.N. *Cell Tiss. Biol.* **2017**, *11*, 3, 220–226].
50. Schafer F.Q., Buettner G.R. *Free Rad. Biol. Med.* **2001**, *30*, 11, 1191–1212. doi 10.1016/S0891-5849(01)00480-4
51. Gomes A., Fernandes E., Lima J.L. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **2005**, *65*, 2–3, 45–80. doi 10.1016/j.jbbm.2005.10.003
52. Wrona M., Wardman P. *Free Rad. Biol. Med.* **2006**, *41*, 4, 657–667. doi 10.1016/j.freeradbiomed.2006.05.006
53. Rice G.C., Bump E.A., Shrieve D.C., Lee W., Kovacs M. *Cancer. Res.* **1986**, *46*, 12, 6105–6110.
54. Sies H. *Redox Biol.* **2017**, *11*, 613–619. doi 10.1016/j.redox.2016.12.035.
55. Lennicke C., Rahn J., Lichtenfels R. *Cell Commun. Signal.* **2015**, *13*, 2, 39. doi 10.1186/s12964-015-0118-6
56. Di Marzo N., Chisci E., Giovannoni R. *Cells.* **2018**, *7*, 10, 156. doi 10.3390/cells7100156.
57. Luo M., Zhou L., Huang Z., Li B., Nice E.C., Xu J., Huang C. *Antioxidants.* **2022**, *11*, 6, 1128. doi 10.3390/antiox11061128
58. George S., Abrahamse H. *Antioxidants.* **2020**, *9*, 11, 1156. doi 10.3390/antiox9111156
59. Armarego W.L.F., Chai C.L.L. Purification of laboratory chemicals. 6th ed. Butterworth-Heinemann. **2009**. 608

Synthesis and Influence of New Indole-Containing Benzo[f]coumarin Derivatives on Proliferation and Redox State of Rat Glioma Cells Line C6

T. A. Kulahava^a, V. A. Shumski^b, and I. V. Mineyeva^{c,*}

^a Institute for Nuclear Problems of BSU, ul. Bobruiskaya, 11, Minsk, 220006 Belarus

^b Institute of Biophysics and cell engineering NAS of Belarus, ul. Akademicheskaya, 27, Minsk, 220072 Belarus

^c Belarusian State University, prosp. Nezavisimosti, 4, Minsk, 220030 Belarus

*e-mail: i.mineyeva@yandex.ru

Received October 21, 2023; revised November 10, 2023; accepted November 12, 2023

For the first time, modification of 2-acetyl-3H-benzo[f]chromen-3-one and 2-[(2E)-3-phenylprop-2-enoyl]-3H-benzo[f]chromen-3-one was carried out due to interaction with indole. It has been established that the resulting benzo[f]coumarin derivatives exhibit antioxidant properties in model systems — they interact with hydrogen peroxide, sodium hypochlorite and regulate the redox state of rat glioma cells line C6, which is manifested by a decrease in the concentration of intracellular hydrogen peroxide and an increase in the level of reduced glutathione. In the presence of exogenous hydrogen peroxide, synthesized benzo[f]coumarin compounds have a protective effect on cells, acting as antioxidants and restoring redox balance. It was found that 2-[3-(1H-indol-3-yl)-3-phenylpropanoyl]-3H-benzo[f]chromen-3-one in micromolar concentrations inhibits the proliferative activity of C6 rat glioma cells by 25–35%.

Keywords: 2-acetyl-3H-benzo[f]chromen-3-one, 2-[(2E)-3-phenylprop-2-enoyl]-3H-benzo[f]chromen-3-one, 2-(1,1-di-1H-indol-3-ylethyl)-3H-benzo[f]chromen-3-one, 2-[3-(1H-indol-3-yl)-3-phenylpropanoyl]-3H-benzo[f]chromen-3-one, antioxidants, indole, in silico analysis, fluorimetry, chemiluminescence