

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

**SELĒNA NOTEICOŠĀ LOMA STRUKTŪRAS –
PRETVĒŽA AKTIVITĀTES PĒTĪJUMOS**

PROMOCIJAS DARBS

Autors: Ilona Domračeva
Studenta apliecības Nr.: id13087

Zinātniskie vadītāji:

Dr.habil.chem., prof. Grigorijs Veinbergs

Dr.chem. Pāvels Arsenjans

Rīga

2015

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūta Eksperimentālās ķīmijterapijas grupā no 2002. gada līdz 2015. gadam.



Darba forma:

promocijas darbs Ķīmijas zinātnes nozarē, Organiskās ķīmijas apakšnozarē

Darba zinātniskie vadītāji:

Dr.habil.chem., prof. Grigorijs Veinbergs (Latvijas Organiskās sintēzes institūts)

Dr.chem. Pāvels Arsenjans (Latvijas Organiskās sintēzes institūts)

Recenzenti:

- 1) Dr.habil.chem., prof. Andris Zicmanis, Latvijas Universitāte
- 2) Dr.chem., prof. Māris Turks, Rīgas Tehniskā Universitāte
- 3) Dr.chem. Einārs Loža, Latvijas Organiskās sintēzes institūts

Darba aizstāvēšana paredzēta Latvijas Universitātes Ķīmijas nozares Promocijas padomes atklātā sēdē 2015. gada 29. oktobrī LU Ķīmijas fakultātē, Jelgavas ielā 1.

Ar promocijas darbu un tā kopsavilkumu var iepazīties LU bibliotēkā, Raiņa bulvārī 19.

SATURS

SAĪSINĀJUMI	5
ANOTĀCIJA	7
IEVADS	9
1. LITERATŪRAS APSKATS	13
1.1. Selēns, selēna savienojumi un to metabolisms organismā	13
1.2. Selēnu saturošo savienojumu darbības mehānisms organismā	17
1.2.1. Selēnu saturošie savienojumi un apoptozes process	17
1.2.2. Apoptozes indukcija modulējot proteīnkināžu aktivitāti.....	19
1.2.3. Apoptozes indukcija modulējot kaspāžu aktivitāti.....	20
1.2.4. Sakarība starp apoptozi un skābekļa aktīvo formu (SAF) līmeni šūnā	20
1.3. Selēna toksiskais efekts	22
1.4. Neorganiskie selēna savienojumi	23
1.5. Organiskie selēna savienojumi	24
2. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	29
2.1. Neorganisko selēna atvasinājumu struktūras - aktivitātes analīze.....	29
2.1.1. Amonija un alkilamonija selenīti	30
2.1.2. Aminoskābju, dipeptīdu un tripeptīdu hidroselenīti.....	32
2.1.3. Betaīnu hidroselenīti.....	36
2.1.4. Heterocikliskie amonija hidroselenīti.....	40
2.1.5. Sililaklilitioaizvietotie N-heterociklu hidroselenīti	44
2.1.6. Neorganisko selēna atvasinājumu pretvēža efekts <i>in vivo</i> un toksiskie blakusefekti	46
2.1.7. Neorganisko selēna atvasinājumu ietekme uz glutaciona peroksidāzes un	48
katalāzes aktivitāti	48
2.1.8. Optimālie neorganiska selēna atvasinājumi audzēja augšanas supresijai	51
2.2. Organisko selēna atvasinājumu struktūras-aktivitātes analīze	51
2.2.1. Selēndiazolu antiproliferatīvās īpašības	51
2.2.2. Kondensētu selēnazolīnija sāļu antiproliferatīva aktivitāte.....	54
2.2.3. Benzselēnofēnu citotoksicitāte <i>in vitro</i>	55
2.2.4. Selenofēnkumarīnu un selenofēnhinolonu antiproliferatīvais efekts	56
2.2.5. Selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu antiproliferatīvā efekta darbības mehānismi	62
2.2.5.1. Apoptozes indukcija MCF-7 audzēju šūnās.....	62
2.2.5.2. Savienojumu ietekme uz antioksidatīvo fermentu aktivitāti.....	66
2.2.5.3. Selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu brīvo radikāļu neitralizēšanas spēja ..	69

2.2.5.4. Savienojumu ietekme uz SAF līmeni audzēju šūnās <i>in vitro</i>	70
2.2.5.5. Savienojumu ietekme uz matricas metaloproteināžu (MMP) aktivitāti un angioģenēzi	75
3. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	78
3.1. Lietotie reģenti un aparatūra	78
3.2. Pētījuma objekti	79
3.2.1. Selēnu saturošie savienojumi	79
3.2.2. Bioloģiskie objekti pētījumos <i>in vitro</i> un <i>in vivo</i>	79
3.3. Eksperimenti <i>in vitro</i>	81
3.3.1. Citotoksiskā efekta noteikšana	81
3.3.2. Bazālās toksicitātes noteikšana	81
3.3.3. Apoptozes noteikšana.....	82
3.3.4. SAF daudzuma noteikšana šūnās	83
3.3.5. Kaspāžu aktivitātes noteikšana.....	83
3.3.6. Angioģenēzes pētījumi <i>in vitro</i>	84
3.3.7. Superoksīda dismutāzes aktivitātes noteikšana.....	84
3.3.8. Glutaciona peroksidāzes aktivitātes noteikšana.....	85
3.3.9. Tioredoksīna reduktāzes aktivitātes noteikšana	85
3.3.10. MMP aktivitātes noteikšana	85
3.4. Eksperimenti <i>in vivo</i>	86
3.4.1. Savienojumu pretvēža efekta noteikšana peļu modelī ar pārpotēto audzēju.....	86
3.4.2. Angioģenēzes pētījumi <i>in vivo</i>	86
3.5. Brīvo radikāļu neitralizēšanas spējas pētījuma metodes.....	86
3.5.1. Peroksila radikāļa noteikšana ar ORAC	87
3.5.2. Riboflavīna/NBT sistēmā ģenerētā $O^{2\bullet-}$ radikāļa noteikšana	87
3.5.3. Prooksidantu īpašības noteikšana, superoksīda ģenerācija	87
SECINĀJUMI.....	88
LITERATŪRAS SARAKSTS.....	90
PIELIKUMS	113

SAĪSINĀJUMI

A549 -cilvēka plaušu karcinomas šūnu līnija	HUVEC-2 - cilvēka nabas saites vēnas endotēlija šūnu līnija
AI% - audzēja augšanas ātruma inhibīcija procentos	i.p. – injekcija vēderdobumā (intraperitoniāli)
AIF – apoptozi inducējošais faktors	IC ₅₀ – savienojuma 50% inhibējošā koncentrācija
ATF – adenozīna trifosfāts	IL-18 - interleikīns-18
B16 - peļu melanomas šūnu līnija	IL-1β - interleikīns-1β
B16-F10 - peļu melanomas šūnu līnija	INF-γ - interferons-gamma
BBSKE - 1,2-[Bis(1,2-benzisoselenazolone-3-(2H)-ketona)] etāns	KB - cilvēka leukēmijas šūnu līnija
BHK21 - Sīrijas kāmjā nierēs fibroblasti	L1210 – peļu leukēmijas šūnu līnija
CaCo - cilvēka resnās zarnas adenokarcinomas šūnu līnija	LD ₅₀ – savienojuma deva, kuras ietekmē iet bojā 50% dzīvnieku
CCL8 - peļu sarkomas šūnu līnija	MCF-7 - estrogēn-pozitīva, cilvēka krūts adenokarcinomas šūnu līnija
CNS – centrāla nervu sistēma	MDA-MB-435s - cilvēka krūts melanomas šūnu līnija
DCF - 2',7'-dihlorfluoresceīns	MES-SA - cilvēka dzemdes sarkomas šūnu līnija
DCFDA - 2',7'-dihlorfluoresceīna diacetāts	MG-22A - peļu hepatomas šūnu līnija
DMEM - Dulbeko modificēta kultivēšanas vide	MMP – matricas metaloproteināzes mRNS – matricas RNS
DMSO – dimetilsulfoksīds	MSC - selenometilcisteīns
DPPH - 2,2-difenil-1-pikrilhidrazils	MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds
DTNB – 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoscābe)	NADH – nikotīnamīda adenīdinukleotīds
DTT – ditiotriētols	NADPH - nikotīnamīda adenīdinukleotīda fosfāts
DZ% - dzīves ilgums procentos	NBT - nitrotetrazolījs zilais
EDTA – etilēndiaminotetraetiķskābe	Neuro2A - peļu neuroblastomas šūnu līnija
GABA - γ-aminobutānskābe	NF-kB – kodola transkripcijas faktors
Gpx - glutaciona peroksidāze	NIH 3T3 - peļu embrionālie fibroblasti
GSH – glutations	
GS-Se-SG – selēna diglutations	
HDAC - histonu deacetilāze	
HepG2 - cilvēka hepatocītu karcinomas šūnu līnija	
HT-1080 - cilvēku fibrosarkomas šūnu līnija	

NNGH - *N*-izobutil-*N*-(4-metoksifenilsulfonil) glicilhidroksāmskābe
NR – neitrālais sarkanais
OA/EB – akridīna oranžais/etīdija bromīds
OD – optiskais blīvums
P388 - peļu leukēmijas šūnu līnija
PBS - fosfāta buferis
PMA - forbol-12-miristāt-13-acetāts
pro-IL-18 - interleikīna-18 prekursors
s.c. – injekcija zem ādas (subkutāni)
S-180 - peļu sarkomas šūnu līnija
SAF – skābekļa aktīvās formas
SAHA - suberoīlanilīda hidroksāmskābe
SeC – selenocisteīns
SELA – selencisteīnasintāze
SELD - selenfosfāt sintāze-2ⁱ

SeM – selenometionīns
SeMC – selenmetionilselenocisteīns
SHSY5Y – cilvēka neuroblastomas šūnu līnija
Smac/DIABLO – mitohondriālais proteīns, kas saistīts ar apoptozes procesu
SOD – superoksīda dismutāze
TBH - *t*-Butilhidroperoksīds
TNF-R - audzēju nekrozes faktors
TrxR - tioredoksīna reduktāze
tRNS – transkripcijas RNS
UGA kodons – stop-kodons, kas signalizē par translācijas procesa beigām
VEGF – asinsvadu endotēlija augšanas faktors

ANOTĀCIJA

Selēna noteicošā loma struktūras – pretvēža aktivitātes pētījumos. I. Domračeva, zinātniskie vadītāji: Dr.habil.chem., prof. Grigorijs Veinbergs, Dr.chem. Pāvels Arsenjans. Promocijas darbs, 112 lappuses, 15 attēli, 19 tabulas, 260 literatūras avoti, pielikums. Latviešu valodā.

Pēdējā gadsimta laikā pieaugot apkārtējās vides piesārņojumam, cilvēki arvien biežāk savā ikdienas dzīvē nonāk saskarē ar kaitīgām un potenciāli kancerogēnām vielām, kā rezultātā pieaug saslimstība ar vēzi. Nākotnē ir nepieciešami selektīvi pretvēža preparāti ar pēc iespējas mazākiem blakus efektiem. Selēns ir viens no unikāliem un neizvietojamiem mikroelementiem cilvēka veselībai. Ir noteikta savstarpēja sakarība starp selēna līmeni ikdienas uzturā un risku saslimt ar dažāda veida audzējiem, kā arī, notiek sekmīga tā izmantošana dažu vēža formu ārstēšanā. Darba galvenais mērķis ir veikt selēna saturošo savienojumu struktūras – pretvēža aktivitātes pētījumus, lai padziļinātu zināšanas un iegūtu pilnīgāku informāciju par šo savienojumu darbības mehānismiem. Iegūtās zināšanas ļaus radīt jaunus perspektīvus selēnu saturošus pretvēža aģentus, kas spētu nomākt audzēju augšanu vai novērst tā veidošanos. Darbā ir veikti struktūras – pretvēža aktivitātes pētījumi neorganisko un organisko selēnu saturošo savienojumu klasēs. Starp pārbaudītiem organiskā amonija selenītiem ir atklāti perspektīvi pretvēža aģenti ar spēju nomākt peļu sarkomas S-180 augšanu. Salīdzinājumā ar plaši izmantoto toksisko nātrija selenītu, kā selēna avotu vairākos uztura bagātinātājos un vitamīnu kompleksos, jaunus organiskā amonija hidroselenītus var izvirzīt par audzēju profilakses līdzekļiem salīdzinošās devās kā nātrija selenītu. 1,2,3-Selēndiazola savienojumu klasē atrasti aktīvie atvasinājumi spēj nomākt audzēja augšanu *in vivo* un ir ar nelieliem toksiskiem blakusefektiem. Selēnazolīnija sāļu klasē tika atrasti savienojumi ar izteiktu antiproliferatīvo spēju uz audzēju šūnām *in vitro*. Viens no selēnazolīnija sāļiem ir 1270 reizes efektīvāks uz hepatomas MG-22A, nekā nātrija selenīts. Savienojumu augstā aktivitāte un izcilā šķīdība, salīdzinot ar Ebselēnu, ļauj pretendēt uz potenciālu pretvēža aģenta atklājumu. Izpētīti kondensēto selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu antiproliferatīvā efekta darbības mehānismi uz ļaundabīgām un normālām šūnām. Viens no iespējamajiem antiproliferatīvā efekta mehānismiem ir saistīts ar apoptozes indukciju audzēju šūnās - process norit caur iniciējošās kaspāzes-2 un efektorās kaspāzes-7 aktivāciju, kā arī ekstremālu skābekļa aktīvo formu līmeņa samazināšanos šūnās. Promocijas darbā iegūtie rezultāti dod iespēju secināt, ka selēna atoma ievadīšana mērķmolekulās ļauj iegūt perspektīvus līdzekļus audzēju ārstēšanai un prevencijai.

ABSTRACT

Determining role of selenium in the structure - antitumor activity studies. I. Domracheva, supervisors: Dr.habil.chem., prof. G. Veinberg; Dr.chem. P. Arsenyan. PhD thesis, 112 pages, 15 figures, 19 tables, 260 literature references, appendice. In Latvian.

In the 20th and 21st centuries, due to environmental pollution, people more often get involved into contact with harmful and potentially carcinogenic substances that increase the risk of cancer. In the future, selective anticancer agents with the least side effects will be required. Selenium is one of the unique and essential trace elements to human health. There is a definite relationship between the level of selenium in the daily diet and the risk of developing various types of cancers; this element could additionally be used against some forms of cancer. The main goal of thesis is to study structure-anticancer activity of selenium compounds so as to acquire more complete and accurate information on the mechanisms of their action. Knowledge gained through the present study is to bring a new perspective on selenium-containing anticancer agents with the ability to inhibit tumor growth or prevent its formation. The work consists of structure-anticancer activity studies of both inorganic and organic selenium compounds classes. Among the tested organoammonium selenites, promising anti-cancer agents with the ability to inhibit murine sarcoma S-180 growth were found. Compared to the widely used toxic sodium selenite as a source of selenium, which is widely used in food supplements and vitamin complexes, new more effective organoammonium hydroselenites is proposed to be used for cancer prevention in doses comparable to sodium selenite. Active representatives in the series of 1,2,3-selenadiazole derivatives are characterized with the ability to inhibit tumor growth in vivo and less toxic side effects. Selenazolinium salts exhibit, also in vitro, antiproliferative activity against malignant cells. One of these compounds turned out to be 1270 times more effective on mice hepatoma MG-22A cell line than sodium selenite. The high activity and excellent solubility compared to Ebselen make selenazolinium salts eligible for the discovery of potential anticancer agent. Cytotoxicity and mechanisms of action of selenophenoquinolinones and selenophenocoumarins on tumor and normal cell lines were studied. One of the possible mechanisms of antiproliferative effects is associated with the induction of apoptosis in tumor cells by initiation of caspase-2 and caspase-7 activation, as well as suppression of extreme levels of reactive oxygen species in cells. Research results lead to the conclusion that the introduction of selenium atom into inorganic and organic molecules allows to obtain promising agents for the cancer treatment and prevention.

IEVADS

Pētījuma aktualitāte

Pagājušā gadsimta laikā būtiski pagarinoties cilvēku mūža ilgumam, saslimstība ar ļaundabīgiem audzējiem ir viens no galvenajiem mirstības cēloņiem. Pēdējos gadu desmitos pētnieki visā pasaulē aktīvi nodarbojas ar jaunu pretvēža aktīvo vielu meklējumiem. Mūsdienās ir mainījušās prasības attiecībā uz pretvēža preparātiem, proti, nākotnē ir nepieciešami selektīvi pretvēža preparāti, kuriem būtu iespējams mazāk nevēlamu blakusefektu lai nepazeminātos pacienta dzīves kvalitāte. Pēdējo 20 gadu zinātniskie pētījumi ir viennozīmīgi pierādījuši, ka selēns ir viens no neaizvietojamiem mikroelementiem ar svarīgām īpašībām cilvēka veselības uzturēšanai. Ir noteikta savstarpēja sakarība starp selēna līmeni ikdienas uzturā un risku saslimt ar dažāda veida audzējiem, kā arī, selēnu saturošus savienojumus sekmīgi izmanto dažu vēža formu ārstēšanā. Selēns ietilpst glutaciona peroksidāzes sastāvā, kas ir viens no pamat fermentiem oksidēšanās/reducēšanās homeostāzē šūnās. Selēnam piemīt antioksidatīvas īpašības un tam ir efektīva iedarbība jebkuros fizioloģiskos vai patoloģiskos procesos, kuru laikā notiek pastiprināta brīvo radikāļu un skābekļa aktīvo formu (SAF) producēšana.

Pēdējo gadu laikā Latvijas Organiskās sintēzes institūtā veikto pētījuma rezultātā ir konstatēts, ka selēnu saturošiem savienojumiem piemīt pretvēža aktivitāte, kura ir atkarīga no jau zināmām un jaunām struktūras – aktivitātes likumsakarībām.

Darba mērķis

Ņemot vērā selēna unikālo lomu cilvēka veselības saglabāšanā, darba galvenais mērķis ir selēnu saturošo savienojumu struktūras – pretvēža aktivitātes pētījumi, lai padziļinātu zināšanas un iegūtu pilnīgāku informāciju par šo savienojumu darbības mehānismu. Šo pētījumu rezultātā iegūtās zināšanas ļaus radīt jaunus perspektīvus selēnu saturošus pretvēža preparātus, kas spētu nomākt audzēju augšanu vai novērst tā veidošanos.

Darba uzdevumi:

1. Pētīt amonija un alkilamonija selenītu un telurītu citotoksicitāti *in vitro* uz audzēju šūnu līnijām un spēju nomākt sarkomas S-180 augšanu *in vivo*.
2. Aminoskābju, dipeptīdu un tripeptīdu hidroselenītu rindā veikt struktūras - pretvēža aktivitātes pētījumus, nosakot audzēja šūnu proliferācijas inhibēšanu *in vitro*. Perspektīvākos neorganiskos selēna atvasinājumus pētīt *in vivo* eksperimentos, izmantojot peļu audzēja modeli ar pārpotētu peļu sarkomu S-180.

3. Noteikt vēža šūnu līniju jutību pret aizvietoto betaīnu hidroselenītu atvasinājumiem. Pamatojoties uz iegūtajiem datiem, savienojumus ar augstāko citotoksicitāti virzīt pētījumiem *in vivo*.
4. Noteikt 1,2,3-selēndiazolu atvasinājumu un selēnazolīniju sāļu spēju kavēt audzēju šūnu proliferāciju *in vitro* un *in vivo*.
5. Noskaidrot kondensētu selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu citotoksiskā efekta darbības mehānismu, pārbaudot spēju ietekmēt kaspāžu aktivitāti, apoptozes indukciju šūnās, antioksidatīvo fermentu sistēmas darbību un SAF līmeni dažādās šūnu līnijās.

Rezultātu praktiskā nozīmība un zinātniskā novitāte

Darbā ir aprakstīti selēnu saturošo neorganisko un organisko savienojumu struktūras – pretvēža aktivitātes pētījumi, pamatojoties uz citotoksiskajām īpašībām *in vitro* uz audzēju šūnu līnijām (cilvēku fibrosarkomas HT-1080, peļu hepatomas MG-22A, peļu melanomas B16 un peļu neuroblastomas Neuro2A), uz nosacīti normālām šūnu līnijām (peļu embrionāliem fibroblastiem NIH 3T3 un Sīrijas kāmjā nieres fibroblastiem BHK21). Ir atklāta organiskā amonija selenītu spēja nomākt peļu sarkomas S-180 augšanu *in vivo*. Iegūtie rezultāti dod iespēju rekomendēt jaunus organiskā amonija selenītus izmantošanai uztura bagātinātāju un vitamīnu kompleksu sastāvā, kā selēna avotu, aizvietojojt praksē plaši izmantoto toksisko nātrija selenītu.

Eksperimentos *in vivo* 1,2,3-selēndiazola savienojumu rindā atrasti aktīvi atvasinājumi ar spēju nomākt peļu audzēja S-180 augšanu un ar nelieliem toksiskiem blakusefektiem. Kondensētiem selēnazolīnija atvasinājumiem piemīt antiproliferatīvais efekts *in vitro* nanomolārās koncentrācijās. Cikloheksil selēnazolīnija atvasinājums inhibē hepatomas MG-22A šūnu proliferāciju 1270 reizes efektīvāk nekā nātrija selenīts. Savienojumu augstā aktivitāte un izcilā šķīdība, salīdzinot ar Ebselēnu (2-benzizoselenazol-3(2H)-ons – glutaciona peroksidāzes mimētiķis), ļauj cerēt uz potenciālu pretvēža aģenta atklājumu.

Izpētīts kondensēto selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu citotoksiskais efekts uz deviņām audzēju šūnu līnijām un normālo fibroblastu NIH 3T3 šūnām. Viens no iespējamiem savienojumu antiproliferatīvā efekta mehānismiem ir saistīts ar apoptozes indukciju audzēju šūnās. Apoptozes procesa iniciēšana ir saistīta vismaz ar diviem dažādiem mehānismiem. Viens ceļš ir saistīts ar savienojumu spēju aktivēt kaspāzi-2 un kaspāzi-7. Ekstremāla SAF līmeņa samazināšanās šūnā savienojumu ietekmē ir otrs ceļš apoptozes indukcijai audzēju šūnās. Tāds selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu efekts saistīts ar kaspāzes-1 aktivāciju, kā rezultātā samazinās mitohondriju darbība. Savienojumu spēja

inhibēt superoksīda dismutāzes, glutationa peroksidāzes un tioredoksīna reduktāzes aktivitāti vel vairāk samazina SAF līmeni.

Apkopojot promocijas darbā veikto eksperimentu rezultātus, var secināt, ka selēna atoma ievadīšana mērķmolekulās ļauj iegūt perspektīvus līdzekļus audzēju ārstēšanai un prevencijai.

Promocijas darba rezultātu aprobācija

Zinātniskās publikācijas:

1. Arsenyan P.; Vasiljeva J.; Shestakova I.; Domracheva I.; Jaschenko E.; Romanchikova N.; Leonchik A.; Rudevica Z.; Belyakov S. Selenopheno[3,2-*c*]- and [2,3-*c*]coumarins: synthesis, cytotoxicity, angiogenesis inhibition, and antioxidant properties. *Compt. Rend. Chim.*, **2015**, 18, 399-409.
2. Arsenyan P.; Vasiljeva J.; Shestakova I.; Domracheva I.; Belyakov S. The synthesis and cytotoxic properties of selenopheno[3,2-*c*]- and selenopheno[2,3-*c*]quinolones. *Chem.Heterocycl. Comp. (Engl. Ed.)*. **2014**, 49, 1674-1680.
3. Arsenyan P.; Paegle E.; Belyakov S.; Shestakova I.; Jaschenko E.; Domracheva I.; Popelis J. Synthesis, structure and cytotoxicity of 3-C, N, S, Se substituted benzo[*b*]selenophene derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* **2011**, 46, 3434-3443.
4. Arsenyan P.; Rubina K.; Shestakova I.; Domracheva I. 4-Methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides: Antitumor action and cytotoxic effect correlation. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42, 635-640.
5. Arsenyan P.; Shestakova I.; Rubina K.; Domracheva I.; Nesterova A.; Vosele K.; Pudova O.; Lukevics E. Organoammonium hydroselenites: antitumor action through radical balance regulation. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, 465, 229-235.
6. Arsenyan P.; Rubina K.; Shestakova I.; Abele E.; Abele R.; Domracheva I.; Nesterova A.; Popelis Yu.; Lukevics E. Synthesis and cytotoxicity of silylalkylthio-substituted N-heterocycles and their hydroselenites. *Appl. Organomet. Chem.* **2003**, 17(11), 825-830.
7. Lukevics E.; Arsenyan P.; Rubina K.; Shestakova I.; Domracheva I.; Nesterova A.; Popelis Ju.; Pudova O. Amino-acid hydroselenites: synthesis and cytotoxicity. *Appl. Organomet. Chem.* **2002**, 16, 235-238.
8. Lukevics E.; Arsenyan P.; Shestakova I.; Domracheva I.; Kanepe I.; Belyakov S.; Popelis J.; Pudova O. Synthesis, structure and cytotoxicity of organoammonium selenites. *Appl. Organomet. Chem.* **2002**, 16, 228-234.

Patenti:

1. Arsenjans P.; Šestakova I.; Domračeva I.; Kalviņš I. Amonija selenīti un telurīti kā glutationa peroksidāzes inhibēšanas līdzekļi, **2014**, LV 14709 B, 20.2.2014.

Konferenču tēzes:

1. Domracheva, I.; Vasiljeva, J.; Shestakova, I.; Arsenyan, P. SAR studies in a series of fused selenopheno quinolinones and coumarins. Drug Discovery conference, August 27-29, **2015**, Riga, Latvia.

Pateicības

Šī darba izveide nebūtu iespējama bez daudzu citu cilvēku līdzdalības. Es vēlos izteikt dziļu pateicību darba vadītājiem Prof. Grigorijam Veinbergam, Dr. Pāvelam Arsenjanam un OSI Farmakomodulātoru sintēzes grupai, kā arī Dr. Irinai Šestakovai un Dr. Ivetai Kaņepi-Lapsai par palīdzību un atbalstu disertācijas rakstīšanā un noformēšanā, kā arī par skološanu un sniegtajiem padomiem.

Vēlos pateikties Latvijas Universitātei, Latvijas Zinātņu Padomei un Latvijas Organiskās sintēzes institūtam par finansiālu atbalstu doktorantūras studiju laikā (LZP 447/2012, 593/2014, VPP-6-1, 3-4-4).

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Selēns, selēna savienojumi un to metabolisms organismā

96% dzīvās matērijas sastāv no četriem elementiem – skābekļa, oglekļa, ūdeņraža un slāpekļa, taču dzīvajos organismos samērojamos daudzumos ir atrasti vēl 50 D. Mendelejeva elementu periodiskās sistēmas elementi, no kuriem 23 ir pierādīta fizioloģiska aktivitāte. No tiem 11 elementi klasificējami kā mikroelementi, kas ir neaizvietojami un to daudzums organismā ir neliels (nepieciešamā deva nepārsniedz 100 mg dienā), no tiem 8 elementi izvietoti elementu periodiskās sistēmas IV un V periodā un tiem ir optimālas proporcijas starp atoma kodola izmēru un elektronegativitāti, lai varētu mijiedarboties ar bioloģisko sistēmu molekulām [1]. Šie elementi ir metāli – vanādijs (V), hroms (Cr), mangāns (Mn), dzelzs (Fe), kobalts (Co), varš (Cu), cinks (Zn), molibdēns (Mo) un nemetāli – selēns (Se), fluors (F) un jods (I) (1.1. att.).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	1 H																	2 He
2	3 Li	4 Be											5 B	6 C	7 N	8 O	9 F	10 Ne
3	11 Na	12 Mg											13 Al	14 Si	15 P	16 S	17 Cl	18 Ar
4	19 K	20 Ca	21 Sc	22 Ti	23 V	24 Cr	25 Mn	26 Fe	27 Co	28 Ni	29 Cu	30 Zn	31 Ga	32 Ge	33 As	34 Se	35 Br	36 Kr
5	37 Rb	38 Sr	39 Y	40 Zr	41 Nb	42 Mo	43 Tc	44 Ru	45 Rh	46 Pd	47 Ag	48 Cd	49 In	50 Sn	51 Sb	52 Te	53 I	54 Xe
6	55 Cs	56 Ba		72 Hf	73 Ta	74 W	75 Re	76 Os	77 Ir	78 Pt	79 Au	80 Hg	81 Tl	82 Pb	83 Bi	84 Po	85 At	86 Rn
7	87 Fr	88 Ra		104 Rf	105 Db	106 Sg	107 Bh	108 Hs	109 Mt	110 Ds	111 Rg	112 Cn	113 Uut	114 Fl	115 Uup	116 Lv	117 Uus	118 Uuo
				57 La	58 Ce	59 Pr	60 Nd	61 Pm	62 Sm	63 Eu	64 Gd	65 Tb	66 Dy	67 Ho	68 Er	69 Tm	70 Yb	71 Lu
				89 Ac	90 Th	91 Pa	92 U	93 Np	94 Pu	95 Am	96 Cm	97 Bk	98 Cf	99 Es	100 Fm	101 Md	102 No	103 Lr

1.1. attēls. Mikroelementu izvietojums elementu periodiskajā sistēmā (oranžā krāsā)

Zviedru ķīmiķis J. Bercēliuss (*Jöns Jakob Berzelius*) 1817. gadā atklāja jaunu ķīmisko elementu – selēnu. Toksiskuma dēļ 20. gs. pirmajā pusē tas tika uzskatīts par nevēlamu. 1933. gadā tika atklāts, ka selēns ir toksisks liellopiem, ja to barībā ir augi, kuros šis elements ir augstā koncentrācijā [2]. 20. gs. otrajā pusē viedoklis par selēna lomu mainījās, tam tika atklātas jaunas bioloģiskās īpašības un zinātniskajos rakstos [3] selēns tika atzīts par neaizvietojamu mikroelementu žurku uzturā. 1973. g. tika konstatēts, ka selēns ietilpst glutaciona peroksidāzes (Gpx) sastāvā, kas šūnās ir viens no pamat fermentiem

oksidēšanās/reducēšanās homeostāzē [4], un kopš šī laika, pētījumu gaitā tika atrasti dažādi selēnu saturoši proteīni, noskaidrota to loma augu un cilvēka šūnu metabolismā un ietekme uz cilvēku veselību [5], kā arī parādīta sakarība starp selēna līmeni ikdienas uzturā un dažu dzīvnieku un cilvēka audzēju gadījuma skaitu. Turpmākajā laika periodā zinātnieku interese par selēna pretvēža un citām bioloģiskām īpašībām ir tikai palielinājusies. Zinātnieki ir atklājuši plašu selēna un selēnu saturošo proteīnu bioloģisko īpašību un funkciju spektru cilvēka organismā, ir pierādīta selēna spēja novērst aterosklerozi, artrītu, dažu audzēju tipu veidošanos, palēnināt novecošanās procesus, kā arī novērst vairogdziedzera darbības traucējumus, kardiovaskulārās saslimšanas, CNS patoloģijas, vīriešu neauglību un organisma imūno funkciju traucējumus. Selēns stimulē organisma imūno sistēmu ķīmijterapijas laikā un tam ir radioprotektīvas īpašības [6]. Selēns kā mikroelements ir nepieciešams gan šūnu, gan humorālās imunitātes normālai funkcionēšanai [5, 7], tam piemīt spēcīga pretiekaisuma, pretvīrusu iedarbība, tas kavē HIV, AIDS [5] un ķīmiskās kancerogēneses progresēšanu [8]. Selēnam raksturīgas arī antioksidatīvās īpašības un tas efektīvi pasargā organismu jebkuros fizioloģiskos vai patoloģiskos procesos, kuru laikā notiek paaugstināta brīvo radikāļu un skābekļa aktīvo formu producēšana. Selēns paaugstina organisma izturību maksimālu fizisko slodžu un oksidatīvā stresa gadījumos, kā arī paaugstinātas smago metālu koncentrācijas apstākļos [9].

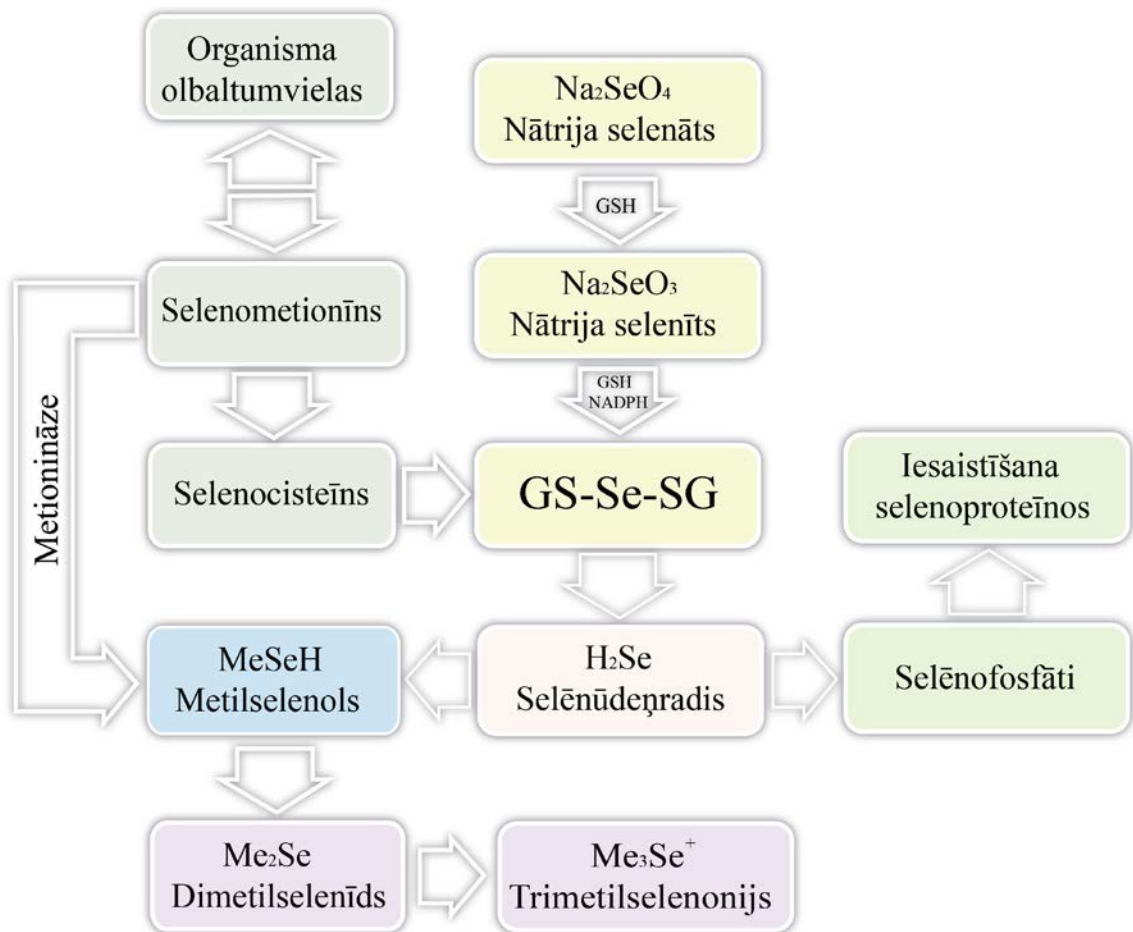
Pierādīts, ka selēnam ir unikāla loma cilvēka fizioloģijā. Selēns organismā nonāk tikai ar barību un ir nepieciešams un neaizvietojs cilvēka un dzīvnieku diētas komponents. Rekomendējamā diennakts deva ir 55-70 µg. Galvenais selēna avots ir graudaugi, īpaši kvieši. Selēnu satur arī jūras produkti un gaļa. Daži augi var uzkrāt līdz pat 0,1% selēna un dažu savvaļas augu un sēņu toksiskums ir saistīts ar augstu selēna saturu. Daudz selēna, ja šī elementa līmenis ir augsts apkārtējā vidē, spēj uzkrāt raugi un prokarioti, to skaitā spirulīna. Brazīlijas riekstos ir augsta selēnu saturošu aminoskābju koncentrācija. Arī acai ogu (*Euterpe oleracea*) eļļā konstatēta augsta selēnorganisko savienojumu koncentrācija, kas nosaka šī produkta spēcīgās antioksidatīvās īpašības. Parasti organiskajos savienojumos selēns ir divvērtīgā formā. Jāatzīmē, ka dzīvnieku valsts produktos dominē selenocisteīns, bet augu valsts produktos – selenometionīns. Organiskā selēna biopieejamība lietojot kviešu miltus vai gaļu ir līdzīga [10-12]. Ja selēna saturs pārtikas produktos ilgstoši ir zemāks par 11 µg/dienā, iestājas selēna deficīts un tas izraisa dažādus veselības traucējumus (1.4. att.), piem., muskuļu distrofiju (balto muskuļu slimība), fatālo kardiomiopātiju (Kešana slimība), hondrodistrofiju (Kasčina-Beka slimība), depresijas [13]. Daudz mazākā mērā ar pārtiku tiek uzņemti selēna neorganiskie savienojumi - selenīti un selenāti.

1.2. attēlā ir parādīta selēna metabolisma shēma organismā. Neorganiskie selenīti un selenāti ar glutaciona palīdzību tiek reducēti un, izveidojoties dažiem starpmetabolītiem, gala rezultātā pārvēršas par selēnūdeņradi [14]. Šāds selēna metabolisma ceļš ir saistīts ar superoksīda veidošanos.

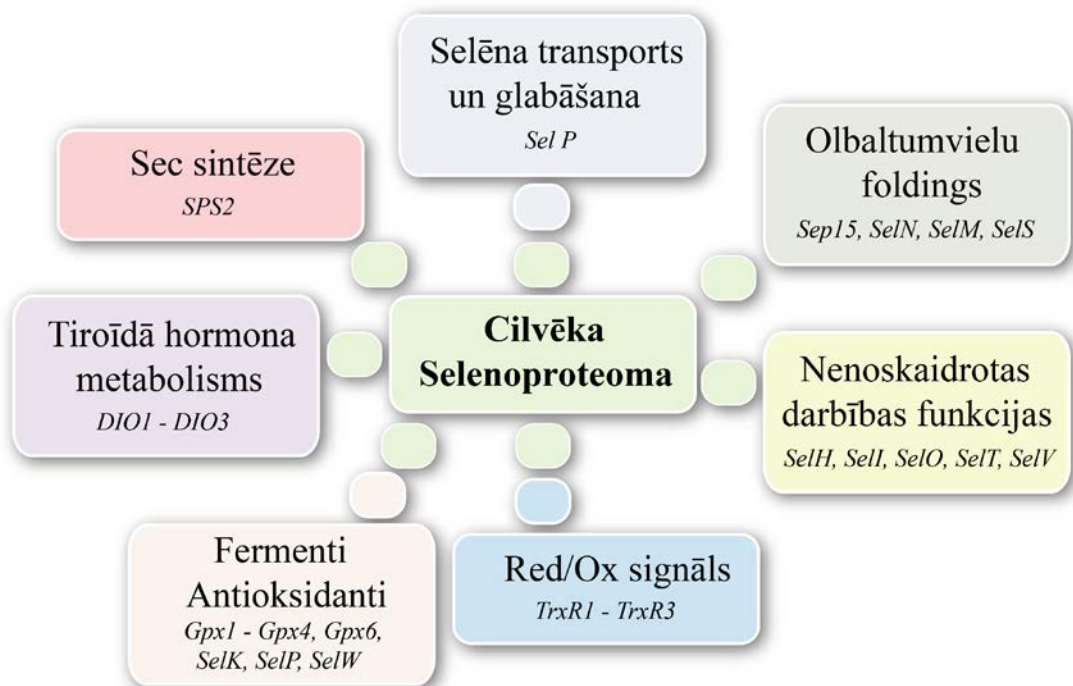
Bioloģiskajos organismos selēna organiskie savienojumi atrodas selēnu saturošu aminoskābju veidā - kā selenocisteīns (SeC), selenometionīns (SeM), selenometionilselenocisteīns (SeMC). SeM ļauj selēnam 35 reizes aktīvāk iesaistīties organisma vielmaiņas procesos, nekā neorganiska selēna savienojumi. Daļa, ar barību uzņemtā, SeM tiek transaminēta, veidojot alanīnu un metānselenolu, kurš tālāk vai nu metilējas un tiek izvadīts, vai demetilējas līdz selēnūdeņradim. SeC var nespecifiski ieslēgties audu olbaltumvielās cisteīna vietā. Šāda SeC ieslēgšanās olbaltumvielās ir atkarīga no organisma nodrošinātības ar sēru. Daļa SeC var deselenizēties, veidojot selenītus [15], vai arī B6 vitamīna atkarīgās selenocisteīnliāzes ietekmē, veidojās selēnūdeņradis (H_2Se) [16, 17] un elementārais Se, kā starpsavienojums. Turklāt, organismā nonākušais SeC pats nepastarpināti olbaltumvielās neieslēdzas. SeMC gala rezultātā arī demetilējas līdz H_2Se [15]. Tādējādi organisko un neorganisko selēna savienojumu metabolisma rezultātā pēc vairākiem starpposmiem veidojas H_2Se . Selēnūdeņraža veidā selēns uzkrājas dzīvajā organismā un šādā veidā var iesaistīties selenoproteīnu sintēzē, vai pēc metilēšanas tas tiek izvadīts no organisma. Metilselēnskābe ($MeSeO_2H$) un sintētiskie selēna savienojumi, kā aprakstīts literatūrā [18], transformējas par $MeSeH$ bez β -liāzes līdzdalības.

Atšķirībā no citiem mikroelementiem, kuri nekovalenti saistās ar proteīniem, selēns atrodas polipeptīdu selenocisteīna sastāvā. Selenocisteīns ir cisteīna analogs, kurā sēra atoms ir aizvietots ar selēnu un jāatzīmē, ka SeC nav tieši iekodēts DNS struktūrā. Sintezējot SeC, uz mRNS tiek izmantots kodons UGA, kurš parasti ir stop-kodons, ar noteikumu, ka pēc šī kodona seko īpaša stimulējoša nukleotīdu secība. Lai ieslēgtu UGA kodonu, no seril-tRNS ar selenocisteīnasintāzes (SELA) palīdzību tiek sintezēta selenocisteīna-tRNS, kur selēna donors ir selēnfosfāts. Selēnfosfāts veidojas no ATF un selenīda, izmantojot selēnfosfāt sintāzi-2ⁱ (SELD), kura arī ir selēnu saturošs ferments [19].

Pašlaik cilvēka organismā ir atklāti 25 selenoproteīni. Glutaciona peroksidāze (Gpx) un tioredoksīna reduktāze (TrxR) piedalās oksidēšanās – reducēšanās procesos audos. Jodotironīndeiodināze (DIO) piedalās tiroīdo hormonu metabolismā. Vairāki selenoproteīni izpilda signālproteīnu funkcijas vai nodrošina selēna pārnesi un uzglabāšanu (1.3.att.).



1.2.attēls. Selēna metabolisms organismā



1.3.attēls. Cilvēka selenoproteīni

1.2. Selēnu saturošo savienojumu darbības mehānisms organismā

Pētījumi gan preklīniskos, gan klīniskos izmēģinājumos ir apstiprinājuši ka dažādi selēna savienojumi darbojas kā pretvēža aģenti. Apkopojot līdzšinējos pētījumus, kas aprakstīti vairākos zinātniskās literatūras apskatos [20-24] par dažādu selēna savienojumu pretvēža darbības mehānismiem, var izdalīt pamatvirzienus:

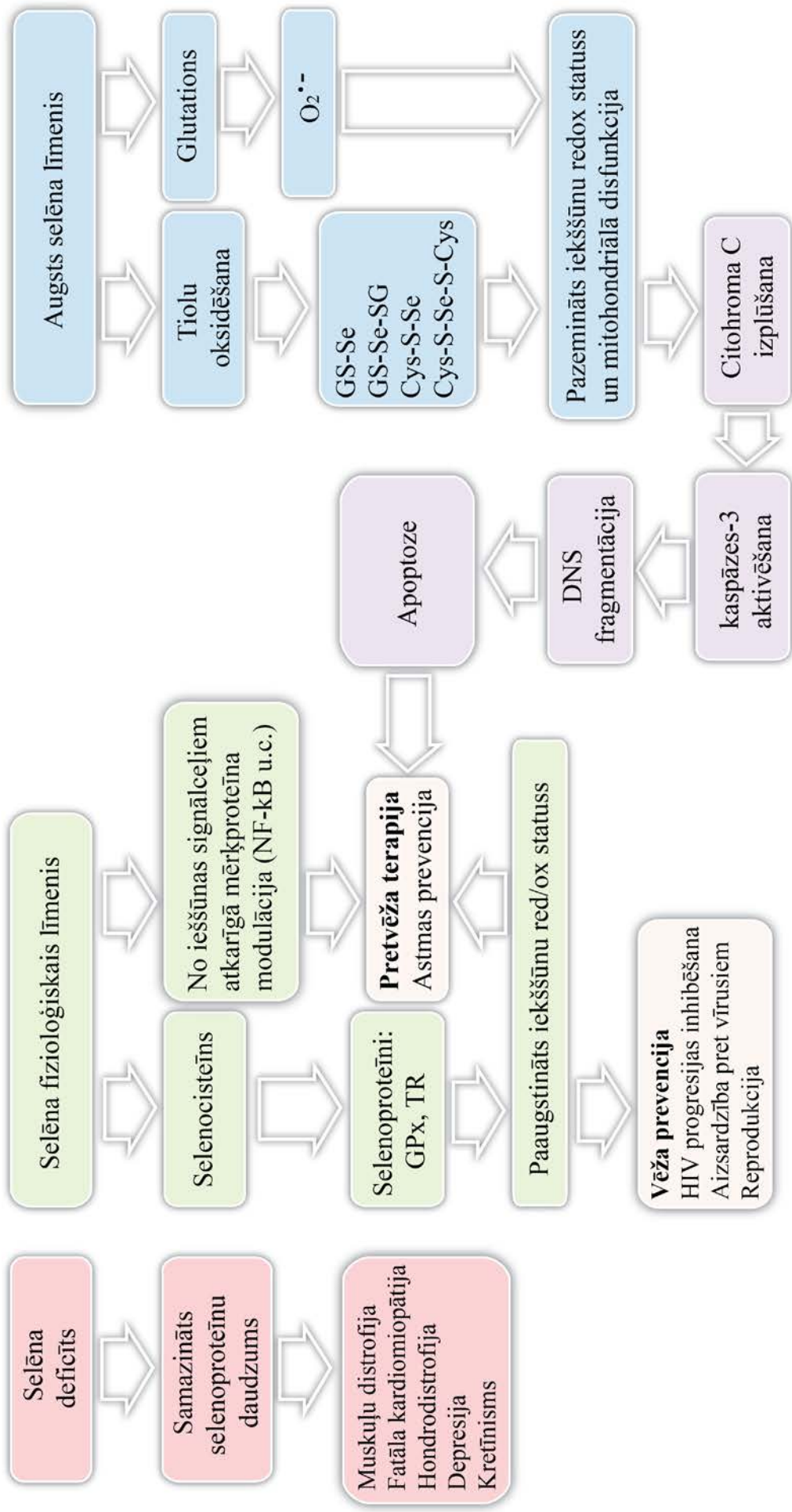
- Selēna savienojumi ietekmē skābekļa aktīvo formu (SAF) līmeni šūnā. Šajā procesā selēnam ir duāla darbības forma: no vienas puses – selēns ir šūnas fermentatīvās antioksidatīvās sistēmas daļa, no otras - paaugstina SAF līmeni šūnā, jo selēnu saturošo savienojumu metabolisma procesā veidojas superoksīds un dažiem selēna savienojumiem piemīt prooksidantu īpašības.
- Selēna savienojumi iniciē šūnu bojāeju apoptozes ceļā, aktivējot dažādus mehānismus: proteīnkināžu, kaspāžu vai mitohondriālo apoptozes indukcijas ceļu.
- Selēna duālā daba – antioksidants / prooksidants, izpaužas kā divējāds efekts uz DNS. Atkarībā no selēna ķīmiskās formas, tas var izraisīt gan DNS bojājumus gan tās reparāciju.
- Selēna savienojumi bloķē šūnu dzīves ciklu, inhibē angiogēnēzi un vēža metastazēšanos.

Pēc pēdējo gadu pētījumu rezultātiem var spriest, ka galvenais selēna savienojumu pretvēža iedarbības mehānisms galvenokārt ietver apoptozes indukciju un šūnu proliferācijas inhibīciju (1.4.att.). Selēna spēja kavēt angiogēnēzi un vēža metastazēšanos, apvienojumā ar spēju modulēt antioksidatīvo un prooksidatīvo sistēmu līdzsvaru šūnā, ļauj tos uzskatīt par perspektīviem pretvēža aģentiem.

1.2.1. Selēnu saturošie savienojumi un apoptozes process

Mūsdienu pētījumos par selēna savienojumu pretvēža darbības mehānismiem vairumā gadījumu tiek uzsvērtā to spēja kavēt šūnu dzīves ciklu un inducēt apoptozi. Lai gan visi pētnieki piekrīt, ka selēnam šajos procesos ir izšķirošā loma, taču tā darbības mehānisms līdz galam nav noskaidrots.

Selēna savienojumu pretvēža efektivitāte korelē ar to ķīmisko uzbūvi un devu, piemēram, to pretvēža efektivitāte *in vivo* korelē ar spēju regulēt šūnas dzīves ciklu, veicināt apoptozi un inhibēt audzēja šūnu migrāciju un invāziju *in vitro* [22]. Literatūrā ir aprakstīta selēna savienojumu spēja veicināt dažādu audzēju šūnu apoptozi: prostatas, taisnās zarnas, aknu, leukēmijas un limfomas [25].



1.4.attēls. Selēna bioloģiskās funkcijas, atkarībā no tā uzņemšanas devas

Gpx, glutationa reduktāze; TR, tioredoksīna reduktāze; GSH, reducēts glutatons; CytC, citohroms C.

Pēdējo gadu pētījumi parāda, ka selēna savienojumi spēj inducēt apoptozi pēc atšķirīga darbības mehānisma atkarībā no šūnu tipa, selēna savienojuma un tā metabolisma šūnā. Piemēram, selēna oksīds izraisa kaspāzes-3 aktivāciju ar tai sekojošu apoptozes indukciju, turpretī nātrija selenīts spēj inducēt apoptozi bez kaspāžu aktivācijas. Šūnas mitohondriālo funkciju modulēšanai ir noteicošā loma apoptozes norises mehānismā. Cits apoptozes indukcijas mehānisms tiek saistīts ar glutaciona un SAF līmeni šūnā. R.Sinhaanda vadītā grupa [26] apkopoja pētījumus par bioloģiskiem mērķiem organismā, kuru aktivācija vai ekspresija mainās selēnsaturošo savienojuma ietekmē, kā rezultātā notiek apoptoze, šie bioloģiskie mērķi ir:

- ✓ šūnu dzīves cikla regulējošie proteīni (Rb, p53, ciclīni A, B, D1 un E, p16, p21 un p27, cdk2, cdk4 and cdc2, gadd34, 45 un 153);
- ✓ mitohondriju faktori (Bcl-2, BAX, BAK, BID, citohroms c, SAF);
- ✓ signālproteīni, proteīnkināzes (PKC, PI3-K, Akt, ERKs 1 & 2, p38 MAPK, JNK), proteāzes (piem., kaspāzes 3, 6, 7, 8 un 9, kalpaini);
- ✓ angioģenēzes faktori (VEGF, MMP-2, IMVD);
- ✓ DNS transkripcijas faktori (NF-κB un AP-1);
- ✓ audzēja supresijas gēni (piem., p53);
- ✓ poliamīna un reducētā glutaciona (GSH) līmenis.

1.2.2. Apoptozes indukcija modulējot proteīnkināžu aktivitāti

Zināms, ka proteīnkināzes regulē šūnu dzīves ciklu, augšanu un diferenciāciju, apoptozi. Dažādu kināžu stimulācija izraisa mērķolbaltumvielu fosforilēšanu, kas saistīta ar programmējamās šūnu nāves regulāciju un atbilstošo transkripcijas faktoru funkcionēšanu. Dažādi selēna atvasinājumi ietekmē atšķirīgu kināžu iedarbību, piem., metilselenols, viens no SeM metabolītiem, inhibē kināzes ERK1/2 aktivitāti fibrosarkomas HT-1080 šūnās [27]. Taisnās zarnas audzēju HCT116 un SW620 augšanas kavēšana, iedarbojoties ar nātrija selenītu, saistīta ar kināzes JNK aktivāciju [28]. Dažu selenocianātu grupas savienojumu darbības mehānisms saistīts ar iedarbošanos uz proteīnkināzi Akt, kas inhibē apoptozes procesus. Proteīnkināze Akt piedalās šūnu cikla regulācijā un inducē olbaltumvielu sintēzi, tāpēc tā ir svarīgs faktors audu augšanas regulācijā. 1,4-Fenilēnbis(metilēn)selenocianāts (*p*-XSC) inducē androgēnatkarīgā LNCaP un androgēnneatkarīgā LNCaP C4-2 cilvēka prostatas audzēja šūnu līnijās apoptozi, samazinot kināzes Akt fosforilācijas līmeni. Uz šīm šūnu līnijām SeM uzrāda līdzīgu iedarbības efektu [29]. 4-Fenilbutilzoselenocianāts (ISC-4) samazina proteīnkināzes Akt3 aktivitāti un 3 reizes paaugstina taisnās zarnas audzēja HT-29 šūnās apoptozes līmeni [30].

1.2.3. Apoptozes indukcija modulējot kaspāžu aktivitāti

Šūnās iespējami divi galvenie apoptozes indukcijas ceļi modulējot kaspāžu aktivitāti:

1. Mitohondriālais ceļš. Mitohondriji veic apoptozes indukcijas procesa galveno funkciju. Apoptotiskajās šūnās ir palielināta mitohondriālo membrānu caurlaidība. Iekššūnu balansu starp pro- un anti- apoptotiskiem Bcl-2 gēna saimes locekļiem regulē proapoptotisko vielu izdalīšanos no mitohondrijiem, piemēram, AIF, endonukleāzes G, Smac/DIABLO un citohroma c. Izdaloties citohromam c no mitohondrijiem, citoplazmā veidojas apoptosomas, kuras aktivē kaspāzi-9 un uzsāk šūnās apoptozes procesus.

2. Iedarbība uz apoptozes receptoriem. Apoptozes receptori ir olbaltumvielu CD95 (Apo-1 vai Fas) un TNF-R (audzēju nekrozes faktors) saime. Aktivējoties apoptozes receptoriem, kaspāze-8 ierosina bioķīmisko reakciju ķēdi, kā rezultātā notiek šūnu apoptoze.

Šobrīd cilvēka organismā ir identificētas 12 kaspāzes, kuras pēc funkcionālajām īpašībām var iedalīt sekojošās grupās: citokīnu aktivatori (kaspāzes -1, -4, -5, -12); efektoro kaspāžu aktivācijas induktori (kaspāzes -2, -8, -9); efektorās kaspāzes – apoptozes izpildītāji (kaspāzes -3, -6, -7); kaspāzes -10 un -14 [31-33].

Selēna savienojumu rindā, kuriem piemīt kaspāžu aktivitātes modulācijas spējas, atsevišķi tiek izdalīti selēnu saturošie heterocikliskie savienojumi. 1,2-[Bis(1,2-benzisoselenazolone-3-(2*H*)-ketona)] etāns (BBSKE) uzrāda kaspāzes-3 aktivitātes modulāciju mēles vēža Tca8113 šūnu līnijā [34]. 2,5-Bis(5-hidroksimetil-2-selenienil)-3-hidroksimetil-*N*-metilpirols (D-501036) ir 1,3-selēnazolīn-4-ona atvasinājums ar plašu pretvēža aktivitātes spektru, kurš inducē apoptozi, aktivējot kaspāzes-9 un -3, atkarībā no devas un iedarbības ilguma [35].

1.2.4. Sakarība starp apoptozi un skābekļa aktīvo formu (SAF) līmeni šūnā

Ir plaši izpētītas selēna savienojumu antioksidantu un prooksidantu īpašības, kuras ļauj tiem ietekmēt SAF līmeni šūnās. Apoptozes indukcijas mitohondriālais ceļš ir tieši saistīts ar SAF ģenerēšanu šūnā. Oksidatīvais stress ir universāls šūnu bojājuma mehānisms dažādu ģenēzes patoloģiju gadījumos un tam ir raksturīga paaugstināta iekššūnas SAF ģenerēšana, kas ir antioksidatīvo un prooksidatīvo sistēmu līdzsvara traucējumu sekas [36]. SAF veidošanās galvenā vieta šūnā ir mitohondriji, taču gadījumos, kad SAF līmeņa paaugstināšanās iemesli ir ārēji, oksidatīvā stresa rezultātā iestājas mitohondriju un citu šūnas komponentu bojājumi, proti, mitohondriju iekšējā membrānā veidojas nespecifiski kanāli ar augstu jonu caurlaidību, rezultātā mitohondriju matrikss uzbriest, plīst ārējā membrāna un citoplazmas olbaltumvielas kopā ar citohromu c izplūst starpmembrānu telpā. Starp šīm olbaltumvielām ir faktori, kas aktivē apoptozi, tai skaitā prokaspāze-9.

Šobrīd koncepcija, ka SAF izraisa tikai bojājumus šūnas funkcionēšanas procesos, tiek pārskatīta no jauna. Plašu popularitāti ir ieguvis termins „oksidatīvā regulācija”, kas parāda oksidēšanas-reducēšanas procesos modificēto proteīnu aktīvo lomu šūnu funkciju regulācijā [36-38]. Nobela prēmijas laureāts Dr. Džeims Vatsons (*James Watson*) atzīmēja SAF divējādo darbības raksturu. Viņš nosauca SAF par „pozitīvo dzīves spēku”, atbilstoši nozīmīgai lomai apoptozes procesā. Šis process ir viens no galvenajiem mehānismiem, ar kura palīdzību iespējams atlasīt bioloģiski disfunkcionālas struktūras, kuras varētu apdraudēt organisma izdzīvošanu. No otras puses, skābekļa SAF aktīvās formas, bez šaubām, ir pazīstamas ar savu spēju neatgriezeniski bojāt olbaltumvielas un nukleīnskābes (DNS un RNS). Periodā, kad organismam nav nepieciešama SAF, lai atbrīvotos no „nekontrolējamām” šūnām, kas pastāvīgi notiek normālos apstākļos, tās tiek neitralizētas ar olbaltumvielām-antioksidantiem.

Šūnas aizsargmehānisms pret SAF un oksidatīvo stresu ietver sevī vairākas pakāpes: preventīvo mehānismu, atjaunojošo mehānismu, fizisko aizsardzību un antioksidatīvo aizsardzību. Antioksidatīvā šūnu aizsardzība sastāv no divām daļām: fermentatīvās un nefermentatīvās. Fermentatīvo antioksidatīvo aizsardzību nodrošina fermenti: glutaciona peroksidāze, tioredoksīna reduktāze, superoksīda dismutāze un katalāze; nefermentatīvo - glutations, askorbīnskābe (C vitamīns), tokoferols (E vitamīns), karotinoīdi, flavonoīdi u.c.

Tādējādi selēns dažādu selenoproteīnu veidā piedalās organisma antioksidatīvajos procesos. Šobrīd vairākos pētījumos pierādītas selēna protektīvās īpašības pret brīvo radikāļu kaitīgo iedarbību. Vairums selēna bioloģisko funkciju organismā saistītas ar tā antioksidatīvajām īpašībām. Selenocisteīna klātbūtne fermenta aktīvajā centrā, salīdzinot ar cisteīnu, būtiski palielina tā katalītisko aktivitāti. Piemēram, formatdehidrogenāze, kas satur selenocisteīnu, ir 300 reizes aktīvāka kā cisteīnu saturošā, un cits piemērs - cisteīna atlikuma aizvietošana ar selenocisteīnu gliceraldehīd-3-fosfātdehidrogenāzē, piešķir fermentam peroksidāzes funkcijas [39].

Selēns stimulē metionīna pārvēršanos par cisteīnu un glutaciona sintēzi, kas arī veicina organisma kopējo antioksidatīvo potenciāla palielināšanos un lipoperoksīdu detoksifikāciju. Tieši selēna augstā antioksidatīvā aktivitāte izskaidro tā radioprotektīvās īpašības, kas ir augstākas nekā tiola savienojumiem. Selēns veicina aizsardzību no skābekļa toksiskās ietekmes paaugstināta atmosfēras spiediena (hiperbārija), UV un γ -starojuma apstākļos. Mazās un vidējās devās selēns veic efektīvu mitohondriju antioksidatīvo aizsardzību, kas ir izteiktāka nekā α -tokoferolam. Selēns kā antioksidants darbojas arī hepato- un kardioaizsardzības procesos [40].

No otras puses, selēna savienojumiem piemīt prooksidatīvās īpašības. Ir izpētītas triju savienojumu: nātrijs selenīta, selenocistamīna un diselenodipropionskābes spēja izraisīt

glutaciona oksidēšanos ar superoksīda ģenerāciju [41]. 2010.g. ir aprakstīti 59 selēnorganiskie savienojumi - superoksīda ģeneratori [42], to skaitā bis(4-aminofenil)diselenīds, kuram pierādīta ar SAF modulāciju saistīta apoptozes indukcija limfocīdās leikēmijas CCRF-CEM šūnās.

1.3. Selēna toksiskais efekts

Galvenā problēma selēna savienojumu izmantošanai terapijā un profilaksē ir diezgan šaurs devas diapazons starp selēna terapeitisko un toksisko devu. Saskaņā ar ārstu rekomendācijām, cilvēkam diennaktī nepieciešami vidēji 55 μg selēna. Vīrusa infekciju (herpes, HIV) ārstēšanas laikā selēna deva var palielināties līdz 600 μg dienā. Selēna savienojumu pretvēža efekts uz atsevišķiem audzēju veidiem parādas pie devas 200-300 μg dienā. Turpretī, selēna toksiskais efekts ir 750-800 μg dienā. Saindēšanās ar selēnu un selenozes pazīmes parādās, ja selēna deva ir vairāk nekā 1540 μg dienā [43, 44]. Kā nevēlamās blakusparādības, pārdozējot selēnu, novēro ādas izsitumus, sliktu dūšu, izteiktu nogurumu, matu izkrišanu, nagu augšanas izmaiņas un depresiju.

Selēna toksiskums un biopieejamība ir atkarīga no savienojumu ķīmiskās dabas. Selēna neorganiskie savienojumi ir toksiskāki nekā organiskie, jo ir ierobežota galvenā toksiskā metabolīta – selēnūdeņraža (hidroselenīda anjons) utilizācijas iespēja. Selēns elementārā (pazīstamas trīs alotropiskās modifikācijas: melnā stiklveidīga forma, pelēki heksagonālās formas kristāli un ķieģeļsarkanā amorfā forma) veidā acīmredzot ir nekaitīgs cilvēkam, taču kaitīgs ķīmiski saistītā veidā. Selēna savienojumi organismā var nonākt caur plaušām, gremošanas traktu vai ādu.

Neorganiskais selēns cilvēka organismā var ieslēgties selenocisteīnā, bet nekad neieslēdzas selenometionīnā. Eksperimenti ar iezīmētu selenometionīnu-75 [45, 46], parādīja, ka SeM ieslēdzas dzīvībai svarīgu fermentu reproducēšanās ciklos, padarot tos nepilnvērtīgus. Tiek uzskatīts, ka intoksikācijas gadījumos ar selēnu, nāve iestājas tādēļ, ka selēns ir bioloģiski tuvs sēram, taču ķīmiski aktīvāks un tas pakāpeniski nomaina sēru fermentu sistēmās, izraisot neatgriezeniskus organisma bojājumus. Ņemot vērā metionīna un selenometionīna ievērojamo fizikāli-ķīmisko īpašību līdzību, SeM ir spējīgs aizvietot metionīnu olbaltumvielās un process notiek pēc specifiska mehānisma: atbilstošā tRNSmet „kļūdās”, pieņemot metionīna vietā tā selēna analogu [15]. SeM nespecifiski ieslēdzoties olbaltumvielās, netiek ievērota jebkāda noteikta stehiometrija. Neskatoties uz to, SeM ir labs selēna avots specifisku selenoproteīnu sintēzē, taču tikai tajā gadījumā, ja organisms ir pietiekami nodrošināts ar sēru metionīna formā. SeM ieslēgšanās process olbaltumvielās un atbrīvošanās no tām proteolīzes procesā

notiek lēni, ar šo apstākli, acīmredzot, ir saistīts ievērojami zemāks SeM toksiskums, salīdzinot ar selenītiem, uzņemot tos perorāli [15, 47].

1.4. Neorganiskie selēna savienojumi

Gandrīz divu gadsimtu laikā ir sintezēti dažādu klašu selēnu saturoši savienojumi un pētītas to īpašības. Selēna valence ķīmiskajos savienojumos nosaka tā bioloģiskās īpašības. Literatūrā parādīts ka, selēns ir efektīvs ar oksidācijas pakāpi +4, taču selenāti ir tik pat efektīvi (oksid. pakāpe +6), ja tos var reducēt līdz pakāpei +4 [48]. Dažādu klašu selēna savienojumi organismā metabolizējas atšķirīgi un galarezultāts ir atšķirīgs. Savienojumi aktivē dažādus bioloģiskās iedarbības molekulāros mehānismus un līdz ar to ir atšķirīgs toksiskums un pretvēža efekts.

Visplašāk izpētītie Se saturošie neorganiskie savienojumi ir selēnūdeņražskābe (H_2Se), selēna dioksīds (SeO_2), nātrija selenīts (Na_2SeO_3), selēnpaskābe (H_2SeO_3) un selēna diglutations ($GS-Se-SG$). Vispiemērotākie neorganisko selēna savienojumu rindā, kā terapeitiskie līdzekļi vēža ārstēšanā, ir selenīti (SeO_3^{2-}). Vairākos pētījumos, tie uzrādīja ievērojamu citotoksicitāti mikromolārā diapazonā pret ļaundabīgajām plaušu [49, 50], prostatas [51], kakla [52], olnīcu [53] un resnās zarnas [54, 55] šūnām, kā arī primārās cilvēku akūtas mieloīdas [56] un limfoblastiskā [57] leukēmijas šūnām. Ziņots, ka medikamentu rezistentas šūnas kļūst daudz jutīgākas pret ķīmijterapiju, ja pievieno selenītus [53, 58]. Nātrija selenīts kombinācijā ar kamfotecīnu pastiprina dzemdes kakla vēža šūnu supresiju [59], ka arī uzlabo 5-fluoruracila, oksaliplatīna un irinotekāna citotoksicitāti uz resnās zarnas vēža šūnu līnijām [60]. Vēl jo vairāk, šis savienojums būtiski uzlabo staru terapijas efektu ārstējot hormonu neatkarīgos prostatas audzējus [61]. *In vivo* eksperimenti ir apstiprinājuši selenītu terapeitisko potenci gan attiecībā uz prostatas un taisnās zarnas audzējiem [62], gan limfoproliferācijas modeļos [63, 64], taču selenītu efektivitāti būtiski nomāc to toksiskums.

Selēna savienojumu pretvēža aktivitāte ir proporcionāla to katalītiskajai aktivitātei. Izpētīts, ka dažādu selēna savienojumu rindā vislielāko aktivitāti novēro selēna diglutationam. Šis savienojums tika patentēts kā kancerostatisks preparāts pret plaušu karcinomas šūnām, zarnu apvalka adenokarcinomu, melanomu, piena dziedzeru adenokarcinomu, gliomu, medulloblastomu, audzēju transformētiem fibroblastiem un keratinocītiem, tā augstās citotoksiskas aktivitātes dēļ. Otrs aktīvākais un visvairāk izpētītākais savienojums ir nātrija selenīts. Šim savienojumam ir pierādīts pretvēža efekts uz vairākiem audzēju veidiem, taču augstais toksiskums ierobežo tā izmantošanu. Šobrīd nātrija selenītu izmanto biopiedevu veidā. Nātrija selenātam (Na_2SeO_4), kurā Se oksidācijas pakāpē ir +6, piemīt antiangiogēneses īpašības [65]. Dažāda pretvēža aktivitāte aprakstīta arī selēna metabolītiem.

Selēnūdeņražskābei augstās devās piemīt antioksidatīvā aktivitāte, šūnu proliferāciju modulējošas un imūno sistēmu stimulējošas īpašības. Metilselenols bloķē šūnu cikla G1 fāzi, stimulē kaspāzes atkarīgo apoptozi, inhibē angiogēnēzi un vēža šūnu invāziju [22].

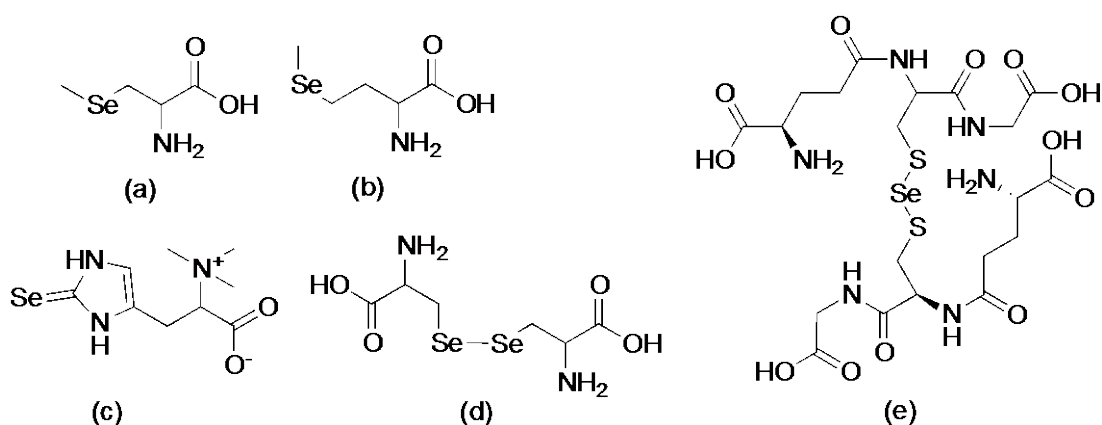
Mūsdienās aptiekās ir pieejams plašs uztura bagātinātāju klāsts, kuri satur neorganisko selēnu. Neorganiskā selēna biopieejamība ir viena no neatrisinātām problēmām. Minerālvielas, tai skaitā selēns, var veidot helātus ar aminoskābēm. Helāti dabiskā ceļā veidojas gremošanas procesā, kad kuņģa skābes un fermenti hidrolizē olbaltumvielas līdz aminoskābēm. Aminoskābes saistās ar minerālvielām, nodrošinot to pārnēsi caur zarnu sienām. Ņemot vērā šos procesus, ir izveidoti selēna kompleksi ar aminoskābēm, lai paaugstinātu neorganiskā selēna biopieejamību, piemēram, *Vitacost Complexed Selenium - Albion® Selenium Glycinate Complex*, kur glicīns ir helātors, kā arī nātrija selenīts tiek apvienots ar selēnu saturošām aminoskābēm: L-selenometionīnu un Se–metil L-selenocisteīnu (piemēram, *Life Extension® Super Selenium Complex*).

1.5. Organiskie selēna savienojumi

Cilvēka organismā ir atrastas divas selēnu saturošas aminoskābes - selenocisteīns un selenometionīns, kas iekļaujas dažādu selenoproteīnu sastāvā. Visplašāk izpētītas ir glutaciona peroksidāzes, selenoproteīna P, jodotironīndejodināzes un tioredoksīna reduktāzes bioloģiskās funkcijas. Šobrīd cilvēka organismā ir atrasti un identificēti vairāk kā 25 selenoproteīni, kuri piedalās imūnajās reakcijās, aizsargā DNS, lipīdus un lipoproteīnus pret bojājumiem, uztur normālu vairogdziedzera darbību, nepieciešami matu un nagu veselībai, kā arī sekmē veselīgu spermatozoīdu ražošanu. Dažādu selēnu saturošo aminoskābju iedarbības mehānisms un bioloģiskais efekts ir atšķirīgs. Se-metilselenocisteīns (MeSeC) var izmainīt dažu kolagēna tipu gēnu un proteīnu ekspresiju, kas izraisa ekstracelulārā matricas izmaiņas un rezultāts ir izmaiņas prostatas šūnu mitozes procesā [66]. Citi autori saista MeSeC pretvēža efektu ar tā metabolīta – metilselenola iedarbības efektu, kurš ir pētīts uz transgēnās peles modeļa ar prostatas adenokarcinomu, ievadot MeSeC perorāli [67]. 2011. g. atklāja jaunu MeSeC metabolītu - α -keto skābes analogu, kuram arī tika pierādīts pretvēža efekts [68]. Pastiprinātu pētnieku interesi izraisa viens no SeM pretvēža darbības mehānismiem, kas saistīts ar SeM metabolītu spēju inhibēt histonu deacetilāzes (HDAC) aktivitāti, ko pavada olbaltumvielu oksidēšanās - reducēšanās modulācija [69].

Japāņu zivsaimniecības zinātnes pētniecības institūta līdzstrādnieki ir atklājuši zilā tunča derīgās īpašības, identificējot tā asinīs un audos augstu 2-selenil-N,N,N-trimetil-L-histidīna saturu. Šis savienojums ir ergotioneīna 1,4-selēna analogs, kuru nosauca par selenoneīnu (1.5.att., c). Selenoneīna klātbūtne tika konstatēta arī citu zivju (skumbrijas,

tilāpijas, makreles) asinīs, hepatopankreātā, liesā, sirdī un skeleta muskuļos, kā arī cūku nierēs, kalmāru hepatopankreātā, vistas guzā, aknās un sirdī [70].



1.5.attēls. (a) Metilselenocisteīns, (b) selenometionīns, (c) selenoneīns, (d) selenocistīns, (e) selēnodiglutations.

Neskatoties uz to, ka SeM darbības mehānisms, kurš saistīts ar vēža veidošanos, ir samērā daudz pētīts, maz ir darīts, lai novērtētu SeM ietekmi uz šūnu proliferāciju. Jaunākajos pētījumos ir pierādīts, ka SeM kavē kolorektālo [71, 72], plaušu [73, 74], krūts un prostatas vēža šūnu augšanu, kā arī konstatēta citotoksicitāte attiecībā uz melanomas šūnām [75, 76], taču, selēnu saturošās aminoskābes uzrāda pretaudzēju aktivitāti ievērojami augstākā koncentrācijā (mikromolārais diapazons), nekā selēna reducētās aktīvās formas. Nesen ziņots par iespēju izmantot SeM, kombinējot to ar jonizējošo starojumu, tas dod iespēju turpmāk SeM izmantot plaušu vēža ārstēšanā [77]. Līdzīgi SeM, selēnometilcisteīns (MSC) proponēts par efektīvu aģentu šūnu proliferācijas kavēšanai vidējās un augstās koncentrācijās cilvēka mutes dobuma plakanšūnu, resnās zarnas un krūts karcinomas šūnās [78, 79]. Neskatoties uz MSC augsto toksicitāti, pēdējos gados pētnieku uzmanību piesaistīja, tā spēja modulēt metastazēšanas procesus. MSC angiogēnēzes inhibēšanas rezultātā kavē audzēja augšanas ātrumu [80, 81], uzlabo pretvēža zāļu piegādi audzējā, tādējādi radot terapeitisko sinerģiju *in vivo*. Pierādīts, ka MSC spēj potencēt irinotekāna un tamoksifēna pretvēža efektu un aizsargā pārējās organisma šūnas no šī preparātu toksicitātes [82-84].

Selenocistīns – diselenīds, kas veidojas oksidējoties selenocisteīnam, nesien piesaistīja uzmanību ar savu augsto pretvēža aktivitāti un lielisku terapeitisku selektivitāti uz cilvēka vēža šūnām, neskarot normālās šūnas (1.5.att., d) [85]. Testos *in vitro* pierādīts, ka selenocistīns efektīvi iedarbojas uz cilvēka melanomas, dzemdes kakla un plaušu vēža šūnām [86]. Kombinētajā terapijā selenocistīns pastiprina 5-fluoruracila aktivitāti uz melanomas šūnām [87], arī individuāli selenocistīnam ir spēcīgs pretvēža efekts *in vivo*, ievērojami kavējot audzēja augšanu, bet neizraisot dzīvniekiem svaru zudumu [88], taču tā izmantošanu pretvēža

terapijā kavē sliktā šķīdība ūdenī. Tāpēc tālākie pētījumi tika pievērsti citu selenīdu un diselenīdu sintēzei un to antiproliferatīvās aktivitātes pārbaudēm.

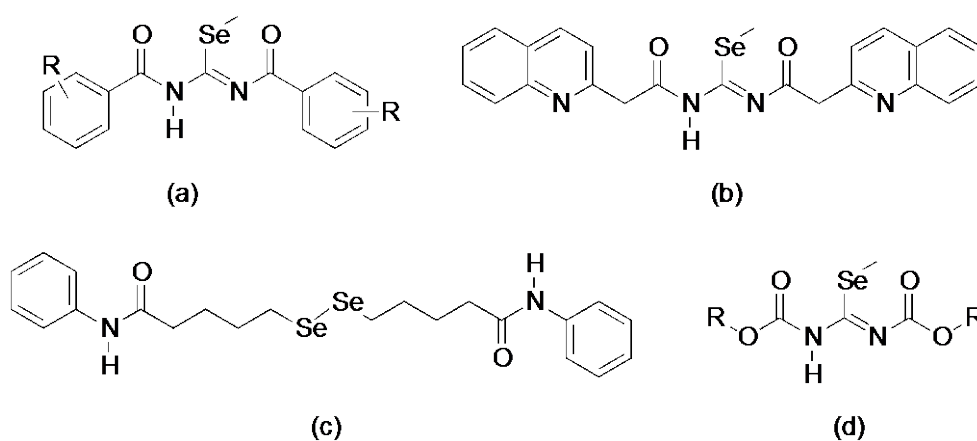
Atklāts, kā selēnu saturošiem hinazolīna un pirido[2,3-*d*]pirimidīna atvasinājumiem zemās mikromolārās koncentrācijās piemīt augsta citotoksicitāte attiecībā pret dažādām cilvēka vēža šūnu līnijām. E. Moreno līdzstrādnieku grupa ir atklājusi bis(4-aminofenil)diselenīda spēju kavēt limfoleikozes šūnu augšanu [89]. Tālāko meklējumu rezultātā tika sintezēti dažādi jauni difenildiselenīdu atvasinājumi un pētīta to ietekme uz vēža šūnu proliferāciju [90, 91].

Imidoselenokarbamāti un hinolīnimidoselenokarbamāti uzrādīja spēju iznīcināt cilvēku prostatas vēža šūnas mikromolārās koncentrācijās (1.6.att.) [92, 93], turklāt, imidoselenokarbamāti efektīvi iznīcina krūts vēža un limfoblastiskās leikēmijas šūnas. D.Desaja līdzstrādnieku grupa izstrādāja suberoilanolīda hidroksāmskābes (SAHA) selēna analoga sintēzes metodes un parādīja ka tie veiksmīgi inhibē dažādu plaušu vēža šūnu līniju proliferāciju salīdzinot ar SAHA [94, 95]. B.Romano pētnieku grupa ziņoja par jauniem metilselenokarbamātu klases savienojumiem, kuriem piemīt augsta citotoksiskā aktivitāte attiecībā pret vairākām cilvēka vēža šūnu līnijām ($IC_{50} < 10 \mu M$) [96]. Vairākus nesen sintezētus selēnocianātu atvasinājumus perspektīvā varēs izmantot kā pretvēža preparātus. 1,4-Fenilēnbis(metilēn)selēnocianāts (p-XSC) uzrāda augstu efektu pret prostatas un mutes dobuma karcinomas šūnām (1.7.att.) [97, 98]. Vēlāk sintezētie fenilalkilizoselēnocianāti – dabīgo fenilalkilizotiocianātu selēna izostēri, kas uzrādīja savu efektivitāti *in vitro* pret melanomas, prostatas, krūts, glioblastomas, sarkomas un resnās zarnas vēža šūnu līnijām, gan *in vivo*, inducējot būtisku audzēja izmēra sarukšanu, vienlaicīgi neizraisot dzīvnieku svara kritumu. Pēc struktūras-aktivitātes sakarību pētījumu rezultātiem tiek secināts, ka audzēja inhibējošā iedarbība palielinās pieaugot savienojumu lipofilitātei [99].

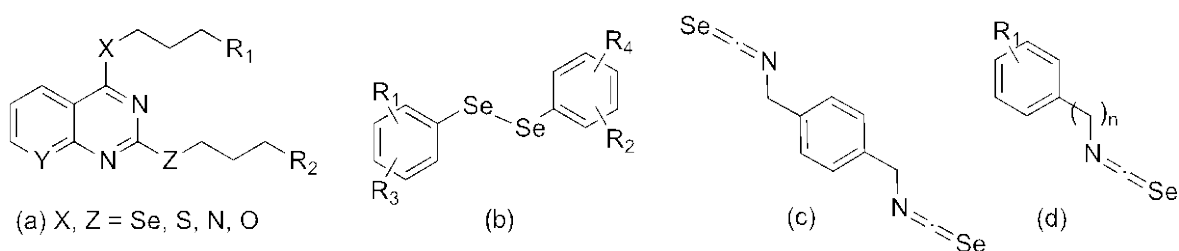
Selēnu saturošie heterocikli ir vēl viena savienojumu klase, kas pēdējos gados piesaista arvien lielāku uzmanību. Ebselēns (2-fenil-1,2-benzizoselenazol-3(2*H*)-ons) ir pirmais veiksmīgais piemērs (1.8.att.). Pirmoreiz tas tika iegūts 1924.g. [100] un to plaši pētīja kā pretiekaisuma līdzekli ar antioksidatīvām īpašībām. Nesen šim heterocikliskajam savienojumam ir pierādīta spēja kavēt cilvēka krūts, resnās zarnas un hepatomas vēža šūnu proliferāciju [101, 102, 103] un, jāpiebilst, ka selēna loma šajā gadījumā ir noteicošā, jo sēra analogs ir pilnīgi neaktīvs. No otras puses, Ebselēna vājā šķīdība ūdenī ir problēma optimālai terapeitiskai izmantošanai.

Lai palielinātu Ebselēna šķīdību, nezaudējot bioloģisko aktivitāti, tālākie pētījumi tika vērsti uz tā struktūras modificēšanu. Viens no veiksmīgiem savienojumiem ir Etaselēns (1,2-[bis(1,2-benzizoselenazol-3-(2*H*)-keto)]etāns), kas pazīstams arī kā BBSKE. Šo savienojumu sintezēja un detalizēti izpētīja prof. H.Zeng ar līdzstrādnieku grupu. Savienojums

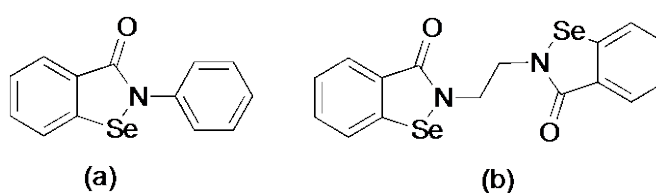
demonstrē ievērojamu pretvēža efektivitāti attiecībā uz dažādām cilvēka vēža formām un mērenu toksicitāti *in vitro* un *in vivo* pētījumos [34, 104-108]. Pavisam nesen, Etaselēns kombinācijā ar cisplatīnu tika testēts *in vivo*. Salīdzinot ar cisplatīna efektu, kombinētajā terapijas procesā novēroja savienojumu sinerģiju, samazinot audzēja izmēru un vienlaicīgi pasargājot organismu no cisplatīna toksicitātes [109], taču, neskatoties uz daudzsološiem rezultātiem, šķīdības palielināšanas problēma netika pilnībā atrisināta. M. Liu zinātnieku grupai izdevās iegūt ūdenī šķīstošu Etaselēna formu radot micellu kopolimēru, kā rezultātā novēroja pretaudzēja aktivitātes paaugstināšanos [110]. Diselenofēna atvasinājumam D-501036 (2,5-bis(5-hidroksimetil-2-selenofenil)-3-hidroksimetil-N-metilpirols) nesen tika atklātas pretvēža īpašības ar plašu aktivitātes spektru pret vairākām cilvēka vēža šūnām ($IC_{50} < 1 \mu M$ diapazonā) [35, 111, 112]. Jāatzīmē, kā D-501036 piemīt selektīva spēja kavēt vēža šūnu, īpaši multirezistentu šūnu augšanu, vienlaicīgi neskarot normālās šūnas (1.9.att.).



1.6.attēls. (a) imidoselenokarbamāti, (b) hinolīnimidoselenokarbamāts, (c) Se-SAHA, (d) selenokarbamoil atvasinājumi

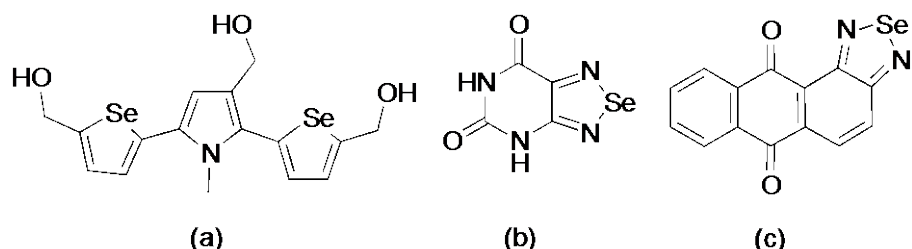


1.7.attēls. (a) Selēnhinazolīni u pirido[2,3-d]pirimidīni, (b) diarildiselenīdi, (c) p-XSC, (d) fenilalkilselēnizocianāti



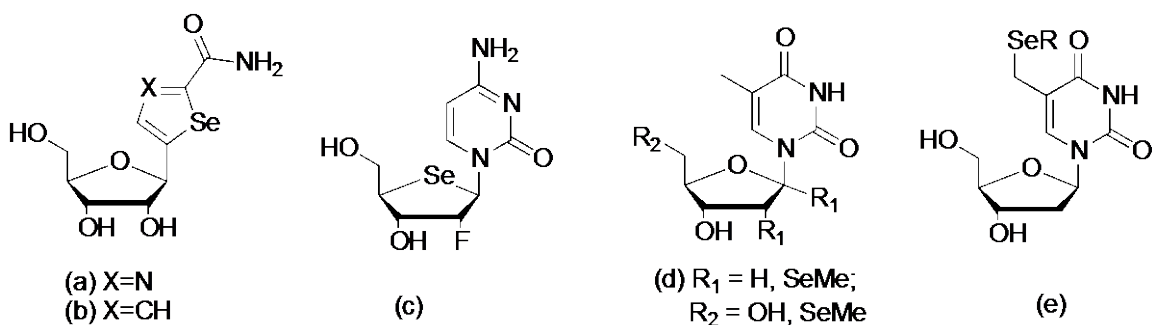
1.8.attēls. (a) Ebselēns, (b) Etaselēns

1,2,5-Selēnadiazoli ir interesanta savienojumu klase jaunu pretvēža preparātu meklējumos. Piemēram 1,2,5-selēnadiazolo[3,4-*d*]pirimidīna-5,7(4*H*,6*H*)dionam piemīt plašs antiproliferatīvas aktivitātes spektrs uz vairākām cilvēka vēža šūnu līnijām [113, 114]. Selenofēniltiazolidīnona atvasinājumiem raksturīga izteikta antiproliferatīva iedarbība pret resnās zarnas audzēja HT29 šūnu augšanu [115].



1.9.attēls. (a) D-501036, (b) un (c) 1,2,5-selēnadiazoli

Plaši pētījumi ir veikti attiecībā uz selēnu saturošo nukleozīdu sintēzi. Balstoties uz dabīgu savienojumu struktūru, 1983. g. tika sintezēts tiazofurīna analogs – selēnazofurīns (1.10.att.). Savienojums parādīja izteiktu pretvēža aktivitāti attiecībā uz peļu leukēmiju P388, Luisa plaušu un osteogēno sarkomu dzīvnieku modeļos [116], taču N-aizvietotiem atvasinājumiem tika konstatēts absolūts aktivitātes zudums testos *in vivo* [117], savukārt, apmainot selēnazola ciklu pret selenofēnu, ieguva vēl vienu perspektīvu pretvēža aģentu. Selenofēnfurīna citotoksiskās aktivitātes līmenis ir salīdzināms ar selēnazofurīna līmeni [118]. Pēdējos gados uz fluorcitozīna [119], timidīna [120] un uridīna bāzes [121] izstrādātas arī citu selēnu saturošo nukleozīdu iegūšanas metodes.



1.10.attēls. (a) Selēnazofurīns, (b) selenofēnofurīns, (c) selēnoarabinozofuranozīlcitozīns, (d) metilselēnotimidīna atvasinājumi, (e) selēnuridīna atvasinājumi

Promocijas darbā ir apkopoti vairāku gadu pētījumi, kuri tika veikti Latvijas Organiskās sintēzes institūtā ar dažādiem selēnu saturošiem savienojumiem. Pētījumu gaitā sintezētiem neorganiskajiem un organiskajiem selēna atvasinājumiem veikta struktūras-aktivitātes analīze ar mērķi noskaidrot struktūras-aktivitātes likumsakarības, tādējādi atlasot selēnu saturošus atvasinājumus ar augstu pretvēža efektu, vienlaikus mēģinot samazināt nevēlamus selēna toksiskos blakusefektus.

2. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

2.1. Neorganisko selēna atvasinājumu struktūras - aktivitātes analīze

Vairākos pētījumos [52, 122-124] ir parādīts, ka neorganiskais nātrijs selenīts spēj iznīcināt audzēja šūnas izmantojot dažādus darbības mehānismus. Viens no tiem ir saistīts ar oksidatīvo stresu, kā rezultātā audzēju šūnās selektīvi tiek bojāti mitohondriji, vienlaicīgi pasargājot normālos audus. Kā jau iepriekš minēts, galvenā problēma, kas saistīta ar neorganisko selēna savienojumu izmantošanu terapijā, ir šaurs devu diapazons starp ārstniecisko un toksisko selēna devu. Lai samazinātu selēna toksiskumu un saglabātu pozitīvo bioloģisko efektu, pētītas nātrijs selenīta kombinācijas ar dažādiem vitamīniem, piemēram, nātrijs selenītu kombinācijā ar E vai C vitamīnu klīnikā izmanto kataraktas un tīklenes makulas deģenerācijas profilaksei [125]. Kombinācija ar E vitamīnu samazina selēna toksisko efektu eksperimentos ar žurkām [126]. Selenīta kombinācija ar tokoferolu plaši izmanto veterinārijā kā dzīvnieku uztura bagātinātāju.

Balstoties uz zināšanām par selēna unikālo lomu cilvēka veselībā, Latvijas Organiskās sintēzes institūtā tika sintezēti dažādi neorganiska selēna atvasinājumi: amonija un metilamonija selenīti, aminoskābju, di- un tripeptīdu, kā arī betaīnu hidroselenīti, alifātisko amīnu un N-heterociklu hidroselenīti. Plašs savienojumu klāsts tika sintezēts, lai veiktu šo savienojumu struktūras-aktivitātes analīzi un noskaidrotu likumsakarības, kas ļautu atlasīt efektīvus selēna atvasinājumus ar augstu pretvēža efektu un vienlaikus pēc iespējas zemākām selēna toksisko blakusefektu izpausmēm.

Struktūras-aktivitātes pētījumi tika uzsākti ar šo savienojumu antiproliferatīvā efektā salīdzinājumu, nosakot savienojumu citotoksicitāti *in vitro* uz audzēju šūnu līnijām: cilvēku fibrosarkomas HT-1080, peļu hepatomas MG-22A, peļu melanomas B16 un peļu neiroblastomas Neuro2A. Papildus tika izmantotas vēl divas šūnu līnijas: peļu embrionālie fibroblasti NIH 3T3 un Sīrijas kāmjā nieres fibroblasti BHK21, kas nav izdalīti no audzējiem, bet ar vīrusu palīdzību transformēti kultūrā *in vitro*. Šīs šūnu līnijas nosacīti sauc par normālām šūnām un bioloģiskajos pētījumos izmanto kā normālo šūnu modeli. Tomēr par pilnīgi normālām tās nevar uzskatīt, jo tām ir dažas audzēju šūnu īpašības, piemēram, neierobežota šūnu proliferācija [127]. Šūnu dzīvotspēja tika noteikta ar MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds) palīdzību, kas parāda dzīvo šūnu mitohondriju fermentu aktivitāti.

Lai novērtētu un salīdzinātu savienojumu iespējamo toksisko efektu, izvēlēta metode, kas ir alternatīva LD₅₀ testam *in vivo*. Testā noteikta savienojumu bazālā toksicitāte uz peļu fibroblastu šūnu līnijas NIH 3T3 un aprēķināta savienojuma paredzamā akūtā toksicitāte (LD₅₀) [128]. Iegūtie dati ļauj novērtēt vairāku savienojumu toksisko efektu, neizmantojot lielu

dzīvnieku skaitu toksicitātes noteikšanai, un atlasīt perspektīvākos savienojumus turpmākajām pārbaudēm *in vivo*. Izmantojot šādu pieeju, dzīvnieku izmantošanu eksperimentos var samazināt vismaz par 50% [129]. Savienojumu pretvēža efekts *in vivo* tika noteikts izmantojot peļu audzēja modeli ar pārpotētu peļu sarkomu S-180.

2.1.1. Amonija un alkilamonija selenīti

Medicīnā plaši tiek izmantota vairāku ārstniecisku līdzekļu kombinētā terapija, piemēram, asinsspiediena normalizēšanai, osteoporozes, psoriāzes u.c. slimību, arī ļaundabīgu audzēju ārstēšanā. Līdzīgas tendences ir arī profilaktiskajā medicīnā, īpaši vēža profilaksē [130]. Pozitīvu mijiedarbību starp dažādiem aģentiem iespējams sagaidīt, ja tie iedarbojas uz vairākiem mērķiem, tādējādi papildinot iedarbības mehānismu, piemēram, modulēt dažādus posmus kancerogēneses procesā. Apvienojot dažādus aģentus, var panākt ārstnieciskā efekta potencēšanu un samazināt iespējamus nelabvēlīgos blakusefektus [131]. Literatūrā ir publicēti pētījumi par selēna spēju pasargāt organismu no cisplatīna toksiskā efekta terapijas laikā [132], savukārt, selēna konjugātam ar cisplatīnu $(\text{NH}_3)_4\text{PtCl}_2\text{SeO}_3$ ir pierādīts citotoksiskais efekts un specifiska telomerāzes inhibēšanas spēja endometrija audzēju šūnās [133].

Amonija un metilamonija selenītiem un telurītiem ir parādīts antiproliferatīvais efekts uz vairākām audzēju šūnu līnijām [134]. Eksperimentālajā darbā iegūtie rezultāti salīdzināti ar nātrija selenīta efektu. Rezultāti apkopoti 1. tabulā.

Nātrija selenīts (**1**) parādīja augstu citotoksicitāti uz cilvēka fibrosarkomas HT-1080 ($\text{IC}_{50}=2 \mu\text{M}$). Citotoksiskais efekts uz normālām šūnām NIH 3T3 ir 20 reizes zemāks ($\text{IC}_{50}=23 \mu\text{M}$). Viszemākais efekts nātrija selenītam novērots pret hepatomas MG-22A ($\text{IC}_{50}=64 \mu\text{M}$) šūnām. Amonija selenītam (**2**) ir selektīva iedarbība uz dažādām šūnu līnijām. Augstākais citotoksiskais efekts novērots uz fibrosarkomas HT-1080 ($\text{IC}_{50}=1 \mu\text{M}$) – līdzīgi kā nātrija selenītam. Pēc antiproliferatīva efekta samazināšanās audzēju šūnu līnijas var izvietot sekojošā secībā: HT-1080 > Neuro2A > MG-22A > B16. Citotoksiskais efekts uz normālām šūnām NIH 3T3 ir 2 reizes augstāks ($\text{IC}_{50}=13 \mu\text{M}$), salīdzinot ar nātrija selenītu. Arī uz BHK21 šūnu līnijas efekts ir praktiski līdzīgs. Metilamonija (**3**) un dimetilamonija (**4**) selenītu citotoksicitāte uz visām pārbaudītajām audzēju šūnu līnijām ir vēl augstāka, tomēr selektivitāte uz dažādām šūnu līnijām saglabājas, nedaudz mainās līniju secība. Metilamonija selenīta (**3**) un dimetilamonija selenīta (**4**) efekts samazinās sekojošā secībā: HT-1080 > Neuro2A > B16 > MG-22A. Citotoksiskais efekts savienojumiem **3** un **4** uz normālām šūnām NIH 3T3 ir attiecīgi 11 un 25 reizes augstāks ($\text{IC}_{50}=2$ un $0,9 \mu\text{M}$), salīdzinot ar nātrija selenītu. Bazālā toksicitāte savienojumiem **2**, **3** un **4** ir līdzīga, aprēķinātais LD_{50} attiecīgi ir 49, 57 un 43 mg/kg, un tie ir apmēram 2 reizes toksiskāki kā nātrija selenīts. Analizējot iegūtos rezultātus, var secināt, ka

ievadot metil grupu amonija selenīta molekulā, paaugstinās citotoksiskais efekts gan uz audzēju šūnām, gan arī uz normālām šūnām. Vienlaicīgi metilgrupa neietekmē bazālas toksicitātes līmeni.

1. tabula

Nr. Formula		IC ₅₀ , μM					Bazālā toksicitāte (LD ₅₀ mg/kg)	Audzēja augšanas inhibīcija <i>in vivo</i> , %
		HT-1080	MG-22A	B16	Neuro 2A	NIH 3T3		
1	Na ₂ SeO ₃	2	64	nt	nt	23	105	68
2	(NH ₄) ₂ SeO ₃	1	22	47	8	13	49	16
3	(MeNH ₃) ₂ SeO ₃	0.5	4	2	1	2	57	47
4	(Me ₂ NH ₂) ₂ SeO ₃	0.9	5	2	0.8	0.9	43	10
5	[(HOCH ₂ CH ₂)MeNH ₂]HSeO ₃	33	40	30	7	54	nt	-26
6	[(HOCH ₂ CH ₂) ₂ MeNH]HSeO ₃	17	34	32	21	48	nt	nt
7	[(HOCH ₂ CH ₂) ₃ NH]HSeO ₃	12	26	395	31	165	nt	81
8	(NH ₄) ₂ TeO ₃	8	10	11	2	175	413	8
9	(MeNH ₃) ₂ TeO ₃	15	26	13	14	763	887	17
10	(Me ₂ NH ₂) ₂ TeO ₃	18	24	36	14	2091	1540	7

nt – nav testēts; “ – “ – audzēja augšanas aktivācija.

Etanolamīnu atvasinājumu sērijā tika pārbaudīti trīs savienojumi: N-metil-N-etanolamonija hidroselenīts (**5**), N-metildietanolamonija hidroselenīts (**6**) un trietanolamonija hidroselenīts (**7**). Etanolamonija hidroselenīts (**5**) parādīja augstāku citotoksisko efektu uz neuroblastomas Neuro2A (IC₅₀=7 μM), uz pārējām audzēju līnijām IC₅₀ ir no 30 līdz 39 μM, savukārt, di- un trietanolamonija hidroselenīti (**6**, **7**) efektīvi inhibē fibrosarkomas HT-1080 augšanu (IC₅₀=17 un 12 μM). Uz pārējām audzēju šūnu līnijām efekts ir apmēram vienāds (IC₅₀=30÷39 μM). Savienojuma **7** citotoksiskais efekts, izņemot ietekmi uz melanomu B16, salīdzinot ar etanolamonija hidroselenītu (**5**), ir 13 reizes zemāks (IC₅₀=395 μM). Šūnu proliferācijas supresija šiem trim savienojumiem (**5**, **6**, **7**) uz normālās šūnu līnijas NIH 3T3 ir zemāka nekā nātrija selenītam, bet viszemākais efekts ir trietanolamonija hidroselenītam (**7**) (IC₅₀=165 μM). Salīdzinot amonija un metilamonija selenītus ar etanolamonija hidroselenītiem var secināt, ka citotoksiskais efekts uz visām šūnu līnijām samazinās.

Selēns un telūrs ir VI grupas elementi, taču dzīvajos organismos telūrs nav sastopams kā mikroelements. Aizvietojoš savienojuma molekulā selēnu ar telūru, savienojumu antiproliferatīvais efekts un toksicitāte samazinās. Amonija telurītam (**8**) saglabājas selektīva iedarbība, un šajā gadījumā visjutīgākā pret to ir peļu neuroblastoma Neuro2A. Visi trīs telūra izostēri (**8-10**) parāda viszemāko efektu uz embrionāliem peļu fibroblastiem NIH 3T3.

Antiproliferatīvais efekts metilamonija (**9**) un dimetilamonija (**10**) telurītam ir zemāks nekā attiecīgajiem selenītiem. Jāpiebilst, kā arī bazālā toksicitāte ir 4-15 reizes zemāka nekā nātrija selenītam. Šie dati parāda, ka selēna un telūra loma šūnu metabolismā ir atšķirīga.

No visiem pārbaudītiem amonija un metilamonija selenītiem un telurītiem tikai metilamonija selenīts (**3**) eksperimentos *in vivo* parādīja mērenu audzēja augšanas kavēšanas spēju (47%), toties trietanolamonija hidroselenīts (**7**) būtiski kavē audzēja augšanu - par 81%.

2.1.2. Aminokābju, dipeptīdu un tripeptīdu hidroselenīti

Minerālvielas, tostarp selēns, var veidot helātus ar aminokābēm, kas nodrošina to transportēšanu caur zarnu sienām. Pierādīts, ka N-acetilcisteīnu kombinācijā ar nātrija selenītu var izmantot, kā potenciālu pretvēža aģentu, jo selēna toksiskais efekts samazinās [135]. Ņemot vērā šos procesus, lai paaugstinātu neorganiskā selēna biopieejamību, izveidoti vairāki selēna kompleksi ar aminokābēm.

Aminokābes, di- un tripeptīdi viegli reaģē ar *in situ* pagatavotu selēnpaskābi (H_2SeO_3), šķīdinot selēna (IV) oksīdu ūdenī. Rezultātā veidojas attiecīgie hidroselenīti [136]. Dažādiem aminokābju, di- un tripeptīdu hidroselenītiem tika konstatēts antiproliferatīvais efekts. Rezultāti ir apkopoti 2. tabulā. Analizējot iegūtās struktūras-aktivitātes attiecības ir redzama citotoksiskā efekta atkarība no aminokābes dabas. Glicīna hidroselenītam (**11**) ir augsts citotoksiskais efekts uz fibrosarkomas HT-1080 ($IC_{50}=10 \mu M$). Uz audzēju šūnām MG-22A, Neuro2A un normālām šūnām NIH 3T3 un BHK21 efekts ir salīdzinoši vienmērīgs (IC_{50} attiecīgi ir 15; 20; 25 un 22 μM) un 2 reizes zemāks nekā uz HT-1080. Salīdzinoši augstais efekts uz fibrosarkomas HT-1080, iespējams, ir saistīts ar to, ka glicīns ietilpst kolagēna sastāvā, turklāt, glicīna daudzums var sasniegt 35% [137]. Interesanti, ka viszemākā jutība pret glicīna hidroselenītu (**11**) ir melanomas B16 šūnām ($IC_{50}=101 \mu M$). Literatūrā ir minēts, ka pievienojot peļu uzturam glicīnu, tiek inhibēta hepatocītu proliferācija kancerogēna WY-14.643 ietekmē un inhibēta melanomas B16 audzēja augšana par 50-75% *in vivo*, tomēr glicīns neietekmē melanomas B16 proliferāciju *in vitro*. Autori izvirzīja hipotēzi, ka glicīns neiedarbojas tieši uz audzēju šūnām, bet kavē audzēja augšanu *in vivo* inhibējot angiogēni [138]. Atšķirībā no glicīna, glicīna hidroselenīts (**11**) *in vitro* inhibē melanomas B16 proliferāciju.

β -Alanīna hidroselenīts (**12**) uzrādīja augstu antiproliferatīvo efektu uz visām audzēju šūnu līnijām. Uz hepatomas MG-22A citotoksiskais efekts ir visaugstākais ($IC_{50}=2 \mu M$), bet uz pārējām šūnu līnijām IC_{50} ir līdzīgs un svārstās robežās no 9 līdz 17 μM . Uz normālām šūnu līnijām NIH 3T3 un BHK21 β -alanīna hidroselenīta (**12**) citotoksiskais efekts ir tikpat augsts, kā uz audzēju šūnām. β -Alanīns kā β -aminokābe, olbaltumvielu sastāvā neietilpst, tas ir

aminoskābju vielmaiņas produkts. β -Alanīna struktūra atrasta vairāku svarīgu bioloģiski aktīvu vielu sastāvā (karnozīns, anserīns, koferments A, pantotēnskābe). Organismā β -alanīns tiek sintezēts aknās. Parādīts, ka pievienojot diētai β -alanīnu, žurku aknās paaugstinās oglekļa tetrahlorīda izraisītais hepatotoksiskais efekts [139], bet peļu aknās β -alanīns darbojas pretēji - samazina oglekļa tetrahlorīda izraisīto hepatotoksicitāti [140]. Novērotais β -alanīna hidroselenīta izcilais citotoksiskais efekts tieši uz hepatomas šūnām, iespējams, saistīts ar to, ka β -alanīna metabolisms ir cieši saistīts tieši ar aknu audiem un hidroselenīts var traucēt metabolismu, izraisot hepatotoksisko efektu.

Serīna hidroselenīts (**13**) *in vitro* parādīja augstu citotoksisko efektu uz hepatomas MG-22A un neuroblastomas Neuro2A šūnām, IC_{50} uz abām šūnu līnijām ir 13 μ M. Tomēr augstu citotoksisko efektu novērojām arī uz normālas šūnu līnijas NIH 3T3 ($IC_{50}=11$ μ M). Efekts uz fibrosarkomas HT-1080 ir 4 reizes zemāks. Mazāk jutīgas pret serīna hidroselenītu ir melanomas B16 un nieru fibroblastu BHK21 šūnas (IC_{50} uz abām šūnu līnijām ir 135 μ M). Eksperimentos *in vivo* serīna hidroselenīts uzrādīja labu pretvēža efektu, audzēju augšanas inhibīcija sasniedza 51%. Serīns spēlē svarīgu lomu purīnu un pirimidīnu biosintēzē šūnā. Serīns ir glicīna un cisteīna biosintēzes prekursors. Tam ir svarīga loma arī vairāku fermentu katalītiskajā funkcijā. Augsts serīna hidroselenīta antiproliferatīvais efekts var tikt saistīts ar to spēju iesaistīties un bloķēt vairākus šūnas dzīvotspējai svarīgus procesus.

Nākamos trīs hidroselenītus apvieno augsts audzēja augšanu stimulējošs efekts *in vivo*. Treonīna (**14**), glutamskābes (**15**) un tirozīna (**16**) hidroselenīti stimulē audzēju augšanu *in vivo* attiecīgi par 192, 144 un 98 %. Tirozīna hidroselenītam *in vitro* nav efekta uz melanomas B16. Iespējams, tas ir saistīts ar tirozīna iesaistīšanos melanīna sintēzē [141]. Zināms, ka B16 melanomas šūnas ir tirozīn-atkarīgas un tirozīna koncentrācijas samazināšana inhibē melanomas šūnu proliferāciju [142].

Prolīna hidroselenīts (**17**) uzrādīja augstu antiproliferatīvo efektu gan uz audzēju, gan uz normālām šūnu līnijām. Augstākais citotoksiskais efekts ir uz hepatomas MG-22A, fibrosarkomas HT-1080 un fibroblastiem NIH 3T3, IC_{50} ir attiecīgi 5, 7 un 6 μ M, tomēr atšķirība no pārējām šūnu līnijām nav liela: uz B16 un Neuro2A audzēju šūnu līnijām iegūtais $IC_{50}=12$ μ M. Organismā daudz prolīna satur saistaudu olbaltumviela – kolagēns. Fibrosarkoma un fibroblasti producē kolagēnu un prolīna metabolisms šajās šūnās ir augstāks nekā citās. Kolagēns ir nepieciešams šūnu adhēzijas un invāzijas nodrošināšanai. Pierādīts, ka selenīts inhibē HT-1080 fibrosarkomas šūnu invāziju, samazinot šūnu adhēziju ar kolagēnu [143]. Prolīna hidroselenīta citotoksicitāte ir augstāka tieši uz fibrosarkomas HT-1080 un fibroblastiem NIH 3T3, toties uz citu šūnu tipiēm efekts ir tikai nedaudz zemāks. Šo efektu var

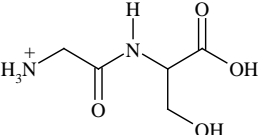
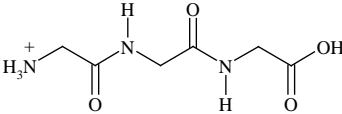
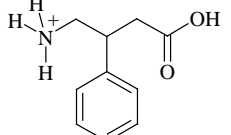
izskaidrot ar to, ka kolagēna loma adhēzijas procesā ir universāla visām šūnām. Iespējams, prolīna hidroselenīts ietekmē šos procesus šūnā, tāpēc efekts ir aptuveni līdzīgs visos audos.

2. tabula

Aminoskābju, dipeptīdu un tripeptīdu hidroselenītu antiproliferatīvais efekts *in vitro* un pretvēža efekts *in vivo*

Nr.	Aminoskābe ⁺ HSeO ₃ ⁻	IC ₅₀ , μM						Audzēja augšanas inhibīcija <i>in vivo</i> , %
		HT-1080	MG-22A	B16	Neuro 2A	NIH 3T3	BHK 21	
11		10	15	101	20	25	22	-16
12		17	2	12	9	5	14	-4
13		43	13	135	13	11	135	51
14		53	148	264	138	122	148	-192
15		83	91	362	322	181	91	-144
16		110	129	*	232	105	65	-98
17		7	5	12	12	6	10	1
18		19	16	209	*	21	12	-18
19		77	42	*	*	180	153	33
20		47	52	315	315	164	151	-103

* - pārbaudītajās devās efekta nav; nt- nav testēts; “ – “ – audzēja augšanas aktivācija.

Nr.	Aminoskābe ⁺ HSeO ₃ ⁻	IC ₅₀ , μM					Audzēja augšanas inhibīcija <i>in vivo</i> , %	
		HT-1080	MG-22A	B16	Neuro 2A	NIH 3T3		BHK 21
21		51	*	*	*	69	36	toksisks
22		31	11	314	167	66	16	-46
23		16	39	nt	nt	nt	nt	51

Vēl viena aminoskābe, kura izmantota kā bāze hidroselenītu sintēzei, ir histidīns. Histidīna hidroselenīts (**18**) *in vitro* parāda augstu citotoksisko efektu uz fibrosarkomas HT-1080, hepatomas MG-22A, kā arī uz normālām šūnu līnijām NIH 3T3 un BHK21 (IC₅₀ attiecīgi ir 19, 16, 21 un 12 μM). Efekts uz melanomas ir apmēram 10 reizes zemāks (IC₅₀=209 μM), bet uz neuroblastomas efekts pazūd. Histidīns ir vairāku fermentu sastāvā, kā arī prekursors histamīna sintēzei. Histamīns veidojas no histidīna ar histidīn-dekarboksilāzes palīdzību. Histamīns ir svarīgs neurotransmiters un kā mediators piedalās neironu šūnu proliferācijā gan normālos, gan audzēju audos. Ir zināma histidīna ietekme uz aminoskābju akumulāciju neuroblastomas un astroцитomas šūnās [144]. Paaugstināts histidīn-dekarboksilāzes līmenis konstatēts melanomas šūnās [145]. Histidīna hidroselenīta (**18**) nespēju ietekmēt neuroblastomas šūnu proliferāciju var saistīt ar plašu histidīna lomu neironālo audu metabolismā un proliferācijā, bet zems citotoksiskais efekts uz melanomas var būt saistīts ar histidīna dekarboksilāzes paaugstinātu aktivitāti melanomas šūnās. Histidīns piedalās smago metālu detoksifikācijā un izvadīšanā no organisma caur aknām un nierēm. Tas nozīmē, ka šajās šūnās histidīna hidroselenīts (**18**) var tikt iesaistīts citos metabolisma ceļos nekā neironālajās šūnās. Iespējams tas ir iemesls augstam citotoksiskajam efektam uz nieru fibroblastu BHK21 un hepatomas MG-22A šūnām.

Pārbaudītajam glicīna hidroselenīta tripeptīdam (**22**) antiproliferatīvais efekts uz melanomas B16 samazinās 3 reizes (IC₅₀=314 μM) salīdzinot ar glicīna hidroselenītu (**11**), bet ar glicīna hidroselenīta dipeptīdu (**19**) efekts zūd. Glicīns ir svarīgs CNS neurotransmisijas inhibītors. Literatūrā nav datu par glicīna citotoksisko efektu fizioloģiskās devās uz nervu šūnām, bet glicīna hidroselenīta (**11**) IC₅₀ uz neuroblastomas Neuro2A šūnām ir 20 μM.

Salīdzinot savienojuma di- un tripeptīda citotoksisko efektu, novērots, ka tripeptīda (**22**) gadījumā tas samazinās ($IC_{50}=167 \mu M$), bet dipeptīdam (**19**) efekta nav. Arī uz pārējām šūnu līnijām dipeptīdam (**19**) ir zems efekts. Gly-Leu hidroselenīta (**20**) citotoksiskais efekts, līdzīgi kā savienojumam **22**, arī ir zems un viszemāka aktivitāte ir uz melanomas B16 un neuroblastomas Neuro2A (IC_{50} uz abām līnijām ir $315 \mu M$). Gly-Ser hidroselenīta (**21**) efekts ir līdzīgs kā savienojumam **19**, arī šajā gadījumā citotoksiskais efekts nav novērojams uz melanomas B16, neuroblastomas Neuro2A, kā arī uz hepatomas MG-22A šūnām. Uz pārējām līnijām citotoksiskais efekts ir līdzīgs kā tripeptīdam **22**. Pārbaudot šo glicīna atvasinājumu efektu *in vivo*, noskaidrots, ka vienīgi glicīna dipeptīds (**19**) nedaudz kavē audzēja augšanu - inhibīcija sasniedz 33%. Glicīna hidroselenīts (**11**) neietekmē audzēja augšanu, glicīna hidroselenīta tripeptīds (**22**) un Gly-Leu hidroselenīts (**20**) stimulē audzēja augšanu attiecīgi par 46 un 103%, bet Gly-Ser hidroselenīts (**21**) parāda ļoti augstu toksisko efektu *in vivo*, kā rezultātā visi dzīvnieki gāja bojā.

Savienojums **23** ir β -fenil- γ -aminobutānskābes (fenibuts) hidroselenīts. Fenibuts ir neurotransmitera γ -aminobutīrskābes (GABA) inhibitors. Tas tiek izmantots kā psihotropas zāles depresijas ārstēšanai. Savienojuma **23** citotoksiskais efekts uz fibrosarkomas HT-1080 ir $16 \mu M$, bet uz hepatomas - $39 \mu M$. Tika noteikta arī bazālā toksicitāte un aprēķinātais LD_{50} sastāda 277 mg/kg , kas ir divas reizes zemāks nekā nātrija selenītam. Fenibuta hidroselenīts uzrāda aktivitāti arī *in vivo*, tas inhibē audzēja augšanu par 51%.

Visiem pārbaudītiem aminoskābju hidroselenītiem citotoksiskais efekts uz normālām šūnu līnijām ir salīdzināms ar efektu uz audzēju šūnu līnijām. Vairāki savienojumi uzrāda zemāku citotoksisko efektu vai efekta neesamību uz melanomas un neuroblastomas šūnām.

2.1.3. Betaīnu hidroselenīti

Betaīni ir trialkilaizvietoto aminoskābju iekšējie sāļi. Betaīna molekula satur pozitīvi lādētu ceturtējo slāpekļa atomu un negatīvi lādētu karboksilgrupu, veidojot bipolāro jonu. Tie ir plaši sastopami gan augu valsts pasaulē, gan bezmugurkaulniekos un augstāko dzīvnieku organismos. Vienkāršākais betaīnu pārstāvis ir trimetilglicīns, kas pašlaik zināms ar nosaukumu betaīns. Pirmo reizi tas tika izdalīts no biešu sulas. Betaīns aktivizē šūnu membrānu fosfolipīdu biosintēzi. Trimetilglicīns cilvēka un dzīvnieku organismā ir metilgrupu donors. Tādējādi betaīns, darbojoties kompleksā ar B6 un B12 vitamīniem, neitralizē toksisko aminoskābi homocisteīnu. Ar metilgrupu pārnesi saista betaīnu pretvēža efektus. Ir pētīta betaīna (uzņemot ar uzturu) spēja samazināt plaušu vēža attīstības risku, kas saistīts ar smēķēšanu [146]. Betaīnu tradicionāli izmanto arī kā hepatoprotektoru [147]. 2010. gadā zilā tunča asinīs tika atrasts jauns unikāls selēnu saturošs savienojums. Tas ir dabīgais heterocikls -

2-selenil-N α ,N α ,N α -trimetil-L-histidīns, ergotioneīna selēna analogs, kuram konstatētas augsta līmeņa antioksidatīvās īpašības [70].

Pētījuma turpinājumā pārbaudīts antiproliferatīvais efekts betaīnu hidroselenītu sērijai. Rezultāti par savienojumu citotoksisko efektu ir apkopoti 3. tabulā. Gandrīz visi betaīna hidroselenīti uzrādīja augstāku vai nātrija selenītam līdzīgu citotoksisko efektu uz audzēju šūnu līnijām, izņemot savienojumu **31**. Trimetilglicīna hidroselenīts (**24**) parādīja augstu antiproliferatīvo efektu uz fibrosarkomas HT-1080 un hepatomas MG-22A ($IC_{50}=4 \mu M$). Uz hepatomas tā efekts ir 15 reizes augstāks nekā nātrija selenītam. Arī bazālā toksicitāte ir nedaudz augstāka kā nātrija selenītam ($LD_{50}=74 \text{ mg/kg}$). Aizstājot trimetilamīna fragmentu ar pirazolīnija heterociklu (**25**), citotoksiskais efekts praktiski neizmainās, bet bazāla toksicitāte nedaudz samazinās - līdz 128 mg/kg .

Pagarinot alifātisko daļu, savienojumam (3-karboksietil)trimetilamonija hidroselenītam (**26**) citotoksiskais efekts uz HT-1080 paaugstinās 4 reizes un nedaudz samazinās efekts uz hepatomas MG-22A ($IC_{50}=7 \mu M$), salīdzinājumā ar (3-carboksietil)-trimetil-amonija hidroselenītu (**24**). Bazālā toksicitāte samazinās līdz 138 mg/kg . Vēl pagarinot alifātisko ķēdi līdz propilgrupai, savienojuma (3-carboksipropil)-trimetil-ammonija hidroselenītam jeb γ -butirobetaīna hidroselenītam (**27**) citotoksiskais efekts mainās tikai uz fibrosarkomas HT-1080 - tas paaugstinās 37 reizes ($IC_{50}=0,11 \mu M$), salīdzinot ar trimetilglicīna hidroselenītu (**24**). Tātad alifātiskās ķēdes garums ievērojami ietekmē antiproliferatīvo efektu uz fibrosarkomas HT-1080 šūnām.

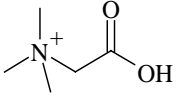
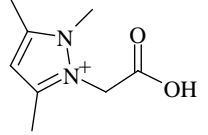
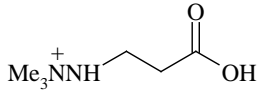
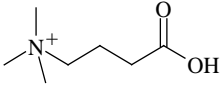
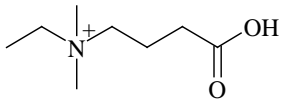
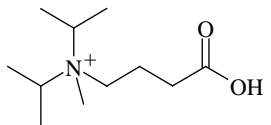
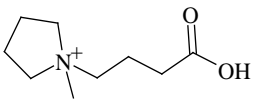
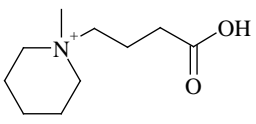
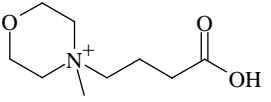
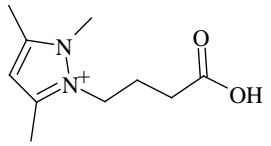
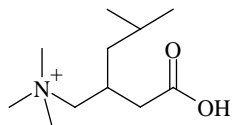
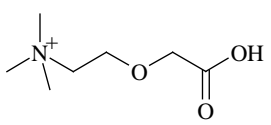
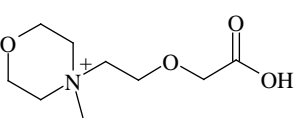
Citotoksisko efektu ietekmē ne tikai alifātiskās ķēdes garums, bet arī pie amīna pievienotās grupas. Savienojumiem ar karboksietilgrupu, nomainot vienu metilgrupu pie amīna uz etilgrupu, (**28**) iegūtais citotoksiskais efekts uz HT-1080 un MG-22A izlīdzinās ($IC_{50} = 4 \mu M$) un bazālā toksicitāte ir 82 mg/kg , savienojuma efekts kļūst līdzīgs trimetilglicīna hidroselenīta (**24**) efektam. Savienojumiem ar karboksipropilgrupu aizvietojot divas metilgrupas pie amīna ar izopropilgrupām (**29**), citotoksiskais efekts samazinās līdz $9 \mu M$ HT-1080 gadījumā un līdz $12 \mu M$ uz MG-22A, bet aprēķinātais LD_{50} praktiski nemainās, salīdzinot ar **27** savienojumu. Aizvietojot amīna grupu ar pieclocekļa heterociklu - pirolidīnu (**30**), citotoksiskais efekts uz abām šūnu līnijām ir vienāds, $IC_{50}=4 \mu M$ un $LD_{50}=90 \text{ mg/kg}$. Metilpiperidilaizvietotam betaīna hidroselenītam (**31**) novērota citotoksiskā efekta samazināšanos uz abām līnijām, uz HT-1080 $IC_{50}=23 \mu M$, bet uz hepatomas MG-22A - $123 \mu M$. Bazālā toksicitāte arī samazinās 10 reizes, $LD_{50}=931 \text{ mg/kg}$, tomēr selektivitāte uz dažādām šūnu līnijām saglabājās, efekts uz fibrosarkomas šūnām ir 5 reizes augstāks kā uz hepatomas šūnām. Pirazolīnija atvasinājumam (**33**) citotoksiskais efekts uz fibrosarkomas HT-

1080 paaugstinās 10 reizes ($IC_{50}=0,9 \mu M$), bet efekts uz hepatomas un bazālā toksicitāte, salīdzinot ar **29** savienojumu, nemainās. Savienojumiem ar karboksipropil grupu, aizvietojot amīna grupu ar morfolīnu (**32**), atkal novērota citotoksiskā efekta atšķirība starp šūnu līnijām. Antiproliferatīvais efekts uz fibrosarkomas ir 3 reizes augstāks, bet bazālā toksicitāte gandrīz nemainās un ir 95 mg/kg. Skābekļa atoma ieviešana alifātiskajā ķēdē (**36**), noved pie citotoksiskā efekta selektivitātes uzlabošanās. Fibrosarkomas HT-1080 šūnu supresija palielinās 6,6 reizes ($IC_{50}=0,9 \mu M$), bet bazālā toksicitāte samazinās, LD_{50} ir 179 mg/kg. 1-(2-Karboksimetoksietil)-1-metilmorfolīna hidroselenītam **36** ir viszemākais toksiskais efekts starp betaīna atvasinājumiem ar augstu citotoksisko efektu. Savienojumam **35** ar aminogrupu un ar metoksilgrupu alifātiskajā ķēdē IC_{50} uz abām līnijām atkal ir vienāds ($IC_{50}=4 \mu M$), bet bazālā toksicitāte – 119 mg/kg.

Par savienojumā **34** betaīna bāzi izmantots plaši pazīstams komerciāls preparāts - pregabalīns (tirdzniecības nosaukums *Lyrice*). Pregabalīns ir pretkrampju zāles, ko lieto neiropātisku sāpju, dažu hronisku sāpju cēloņu ārstēšanai, piemēram, fibromialģijas gadījumā [148]. Pēc 3. tabulas datiem, pregabalīna hidroselenītam (**34**) piemīt antiproliferatīvs efekts uz audzēju šūnām. Citotoksiskais efekts uz fibrosarkomas HT-1080 ir augstāks nekā uz hepatomas MG-22A (IC_{50} attiecīgi ir $3 \mu M$ un $30 \mu M$). Bazālā toksicitāte ir 99 mg/kg.

Analizējot iegūtos rezultātus, pārbaudītos betaīna hidroselenītus var sadalīt divās grupās. Pirmajā grupā ir savienojumi ar līdzīgu citotoksisku efektu uz abām audzēju šūnu līnijām: **24**, **28**, **30**, **35**. Otrajā grupā ir savienojumi, kuriem citotoksiskais efekts uz fibrosarkomas HT-1080 ir augstāks nekā uz hepatomas MG-22A: **29** (atšķirība ir 1,3 reizes), **25** (2 reizes), **32** (3 reizes), **31** (5 reizes), **36** (6,7 reizes), **26** (7 reizes), **33** un **34** (10 reizes), **27** (32 reizes). γ -Butiropbetaīna hidroselenīts (**27**) uzrāda vislielāko citotoksiskā efekta selektivitāti starp HT-1080 un MG-22A šūnām – atšķirība ir 32 reizes (attiecīgi IC_{50} ir $0,11 \mu M$ un $4 \mu M$). Viens no šī efekta izskaidrojumiem var tikt saistīts ar atšķirīgu γ -butiropbetaīna dioksigenāzes ekspresijas līmeni aknās un saistaudos. γ -Butiropbetaīna dioksigenāze ir ferments, kurš katalizē L-karnitīna veidošanos no γ -butiropbetaīna un aknās šī fermenta līmenis ir visaugstākais [149, 150], tātad aknu šūnās attiecīgais hidroselenīts var tikt metabolizēts un citotoksiskais efekts samazinās. γ -Butiropbetaīna dioksigenāzei nav viena strikti specifiska substrāta, ferments var izmantot arī dažus modificētus substrātus [151, 152]. Piemēram, mildronātu iespējams oksidēt [153], veidojot virkni produktu, tai skaitā malonskābes semialdehīdu, dimetilamīnu, formaldehīdu un (1-metilimidazolidin-4-il)etiķskābi. Meldonija hidroselenītam (**26**) atšķirība starp citotoksisko efektu sasniedz 7 reizes. Iespējams, arī pārējie savienojumi var būt šī fermenta substrāti.

Betaīnu hidroselenītu antiproliferatīvais efekts *in vitro* un pretvēža efekts *in vivo*

Nr.	(Amīns)H ⁺ HSeO ₃ ⁻	IC ₅₀ , μM		Bazālā toksicitāte (LD ₅₀ mg/kg)	Audzēja augšanas inhibīcija <i>in vivo</i> , %
		HT-1080	MG-22A		
24		4	4	74	nt
25		3	7	128	nt
26		1	7	138	100
27		0.11	4	82	100
28		4	4	82	87
29		9	12	99	88
30		3	3	90	83
31		23	123	931	100
32		3	10	95	100
33		0.9	9	111	nt
34		3	30	99	nt
35		4	4	119	100
36		0.9	6	179	nt

nt – nav testēts

Savienojumiem **26-32** un **35** tika pārbaudīts pretvēža efekts *in vivo*. Visi savienojumi inhibē audzēja augšanu par 80–100%. Detalizēta *in vivo* pretvēža efekta un savienojumu blakusefektu analīze dota nodaļā 2.1.6.

2.1.4. Heterocikliskie amonija hidroselenīti

Jauni hidroselenīti ar heterociklisku organisko bāzi iegūti, selēna dioksīdam reaģējot ar heterocikliskajiem amīniem, un tiem tika konstatēts antiproliferatīvais efekts [154, 155]. Rezultāti par heterociklisko amonija hidroselenītu bioloģiskajām īpašībām apkopoti 4. tabulā. Savienojumu antiproliferatīvais efekts mainās atkarībā no izmantotās heterocikla bāzes.

Imidazols ir pieclocēkļu aromātiskais heterocikls, kas ietilpst aminoskābes histidīna molekulā. Kopā ar pirimidīnu tas veido purīnu - dabā visplašāk sastopamo slāpekļa atomu saturošo heterociklu. Imidazola gredzenu satur vairāki ārstnieciskie līdzekļi, piemēram, pretsēnīšu preparāti, antibiotiķi (nitroimidazols), sedatīvie preparāti (midozolams) [156, 157] un CNS stimulatori (kofeīns, teobromīns) [158]. Pēdējo gadu pētījumos dažādiem imidazolu saturošiem atvasinājumiem ir pierādīts antiproliferatīvais efekts [159].

Imidazolīnija hidroselenīts (**37**) uzrādīja vienādi augstu antiproliferatīvo efektu ($IC_{50}=3\div 5 \mu M$) uz visām pārbaudītajām audzēju šūnām. Uz normālām NIH 3T3 šūnām citotoksiskais efekts ir 11 reizes zemāks ($IC_{50}=45 \mu M$). Savienojumam ir selektīva ietekme uz audzēju šūnām.

Piridīnija selenītam (**38**), salīdzinot ar imidazola atvasinājumu (**37**), novērota citotoksiskā efekta samazināšanās uz audzēju šūnu līnijām no 4 līdz 10 reizēm. Piridīna gredzens ir B3 vitamīna jeb nikotīnskābes, kā arī vairāku medikamentu sastāvā [160]. Ievadot aldoksīma grupu piridīnā, tās hidroselenīts (**39**) neuzrāda citotoksicitāti pret HT-1080 un MG-22A šūnu līnijām, bet IC_{50} uz NIH 3T3 šūnu līnijas ir $147 \mu M$. Aizstājot aldoksīma grupu ar amidoksīmu (**40**), savienojumam parādās augsts citotoksiskais efekts uz fibrosarkomas HT-1080, hepatomas MG-22A un neuroblastomas Neuro2A šūnām (attiecīgi 14 , 17 un $11 \mu M$) un tas ir nedaudz augstāks nekā piridīnija selenītam (**38**). Jāuzsver, ka uz melanomas B16 citotoksiskais efekts ir apmēram 6 reizes augstāks ($IC_{50}=2 \mu M$) nekā uz citām līnijām. Literatūrā ir parādīts, ka nikotīns akumulējās audos, kas satur melanīnu, modulējot melanīna sintēzi, antioksidatīvo fermentu darbību un samazina cilvēku normālo melanocītu dzīvotspēju [161], bet nikotīnskābes hidroksamāts inhibē melanīna sintēzi peļu melanomas B16-F10 šūnās [162]. Iespējams, tāpēc piridīnija selenītiem ir selektīva ietekme uz melanīnu saturošiem audiem.

Tālāk hidroselenītu veidošanai tika izmantoti 2,2`- un 4,4`-bipiridīni. Abi reģioizomēri viegli veido helāta kompleksus ar lielāko daļu pārejas metālu joniem, tai skaita ar dzelzi, bet 4,4`-bipiridīns ir prekursors zināmajam herbicīdam - *Parakuat* (N,N'-dimetil-4,4'-bipiridīns). Literatūrā ir parādīts, ka 4,4`-bipiridīns var traucēt elektronu pānesi bioloģiskajās sistēmās [163]. Abiem 2,2`-bipiridīnija (**41**) un 4,4`-bipiridīnija (**42**) hidroselenītiem novērots augsts (līdzīgi savienojumam **40**) citotoksiskais efekts uz fibrosarkomas HT-1080 un hepatomas MG-22A, IC_{50} ir robežās no 11 līdz 18 μM . Abiem savienojumiem citotoksicitāte ir augstāka uz neuroblastomas Neuro2A (IC_{50} ir 9 un 3 μM) un melanomas B16 ($IC_{50}=2$ μM). Literatūrā parādīts, ka 2,2`-bipiridīns *in vivo* eksperimentos pelēm uzrāda neirotoksisko efektu devā 300 mg/kg, bet 4,4`-bipiridīns šāda devā ir letāls. Pēc literatūras datiem, herbicīds *Parakuat* traucē dopamīnerģisko neironu darbību [164]. No iegūtajiem eksperimentālajiem datiem var secināt, ka 4,4`-bipiridīnija hidroselenītam (**42**) ir augstāks citotoksiskais efekts uz neuroblastomas šūnām nekā reģioizomēram (**41**). Augsts bipiridīnija hidroselenītu efekts tieši uz melanomas šūnām var tikt izskaidrots ar to spēju saistīt metālu jonus. Parādīts, ka melanīns reakcijā ar Fe^{2+} (Fentona reakcija), paaugstina ūdeņraža peroksīda veidošanos, turklāt stipra helātora klātbūtnē (piem., EDTA) efekts pieaug [165]. Līdzīga ietekme ir konstatēta melanīnu saturošos dopamīnerģiskajos neironos smadzeņu melnajā vielā (*substantia nigra*) [166]. Bipiridīns ir stiprs metālu helātors un tas varētu būt viens no augstā citotoksiskā efekta izskaidrojumiem. Uz normāliem embrionāliem fibroblastiem NIH 3T3 2,2`-bipiridīnija hidroselenītam (**41**) citotoksiskais efekts ir salīdzinoši 2–15 reizes zemāks nekā uz audzēju šūnām ($IC_{50}=30,2$ μM), savukārt, 4,4`-bipiridīnija hidroselenītam (**42**) pārbaudītajās devās nav citotoksiska efekta uz NIH 3T3 šūnām. M.Michel-Buono grupa izpētīja, ka 4,4-bipiridīnu IC_{50} , pēc 11 dienu inkubācijas uz normāliem cilvēka keratinocītiem NHK, ir 100-1000 μM , kā arī 4,4-bipiridīnija ietekmē netika konstatēta keratinocītu displāzija (saistaudu attīstības traucējumi) [167]. Eksperimentālie dati, kas parādīti 4. tabulā ir iegūti pēc 72 stundu inkubācijas ar savienojumu un maksimālā izmantotā deva bija 100 μM . Tātad, var secināt, ka 4,4`-bipiridīnija hidroselenītam (**42**) ir selektīva ietekme uz audzēju šūnām.

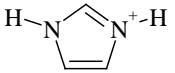
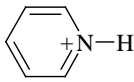
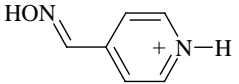
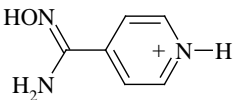
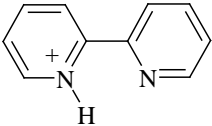
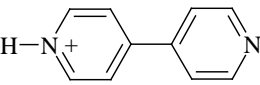
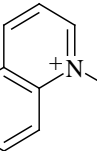
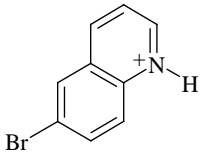
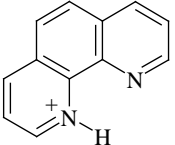
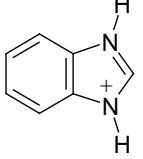
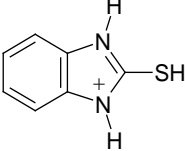
Vēl viena heterociklu klase, kas šajā darbā tika pārbaudīta, ir kondensētie heterocikli. Kā piemērs izmantots hinolīns. Hinolīna kodols ir dažu dabīgo vielu (alkaloīdu) un vairāku farmakoloģiski aktīvo vielu sastāvā. Hinolīna atvasinājumiem ir konstatētas vairākas bioloģiskas aktivitātes: pretmalārijas, antibakteriāla, pretsēnīšu, prettārpu, kardiotoniska, pretkrampju, pretiekaisuma, pretsāpju un pretvēža [168, 169]. Eksperimentos *in vitro* tika pārbaudīti hinolīnija selenīts (**43**) un 6-bromohinolīnija selenīts (**44**). Augstākais antiproliferatīvais efekts novērots savienojumam **44**. No pārbaudītajām audzēju šūnām, augstāka ietekme ir pret neuroblastomas Neuro2A un melanomas B16 šūnām (IC_{50} attiecīgi ir 5

un 2 μM). Novērota selektīva ietekme arī uz citām audzēju šūnām, bet uz normāliem fibroblastiem NIH 3T3 savienojumam citotoksiska efekta nav. Hinolīnija selenītam (**43**) citotoksiskais efekts uz Neuro2A un B16 šūnām ir attiecīgi 7 un 100 reizes zemāks nekā 6-bromatvasinājumam (**44**) un citotoksiskais efekts novērojams arī uz normālām šūnām, $\text{IC}_{50}=178 \mu\text{M}$. Literatūrā ir aprakstīts, ka hinolīna savienojumi spēj inhibēt melanīna produkciju cilvēka ādā [170]. Iespējams, ka augsts 6-bromohinolīnija selenīta (**44**) citotoksiskais efekts tieši uz melanomas šūnām var būt saistīts ar spēju modulēt melanogēnēzes procesu.

Fenantrolīns ir kondensēts heterociklisks savienojums, kas var veidot kompleksus ar vairākiem metālu joniem [171]. 1,10-fenantrolīns veido kompleksu ar dzelzs (II) jonu un ir nosaukts par “feroīnu”. Tas ir metaloproteināžu inhibitors, kura darbības mehānisms ir saistīts ar fenantrolīna spēju saistīt metāla jonus fermenta aktīvajā centrā [172]. Pēc 4. tabulas datiem *o*-fenantrolīnija selenītam (**45**) ir augsts citotoksiskais efekts uz audzēju šūnu līnijām, IC_{50} ir ap 2 μM , izņemot melanomas B16 šūnas, kur efekts ir nedaudz zemāks - IC_{50} ir 12 μM . Diemžēl augsta citotoksicitāte novērota arī uz normālās šūnu līnijas NIH 3T3 ($\text{IC}_{50}=3 \mu\text{M}$). Šāds vienlīdz augsts citotoksiskais efekts uz visiem šūnu tipiem varētu būt saistīts tieši ar fenantrolīnija spēju saistīt metālus un neselektīvi traucēt vairāku metālu saturošo fermentu darbību šūnā. *o*-Fenantrolīnija hidroselenīts (**45**) uzrādīja pretvēža efektu *in vivo*, audzēja augšanas inhibīcijai sasniedzot 39%.

Darbā tika pārbaudīti divi benzimidazola atvasinājumi: benzimidazolīnija hidroselenīts (**46**) un 2-merkaptobenzimidazolīnija hidroselenīts (**47**). Benzimidazola atvasinājumi ir plaši pētīti un izmantoti farmakoloģisko vielu dizainā. Tiem ir konstatēts pretmikrobu, un pretvīrusu efekts, kā arī pret diabēta un pretvēža aktivitāte [173]. 2-merkaptobenzimidazola atvasinājumiem arī ir zināms pretmikrobu efekts, kā arī antihistamīna, neirotrofs un analgētisks efekts [174]. Benzimidazolīnija hidroselenīts (**46**) parāda līdzīgu antiproliferatīvo efektu uz visām pārbaudītajām šūnu līnijām, IC_{50} svārstās no 16 līdz 29 μM . Savienojuma līdzīgais efekts visos gadījumos var būt saistīts ar to, ka tiek ietekmēti bazālie fizioloģiskie mehānismi. Piemēram, viens no literatūrā aprakstītiem benzimidazola antiproliferatīvā efekta darbības mehānismiem ir saistīts ar mikrotubulīna producēšanas inhibīciju šūnās. Šāds darbības mehānisms ir līdzīgs tradicionālās ķīmijterapijas zāļu darbībai, piemēram, taksāni un kapmirtes alkaloīdi bloķē šūnu dalīšanos šūnas cikla metafāzē (G2/M fāzes) [175]. Benzimidazolīnija hidroselenīts (**46**) ir otrs no visiem pārbaudītajiem heterocikliem, kurš uzrāda pretvēža efektu *in vivo* - audzēja augšana tiek inhibēta par 51%. Interesanti, ka abiem heterocikliskajiem savienojumiem (benzimidazolīnija selenīts (**46**) un *o*-fenantrolīnija selenīts (**45**)), kuri parādīja efektu *in vivo*, nav antiproliferatīvā efekta selektivitātes uz dažādiem šūnu tipiem.

N-Heterociklu hidroselenītu antiproliferatīvais efekts *in vitro* un pretvēža efekts *in vivo*

Nr.	(NH ⁺ -heterocikls) HSeO ₃ ⁻	IC ₅₀ , μM					Audzēja augšanas inhibīcija <i>in vivo</i> , %
		HT- 1080	MG- 22A	Neuro 2A	B16	NIH 3T3	
37		4	5	4	3	45	nt
38		22	33	17	34	nt	nt
39		*	*	nt	nt	147	25
40		14	17	11	2	25	27
41		18	11	9	2	30	-28
42		16	15	3	2	*	-48
43		23	29	37	187	178	-28
44		15	17	5	2	*	nt
45		2	2	2	12	3	39
46		21	29	28	21	16	51
47		143	253	nt	nt	80	-37

* - pārbaudītajās devās efekta nav; nt- nav testēts; “-” – audzēja augšanas aktivācija.

2.1.5. Sililalkiltioaizvietotie N-heterociklu hidroselenīti

Sililalkiltioaizvietotie N-heterocikli viegli reaģē ar selēnpaskābi, veidojot attiecīgos amonija hidroselenītus. Reakcija ar labiem iznākumiem notiek istabas temperatūrā (67-94%) [176]. Eksperimentos *in vitro* sililalkiltioaizvietotiem N-heterociklu hidroselenītiem noteikta ietekme uz dažādu šūnu līniju proliferāciju. Iegūtie rezultāti apkopoti 5. tabulā. Lielākā daļa no sililalkiltioaizvietotiem N-heterocikliem parādīja augstu antiproliferatīvo efektu uz fibrosarkomas HT-1080, hepatomas MG-22A, melanomas B16 un neuroblastomas Neuro2A šūnu līnijām. Lai izpētītu lipofilitātes ietekmi, eksperimentos tika izmantoti savienojumi ar divām dažāda garuma sililalkiltio ķēdēm.

Eksperimentos *in vitro* tika pārbaudīti N-metilimidazola atvasinājumi. N-Metil-2-[(3-trimetilsililmetil)tio]-imidazolīnija hidroselenītam (**48**) piemīt augsts citotoksiskais efekts uz fibrosarkomas HT-1080 ($IC_{50}=1 \mu M$), bet zemāks - uz melanomas B16 un neuroblastomas Neuro2A, attiecīgi IC_{50} ir 11 un 6 μM , tomēr citotoksiskums uz normālām šūnām arī ir augsts, $IC_{50} = 6 \mu M$. Hepatomas MG-22A šūnu proliferācijas supresija ($IC_{50} = 143 \mu M$) ir 119 reizes zemāka nekā fibrosarkomas HT-1080 un 23 reizes zemāka nekā normālo šūnu BHK21 proliferācijas supresija, bet bazālā toksicitāte ir 2 reizes zemāka nekā nātrija selenītam ($LD_{50} = 260 \text{ mg/kg}$). Trimetilsililpropiltio-atvasinājumam (**49**) citotoksiskais efekts uz visām audzēju šūnām ir līdzīgs, $IC_{50} = 3 \div 5 \mu M$. Citotoksiskais efekts uz normālam šūnām pieaug 11 reizes ($IC_{50} = 0.56 \mu M$), bet bazālā toksicitāte 4 reizes ($LD_{50} = 60 \text{ mg/kg}$), salīdzinot ar **48** savienojumu.

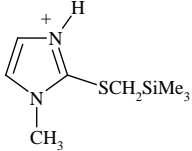
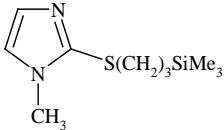
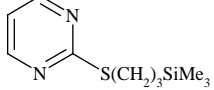
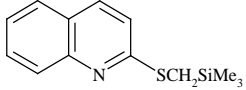
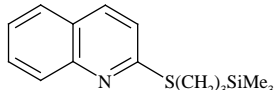
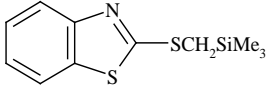
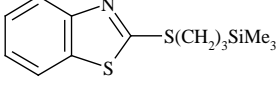
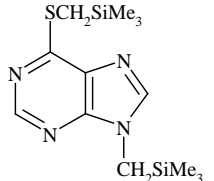
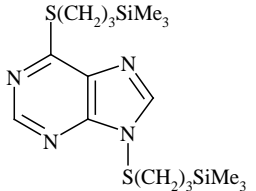
(3-Trimetilsililpropil)tiopirimidīna hidroselenīta (**50**) antiproliferatīvais efekts uz fibrosarkomas HT-1080 un melanomas B16 ir vienāds ($IC_{50} = 3 \mu M$), bet uz hepatomas MG-22A efekts ir 7 reizes zemāks, savukārt uz neuroblastomas Neuro2A pilnīgi pazūd. Citotoksiskā efekta nav arī uz normālām šūnām BHK21, bazālā toksicitāte, salīdzinot ar **49** savienojumu, samazinās 2 reizes.

Darbā tika pārbaudīta savienojumu grupa, kur izmantoti kondensētie heterocikli. Izmantojot hinolīnu kā heterocikla bāzi konstatējam ievērojamu toksiskā efekta samazināšanos - bazālā toksicitāte 2-[trimetilsililmetil)tio]hinolīnija hidroselenītam (**51**) ir 972 mg/kg, kas ir 9 reizes mazāk nekā nātrija selenītam, un 2-[trimetilsililpropil)tio]hinolīnija hidroselenītam (**52**) - $LD_{50}=517 \text{ mg/kg}$. Savienojumu antiproliferatīvais efekts uz audzēju šūnām ir atšķirīgs un šūnu jutīgums pret savienojumu mainās atkarībā no sililalkiltio ķēdes garuma. Savienojumam (**51**) ar sililmetiltio ķēdi audzēju šūnu līnijas, pēc citotoksiskā efekta samazināšanās, var izvietot sekojošā secībā: HT-1080 > Neuro2A; B16 > MG-22A, bet savienojumam (**52**) ar sililpropiltio ķēdi iegūstam sekojošu secību: B16 > HT-1080 > MG-22A > Neuro2A. IC_{50} abiem savienojumiem svārstās apmēram vienādās robežās, **51** - no 1 līdz 49 μM , bet **52** - no 3 līdz 42

μM . Savienojumu **51** un **52** citotoksiskais efekts uz normālām šūnām BHK21 ir līdzīgs audzēju šūnām, IC_{50} attiecīgi ir 6 un 10 μM . Ja salīdzina rezultātus ar hinolīnija selenītu (**43**), redzams, ka sililalkil ķēde molekulā dod augstāku antiproliferatīvo efektu uz audzēju šūnu līnijām, tomēr vienlaikus pieaug citotoksiskais efekts uz normālām šūnām. Eksperimentos *in vivo* šie trīs selenīti ar hinolīna bāzi neparādīja ievērojamu efektu.

5. tabula

Sililitioaizvietoto N-heterociklu hidroselenītu antiproliferatīvais efekts *in vitro* un pretvēža efekts *in vivo*

Nr.	Formula	IC_{50} , μM					Bazālā toksicitāte (LD_{50} mg/kg)	Audzēja augšanas inhibīcija <i>in vivo</i> , %
		HT-1080	MG-22A	B16	Neuro 2A	BHK 21		
48		1	143	11	6	6	260	nt
49		3	3	4	5	0.56	60	10
50		3	21	3	*	*	134	12
51		1	49	11	11	6	972	-13
52		5	9	3	42	10	517	22
53		9	58	8	3	5	222	nt
54		5	13	7	27	6	594	21
55		3	17	8	38	4	312	39
56		2	39	8	10	31	421	-3

* - pārbaudītajās devās efekta nav; nt- nav testēts; “ – “ – audzēja augšanas aktivācija.

Benzotiazolīnija hidroselenītiem *in vitro* novērojām līdzīgu efektu kā savienojumiem ar hinolīna bāzi: antiproliferatīvais efekts uz audzēju šūnām ir atšķirīgs un šūnu jutīgums pret savienojumu mainās atkarībā no sililalkiltio ķēdes garuma. Trimetilsililmetiltio atvasinājumam (**53**) pēc citotoksiskā efekta samazināšanās audzēju šūnu līnijas izkārtojās sekojošā secībā: Neuro2A > B16 > HT-1080 > MG-22A; trimetilsililpropiltio analogam (**54**) – HT-1080 > B16 > MG-22A > Neuro2A. IC₅₀ svārstās robežās no 5 līdz 58 μM. Citotoksiskais efekts uz normālām šūnām BHK21 arī ir līdzīgs kā uz audzēju šūnām. Savienojumam ar garāko sililalkil ķēdi (**54**) bazāla toksicitāte ir 3 reizes zemāka (LD₅₀ = 594 mg/kg), salīdzinot ar **53** savienojumu. Trimetilsililalkiltiopurīni **55** un **56** inhibē audzēju šūnu augšanu, IC₅₀ ir robežās no 2 līdz 39 μM. Citotoksiskais efekts uz normālām šūnām BHK21 arī ir audzēju šūnu līmenī. Bazālā toksicitāte purīna savienojumam **55** ir 312 mg/kg, bet savienojumam **56** - 421 mg/kg.

Apkopojot rezultātus par sililalkiltioaizvietotiem N-heterociklu hidroselenītiem var secināt, ka sililalkiltio ķēdes garuma pieaugums ievērojami samazina bazālo toksicitāti, bet antiproliferatīvais efekts uz audzēju šūnām paliek augstā līmenī, tomēr nav konstatēta selektīva ietekme tikai uz audzēju šūnām. Visiem savienojumiem novērota atšķirīga ietekme uz dažādām šūnu līnijām, pie tam selektivitāte mainās atkarībā no heterocikla veida, kas tiek izmantots kā bāze, un sililalkiltio ķēdes garuma.

Pretvēža efektu *in vivo* parādīja tikai 6-[(trimetilsililmetil)tio]-9-(trimetilsililmetil) purīnija hidroselenīts (**55**) - audzēja augšana tiek inhibēta par 39%.

2.1.6. Neorganisko selēna atvasinājumu pretvēža efekts *in vivo* un toksiskie blakusefekti

Savienojumu pretvēža efekts noteikts izmantojot peļu audzēja modeli uz ICR pelēm ar pārpotētu peļu sarkomu S-180. Savienojumi tika ievadīti i.p., nākošajā dienā pēc audzēja pārpotēšanas. Izmantotas trīs savienojumu ievadīšanas shēmas:

A - 1., un 3. dienā, devā 10 mg/kg;

B - 1., 2., 4., 7., un 8. dienā, devā 10 mg/kg;

C - 1., 2., 3., 4., 7., 8. un 9. dienā, devā 3 mg/kg.

Eksperimenta gaitā tika novērtēta audzēja augšanas ātruma inhibīcija (AI%) un dzīves ilguma izmaiņas (DZ%), salīdzinot ar kontroles grupas dzīvnieku rādītājiem. Iegūtie dati par neorganiskā selēna atvasinājumu pretvēža efektu *in vivo* un to toksiskajiem blakusefektiem ir apkopoti 6. tabulā. Nātrija selenīta aktivitāte pārbaudīta dažādās devās. Ievadot kopējo devu 20 mg/kg (kas pārsniedz *in vitro* noteikto LD₅₀=3,5 mg/kg) visiem dzīvniekiem grupā audzēja inhibīcija ir 100%, bet pēc eksperimenta beigām visi dzīvnieki iet bojā toksisku blakusefektu dēļ. Samazinot kopējo devu līdz 10 mg/kg, audzēja inhibīcija ir 68% un, neskatoties uz to, ka visiem dzīvniekiem ir novērojams svara zudums, kas liecina par savienojuma toksisko efektu,

tikai 20% dzīvnieku iet bojā, bet pārējiem dzīves ilgums palielinās par 104%. Samazinot kopējo devu līdz 2 mg/kg, audzēja inhibīcija ir 53% un dzīves ilgums palielinās tikai par 55%, tomēr toksiskie blakusefekti ir tādi paši, kā ar devu 10 mg/kg. Šie rezultāti vēlreiz parāda galveno problēmu, kas saistīta ar selēna savienojumu izmantošanu terapijā un profilaksē, selēnam ir diezgan šaurs diapazons starp selēna terapeitisko un toksisko devu.

6. tabula

Neorganisko selēna atvasinājumu pretvēža efekts *in vivo* un toksisko blakusefektu salīdzinājums

Nr.	Ievadīšanas shēma	Kopējā ievadītā deva, mg/kg	AI%	DZ%	Toksiskie blakusefekti	
					a	b
Na ₂ SeO ₃	A	2	53	55	++	+
		10	68	104	++	+
		20	100	16	+++	+++
7	B	50	81	nt	+	+
13	C	30	43	nt	-	-
19	C	30	33	nt	+++	++
23	A	20	51	213	+	-
26	A	20	100	149	+++	++
27	A	20	100	288	+++	+
28	A	20	87	80	+++	-
29	A	20	88	134	++	-
30	A	20	83	16	+++	++
31	A	20	100	20	+++	+
32	A	20	100	265	+++	-
35	A	20	100	94	+++	++
40	C	21	27	nt	-	-
45	B	50	39	nt	+++	+
46	C	21	51	nt	-	-
53	C	12	39	nt	-	-

nt - nav testēts;

a - dzīvniekiem novērots svara zudums: + - vāji izteikts; ++ - izteikts tikai daļai dzīvnieku grupā; +++ - stipri izteikts visiem dzīvniekiem grupā.

b - dzīvnieku skaits, kas iet bojā toksisko efektu dēļ: + - 20% dzīvnieku iet bojā; ++ - 40-60% dzīvnieku iet bojā; +++ - 80-100% dzīvnieku iet bojā.

Izvērtējot toksisko efektu izpausmes dažādiem hidroselenītiem eksperimentos *in vivo*, konstatēts, kā tikai diviem savienojumiem: serīna hidroselenītam (**13**) un benzimidazola hidroselenītam (**46**) nav konstatēti toksiski blakusefekti, bet pretvēža efekts attiecīgi ir 43% un 51% (kopējā ievadītā deva ir 30 un 21 mg/kg, kas ir salīdzināms ar nātrija selenīta daudzumu attiecīgi 22,2 un 14,7 mg/kg). Vēl diviem savienojumiem toksiskie blakusefekti ir daudz zemāki nekā nātrija selenītam un neviens no dzīvniekiem neiet bojā toksisko efektu dēļ. Ievadot fenibuta hidroselenītu (**23**), tikai nelielai daļai dzīvnieku novērojām vāji izteiktu svara zudumu, bet audzēja inhibīcija sasniedz 51% un dzīves ilgums pieaug par 213%.

(3-Karboksipropil)diizopropilmetilamonija hidroselenītam (**29**) toksiskie efekti ir izteikti tikai dažiem dzīvniekiem, turklāt audzēja inhibīcija sasniedz 88% un dzīves ilgums pieaug par 134%. Vēl var atzīmēt 4-(3-karboksipropil)-4-metilmorfolīnija hidroselenītu (**32**). Šajā gadījumā, neskatoties uz to, ka visiem dzīvniekiem ir stipri izteikts toksisks blakusefekts (svara zudums), eksperimenta laikā neviens no dzīvniekiem neiet bojā toksisko efektu dēļ un ir novērota 100% audzēja inhibīcija, kā arī dzīves ilguma pieaugums par 265%.

Diviem savienojumiem tika noteikta LD₅₀ *in vivo* izmantojot “up-and-down” metodi [177]. Savienojumam (3-karboksipropil)-trimetil-amonija hidroselenītam (**27**) LD₅₀=33 mg/kg (bazālā toksicitāte *in vitro* 82 mg/kg) un meldonija hidroselenītam (**26**) LD₅₀=102 mg/kg (bazālā toksicitāte *in vitro* 138 mg/kg). Pēc literatūras datiem Na₂SeO₃ *in vivo* LD₅₀=3,5 mg/kg, selenocisteīnam - LD₅₀=35,8 mg/kg un selenometionīnam - LD₅₀=4,3 mg/kg [178-180]. Tas parāda, ka izmantojot kombināciju ar organisko bāzi var samazināt selenīta toksisko efektu līdz 29 reizēm.

2.1.7. Neorganisko selēna atvasinājumu ietekme uz glutaciona peroksidāzes un katalāzes aktivitāti

Skābekļa aktīvās formas (SAF), tādas kā superoksīds un ūdeņraža peroksīds, tiek ģenerētas šūnas mitohondrijos normālā oksidatīvās elpošanas procesā, kā arī oksidēšanās-reducēšanās fermentu darbības rezultātā. Superoksīdam ir īss pussabrukšanas periods, bet kombinācijā ar slāpekļa oksīdu, tas var veidot ļoti aktīvu peroksinitrītu, kas spontāni vai fermentatīvi var transformēties par ūdeņraža peroksīdu un molekulāro skābekli [181]. Ūdeņraža peroksīdam ir garāks pussabrukšanas periods nekā superoksīdam un tas var pārvietoties caur membrānām tiešās difūzijas ceļā vai caur transporta kanāliem [182]. Paaugstināts ūdeņraža peroksīda līmenis var novest pie tiolu oksidēšanas un izraisīt oksidatīvo stresu. Ūdeņraža peroksīda līmeņa regulācija pasargā šūnu no ļoti aktīvā un postoša hidroksilradikāļa (OH[•]), kurš veidojas ūdeņraža peroksīda reakcijā ar Fe²⁺ (Fentona reakcija). Standarta apstākļos Fentona reakciju limitē neliels brīvo pārejas metālu daudzums šūnā, bet tas

var pieaugt oksidatīvā stresa apstākļos, kad paaugstinās iekššūnu ūdeņraža peroksīda līmenis un atbrīvojas Fe (II) katjons no iekššūnu depo [183]. No otras puses neliels ūdeņraža peroksīda daudzums šūnai ir nepieciešams, lai nodrošinātu svarīgas tiolsaturošo proteīnu modifikācijas, starp- un iekšmolekulāro disulfīdu veidošanos. Ūdeņraža peroksīdam ir arī sekundāra signāla pārnēsēja loma iekššūnu signālu transdukcijā, modulējot oksidēšanas pakāpi redoks-atkarīgajam cisteīnam, lai veicinātu kināzes funkciju [184]. Glutaciona peroksidāze (Gpx), katalāze un peroksiredoksīns ir galvenie fermenti ūdeņraža peroksīdu utilizācijai šūnā.

Nātrija selenīts ir atzīts kā potenciāls antioksidants. Tā kā selēns atrodas glutaciona peroksidāzes aktīvajā centrā, pētījumos ir parādīts, ka pievienojot selēnu uzturā, neorganiskā vai organiskā formā, tiek novērots Gpx un katalāzes aktivitātes pieaugums asinīs, aknās, spermā un citos audos. Pieaug arī fermenta ekspresijas līmenis un Gpx mRNA līmenis. Šis efekts tika atklāts zīdītāju (tai skaitā cilvēka) [185, 186], kā arī zivju [187] un putnu [188] organismos. Analōģisku efektu novēroja uz primārajiem hepatocītiem [189] un taisnās zarnas CaCo audzēju šūnām [190]. Nātrija selenīts aktivē arī attīrītu Gpx fermentu [191].

7. tabula

Amonija un metilamonija selenītu un telurītu ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti

Nr.	Inhibīcija, %					
	LGpx		EGpx		PGpx	
	1x10 ⁻⁴ M	1x10 ⁻⁷ M	1x10 ⁻⁴ M	1x10 ⁻⁷ M	1x10 ⁻⁴ M	1x10 ⁻⁷ M
2	73±5	56±12	66±11	52±15	74±10	17±7
3	86±1	2±2	50±6	38±10	66±7	11±2
4	61±5	16±1	43±6	29±8	68±16	2±2
7	50±5	97±21	46±6	55±16	40±14	-28±6
8	25±3	53±3	49±11	40±11	10±5	0±3
9	39±10	23±5	27±7	34±12	18±3	0±2

“ – “ – fermenta aktivācija.

PGpx – glutaciona peroksidāze no peļu aknām, LGpx – no peļu asinīm un EGpx - komerciāls ferments no liellopu aknām

Lai noskaidrotu savienojumu spēju ietekmēt antioksidatīvo fermentu darbību, tika pārbaudīta to ietekme uz katalāzes (izdalīta no vērša aknām) aktivitāti un uz glutaciona peroksidāzi, kas izdalīta no dažādiem avotiem: PGpx – no peļu aknām, LGpx –no peļu asinīm un EGpx - komerciāls ferments no liellopu aknām.

Iegūtie rezultāti par amonija selenītu (2-4) un telurītu (7-9) ietekmi uz glutaciona peroksidāzi apkopoti 7. tabulā. Amonija, metil- un dimetilamonija selenītiem ir vienāds efekts uz visiem trim Gpx variantiem. Savienojumi inhibē fermenta aktivitāti par 43-86%, savukārt, telurīti inhibē tikai Gpx no peļu un liellopu aknām. Literatūrā ir parādīta telūra spēja inhibēt Gpx hepatocītos. Telūrs spēj saistīties ar selenoproteīniem un inhibēt to katalītisko aktivitāti [192, 193], turklāt savienojumu inhibīcijas spēja zemākā koncentrācijā ir augstāka. Efekts samazinās savienojumu rindā: amonija telurīts (8) > metilamonija telurīts (9) > dimetilamonija telurīts (10). Telurīti neietekmē vai vāji ietekmē eritrocītu Gpx, šo fermentu par 40% inhibē tikai amonija telurīts.

8. tabula

Neorganisko selēna atvasinājumu ietekme uz glutaciona peroksidāzes un katalāzes aktivitāti

Nr.	Katalāzes inhibīcija, %	EGpx inhibīcija, %	Nr.	Katalāzes inhibīcija, %	EGpx inhibīcija, %
2	nt	66±11	20	5±4	nt
3	-9±2	50±6	21	7±5	nt
4	-14±5	42±6	22	-11±2	46±6
5	17±4	nt	23	11±2*	nt
7	-2±1	46±6	37	10±8	nt
8	11±2*	49±11	39	17±3	26±2
9	9±2*	27±7	40	15±3	50±5
10	11±1	nt	41	23±2	nt
11	17±7	nt	42	16±1	nt
12	99±1	62±3	43	15±4	nt
13	100±3	26±8	44	5±2	nt
14	16±3	nt	45	20±1	52±10
15	94±5	nt	46	5±3	nt
16	14±3	nt	47	12±7	36±2
17	12±7	21±1	50	-9±6	nt
18	8±5	nt	51	16±2*	nt
19	99±1	nt			

Savienojumi pārbaudīti koncentrācija 0.1 mM. EGpx – glutaciona peroksidāze no liellopu eritrocītiem.

*- savienojumi pārbaudīti devā 0,01 mM, lielākās koncentrācijās savienojumi izkrīt nogulsnēs.

nt- nav testēts; “ – “ – fermenta aktivācija.

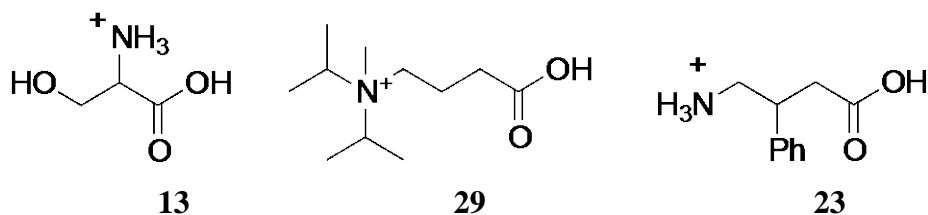
Analizējot rezultātus par savienojumu ietekmi uz katalāzes aktivitāti 8. tabulā, var secināt, ka no visiem pārbaudītiem aminoskābju hidroselenītiem katalāzes aktivitāti par 100% inhibē tikai β-alanīna (12), serīna (13) un glutamskābes (15) hidroselenīti, kā arī glicilglicīna hidroselenīts (19). Neviens no pārbaudītajiem heterocikliskiem hidroselenītiem (37-51)

katalāzes aktivitāti neietekmē. β -Alanīna (**12**) un serīna (**13**) hidroselenīti inhibē arī Gpx aktivitāti attiecīgi par 62% un 26%. Diglicilglicīna hidroselenīts (**22**) inhibē Gpx tikai par 46%. No heterocikliskiem hidroselenītiem, Gpx inhibē līdz 50% tikai 4-amidoksimopiridinija selenīts (**40**).

Aktīva Gpx un katalāzes inhibīcija šūnās var izsaukt oksidatīvo stresu, kas spēj inducēt apoptozi audzēja šūnās. Tas varētu būt viens no iespējamajiem šo savienojumu antiproliferatīvā efekta darbības mehānismiem.

2.1.8. Optimālie neorganiska selēna atvasinājumi audzēja augšanas supresijai

Apkopojot visus eksperimentos iegūtos rezultātus par neorganiskā selēna atvasinājumiem, 2.1. attēlā ir parādītas optimālās organiskās bāzes iespējamo pretvēža savienojumu dizainam. Izmantojot šos atvasinājumus, izdevās saglabāt vai pat uzlabot savienojumu pretvēža efektu *in vivo*, kā arī pilnībā vai daļēji novērst toksiskos blakusefektus salīdzinot ar nātrija selenītu.



2.1.att. Optimālas organoamonija hidroselenītu struktūras

2.2. Organisko selēna atvasinājumu struktūras-aktivitātes analīze

Salīdzinot ar neorganiskajiem selēna savienojumiem, organiskie selēna savienojumi ir perspektīvāki bioloģiski aktīvu vielu radīšanai, to vieglākas biopieejamības un zemāka toksiskuma dēļ. Tādēļ pēdējos gados ir veikti plaši bioorganiskie pētījumi par dažāda tipa selēnu saturošiem organiskiem savienojumiem. To daudzveidīgās bioloģiskās īpašības un spēja iesaistīties dažādos bioloģiskajos procesos ļauj ievērojami plašāk izvērst perspektīvu pētījumu lauku. Zinātniskajā literatūrā ir aprakstīts liels skaits heterociklisko selēnu saturošo savienojumu - izoselēnazoli, selēnsulfīdi, selēndiazoli un selēntriazoli [194]. Vairāku heterociklisko selēnu saturošo savienojumu klašu izpētei pievēršamies arī šajā darbā.

2.2.1. Selēndiazolu antiproliferatīvās īpašības

Savienojumi ar selēndiazola ciklu ir piesaistījuši plašu pētnieku uzmanību, jo metabolisma procesa rezultātā bioloģiskajās sistēmās tie spēj darboties kā selēna donori. Pēdējos gados ir plaši aprakstīti pētījumi par selēndiazolu atvasinājumiem, kā rezultātā tiem ir

konstatēts plašs bioloģisko aktivitāšu spektrs, piemēram, 4-aril-4*H*-hromeno[4,3-*d*]-1,2,3-selēndizola atvasinājumiem ir izteikta citotoksiska aktivitāte uz cilvēka leukēmijas KB, adenokarcinomas A549, hepatomas SMC-7721 un kuņģa vēža SGC-7901 šūnu līnijām [195]. Jaunai savienojumu klasei - 5,7-diaril-4,4-dimetil-4,5,6,7-tetrahidropiridīn[3,4-*d*]-1,2,3-selēndiazoliem ir konstatēta pretmikrobu un pretsēnīšu aktivitāte [196]. Savukārt, 1,2,5-selēnadiazoli spēj inhibēt tioredoksīna reduktāzi, tādējādi izmainot audzēju šūnu jutību pret jonizējošā starojuma iedarbību [197]. Pierādīts, ka 6-fenil-7(6*H*)-izoselenazolo[4,3-*d*]pirimidons inhibē peļu leukēmijas P388 attīstību *in vivo* [198]. Augsts inhibīcijas efekts uz leukēmijas L1210 šūnām ir atrasts 2-amino 4-aizvietoto selēnazola savienojumu klasē [199].

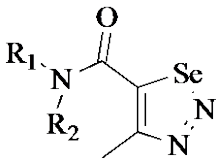
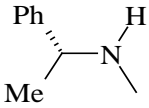
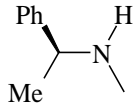
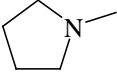
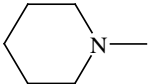
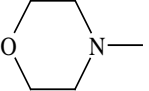
Šajā darbā tika pārbaudīta vairāku 4-metil-1,2,3-selēndiazol-5-karbonskābes amīdu atvasinājumu spēja nomākt ļaundabīgu audzēju šūnu augšanu [200]. Eksperimentos iegūtie *in vitro* un *in vivo* rezultāti apkopoti 9. tabulā.

Kopumā savienojumi *in vitro* uz audzēju šūnu līnijām HT-1080 un MG-22A parādīja zemu antiproliferatīvo efektu. 4-Metil-1,2,3-selēndiazol-5-karbonskābes dimetilamīdam (**57**) un di(izopropil)amīda analogam **58** nekonstatēts citotoksiskais efekts uz fibrosarkomas HT-1080, bet hepatomas MG-22A šūnas ir jutīgākas pret šiem amīdiem – iegūtie IC₅₀ rādītāji ir attiecīgi 160 μM un 113 μM. Arī 4-metil-1,2,3-selēnadiazol-5-karbonskābes (*R*)-(1-feniletil)amīdam **59** piemīt selektīvs citotoksiskais efekts uz dažādām šūnu līnijām - uz fibrosarkomas HT-1080 tas ir 3,4 reizes zemāks nekā uz MG-22A, savukārt, tā (*S*)-enantiomēram **60** selektivitāte zūd un iegūtais citotoksiskais efekts uz abām šūnu līnijām ir vienāds (IC₅₀=111 un 114 μM). Antiproliferatīvais efekts nedaudz uzlabojas ciklisko amīdu **61-63** rindā, piroolidīna atvasinājumam **61** ir vidējā citotoksicitāte: uz HT-1080 IC₅₀ ir 78 μM un uz MG-22A - 135 μM, bet piperidila atvasinājumam **62** uz HT-1080 šūnām tā pazeminās līdz 120 μM un praktiski pazūd aizstājot piperidilgrupu ar morfolīnu savienojumā **63**. Uz hepatomas amīdam **63** citotoksiskā aktivitāte saglabājas, IC₅₀=131 μM. Jāatzīmē, ka uz hepatomas MG-22A ar visiem atvasinājumiem iegūts apmēram vienāds antiproliferatīvais efekts (IC₅₀ ir 105 - 160 μM). Kopumā selēndiazoliem **57-63** piemīt vidēja vai zema antiproliferatīva aktivitāte *in vitro*. Visiem šīs sērijas selēndiazoliem ir zema arī bazālā toksicitāte, LD₅₀=800÷1442 mg/kg.

Neskatoties uz līdzīgiem citotoksicitātes rādītājiem *in vitro*, *in vivo* testos tika iegūti atšķirīgi rezultāti. 4-Metil-1,2,3-selēndiazol-5-karbonskābes amīdu atvasinājumiem **57-63** pretvēža efekts *in vivo* noteikts uz peļu sarkomas S-180. Divas dienas ievadot savienojumu **57** devā 2 mg/kg, iegūta sarkomas augšanas inhibīcija par 58% (eksp. 11. dienā). Diemžēl savienojumam ir negatīvi blakusefekti – elpošanas traucējumi dzīvniekiem vienlaikus ar svara zudumu par 17%. Izmantojot savienojumu, kurā metilgrupas nomainītas pret izopropilgrupām, iegūti sliktāki rezultāti - amīds **58** stimulē audzēja augšanu par 32%. Diviem optiskiem

izomēriem (**59** – (*R*)-izomērs; **60** – (*S*)-izomērs) konstatēts pretējs efekts *in vivo*. (*R*)-izomērs spēj nedaudz inhibēt sarkomas augšanu (par 20%), bet (*S*)-izomērs stimulē tās augšanu (23%).

9.tabula

Nr.		IC ₅₀ , μM		Bazālā toksicitāte (LD ₅₀ mg/kg)	Audzēja augšanas inhibīcija <i>in vivo</i> , %	Toksiskais efekts, svara zudums, %
		HT-1080	MG-22A			
57	Me ₂ N	*	160	1134	58	17
58	(<i>i</i> -Pr) ₂ N	*	113	1755	-32	0
59		454	132	1029	20	3
60		111	114	1442	-23	0
61		78	135	977	85	23
62		120	105	800	71	8
63		*	131	1145	0	8

* - nav citotoksiskā efekta; “ – “ – audzēja augšanas aktivācija.

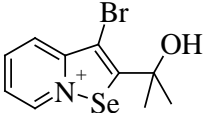
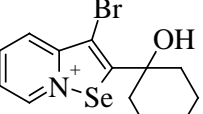
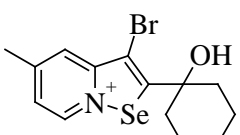
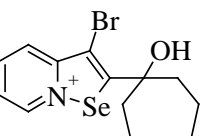
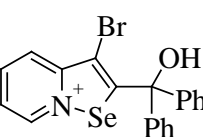
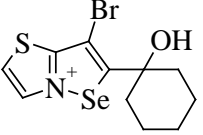
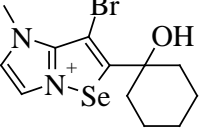
Eksperimentos *in vivo* ar cikliskiem amīdiem **61-63** elpošanas traucējumi pelēm netika konstatēti, bet novērojām svara zudumu par 8-23%. Pirolidīna amīds **61** izsauc audzēja augšanas ātruma inhibīciju par 85%, taču uzrāda arī lielāko toksisko efektu starp cikliskajiem atvasinājumiem (svara zudums 23%). Piperidīna analogs **62** inhibē sarkomas S-180 audzēja augšanu par 71% un tam ir tikai neliels toksiskais blakusefekts (svara zudums 8%). Morfolilatvasinājums **63** neietekmē sarkomas S-180 augšanu un izraisa dzīvniekiem svara zudumus par 8%. Balstoties uz eksperimentos iegūtajiem datiem var secināt, ka amīda fragmenta modifikācijas stipri ietekmē selēndiazolu pretvēža īpašības, pat minimālas izmaiņas struktūrā spēj uzlabot sarkomas S-180 augšanas supresiju, vai pretēji - aktivēt audzēja augšanu.

2.2.2. Kondensētu selēnazolīnija sāļu antiproliferatīva aktivitāte

Ir sintezēta jauna kondensēto heterociklu klase – selēnazolīnija sāļi – savienojumi ar Se–N⁺ kovalento saiti. Pēc ķīmiskās uzbūves šie heterocikliskie savienojumi atgādina Ebselēna struktūru. Galvenais Ebselēna izmantošanas limitējošais faktors ir tā sliktā šķīdība fizioloģiskajā vidē. Selēnazolīnija sāļu gadījumā šis faktors ir pilnībā novērsts. Noskaidrots, ka saite Se–N⁺ ir stabila vidē līdz pH<8.0. Šo jauno selēnu saturošo heterociklisko savienojumu spēja kavēt vēža šūnu augšanu tika pētīta *in vitro* izmantojot cilvēka fibrosarkomas HT-1080, peļu hepatomas MG-22A un cilvēka krūts adenokarcinomas MCF-7 šūnas, noteikta savienojumu bazāla toksicitāte *in vitro* un aprēķināta savienojumu paredzamā akūtā toksicitāte (LD₅₀). Par savienojumu **64-70** citotoksiskumu iegūtie rezultāti apkopoti 10. tabulā.

10.tabula

Kondensētu selēnazolīnija sāļu antiproliferatīvais efekts uz šūnu līnijām *in vitro*

Nr.	Formula	IC ₅₀ , μM			Bazālā toksicitāte (LD ₅₀ mg/kg)
		HT-1080	MG-22A	MCF-7	
1	Na ₂ SeO ₃	1.7	64	17	105
64		2.8	2.8	3.1	142
65		0.07	0.05	0.50	99
66		0.11	0.23	1.5	98
67		0.12	0.34	0.29	70
68		0.40	0.22	0.39	144
69		2.5	5.0	3.2	80
70		2.5	1.2	1.5	120

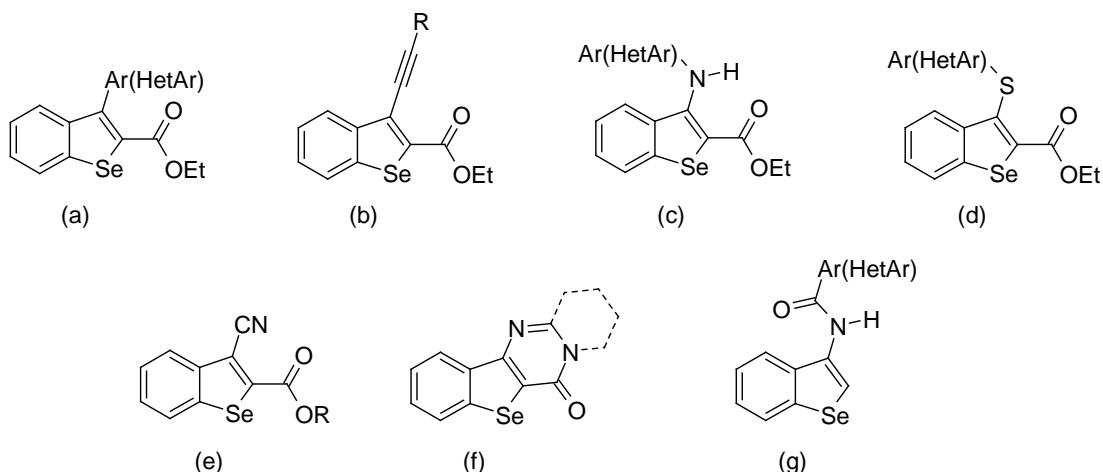
Visas eksperimentos izmantotās vēža šūnu līnijas ir jutīgas pret metilhidroksietil-aizvietoto selenazolopiridīnija hlorīdu **64**, iegūtais IC_{50} ir no 2.8 līdz 3.1 μM , bet bazālās toksicitātes līmenis ir 142 mg/kg. Divu metilgrupu nomaina pret cikloheksil aizvietotāju krasi uzlabo savienojuma **65** antiproliferatīvās īpašības - citotoksiskais efekts uz hepatomas MG-22A šūnām ir 0.05 μM . Salīdzinot ar nātrija selenītu (**1**), savienojums **65** ir 1270 reizes efektīvāks uz MG-22A šūnām, 24 reizes - uz HT-1080 šūnām un 34 reizes - uz krūts adenokarcinomas MCF-7 šūnām, tomēr bazālā toksicitāte abām vielām ir vienlīdz augsta (LD_{50} ir 105 un 99 mg/kg). Savukārt metilgrupas ievadīšana piridīna gredzenā pat četrkārt pazemina selēnazolīnija **66** citotoksicitāti, salīdzinot ar savienojumu **65**, bet bazālās toksicitātes līmenis paliek nemainīgs ($LD_{50}=98$ mg/kg). Cikloalkilgrupas palielināšana līdz cikloheptil neietekmē selenazolopiridīnija **67** citotoksicitātes efektu uz vēža šūnām, bet paaugstina tā bazālo toksicitāti. Fenilgrupas ieviešana struktūras spirta fragmentā, kura tika realizēta savienojumā **68**, pazemina bazālo toksicitāti līdz 144 mg/kg, vienlaicīgi neietekmējot tā augsto antiproliferatīvā efekta līmeni ($IC_{50}=0.22\div 0.40$ μM). Iespējams, tas ir saistīts ar vielas stabilitātes palielināšanos *in vitro* citotoksicitātes noteikšanas testa apstākļos. Analizējot 10. tabulas datus, redzams, ka piridīna gredzena maiņa pret tiazolu un N-metilimidazolu noved pie savienojumu antiproliferatīvās aktivitātes pazemināšanās - savienojumu **69** un **70** citotoksiskais efekts uz vēžu šūnu līnijām svārstās no 1.8 līdz 5.0 μM . Selenazoloimidazolīnija **70** bazālā toksicitāte ir 1.5 reizes zemāka nekā selenazolotiazolīnija analogam **69**.

Kopumā šo jauno selēnu saturošo heterociklisko savienojumu klasi var vērtēt kā ļoti citotoksisku pret vēža šūnām eksperimentos *in vitro*. Savienojumu **64-70** augstā citotoksiska aktivitāte un izcilā šķīdība, turpinot iesāktos pētījumus, ļauj cerēt uz jaunu perspektīvu pretvēža preparātu radīšanu nākotnē.

2.2.3. Benzselēnofēnu citotoksicitāte *in vitro*

Aizvietoto benzselēnofēnu klases savienojumu pamatstruktūras ir atspoguļotas 2.2. attēlā. Savienojumiem pārbaudīta citotoksiskā aktivitāte uz cilvēka fibrosarkomas HT-1080, peļu hepatomas MG-22A [201], kā arī noteikta šo savienojumu bazālā toksicitāte *in vitro* uz peļu fibroblastu NIH 3T3 šūnu līnijas un aprēķināta savienojumu paredzamā akūtā toksicitāte (LD_{50}). Pēc eksperimentāli iegūtajiem datiem šī tipa savienojumus (**a**)-(g) var raksturot ar vidēji vai vāji izteiktu spēju kavēt audzēja šūnu augšanu *in vitro*. Bazālā toksicitāte gandrīz visiem benz[*b*]selēnofēniem svārstās no 400 līdz 2300 mg/kg. Izņēmums ir polikondensētie benz[*b*]selēnofēnu (**f**) atvasinājumi. Šo savienojumu rindā bija atvasinājumi, kuru IC_{50} uz vēža šūnu līnijām ir 5.0 μM , kā arī novērots, ka šie savienojumi maina HT-1080 šūnu morfoloģiju.

Diemžēl, sliktas šķīdības dēļ šī tipa savienojumi nav perspektīvi pretvēža aģenta kandidāta meklējumos.



2.2. attēls. Benzoselenofēnu pamatstruktūras

(a) 3-Aril(hetaril)benz[b]selenofēni, (b) 3-etinilbenz[b]selenofēni, (c) 3-aril(hetaril)aminobenz[b]selenofēni, (d) 3-aril(hetaril)tiobenz[b]selenofēni, (e) 3-ciānobenz[b]selenofēni, (f) polikondensētie benz[b]selenofēni, (g) 3-aril(hetaril)karboksamīdobenz[b]selenofēni.

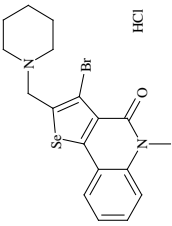
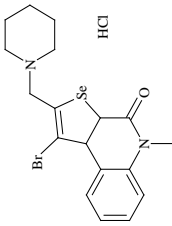
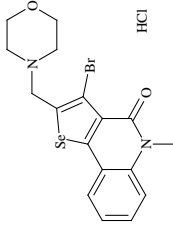
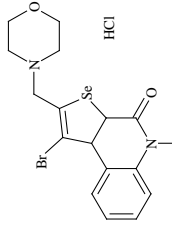
2.2.4. Selenofēnkumarīnu un selenofēnhinolonu antiproliferatīvais efekts

Sākotnēji pētot hinolonu atvasinājumus, tiem tika konstatētas antibakteriālās un pretmalārijas īpašības [202, 203]. Mūsdienās hinolona klases antibiotikas: ciprofloksacīns, norfloksacīns, pefloksacīns, lomefloksacīns un ofloksacīns, tiek veiksmīgi izmantotas bakteriālo infekciju ārstēšanai un profilaksei [204]. Ir konstatēts, ka N-metilfuro[3,2-*c*]hinolona atvasinājumiem piemīt citotoksiskais efekts pret dažiem audzēju veidiem, it īpaši melanomas un zarnu vēža šūnām [205]. Organiskās Sintēzes institūtā tika sintezēta heterociklisko savienojumu rinda – selenofēnkumarīnu un selenofēnhinolonu atvasinājumi [206, 207]. Selenofēnkumarīnu un selenofēnhinolonu atvasinājumu citotoksisko īpašību pārbaudēm *in vitro* izmantotas 10 šūnu līnijas: fibrosarkomas HT-1080, melanomas MDA-MB-435s, adenokarcinomas MCF-7, sarkomas MES-SA, karcinomas A549, neiroblastomas SHSY5Y, sarkomas CCL8, hepatomas MG-22A, hepatocītu karcinomas HepG2 un normālo fibroblastu NIH 3T3 šūnas. Selenofēnhinolonu atvasinājumu pārbaūžu rezultāti apkopoti 11. tabulā. Salīdzinot 3-brom-5-metil-2-(piperidilmetil)selenofēn[3,2-*c*]hinolonu (**71**) ar tā [2,3-*c*]-reģioizomēru **72** novērots, ka savienojumam **71** piemīt izteiktāks citotoksiskais efekts, īpaši pret sarkomas MES-SA šūnām ($IC_{50}=6 \mu M$). Nomainot piperidil aizvietotāju ar morfolīnu, savienojuma **74** citotoksiskais efekts samazinās, tomēr [3,2-*c*]-reģioizomēram **73** arī novērota citotoksiskā efekta selektivitāte tikai uz peļu un cilvēka hepatomas šūnām ($IC_{50}=5 \mu M$). Selenofēnhinoloniem piemīt zema bazālā toksicitāte, savienojumiem ar piperidil aizvietotāju $LD_{50}=522 \text{ mg/kg}$, bet morfolīnmetil analogiem - $LD_{50} = 906\div 2000 \text{ mg/kg}$.

Kumarīni veido svarīgu savienojumu klasi ar plašu bioloģisko īpašību spektru. Literatūrā aprakstītas kumarīnu pretvēža, pret-HIV, antikoagulantu, spazmolītiskās un antibakteriālās īpašības [208-210]. Dažādiem kumarīnu atvasinājumiem piemīt arī citotoksiskā aktivitāte *in vitro* un *in vivo* [211, 212]. Šobrīd jau ir izstrādāti ārstnieciski preparāti ar plašu iedarbības spektru (piem., *Psoralen*, *Angelicin*, *Xanthotoxin*, *Bergapten*, *Nodakenetin*). Preparāts *Osthole* efektīvi inhibē krūts audzēja šūnu invāziju, migrāciju un MMP aktivitāti [213].

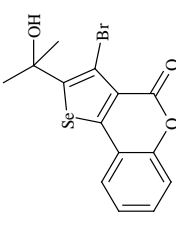
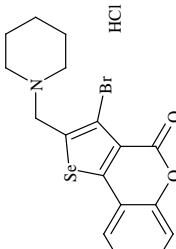
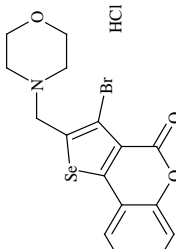
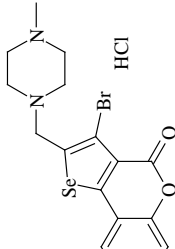
Eksperimentu rezultāti par selenofēn[2,3-*c*]- un [3,2-*c*]kumarīnu antiproliferatīvo efektu apkopoti 12. tabulā. Piecas audzēju šūnu līnijas un normālas šūnas NIH 3T3 neuzrādīja jutīgumu pret 3-bromo-2-(1-hidroksi-1-metileilselenofēn[3,2-*c*]hromen-4-onu (**75**), tomēr uz četrām audzēju līnijām citotoksiskais efekts tika novērots, tās ir: neiroblastoma SHSY5Y (LD₅₀=42 μM), plaušu karcinoma A549 (LD₅₀=92 μM), hepatoma HepG2 (LD₅₀=69 μM) un peļu sarkoma CCL6 (LD₅₀=47 μM). Zems citotoksiskais efekts uz pārbaudītajām šūnu līnijām novērots [2,3-*c*] analogam **79**, izņemot cilvēku fibrosarkomas HT-1080, peļu sarkomas CCL8 un peļu hepatomas MG-22A šūnas (IC₅₀=32÷36 μM). Piperidilmetil aizvietotam [3,2-*c*] reģioizomēram **76** ir augsts citotoksiskais efekts, līdzīgi kā savienojumam **75**, uz sarkomas HT-1080 un CCL8 šūnām (IC₅₀=34÷36 μM) un uz hepatomas MG-22A (IC₅₀=32 μM). [2,3-*c*] reģioizomērs (**80**) uzrāda augstu antiproliferatīvo efektu uz visām audzēju šūnu līnijām (IC₅₀=11÷39 μM), zemākais efekts ir uz normālām šūnām NIH 3T3 (IC₅₀=43 μM). Savienojumi ar morfolīna aizvietotāju (**77** un **81**) parādīja izteiktu citotoksiskā efekta selektivitāti uz dažām šūnu līnijām: abiem savienojumiem vidēji augsts efekts pret MDA-MB-435s (IC₅₀=48÷61 μM) un MCF-7 (IC₅₀=51÷71 μM). [2,3-*c*] reģioizomēram **81** augsts pret A549, SHSY5Y un CCL8 šūnām (IC₅₀=11÷14 μM) un zemāks [2,3-*c*] reģioizomēra **77** gadījumā uz šīm pašām šūnām (IC₅₀=43÷59 μM). Uz pārējām šūnu līnijām citotoksiskais efekts ir ļoti zems. Abi savienojumi (**77**, **81**) nav citotoksiski uz normālās šūnu līnijas NIH 3T3 un to bazālā toksicitāte ir zema (LD₅₀=1476÷2000 mg/kg). Daudzsološus rezultātus parādīja aminometilselenofēnkumarīni **78** un **82**. Abiem reģioizomēriem ir augsts citotoksiskais efekts uz visām testētajām audzēju šūnu līnijām (IC₅₀ =5÷48 μM). Augstāko efektu novērojām [2,3-*c*] reģioizomēram **82** uz sarkomas MES-SA (IC₅₀=5 μM). Savienojumu 2-morfol-4-ilmetil-3-(piridilamino)selenofēn[3,2-*c*]hromen-4-onu (**83-85**) rindā konstatēts, ka 2-piridilamino atvasinājumam **83** uz vairumu audzēju šūnu nav citotoksiskā efekta vai tas ir zems. Toties 3- un 4-piridilaminokumarīniem **84** un **85** ir augsts citotoksiskais efekts uz visām, tai skaitā uz normālām, šūnām (IC₅₀=9÷49 μM). Bazālā toksicitāte visiem savienojumiem ir zema (LD₅₀=484÷2000 mg/kg).

Selenofēhinolonu atvasinājumu antiproliferatīvais efekts uz dažādām šūnu līnijām *in vitro*

Nr.	Formula	IC ₅₀ , μM										Bazāla toksicitāte (LD ₅₀ mg/kg)
		MDA-MB-435s	MCF-7	MES-SA	HT-1080	A549	SHSY5Y	CLL8	NIH 3T3	MG-22A	HepG2	
71		12	13	6	16	32	34	18	24	12	19	522
72		96	82	52	54	39	48	90	41	35	64	522
73		>100	26	19	54	100	100	>100	32	5	5	906
74		72	42	36	41	48	100	81	50	30	>100	>2000

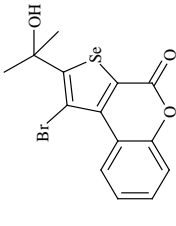
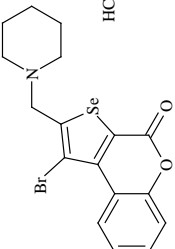
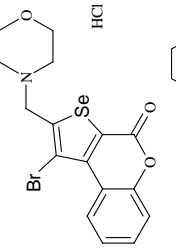
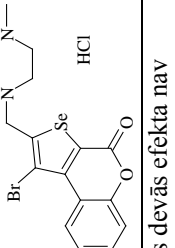
12. tabula

Selenofēn[3,2-c] un [2,3-c]kumarīnu atvasinājumu antiproliferatīvais efekts uz dažādām šūnu līnijām *in vitro*

Nr.	Formula	IC ₅₀ , μM										Bazālā toksicitāte (LD ₅₀ mg/kg)
		MDA-MB-435s	MCF-7	MES-SA	HT-1080	A549	SHSY5Y	CI8	NIH 3T3	MG-22A	HepG2	
75		*	*	*	*	92	42	47	*	*	69	>2000
76		*	*	*	*	100	100	47	*	27	*	>2000
77		61	51	*	*	45	59	43	100	100	100	1476
78		22	16	12	32	28	48	22	42	15	36	572

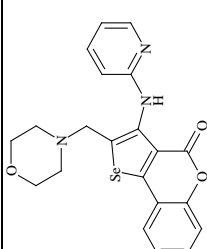
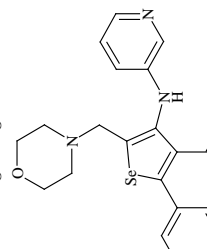
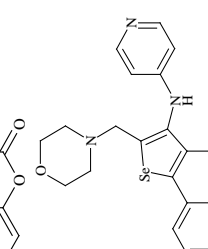
* - pārbaudītajās devās efekta nav

12. tabula. Turpinājums

Nr.	Formula	IC ₅₀ , μM									Bazālā toksicitāte (LD ₅₀ mg/kg)	
		MDA-MB-435s	MCF-7	MES-SA	HT-1080	A549	SHSY5Y	CCl8	NIH 3T3	MG-22A		HepG2
79		*	100	100	36	>100	*	34	100	32	100	>2000
80		20	19	12	21	38	20	11	43	13	39	660
81		48	71	*	*	11	13	14	>100	*	>100	>2000
82		17	17	5	20	27	22	17	21	12	27	334

* - pārbaudītajās devās efekta nav

12. tabula. Turpinājums

Nr.	Formula	IC ₅₀ , μM									Bazālā toksicitāte (LD ₅₀ mg/kg)	
		MDA-MB-435s	MCF-7	MES-SA	HT-1080	A549	SHSY5Y	CCL8	NIH 3T3	MG-22A		HepG2
83		*	81	89	100	nt	nt	*	31	58	74	>2000
84		16	19	18	49	17	16	37	13	36	705	
85		17	9	13	16	nt	nt	16	24	12	35	484

* - pārbaudītajās devās efekta nav; nt – nav testēts

Apkopojot iegūtos rezultātus, var secināt, ka selenofēnkumarīniem **75-85** ir izteikta selektīva iedarbība uz dažām audzēju šūnu līnijām un pārsvarā šie savienojumi nav citotoksiski uz normālām šūnām NIH 3T3. Augstāku antiproliferatīvo efektu parāda metilpirazolil aizvietotie savienojumi (**78, 82**) un 3- un 4-piridilaminokumarīni (**84, 85**). Bazālā toksicitāte selenofēnkumarīniem **75-85** ($LD_{50}=334\div 2000$ mg/kg) vairumā gadījumu ir par kārtu zemāka, nekā nātrija selenītam (**1**) ($LD_{50}=105$ mg/kg).

2.2.5. Selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu antiproliferatīvā efekta darbības mehānismi

Eksperimentos *in vitro* un *in vivo* par 85 selēnu saturošo savienojumu antiproliferatīvo efektu iegūtās struktūras – aktivitātes sakarības dod iespēju atlasīt bioloģiski aktīvākos savienojumus to darbības mehānismu turpmākajiem pētījumiem. Izvēlētajiem selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu atvasinājumiem ir augsta antiproliferatīvā aktivitāte uz pārbaudītajām audzēju šūnu līnijām un zems toksiskais efekts. Lai noskaidrotu iespējamās antiproliferatīvās darbības mehānismus tika veikti sekojoši pētījumi:

- a) noteikta savienojumu spēja inducēt apoptozi šūnās un ietekmēt ar apoptozes procesu saistītos faktorus;
- b) noteikta savienojumu spēja neitralizēt brīvos radikāļus, ietekmēt šūnu fermentatīvās antioksidatīvās sistēmas darbību un skābekļa aktīvās formas (SAF) līmeni šūnās;
- c) pārbaudīta savienojumu spēja regulēt matricas metaloproteīnāžu (MMP) aktivitāti un angiogēnēzi.

2.2.5.1. Apoptozes indukcija MCF-7 audzēju šūnās

Dzīvajos organismos šūnu apoptoze ir ieprogrammēta organisma šūnu bojāejas forma, kuras gaitā šūna sadalās ar membrānu pārklātos fragmentos, kurus tālāk spēj fagocitēt makrofāgi vai savām vajadzībām izmantot citas šūnas. Viena no galvenajām apoptozes funkcijām ir dzīvotnespējīgo (mutējošo, inficēto) šūnu likvidēšana, neizraisot iekaisumu. Audzēja šūnu spēja izvairīties no apoptozes un turpināt nekontrolēti dalīties, ir viena no galvenajām ļaundabīga audzēja šūnu pazīmēm un tāpēc savienojumu spēja inducēt audzēju šūnās apoptozi ir svarīgs pretvēža terapijas mērķis [214]. Cits šūnu bojāejas process – nekroze – notiek traumējot šūnas (mehāniski, ķīmiski) vai arī infekcijas gadījumā. Šūnas sabrūk un izplūdušais šūnu saturs izraisa iekaisumu apkārtējos audos [215].

MCF-7 šūnas tika audzētas 4 un 24 stundas selenofēnkumarīnu un selenofēnhinolonu atvasinājumu klātbūtnē. Apoptotisko un nekrotisko šūnu skaitu noteica veicot dubulto krāsošanu ar akridīnoranžo un etīdija bromīdu. Iegūtie rezultāti apkopoti 13. tabulā un 2.3. attēlā. Pētītie selenofēnhinoloni (**71-74**) izraisa apoptotisko šūnu skaita pieaugumu MCF-7

šūnu līnijā. Starp reģioizomēriem atrasta atšķirība procesa attīstības ātrumā: ar [3,2-*c*] reģioizomēriem (**71**, **73**) apoptotisko šūnu skaits pieaug līdz 20÷30% jau pēc 4 stundām, bet pēc 24 stundām visas šūnas iet bojā (2.3. att., B, C, F, G) ; savukārt ar [2,3-*c*] reģioizomēriem (**72**, **74**) šis process norit lēnāk - pēc 4 stundām apoptoze netika novērota, bet pēc 24 stundām apoptotisko šūnu skaits sasniedz 60÷78% (2.3. att., D, E, H, I). Ar apoptozes procesa ātruma atšķirību varētu izskaidrot arī atšķirīgu IC₅₀ reģioizomēru pāriem (**71**, **73** - IC₅₀=13 un 26 μM; **72**, **74** - IC₅₀=82 un 42 μM). Morfolīna atvasinājumi (**73**, **74**) neizsauc nekrotisko šūnu skaita palielināšanos.

13. tabula

Apoptotisko un nekrotisko MCF-7 šūnu skaita izmaiņas savienojumu ietekmē					
Nr.	IC ₅₀ , μM	4 st. inkubācija		24 st. inkubācija	
		Apoptoze, %	Nekroze, %	Apoptoze, %	Nekroze, %
kontrole	-	7±1	2±1	10±4	1±1
71	13	30±6*	39±7*	d	d
72	82	9±3	12±3*	78±13*	31±13*
73	26	20±4*	5±1	d	d
74	42	12±4	9±5	60±14*	8±6
75	*	12±3	2±1	nt	nt
76	*	17±4	7±3*	30±7*	3±2
77	51	30±6*	1±1	9±3	5±1
78	16	31±7*	25±4*	50±3*	1±1
79	100	11±2	3±4	13±6	1±1
80	19	8±2	1±1	31±1*	33±2*
81	71	15±7	1±1	12±2	1±0
82^a	17	41±16*	17±7*	d	d

Šūnas inkubēja ar savienojumiem devā 100 μM 4 un 24st.

a – 1 stundu inkubācija ar savienojumu, pēc 4 stundu inkubācijas visas šūnas iet bojā; d - visas šūnas iet bojā; nt – nav testēts, * - ttest p<0.005.

Selenofēnkumarīnu rindā četri savienojumi (**75**, **76**, **79**, **81**) neietekmē apoptotisko un nekrotisko šūnu skaitu. Aktīvākais savienojums apoptozes/nekrozes pētījumos ir N-metilpiperazilmetil kumarīns **82** (2.3. att., S, T). Apoptotisko šūnu skaits pieaug ļoti strauji - jau pēc 1 stundas tas sasniedz 41%, bet pēc 4 stundām visas šūnas iet bojā, toties [2,3-*c*] analoga **78** klātbūtnē efekts izpaužas lēnāk un pēc 4 stundām apoptotisko šūnu skaits ir 30%, bet pēc 24 stundām - 50% (2.3. att., N, O). Morfolil [2,3-*c*] reģioizomēram **77** apoptotisko šūnu skaits pēc 4 stundām pieaug līdz 30% un savienojums neietekmē nekrotisko šūnu skaitu

(2.3. att., L, M). Jāatzīmē, ka pēc 24 stundām apoptotisko šūnu skaits atgriežas normas robežās un, iespējams, ka šajā gadījumā šūnas adaptējas pret savienojuma iedarbību.

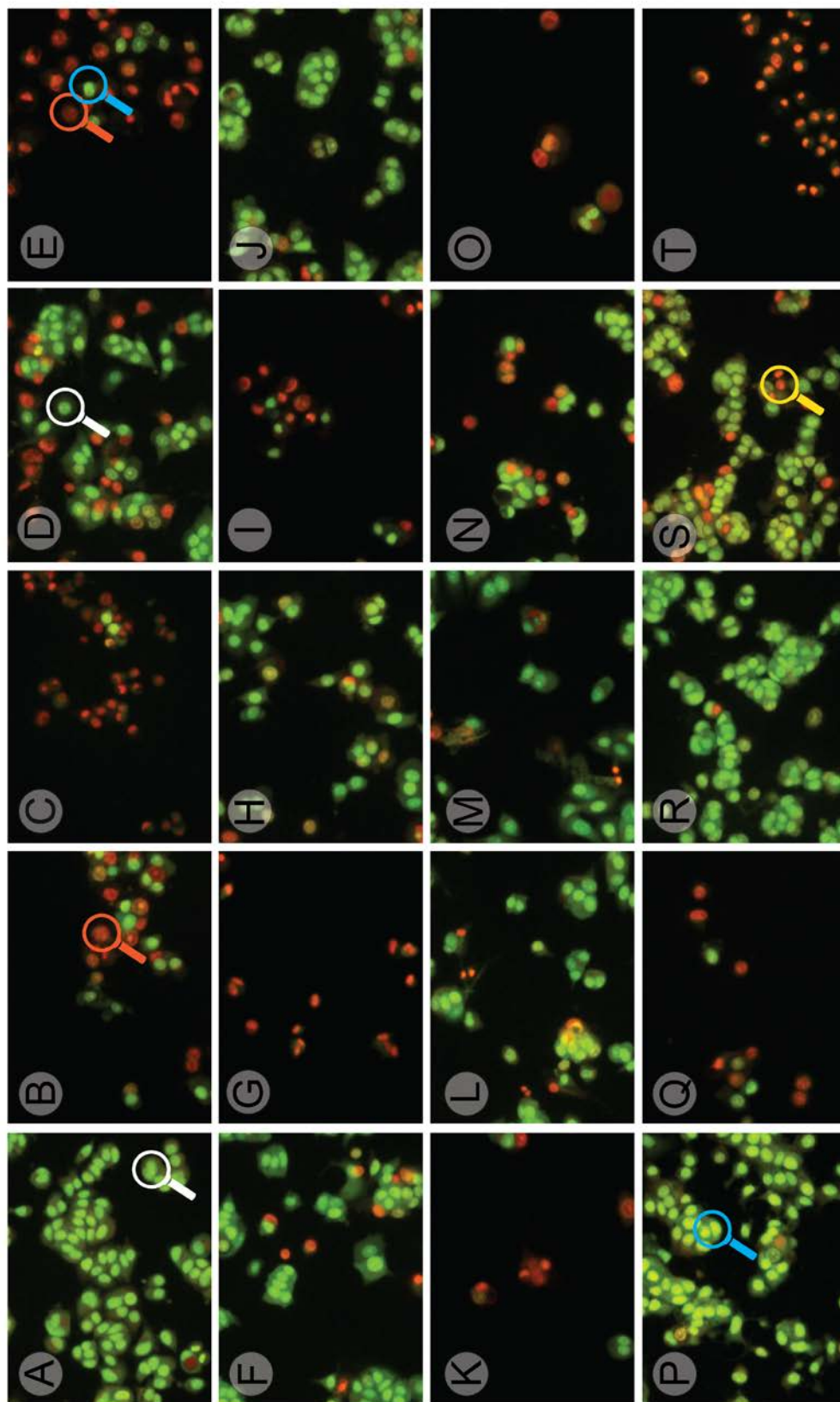
Lai noskaidrotu iespējamās apoptozes indukcijas ceļus, tika pārbaudīta savienojumu **71-74, 78, 82** ietekme uz vairāku kaspāžu aktivitāti MCF-7 audzēju šūnās. Kaspāžu aktivitāte ir viens no svarīgākajiem aspektiem apoptozes procesā.

Kaspāzes ietilpst aspartātatkarīgo cisteīna proteāžu fermentu grupā. Ir identificētas četrpadsmit dažādas kaspāzes, kuras, atkarībā no substrāta specifiskuma, var iedalīt trīs apakšgrupās: I grupa – kaspāze-1, 4, 5, 11, 12, 13 un 14, nozīmīgas iekaisuma procesos; II grupā - apoptozi iniciējošas kaspāzes (kaspāze-2, -8, -9 un -10), kuras aktivē III grupas efektorās kaspāzes (kaspāze-3, -6 un -7) [216, 217].

Aktīvākajiem savienojumiem **71-74, 78** un **82** tika noteikta ietekme uz kaspāžu -1, 2, 3/7, 4, 5, 6, 8, 9, 10 aktivitāti. Šūnas 4 stundas tika pakļautas savienojumu ietekmei (deva 100 μ M), un pēc tam noteikta kaspāžu aktivitāte. Iegūtie rezultāti ir apkopoti 14. tabulā. Selenofēn[3,2-*c*]hinoloni **71** un **73** izraisa kaspāzes-1 aktivāciju par 56 un 37%, bet reģioizomēriem **72** un **74** ir zemāks efekts – tikai par 27 un 15%. Selenofēnkumarīna metilpirazolila atvasinājumi **78** un **82** arī spēj aktivēt kaspāzi-1, attiecīgi par 23 un 38%.

Kaspāze-1 ir interleikīna-1 β (IL-1 β) konvertējošais ferments, tā katalizē neaktīvā IL-1 β prekursora konversiju aktīvā formā. Makrofāgos kaspāze-1 aktivē interleikīna-18 prekursoru (pro-IL-18), rezultātā veidojas IL-18, kurš stimulē interferona-gamma (INF- γ) sintēzi un FAS-liganda ekspresiju. Šie procesi nosaka kaspāzes-1 lomu, kas saistīta ar iekaisuma procesu regulāciju caur citokīniem [218]. Kaspāzes-1 deficīts izsauc pretiekaisuma citokīnu sintēzes supresiju un samazina iekaisuma reakciju [219]. Kaspāzes-1 aktivācija izsauc šūnu nāvi piroptozes ceļā (viens no programmētās šūnu nāves veidiem, kas ir saistīts ar organisma atbildi bakteriāla iekaisuma procesā). Piroptozes rezultātā notiek DNS sašķelšana, pretiekaisuma citokīnu aktivācija un šūnu iekšējais saturs izplūst starpšūnu telpā [220, 221], tātad selenofēnhinoloniem un selenofēnkumarīniem var prognozēt ietekmi uz iekaisumu procesiem organismā. Jāpiebilst, kā savienojumu reģioizomēriem efekts atšķiras.

Pārbaudītie savienojumi aktivē arī kaspāzi-2, kas ir viena no apoptozi iniciējošām kaspāzēm. Augstāku efektu izraisa [2,3-*c*] reģioizomēri un selenofēnhinoloniem efekts ir augstāks, nekā selenofēnkumarīniem (attiecīgi 22÷46% un 9÷21%). Apoptozi inducējošie faktori: DNS bojājumi, citoskeleta sabrukšana vai karstuma šoks, izraisa neaktīvās pro-kaspāzes-2 aktivāciju un tālāk caur virkni proteīnu tiek aktivēta prokaspāze-8 [222, 223]. Kaspāze-2 kalpo arī kā transportieris kaspāzei-3 no šūnas citozola uz kodolu [224], kā arī ir iesaistīta apoptozes indukcijas ceļā, kas izraisa citohroma C un citu mitohondriālo faktoru izplūšanu no mitohondrijiem [225].



2.3. attēls. Apoptotisko un nekrotisko MCF-7 šūnu skaits pēc 4 un 24 stundām inkubācijas ar savienojumiem Savienojuma koncentrācija 100 μ M. (A) – kontrole; (B) – 71, 4st.; (C) – 71, 24 st.; (D) – 72, 4st.; (E) – 72, 24 st.; (F) – 73, 4st.; (G) – 73, 24 st.; (H) – 74, 4st.; (I) – 74, 24 st.; (J) – 76, 4 st.; (K) – 76, 24 st.; (L) – 77, 4 st.; (M) – 77, 24, st.; (N) – 78, 4st.; (O) – 78, 24 st.; (P) – 80, 4 st.; (Q) – 80, 24 st.; (R) – 81, 24 st.; (S) – 82, 1 st.; (T) – 82, 4 st. Balts marķējums – normālās šūnas; zils – agrīnā apoptozes stādija; dzeltens –apoptozes beigu stādija; oranžs – nekrotiskas šūnas.

Kā redzams 14. tabulā, neviens savienojums neietekmē kaspāzi-8, bet notiek kaspāzes -3/7 aktivācija (testēšanas komplektā tiek izmantots substrāts, kuru spēj konvertēt abas kaspāzes). Zināms, ka MCF-7 šūnas neekspressē kaspāzi-3 un apoptoze norit secīgi aktivējot kaspāzes -9, -7 un -6 [226-229], tādējādi varam secināt, ka MCF-7 šūnās savienojumu ietekmē tiek aktivēta kaspāze-7. Piperidīna selenofēnhinolonu atvasinājumiem (**71**, **72**) ir visaugstākais efekts uz kaspāzi-2 - aktivācija sasniedz $52 \pm 170\%$. Arī šajā gadījumā novērojām atšķirīgu efektu dažādiem reģioizomēriem.

Apkopojot iegūtos datus par apoptozes indukciju MCF-7 šūnās var secināt, ka viens no pārbaudīto selenofēnhinolona un selenofēnkumarīna atvasinājumu iespējamajiem antiproliferatīvā efekta mehānismiem ir saistīts ar apoptozes indukciju audzēju šūnās un process norit aktivējot iniciējošo kaspāzi-2 un efektoro kaspāzi-7. Pārbaudītie savienojumi aktivē arī kaspāzi-1, kas saistīta ar iekaisuma procesu norisi organismā. Savienojumu izomērija ietekmē apoptozes attīstības ātrumu un pakāpi. Selenofēnhinoloniem ir raksturīga spēja inducēt apoptozes procesus audzēja šūnās un to reģioizomēru selektivitāte ir augstāka salīdzinot ar selenofēnkumarīnu reģioselectivitāti.

14. tabula

Kaspāzes aktivitāte MCF-7 šūnās savienojumu ietekmē (aktivitāte, %)

Nr.	Kaspāze								
	1	2	3/7	4	5	6	8	9	10
kontrolē	100±10	100±7	100±4	100±16	100±17	100±11	100±7	100±4	100±4
71	156±2	132±18	270±1	97±21	87±2	85±1	84±3	91±13	106±4
72	127±3	146±11	152±9	103±5	88±5	87±4	88±3	86±1	97±3
73	137±1	122±12	128±22	91±4	82±11	91±2	87±2	92±9	95±3
74	115±15	145±24	146±4	76±18	88±4	93±3	99±9	102±12	99±1
78	123±15	109±22	114±12	73±23	95±16	98±1	102±6	93±1	107±9
82	138±13	121±3	134±6	84±13	107±17	89±4	114±18	108±11	97±3

2.2.5.2. Savienojumu ietekme uz antioksidatīvo fermentu aktivitāti

Savienojumu antiproliferatīvā efekta darbības mehānisma noskaidrošanai veikti pētījumi par selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu spēju ietekmēt šūnu antioksidatīvo fermentu sistēmu darbību. Superoksīda dismutāze (SOD) un glutaciona peroksidāze (Gpx) šūnā veido antioksidantu fermentu grupu, kuras darbības rezultātā tiek līdzsvarots un regulēts SAF līmenis šūnās, tādējādi pasargājot tās no oksidatīvā stresa. Šo fermentu nelīdzsvarota vai nepilnīga darbība ir saistīta ar vairākiem patoloģiskiem stāvokļiem organismā, tai skaitā arī

audzēju attīstību. SOD katalizē superoksīda dismutāciju par skābekli un ūdeņraža peroksīdu, kurš tālāk ar Gpx palīdzību tiek pārveidots par ūdeni [230].

Šūnu oksidēšanas-reducēšanas līdzsvara regulācijā piedalās arī tioredoksīna reduktāze (TrxR), kas katalizē reducētā tioredoksīna veidošanos šūnās. Tioredoksīns ir iesaistīts vairākos svarīgos procesos - sākot no ribonukleotīdu reducēšanas par dezoksiribonukleotīdiem līdz ksenobiotiķu, oksidētāju un radikāļu detoksifikācijai šūnā [231].

Selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu ietekmes noteikšanai uz SOD fermenta aktivitāti izmantoti fermenti no dažādiem avotiem: attīrīts ferments no liellopu eritrocītiem (SOD_{eritrocītu}), MG-22A un HepG2 šūnu homogenātiem, kā arī peļu aknu homogenāta. 15. tabulā apkopoti iegūtie dati. Visi selenofēnhinolona atvasinājumi (**71-74**) inhibē SOD aktivitāti peļu aknu un peļu MG-22A šūnu homogenātā par 39÷89%, bet uz SOD no cilvēku HepG2 šūnām inhibējošais efekts ir tikai morfolīna atvasinājumiem **73** un **74**. Var secināt, ka selenofēnhinolona piperidīna atvasinājumi (**71, 72**) specifiski inhibē tieši SOD izoformu no peļu audiem. Salīdzinot reģioizomēru ietekmi, morfolīna atvasinājuma [3,2-*c*] reģioizomēra **74** efekts sasniedz pat 86%, bet [2,3-*c*] reģioizomēra **73** – tikai 26%. Uz attīrītā fermenta reģioizomēru selektīvā ietekme arī ir labi izteikta - [3,2-*c*] reģioizomēri **72** un **74** parāda augstāku inhibējošo efektu (attiecīgi 40 un 30%), nekā [2,3-*c*] reģioizomēri.

15. tabula

Selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu ietekme uz SOD aktivitāti

Nr.	SOD, inhibīcijas %			
	SOD _{eritrocītu}	HepG2 šūnu homogenāts	MG-22A šūnu homogenāts	Peļu aknu homogenāts
71	22 ±6	-9 ±10	32 ±5	68 ±15
72	40 ±12	-51 ±6	78 ±25	51±25
73	17 ±3	26 ±14	82 ±3	53 ±18
74	30 ±5	86 ±16	89 ±11	55 ±5
75	-8 ±17	2 ±6	20 ±2	29 ±4
76	20 ±4	18 ±13	-25 ±7	39 ±6
77	-1 ±10	-1 ±14	37 ±20	23 ±7
78	-20 ±12	-37 ±18	-9 ±12	-27 ±14
79	-11 ±4	5 ±8	42 ±5	9 ±12
80	-20 ±4	75 ±30	-6 ±10	25 ±9
81	13 ±6	-1 ±5	-23 ±14	-12 ±13
82	29 ±6	41 ±15	-2 ±8	34 ±9

Savienojumu koncentrācija 100 μM. “ – “ – fermenta aktivācija.

Selenofēnkumarīni neuzrāda ietekmi uz attīrītā SOD fermenta, izņemot **82** savienojumu, kuram novērojams neliels inhibējošs efekts (29%). SOD aktivitāti cilvēka hepatomas HepG2 šūnās inhibē tikai divi no savienojumiem: **80** un **82**, bet uz peļu hepatomas MG-22A šūnu SOD iedarbojas citi atvasinājumi: **77** un **79**, tomēr kopumā selenofēnkumarīnu ietekme uz SOD aktivitāti ir neliela vai nav novērojama.

Savienojumu ietekme uz glutaciona peroksidāzes aktivitāti tika pārbaudīta hepatomas MG-22A un HepG2 šūnu homogenātos un peļu aknu homogenātā, kā peroksīda avots tika izmantots *t*-butilhidroperoksīds (TBH). Rezultāti apkopoti 16. tabulā.

Visi selenofēnhinoloni un selenofēnkumarīni inhibē Gpx aktivitāti cilvēku HepG2 šūnu homogenātā no 53 līdz 100%. Uz Gpx no peļu hepatomas MG-22A šūnām tikai diviem savienojumiem (**75** un **77**) nav inhibējošā efekta, pārējie savienojumi inhibē Gpx par 44÷100%. Interesanti, ka praktiski visi savienojumi neietekmē peļu aknu Gpx aktivitāti (homogenāts iegūts no veselīgiem dzīvniekiem) un tikai savienojumam **80** ir inhibējošs efekts (37%). Iegūtie dati ļauj izdarīt secinājumus, ka selenofēnhinoloniem un selenofēnkumarīniem varētu būt selektīva iedarbība uz audzēju šūnās esošām glutaciona peroksidāzes izoformām.

16. tabula

Selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu ietekme uz Gpx un TrxR aktivitāti

Nr.	Gpx, inhibīcijas %			TrxR, inhibīcijas %
	HepG2 šūnu homogenāts	MG-22A šūnu homogenāts	Peļu aknu homogenāts	HepG2 šūnu homogenāts
71	93 ±10	89 ±4	12 ±0	56 ±2
72	98 ±6	100 ±0	26 ±4	84 ±8
73	59 ±9	65 ±6	1 ±1	68 ±15
74	63 ±9	44 ±16	21 ±15	96 ±2
75	98 ±4	-29 ±12	14 ±1	47 ±5
76	100 ±5	75 ±12	21 ±11	57 ±8
77	82 ±19	65 ±12	5 ±12	69 ±2
78	53 ±11	53 ±18	4 ±13	52 ±4
79	96 ±7	62 ±1	11 ±10	54 ±12
80	85 ±17	63 ±6	37 ±15	19 ±13
81	72 ±7	64 ±18	19 ±16	-8 ±7
82	81 ±21	-27 ±17	17 ±14	10 ±5

Savienojumu koncentrācija 100 μM. “ – “ – fermenta aktivācija.

Savienojumu ietekme uz tioredoksīna reduktāzes aktivitāti noteikta hepatomas HepG2 šūnu homogenātā. Rezultāti apkopoti 16. tabulā. Visi selenofēnhinoloni (**71-74**) inhibē TrxR aktivitāti, novērota izteiktā efekta atšķirība starp [3,2-*c*] un [2,3-*c*] reģioizomēriem. Inhibīcija efektīvāka ir ar [3,2-*c*] reģioizomēriem (**72, 74**) - tā sasniedz 84 un 96%, bet ar [2,3-*c*] reģioizomēriem (**71, 73**) – 56 un 68%.

Izteiktā selektīva iedarbība uz TrxR ir arī starp selenofēnkumarīnu reģioizomēriem, izņemot atvasinājumus ar 1-hidroksi-1-metiletil aizvietotāju (**75, 79**), kuriem nav atšķirības starp reģioizomēriem un inhibīcija abos gadījumos ir 50%. Pārējo savienojumu [3,2-*c*] reģioizomēri (**76-78**) TrxR aktivitāti inhibē par 52–69%, bet [2,3-*c*] analogiem efekts nav novērots.

2.2.5.3. Selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu brīvo radikāļu neitralizēšanas spēja

Dažādu bioķīmisko reakciju rezultātā organismā nepārtraukti veidojas brīvie radikāļi. Viena no aizsardzības sistēmām, kas pasargā organismu no brīvo radikāļu ietekmes, ir nefermentatīva antioksidatīvā aizsardzības sistēma. Tās sastāvā ietilpst A, C un E vitamīni, glutations (GSH), β -karotīns, urīnskābe, tioktīnskābe, ubikvīnons (koenzīms Q10). Atbilstoši literatūras datiem vairākiem selēnu saturošiem savienojumiem ir pierādīta spēja neitralizēt brīvos radikāļus, piemēram, Ebselēnam [232].

Lai pierādītu selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu spēju neitralizēt brīvos radikāļus, noteikta to spēja neitralizēt superoksīda un peroksila radikāļus (ROO[•]). Superoksīda noteikšanas metode [233] ir balstīta uz superoksīda ģenerāciju PMS-NADH sistēmā. NADH tiek oksidēts, bet krāsviela nitrotetrazolijs zilais (NBT) tiek reducēta krāsainā formā. Savienojumu spēja neitralizēt peroksila radikāļi noteikta ar ORAC metodi [234]. Peroksila radikālis reaģē ar fluorescento krāsvielu un rezultātā veidojas nefluorescējošs produkts. Savienojuma spēja inhibēt šo reakciju dod iespēju novērtēt tā spēju neitralizēt peroksila radikāļus.

Literatūrā ir aprakstīta selēnu saturošu savienojumu spēja ģenerēt superoksīdu, oksidējot GSH. Superoksīda koncentrācijas detektēšana notiek ar lucigenīna palīdzību [235]. Izmantojot šo testu var spriest par savienojumu prooksidanta īpašībām.

Iegūtie rezultāti par savienojumu spēju neitralizēt brīvos radikāļus un ģenerēt superoksīdu apkopoti 17. tabulā. Peroksila radikāļus spēj neitralizēt selenofēnhinolona piperidīna atvasinājumi (**71, 72**), IC₅₀ attiecīgi ir 780 un 560 μ M. Nomainot aizvietotāju ar morfolīnu, [3,2-*c*] reģioizomēram (**73**) šīs spējas zūd, bet [2,3-*c*] reģioizomēram (**74**) – pastiprinās (IC₅₀=163 μ M). Ar superoksīdu reaģē tikai selenofēnhinolonu [3,2-*c*] reģioizomēri un savienojumam ar morfolīnu (**73**) efekts ir augstāks (IC₅₀=550 μ M). Salīdzinājumam testēto

Se-metionīna un 7-hidroksikumarīna spējas saistīt peroksila radikāli ir daudz augstākas ($IC_{50}=2\div 6 \mu M$).

Kaut gan abi 1-hidroksi-1-metiletil reģioizomēri **75** un **79** nespēj saistīt peroksila radikāli, pārējie selenofēnkumarīnu atvasinājumi spēj neitralizēt peroksila radikāli un augstākais efekts piemīt piperidīna atvasinājumiem (**78**, **82**), IC_{50} attiecīgi ir 87 un 62 μM . Piridilaminokumarīni **83-85** arī spēj neitralizēt superoksīdu un savienojuma **84** spēja saistīt peroksila radikāli ir visefektīvākā ($IC_{50} = 4 \mu M$), kas ir līdzīgi kā 7-hidroksikumarīnam un Se-metionīnam.

Spēju ģenerēt superoksīdu *in vitro*, oksidējot GSH, parādīja tikai trīs savienojumi: 1-hidroksi-1-metiletil)selenofēnkumarīni **75**, **79** un 3-piridilaminokumarīns **84**. Citotoksicitātes testos *in vitro* savienojumiem **75**, **79** uz vairākām šūnu līnijām ir zems citotoksiskais efekts vai tā nav (skat. 12. tab.). Kā viens no iespējamiem iemesliem šim apstāklim varētu būt saistīts ar šo savienojumu prooksidatīvajām īpašībām un nespēju saistīt brīvos radikāļus. Savienojumam **84** ir augsts citotoksiskais efekts ($IC_{50}=13\div 49 \mu M$) un tas ir ne tikai prooksidants, bet arī efektīvi neitralizē superoksīdu un peroksila radikāļus.

17. tabula

Selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu spēja neitralizēt brīvos radikāļus un ģenerēt superoksīdu

Nr.	$IC_{50}, \mu M$		Superoksīda ģenerācija, RFV
	Superoksīds	Peroksila radikālis	
Se-metionīns kumarīns	>1000	6	-
7-hidroksikumarīns	-	>1000	-
71	60	2	-
72	>1000	780	-
73	-	560	-
74	550	-	-
75	-	163	-
76	-	-	627
77	710	598	-
78	>1000	398	-
79	-	87	-
80	-	-	950
81	>1000	320	-
82	>1000	1000	-
83	260	62	-
84	1000	nt	-
85	160	4	1875
	500	nt	-

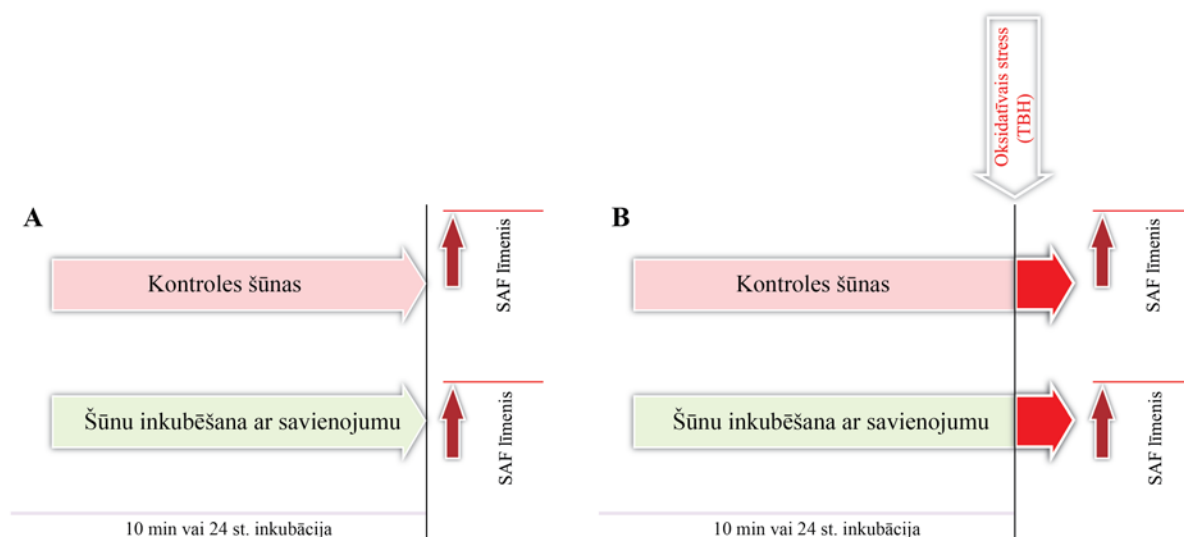
“-” – nav efekta; nt - nav testēts

2.2.5.4. Savienojumu ietekme uz SAF līmeni audzēju šūnās *in vitro*

Skābekļa aktīvās formas (SAF) normālos bioloģiskos procesos šūnās veidojas nelielā daudzumā un tam ir svarīga loma iekššūnu signālu pārraidē un homeostāzē [236]. Lai noteiktu

savienojumu ietekmi uz SAF (hidroksila, peroksila u.c. radikāļi) līmeni šūnās, tika izmantota fluorescējoša krāsviela 2',7'-dihlorfluoresceīna diacetāts (DCFDA). Ar iekššūnas esterāžu palīdzību DCFDA procesa gaitā tiek deacilēts līdz nefluorescējošam savienojumam, kurš reaģējot ar SAF oksidējas par fluorescējošo 2',7'-dihlorfluoresceīnu (DCF).

Lai iegūtu pilnīgu informāciju par savienojumu ietekmi uz SAF līmeni šūnā izmantotas divas eksperimenta shēmas (2.4.att.). Pirmajā variantā, shēma **A** - šūnas inkubētas ar savienojumiem 10 min vai 24 stundas un pēc inkubācijas mērīts SAF līmenis šūnās. Iegūtie rezultāti dod priekšstatu par savienojuma spēju ietekmēt SAF līmeni šūnās un izraisīt oksidatīvo stresu. Pēc otras shēmas **B** - šūnas vispirms inkubētas ar savienojumiem 10 min vai 24 stundas un pēc inkubācijas tika izraisīts šūnās oksidatīvais stress, kā peroksīda avotu izmantojot t-butilhidroperoksīdu (TBH). Šūnas atbilde uz stimulāciju ar peroksīdu ir SAF līmeņa pieaugums. Šī eksperimenta shēma parāda savienojumu spēju modulēt šūnas izturību pret izraisīto oksidatīvo stresu.



2.4. attēls. SAF līmeņa noteikšanas shēma

A – savienojuma ietekme uz SAF līmeni; B - savienojumu spēja modulēt šūnas atbildi uz stimulāciju ar peroksīdu.

Iegūtie rezultāti par SAF līmeņa izmaiņām savienojumu ietekmē apkopoti 18. tabulā un 2.5. attēlā. Pēc 10 min inkubācijas strauju SAF līmeņa kāpumu peļu hepatomas MG-22A un cilvēka krūts audzēju MCF-7 šūnās izraisa tikai savienojums **82**, attiecīgi 158 % un 152% (2.3.att., shēma A). Kā atzīmēts iepriekš, savienojums **82** vienīgais no selenofēnkumarīniem izraisa ātru šūnu bojāeju apoptozes ceļā jau pēc 4 stundām. Interesanti, ka ar savienojumu **82** apstrādātajās MG-22A un MCF-7 šūnās, pēc stimulācijas ar peroksīdu (2.4. att., shēma B), SAF līmenis pieaug attiecīgi par 59% un 100% mazāk nekā kontroles šūnās. Iespējams, ka

pats savienojums izsauc maksimālo oksidatīvo stresu un papildus stimulācija ar peroksīdu nespēj izsaukt tik pat lielu atbildi kā kontroles šūnās. Lai noskaidroti ilgstošu savienojuma **82** efektu uz SAF līmeni, šūnas tika audzētas 24 stundas ar savienojumu devā 25 μM (pēc 4 stundām ar **82** savienojumu devā 100 μM iet bojā). Rezultātā novērots, ka SAF līmenis samazinājies par 66% uz peļu hepatomas MG-22A un par 95% uz cilvēka hepatomas HepG2 šūnām, tādējādi var secināt, ka HepG2 šūnās SAF veidošanās ir pilnībā bloķēta, turklāt ir traucēta arī šūnu spēja atbildēt uz ārējo stimulatoru (peroksīdu). Hepatomu MG-22A un HepG2 šūnās, kas tika inkubētas ar savienojumu 24 stundas, SAF līmeņa kāpums pēc peroksīda pievienošanas ir zemāks kā neapstrādātajām kontroles šūnām, attiecīgi par 95% un 68%. Interesanti, ka SAF līmenis MCF-7 šūnās pēc 24 stundu ietekmes neatšķirās no kontroles šūnām, atšķirībā no hepatomas šūnām.

Savienojuma **82** [3,2-*c*] reģioizomērs **78**, pēc 10 min inkubācijas ar MG-22A šūnām, neietekmē SAF līmeni, bet šūnu atbildi uz peroksīdu samazina tikai par 24%. MCF-7 šūnās novērots SAF līmeņa pieaugums par 38% un šūnu atbilde uz stimulāciju arī ir augstāka par 35%, toties ilgstošā savienojuma ietekmē (24 st.) izraisa MCF-7 un MG-22A šūnās SAF līmeņa kritumu A un B eksperimenta variantos par 29÷87%. Cilvēka hepatomas HepG2 šūnās **78** savienojums SAF līmeni neietekmē.

Analizējot iegūtos rezultātus, var atzīmēt divas likumsakarības, kas labi redzamas 2.4. attēlā. Pirmkārt – savienojumu reģioizomēriem ir atšķirīgs modulējošs efekts attiecībā pret SAF līmeni šūnā. Otrkārt – reģioizomēru ietekme ir atšķirīga uz peļu un cilvēku hepatomas šūnām (sugu specifiskums) un ir novērojama ietekmes atšķirība starp cilvēka hepatomas un krūts vēža šūnām (audu specifiskums).

Selenofēnkumarīnu sērijas savienojumu ietekme uz hepatomas HepG2 šūnām ir augstāka nekā uz krūts audzēja MCF-7 šūnām, kas var būt izskaidrojams ar augstāku oksidēšanas-reducēšanas fermentu aktivitāti un daudzumu hepatocītos salīdzinājuma ar krūts audiem. Savienojumiem ar metilpirazolil (**78**, **82**) aizvietotājiem modulējošais efekts uz SAF līmeni ir visaugstākais - SAF veidošanās šūnās tiek bloķēta dažos gadījumos līdz pat 87÷92%. Piperidīna aizvietotiem savienojumiem (**76**, **80**) efekts jau ir zemāks, maksimālais inhibīcijas efekts sasniedz tikai 52%. Savienojumi ar metilpirazolīla (**78**, **82**), kā arī ar piperidīna (**76**, **80**) aizvietotāju par 35÷95% bloķē šūnu atbildi uz stimulāciju. Ievadot molekulā morfolīnu (**77**, **81**) tiek panākts pretējs efekts, bet viens no reģioizomēriem pēc 24 stundām izraisa SAF daudzuma pieaugumu cilvēka šūnu kultūrās par 71÷77%. Turklāt, uz hepatomas HepG2 šūnām tas ir [2,3-*c*]-, bet uz krūts audzēja MCF-7 šūnām - [3,2-*c*]-reģioizomērs.

SAF līmenis MCF-7, MG-22A un HepG2 šūnās, inhibīcija (%)

Nr.	MCF-7						MG-22A						HepG2	
	10 min inkubācija			24 st. inkubācija			10 min inkubācija			24 st. inkubācija			24 st. inkubācija	
	SAF	SAF -TBH	SAF	SAF -TBH	SAF	SAF -TBH	SAF	SAF -TBH	SAF	SAF -TBH	SAF	SAF -TBH	SAF	SAF -TBH
71	2±6	62±12	25±5	47±7	10±7	27±12	61±12	80±5	76±13	60±14				
72	3±9	33±16	44±16	36±3	2±5	25±10	13±2	25±9	61±17	66±11				
73	-30±14	-22±8	31±17	64±9	15±7	10±14	59±16	82±15	47±11	40±2				
74	15±12	18±17	16±9	60±7	28±17	32±2	-14±4	-18±2	-57±10	31±10				
75	nt	nt	-3±12	2±7	nt	nt	-28±10	-48±7	-17±13	-91±3				
76	6±5	45±12	15±4	-7±11	28±10	-16±11	37±13	59±8	37±9	40±13				
77	-36±12	-48±4	-71±4	31±12	21±12	31±5	20±12	60±8	11±5	35±6				
78	-38±2	-35±11	35±2	29±10	-7±6	24±10	55±8	87±6	24±18	-6±17				
79	nt	nt	11±15	24±17	nt	nt	-75±10	21±10	47±5	21±9				
80	-11±7	9±14	19±16	-1±11	4±3	0±5	53±7	92±8	8±14	67±9				
81	-6±11	9±15	22±10	-29±9	-13±3	11±12	5±16	-9±12	-77±15	24±10				
82	-152±13	100±15	-5±4	23±6	-158±10	59±7	66±3	95±11	92±6	68±1				
83	nt	nt	10±6	38±3	nt	nt	14±9	53±14	nt	nt				
84	nt	nt	17±5	48±7	nt	nt	21±9	27±9	39±4	33±2				
85	nt	nt	62±12	84±7	nt	nt	58±5	34±7	61±14	51±4				
Se-metionīns	nt	nt	-46±8	-2±3	nt	nt	-20±7	-24±8	-45±8	29±6				
7-hidroksikumarīns	nt	nt	-8±7	-69±16	nt	nt	-19±10	-16±2	19±7	-37±8				

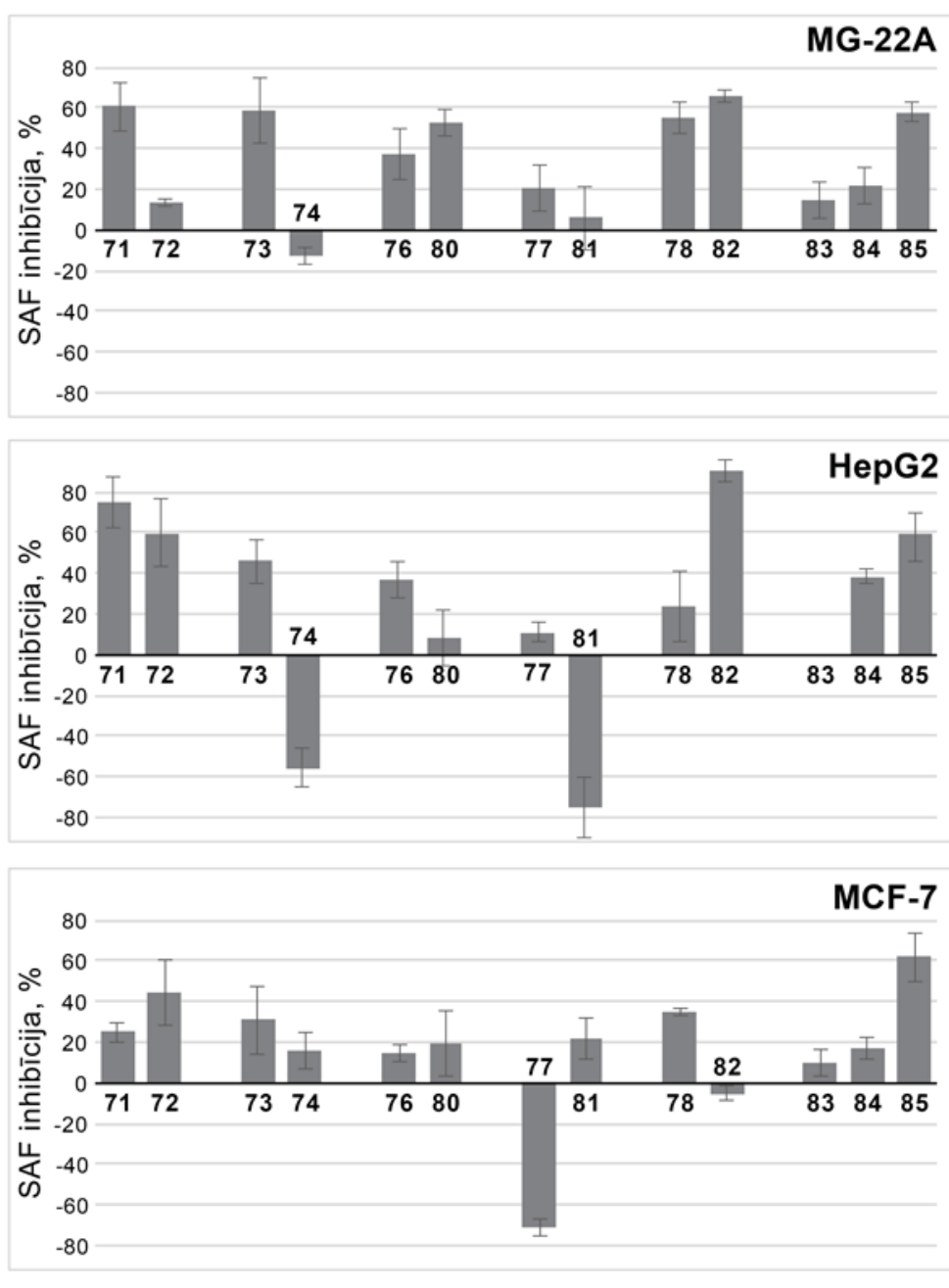
Savienojumu ietekme pārbaudīta devā 100 µM, pēc 10 min un 24 st. inkubācijas;

c - savienojumu ietekme pārbaudīta ar devu 25 µM, jo ar devu 100 µM pēc 4 st. visas šūnas gājušas bojā;

SAF – skābekļa aktīvo formu daudzuma inhibīcija, salīdzinot ar kontroles šūnām (2.4. att., shēma A);

SAF-TBH - skābekļa aktīvo formu līmeņa pieauguma inhibīcija pēc stimulācijas ar t-butilhidroperoksīdu, salīdzinot ar kontroles šūnām (2.4. att., shēma B);

“ - “ – SAF līmeņa pieaugums; nt - nav testēts.



2.5. attēls. SAF līmenis šūnās pēc 24 stundu apstrādes ar savienojumiem

SAF līmeņa pieauguma inhibīcija (%) salīdzinot ar kontroles šūnām.

Selenofēn[3,2-*c*]hinolonu atvasinājumu **71** un **73** ilgstoša ietekme uz šūnām samazina SAF līmeni pārbaudītajās šūnu līnijās, SAF veidošanās šūnās tiek bloķēta par 25-76%. Piperidil [2,3-*c*] analogam **72** uz cilvēka šūnu līnijām ir līdzīgs efekts, bet uz peļu šūnu līnijas efekta nav. Jāpiebilst, kā morfolil[2,3-*c*]hinolons **74** nespēj ietekmēt SAF līmeni šūnās, izņemot cilvēka hepatomas šūnas HepG2, kurās efekts ir pretējs nekā **73** savienojumam, SAF daudzums pieaug par 57%.

Sekojoša likumsakarība konstatēta 2-morfol-4-ilmetil-3-(piperidilamino) selenofēn[3,2-*c*]hromen-4-onu (**83-85**) rindā. Savienojumi bloķē SAF veidošanos visās šūnu līnijās un šūnu

spēju atbildēt uz ārējo stimulu (peroksīdu). Efekts pieaug rindā: 2-piridilamino (**83**) < 3-piridilamino (**84**) < 4-piridilaminokumarīns (**85**). Visaugstākais efekts ir **85** savienojumam: SAF līmenis bloķēts par 58÷62% un šūnu spēja atbildēt uz ārējo stimulu – par 34÷84%.

Analizējot iegūtos rezultātus, var secināt, ka selenofēnhinoloni un selenofēnkumarīni ar augstu citotoksisko efektu pārsvarā samazina vai pilnībā bloķē SAF veidošanos šūnās, kā arī samazina šūnu atbildi uz ārējo stresa signālu. Se-metionīnam, 7-hidroksikumarīnam un citotoksiski neaktīvajiem 1-hidroksi-(1-metiletil)selenofēnkumarīniem (**75**, **79**) šāda efekta nav.

Pēdējos gados tiek uzsvērts, ka SAF spēlē ne tikai destruktīvu lomu, bet fizioloģiskos daudzumos ir ārkārtīgi nepieciešams šūnu dzīvotspējai. Ūdeņraža peroksīds augstā koncentrācijā izraisa šūnu nāvi, bet zemā koncentrācijā darbojās kā iekššūnu signālmolekula [237, 238]. H₂O₂ citozolā veicina tirozīna fosforilēšanos, kā rezultātā tirozīna fosfatāze tiek inaktivēta un vienlaikus aktivēta tirozīnkināze [239].

Pārbaudīto selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu citotoksiskā efekta mehānisms ir saistīts nevis ar SAF līmeņa pieaugumu un oksidatīvo stresu, kas noved pie apoptozes, bet ar ekstremālu SAF līmeņa samazināšanos šūnās, kā rezultātā tiek traucēti signālceļi, kuros ir iesaistīti superoksīds un ūdeņraža peroksīds, rezultātā šūna iet bojā apoptozes ceļā. Literatūrā ir parādīts, ka kaspāzes-1 aktivācija samazina mitohondriju elpošanu un SAF līmeni hepatocītos [240]. No eksperimentos iegūtajiem datiem var secināt, ka savienojumi izsauc kaspāzes-1 aktivāciju un tas, iespējams, ir viens no mehānismiem, kas rezultātā noved pie SAF līmeņa samazināšanās. SOD inhibīcija un savienojumu spēja neitralizēt brīvos radikāļus, it īpaši peroksila radikāļi, vēl vairāk pazemina SAF līmeni. Līdzīgs efekts, kad zems SAF līmenis ir par iemeslu šūnu apoptozei, atklāts dihidromiricētīnam uz HepG2 šūnām. Autori konstatēja, ka pievienojot nelielu H₂O₂ daudzumu vienlaikus ar dihidromiricētīnu, apoptoze šūnās neattīstās [241].

2.2.5.5. Savienojumu ietekme uz matriksa metaloproteīnāžu (MMP) aktivitāti un angiogēzi

Ārstējot audzējus ir svarīgi ne tikai inhibēt vēžu šūnu proliferāciju, bet arī ietekmēt procesus, kas ir saistīti ar audzēju šūnu invāziju un audzēja attīstīšanos. MMP spēlē svarīgu lomu audzēju šūnu invāzijas un metastazēšanās procesā [242].

MMP aktivitātes noteikšanai tika izmantots “MMP Inhibitor Profiling Kit” (BIOMOL). Testēšanas komplekts satur sekojošas metaloproteīnāžu izoformas: MMP-1 – kolagenāze-1, MMP-2 – želatināze-A, MMP-3 – stromlizīns-1, MMP-7 – matrilizīns-1, MMP-8 – kolagenāze-2, MMP-9 – želatināze-B, MMP-10 – stromlizīns-1, MMP-12 – makrofāgu

metaloproteāze, MMP-13 – kolagenāze-3, MMP-14 – membrānas 1-tipa matriksa MMP. NNGH (*N*-izobutil-*N*-(4-metoksifenilsulfonil)glicilhidroksāmskābe) tika izmantots kā standarta inhibitors.

Matriksa metaloproteāzes ietilpst kalcija atkarīgo Zn-saturošo endopeptidāžu grupā, kas atbild par starpšūnu matriksa veidošanu un pārbūvi. Normālos fizioloģiskajos apstākļos šo fermentu ekspresija organismā ir minimāla. Fermentu hiperekspresija ir novērojama patoloģiskos organisma stāvokļos, tai skaitā onkoloģisko saslimšanu gadījumos. Klīniskie un preklīniskie pētījumi ir devuši pozitīvus rezultātus šo fermentu inhibitoru kā pretvēža aģentu izmantošanā. Matriksa metaloproteāžu inhibitoru izmantošana ir viens no mūsdienu pretvēža terapijas virzieniem.

MMP – 2, 7, 9, 13, 12, 14 ir proteolītiskie fermenti, kas atbild par ekstracelulārā matriksa degradāciju dažādu patoloģiju gadījumos, ieskaitot audzēja invāziju un metastazēšanas procesus. MMP-7 ekspresija prostatas dziedzerā epitēlijā, aizkuņģa dziedzerī, zarnu traktā u.c., kā arī hiperekspresija vairākos audzējos. MMP-1 atbild par 2. tipa kolagēna degradāciju un piedalās reimatoīdā artrīta attīstības procesā. Šis ferments tiek producēts fibroblastos, bet audzējos notiek tā hiperekspresija. MMP-3 un MMP-10 ir prokolagenāzes ar augstu aktivitāti, kas piedalās skrimšļaudu degradācijā, kas noved pie audu sabrukšanas artrīta gadījumā. MMP-8 sagrauj kolagēnu un piedalās daudzos iekaisuma procesos [243-245].

Angioģenēze ir fizioloģisks process organismā, kad veidojas jauni asinsvadi. Audzēja attīstīšanās un augšanas gadījumā audzēja šūnas izdala augšanas faktorus, kas stimulē angioģenēzi un jaunizveidotie kapilāri nodrošina audzēja vielmaiņu [246]. Savienojumu spēja inhibēt MMP aktivitātes un to ietekme uz angioģenēzi tika pētīta *in vitro* un *in vivo*.

Angioģenēzes pētījumos *in vitro* tika izmantota cilvēka nabas saites vēnas endotēlija šūnu līnija (HUVEC-2). Kapilāru tīkla struktūras veidošanos novēroja, audzējot endotēlija šūnas uz ekstracelulāra matriksa (matrigēls).

Savienojumu ietekme uz angioģenēzi *in vivo* pētīta izmantojot peļu modeļa sistēmu ar matrigēlu. Darbam *in vivo* tika izmantots ekstracelulārs matrikss (BD MatrigelTM Basement Membrane Matrix High Concentration) uz Balb/c AnNCrl peļu mātītēm. Pelēm zem ādas tika ievadīts matrigēls, kas sajaukts ar augšanas faktoriem un testējamo savienojumu, un novērots kapilāru veidošanās matrigēla slānī.

19. tabula.

Savienojumu ietekme uz MMP aktivitāti un angiogēnēzi

Nr.	Inhibīcija, %														Angiogēnēze, inhibīcijas %	
	MMP 1	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8	MMP 9	MMP 10	MMP 12	MMP 13	MMP 14	<i>In vitro</i>	<i>In vivo</i>				
NNGH	100	100	100	14.0	100	100	100	100	100	100	100	100	-	-		
71	0	0	0	1.1	0	0	0	3.5	0.6	8.4	-	-	-	-		
72	7.8	0	1.6	4.4	0	2.7	5.4	0	0	21.4	-	-	-	-		
73	0	16.0	6.7	8.1	0	0	9.1	0	14.0	7.9	-	-	-	-		
74	11.4	0	3.2	19.5	5.4	4.0	7.0	0	0	18.8	-	-	-	-		
75	0	0	1.7	13.7	3.8	9.3	0	0	9.1	0	-	-	-	-		
76	0.9	10.8	4.5	7.3	0	1.5	1.5	0	6.1	11.9	-	-	-	-		
77	0	0	0	4.2	0	0	0	0	6.6	8.5	-	-	-	-		
78	0	0	0	6.5	0	2.4	0	0	7.0	13.7	-	-	-	-		
79	3.9	0.5	12.5	4.2	0	14.0	9.2	6.0	12.7	8.7	-	-	-	-		
80	8.5	9.0	9.4	3.1	0	10.6	11.3	11.6	8.1	19.3	-	-	-	-		
81	4.5	0	7.5	2.0	0	7.8	6.5	8.7	23.2	7.3	-	-	-	-		
82	10.1	14.7	10.0	6.4	0	11.2	14.0	13.3	12.2	33.5	84±14	30±4	-	-		
83	13.6	31.9	13.4	10.7	16.9	12.7	12.8	12.2	10.6	21.6	3±1	36±8	-	-		
84	18.5	26.4	14.1	14.2	15.4	15.3	16.3	13.8	23.7	24.6	-	-	-	-		
85	12.0	54.0	15.8	12.3	12.4	17.0	12.6	14.9	14.9	40.0	95±7	9±4	-	-		

Rezultāti par savienojumu ietekmi uz MMP un angioģenēzi apkopoti 19. tabulā. Pēc iegūtajiem datiem, tikai trīs savienojumi inhibē MMP (inhibīcija tiek uzskatīta par novērojamu, ja tā sasniedz >30%) - un tie ir selenofēnkumarīni.

Savienojums **82** selektīvi inhibē tikai MMP14 (33%), kā arī tam ir augsts inhibējošs efekts uz angioģenēzes procesu: par 84% *in vitro* un par 30% *in vivo*. Savienojums **83** inhibē MMP2 par 32%, pilnīgi neietekmē angioģenēzes procesus *in vitro*, bet *in vivo* inhibīcijas efekts sasniedz 36%. Savienojums **85** inhibē MMP2 par 54% un MMP14 par 40%. Nosakot ietekmi uz angioģenēzi, savienojumam **85** novēro pretēju efektu kā savienojumam **83** - *in vitro* inhibīcija sasniedz 95%, bet *in vivo* efekta nav.

Apkopojot visus pētījumus par iespējamām selenofēnhinoloni un selenofēnkumarīnu antiproliferatīvā efekta darbības mehānismiem, var secināt sekojošo:

- a) viens no iespējamajiem antiproliferatīvā efekta mehānismiem ir saistīts ar apoptozes indukciju audzēju šūnās un process norit aktivējot iniciējošo kaspāzi-2 un efektoro kaspāzi-7;
- b) selenofēnhinoloniem un selenofēnkumarīniem var prognozēt ietekmi uz procesiem kas saistīti ar iekaisumu norisi organismā;
- c) selenofēnhinoloni un selenofēnkumarīni izraisa krasu SAF līmeņa samazināšanos šūnā, un šī efekta iemesls iespējams ir kaspāzes-1 aktivācija, kuras rezultātā samazinās mitohondriju elpošana, un savienojumu spēja inhibēt SOD aktivitāti, ka arī neitralizēt brīvos radikālus;
- d) ekstremāla SAF līmeņa samazināšanās šūnā ir vēl viens ceļš, kā rezultātā selenofēnhinoloni un selenofēnkumarīni audzēju šūnās izraisa apoptozes indukciju;
- e) N-metilpiperazilmetil kumarīns (**82**), 2- un 4-piridilaminokumarīni (**83**, **85**) ietekmē MMP aktivitāti un angioģenēzi.

3. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

3.1. Lietotie reģenti un aparātūra

Daudzkanālu spektrofotometrs (Tecan Infinite100, Austrija); homogenizators Ultra Turrax T25 (Ika-Verker, Janke and Kunkel Inc., Vācija); fluorescentais mikroskops (Eclipse TE300, Nikon, Japāna); mikroskops (Nikon Inverted Microscop ECLIPSE TE300) ar digitālo fotokameru (Nikon Coolpix990); laminārais velkmes skapis; CO₂ inkubators (Hereaus); ultra zemas

temperatūras saldētava (Innova U101, New Brunswick scientific), šķidrā slāpekļa glabāšanas sistēma (CRYO Plus2, ThermoScientific), datorprogrammas Prism 3.0, Image-Pro Plus 5.1., Magellan 6.

2',7'-dihlorfluoresceīna diacetāts (DCFDA); Dulbeko modificēta kultivēšanas vide (DMEM); 2,2-difenil-1-pikrilhidrazils (DPPH); 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoscābe) (DTNB); ditiotriētols (DTT); etilēndiaminotetraetiķskābe (EDTA); glutaciona peroksidāze no buļļu eritrocītiem; glutatons (GSH); nikotīnamīda adenīdinukleotīds (NADH); nikotīnamīda adenīdinukleotīda fosfāts (NADPH); nitrotetrazolijs zilais (NBT); neitrālais sarkanais (NR); akridīna oranžais; etīdija bromīds; forbol-12-miristāt-13-acetāts (PMA); *t*-butilhidroperoksīds (TBH); asinsvadu endotēlija augšanas faktors (VEGF); 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīds (MTT); fetālais govs serums; glutamīns; ekstracelulārais matrikss (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix High Concentration); fibroblastu augšanas faktors (bFGF); heparīns; adrenalīns; liellopu seruma albumīns (BSA); zelta tiomalāts; N-isobutil-N-(4-metoksifenilsulfonil)-glicilhidroksāmskābe (NNGH); *p*-nitro-tetrazolija zilais (NBT); 2,2'-azobis(2-amino-propāna) dihidrohlorīds (AAPH); fluoresceīns; dimetilsulfoksīds (DMSO). Visi reaģenti no firmas Sigma, Acros Organic.

Šūnu kultūru audzēšanai izmantots sterils plastiks no firmas "Sarsted" (Vācija).

3.2. Pētījuma objekti

3.2.1. Selēnu saturošie savienojumi

Neorganiskie selēna savienojumi **2-56** un organiskie selēna savienojumi **57-85** saņemti no Organiskās sintēzes institūta Farmakomodulatoru sintēzes grupas vad. Dr. ķīm. P.Arsenjana.

Izmantoti komerciālie savienojumi: nātrija selenīts, L-selenometionīns, L-selenocisteīns; un 7-hidroksikumarīns (Sigma).

3.2.2. Bioloģiskie objekti pētījumos *in vitro* un *in vivo*

a) Šūnu kultūras.

Pētījumos *in vitro* izmantotas sekojošas šūnu līnijas:

A549 – cilvēka plaušu karcinoma;

B16 – peļu melanoma;

BHK21 – Sīrijas kāmjā nieres fibroblasti;

CCL8 – peļu sarkoma;

HepG2 – cilvēka hepatocītu karcinoma;

HT-1080 – cilvēka saistaudu fibrosarkoma;
MCF-7 – cilvēka krūts adenokarcinoma;
MDA-MB-435s – cilvēka krūts melanoma;
MES-SA – cilvēka dzemdes sarkoma;
MG-22A – peļu hepatosarkoma;
Neuro2A – peļu neuroblastoma;
NIH 3T3 – peļu embrija fibroblasti;
S-180 - peļu sarkoma;
SHSY5Y – cilvēka neuroblastoma.

Šūnu līnijas iegūtas no ATCC un ECCC kolekcijām. HUVEC-2 - cilvēka nabas saites vēnas endotēlija šūnas, iegūtas no „BD™ Biosciences”.

b) Laboratorijas dzīvnieki

Eksperimentos izmantotas ICR un Balb/c AnNCrl peles (20-23 g), sešu nedēļu vecumā. Peles iegūtas eksperimentālo dzīvnieku audzētavā *Charles River* (Francija) un Rīgas Stradiņa universitātes eksperimenta dzīvnieku audzētavā (Latvija). Dzīvnieki tika turēti grupās pa 5 (būru izmērs 43x27x15cm, konstanta temperatūra 22±2°C, relatīvais mitrums 55±15%, ventilācija 15-20 gaisa apjomu nomaīņa/st un 12 stundu gaismas/tumsas cikls. Dzīvnieku uzturēšanai izmanto pakaišus no firmas “Basic micro” (Holande) un barību no firmas “Lactamin” (Zviedrija). Barība un ūdens ir pieejami *ad libitum*. *In vivo* eksperimentu protokolus ir akceptējusi LR Pārtikas un Veterinārais dienests un LZP Ētikas komisija.

c) Šūnu un audu homogenāti

Šūnu homogenātu pagatavošana. Šūnu masu audzē standarta šūnu kultivēšanas vidē DMEM, kas satur 10% fetālo serumu, 4 mM glutamīnu, termostatā 37°C un 5% CO₂ atmosfērā. Šūnas ar skrāpi savāc un atmazgā ar PBS buferi 2 reizes, centrifugējot 10 minūtes 1400 apg/min, 4°C. Šūnām (10⁷ šūnu) pievieno 1ml auksta lizējoša bufera (10 mM Trīs, 150 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1mM DTT, pH=7.5). Šūnu masu homogenizē 5 min, 10000 apg/min un veic trīs sasaldēšanas /atsaldēšanas ciklus šķidrā slāpekļī. Homogenātu centrifugē 15 minūtes 11000 apg/min, 4°C. Supernatantu savāc un glabā -70°C.

Audu homogenāta pagatavošana. Peles eitanizē ar ketamīna - ksilazīna injekciju un izņem aknas. 1g audu pievieno 5 ml lizējoša bufera (10 mM Tris, 2M NaCl, 1mM EDTA,

pH=8.0). Homogenizē 5 min, 10000 apg/min. Iegūto homogenātu centrifugē 15 min. 12000g, 4°C. Supernatantu savāc un glabā -70°C.

Proteīna koncentrāciju supernatantā nosaka ar testēšanas komplekta palīdzību (protein assay kit, Bio-Rad).

3.3. Eksperimenti *in vitro*

3.3.1. Citotoksiskā efekta noteikšana

Dzīvo šūnu daudzumu nosaka ar vitālo krāsvielu MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolija bromīdu), kas parāda dzīvo šūnu mitohondriālo oksidoreduktāžu aktivitāti. Mitohondriālie fermenti reducē MTT tetrazolija sāli par nešķīstošu formazānu, kam ir purpura krāsa [247].

Šūnas audzē standarta šūnu kultivēšanas vidē DMEM, kas satur 10% fetālo serumu, 4 mM glutamīnu, bez antibiotiku klātbūtnes, termostatā 37°C un 5% CO₂ atmosfērā. Eksperimentam šūnas uzsēj uz 96 lauciņu platēm kultivēšanas vidē DMEM kopā ar testējamo savienojumu dažādās koncentrācijās un kultivē 72 st. Pēc inkubācijas ar savienojumu, pievieno MTT šķīdumu (gala konc. 0.2 mg/ml) katrā plates lauciņā. Inkubē 3 stundas (37°C, 5% CO₂), pēc tam vidi ar MTT šķīdumu noņem un saistīto krāsvielu ekstrahē, pievienojot 200 µl DMSO. Paraugu optisko blīvumu (OD; 540 nm) nosaka izmantojot daudzkanālu spektrofotometru (Tecan multiplate reader Infinite100). Aprēķina dzīvo šūnu daudzumu (%). IC₅₀ (savienojuma koncentrāciju, kuras ietekmē iet bojā 50% šūnu) aprēķina ar programmas Graph Pad Prism® 3.0 palīdzību.

3.3.2. Bazālās toksicitātes noteikšana

NR tests tiek veikts saskaņā ar standarta protokolu [128]. Pamatojoties uz NICEATM-ECVAM validācijas pētījumu rezultātiem, šī testēšanas metode ir ieteicama pastāvīgiem pētījumiem pirms savienojumu akūtas toksicitātes noteikšanas eksperimentos ar grauzējiem [248]. Tests ir piemērots un lietderīgi izmantojams, lai novērtētu sākotnējās devas, tādējādi dzīvnieku izmantošanu katrā pētījumā var samazināt par 50% [129]. NR citotoksiskuma testā šūnu izdzīvošanas analīze pamatojas uz dzīvo šūnu spēju absorbēt un saistīt vitālo krāsvielu neitrālo sarkano. *In vitro* testa datus var izmantot, lai novērtētu sākuma devu akūtiem *per os* toksicitātes pētījumiem uz grauzējiem.

NIH 3T3 šūnas kultivē 96 lauciņu platēs DMEM vidē ar 5 % fetālo serumu 24 h. Pēc tam pievieno savienojumu 8 koncentrācijās (1000, 316, 100, 31, 10, 3, 1 µg/ml) un turpina inkubāciju vēl 24 st. Kontrolei izmanto neapstrādātas šūnas. Pēc inkubācijas ar savienojumu, šūnām noņem vidi un pievieno 150 µl NR (neitrālais sarkanais) krāsvielas šķīduma (0.05 mg/ml NR šķīdina DMEM vidē, 24 h inkubē 37°C un pirms lietošanas filtrē caur 0.22 µm filtru). Pēc 3 st. inkubācijas šūnas atmazgā ar fosfāta buferi (PBS) un saistīto krāsvielu ekstrahē ar etiķskābes, etalona un ūdens maisījumu (1:50:49 v/v). Paraugu optisko blīvumu (OD; 540 nm) nosaka izmantojot daudzkanālu spektrofotometru (Tecan multiplate reader Infinite100). IC₅₀ aprēķina ar programmas Graph Pad Prism® 3.0 palīdzību.

LD₅₀ novērtē izmantojot IC₅₀. *In vivo* LD₅₀ sākuma devu aprēķina, ievietojot *in vitro* iegūto IC₅₀ vērtību regresijas formulā [249]:

$$\log [\text{LD}_{50} (\text{mM/kg})] = 0,439 \times \log [\text{IC}_{50} (\text{mM})] + 0,621.$$

Akūtās toksicitātes kategorijas (pēc *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS)* klasifikācijas):

- I toksiskuma kategorija - LD₅₀ ≤ 5 mg/kg;
- II toksiskuma kategorija - LD₅₀ > 5 mg/kg < 50 mg/kg (ļoti toksisks);
- III toksiskuma kategorija - LD₅₀ > 50 mg/kg < 300 mg/kg (vidēji toksisks);
- IV toksiskuma kategorija - LD₅₀ > 300 mg/kg < 2000 mg/kg (nedaudz toksisks);
- V toksiskuma kategorija - LD₅₀ > 2000 mg/kg < 5000 mg/kg (praktiski nav toksisks).

3.3.3. Apoptozes noteikšana

Apoptotisko un nekrotisko šūnu skaitu nosaka ar dubultās krāsošanas metodi, izmantojot fluorescentās krāsvielas: akridīnoranžo (OA) un etīdija bromīdu (EB) [250], ar modifikācijām. AO spēj saistīties ar DNS un RNS: saistoties ar DNS dubultspirāli veido kompleksu, kas fluorescē zaļajā spektrā (530 nm); ar vienpavediena DNS vai RNS veidojas kompleksi, kas fluorescē sarkanajā spektrā (630 nm). Krāsviela EB integrējas DNS struktūrā un tās fluorescences novērojama oranžajā spektrā (605 nm). Izmantojot abas krāsvielas var diferencēt dzīvotspējīgās, apoptotiskās un nekrotiskās šūnas. AO krāso šūnu kodolus zaļā krāsā, bet EB šūnas var absorbēt tikai caur bojātu membrānu un tas krāso kodolu oranž-sarkanā krāsā. Šūnas diferencējas sekojoši: dzīvotspējīgās šūnas - morfoloģiski normāls izskats ar zaļu kodolu; šūnas agrīnā apoptozes stadijā – zaļš kodols ar kondensētu un fragmentētu hromatīnu, šūnas apoptozes beigu stadijā – kondensēts un fragmentēts oranži-sarkani krāsots hromatīns; nekrotiskas šūnas - morfoloģiski normālas ar oranži-sarkanu kodolu.

Apoptozes noteikšanai MCF-7 šūnas audzē 96-lauciņu platē, koncentrācijā 10000 šūnu/lauciņā. Pēc 24 stundām šūnām pievieno savienojumu devā 100 μ M un inkubē 4 vai 24 stundas. Pēc inkubācijas šūnas atmazgā ar PBS un pievieno 40 μ l OA/EB krāsvielu maisījumu (100 μ g/ml AO un 100 μ g/ml EB). Krāso 2 min, šūnas atmazgā ar PBS un analizē ar fluorescentā mikroskopa palīdzību 400x palielinājumā. Rezultātus fotografē ar digitālo kameru. Apoptotisko un nekrotisko šūnu daudzumu aprēķināšanai izmanto NIS Elements Basic Research A programmatūru. Katrā paraugā tika saskaitītas ne mazāk kā 300 šūnas.

3.3.4. SAF daudzuma noteikšana šūnās

SAF līmeni šūnās nosaka izmantojot fluorescējošu krāsvielu - 2',7'-dihlorfluoresceīna diacetātu (DCFDA) [251]. Pēc DCFDA iekļūšanas šūnā, ar iekššūnas esterāžu palīdzību, tas tiek deacilēts līdz nefluorescējošam savienojuma, kurš reaģējot ar SAF (hidroksila, peroksila u.c. radikāļi) oksidējas līdz fluorescējošam savienojumam - 2',7'-dihlorfluoresceīnam (DCF).

MG-22A, HepG2 vai MCF-7 šūnas audzē 96-lauciņu platē, koncentrācijā 10000 šūnu/lauciņā. Pēc 48 stundām šūnām pievieno testējamo savienojumu devā 100 μ M un inkubē 10 min vai 24 stundas. Izmantotas divas eksperimenta shēmas (2.4.att.). A-shēma: pēc inkubācijas šūnas atmazgā ar PBS un pievieno 5 μ M DCFDA šķīdumu PBS buferī. Šūnas krāso 30 min, 37°C, 5% CO₂ atmosfērā, pēc tam vienu reizi atmazgā ar PBS un izmēra fluorescences intensitāti (Ex/Em - 485/535 nm).

Lai noteiktu šūnu spēju atbildēt uz izraisīto oksidatīvo stresu, šūnas pēc inkubācijas ar savienojumu apstrādā pēc B-shēmas (2.3. att.): šūnām pievieno 200 μ M *t*-butilhidroperoksīdu, inkubē 2 st., atmazgā ar PBS un pievieno 5 μ M DCFDA šķīdumu PBS buferī un krāso 30 min, 37°C, 5% CO₂ atmosfērā. Šūnas atmazgā vienu reizi ar PBS un izmēra fluorescences intensitāti. Aprēķina SAF daudzumu paraugos, nosakot savienojuma efekta procentuālo attiecību pret kontroles šūnām bez savienojuma. Katram savienojumam tika veikti 6 atkārtojumi.

3.3.5. Kaspāžu aktivitātes noteikšana

Kaspāžu aktivitātes noteikšanai šūnās izmanto testēšanas komplektu (Caspase Fluorometric Substrate Set, BioVision) un darbus veic pēc protokola. Komplektā ietilpst specifiski substrāti 9 dažādu kaspāžu noteikšanai: kaspāzes -1, -2, -3/7, -4, -5, -6, -8, -9, -10.

MCF-7 šūnas audzē 96-lauciņu platē, koncentrācijā 10000 šūnu/lauciņā. Pēc 48 stundām šūnām pievieno testējamo savienojumu devā 100 μ M, inkubē 4 stundas. Pēc tam plati ar šūnām centrifugē (1500 apg/min, 5 min), noņem vidi un pievieno lizējošo buferi, inkubē 10 min uz

ledus, pievieno reakcijas buferi un kaspāzei atbilstošo substrātu, inkubē 1 st. un izmēra fluorescences intensitāti (Ex/Em – 400/505 nm). Savienojuma ietekmi izsaka procentos pret kontroles šūnām.

3.3.6. Angioģenēzes pētījumi *in vitro*

Angioģenēzes pētījumos *in vitro* izmanto cilvēka nabas saites vēnas endotēlija šūnu līniju HUVEC-2 („BD™ Biosciences”). Šūnas audzē kultivēšanas vidē (BD™ Biosciences) uz virsmas (BD Biocoat™), kas apstrādāta ar kolagēnu I.

Kapilāru tīkla struktūras veidošanos novērtē, audzējot endotēlija šūnas uz ekstracelulāra matricas (matrigel, BD™ Biosciences), izmantojot testēšanas komplektu (In vitro angiogenesis assay kit, Cayman), pēc adaptētas metodikas [252].

96-lauciņu plates pārklāj ar matrigēlu (40µl/lauciņā) un polimerizē 60 min 37°C, 5% CO₂ atmosfērā. Šūnas uzsēj uz polimerizētā matrigēla 10000 šūnas/lauciņā, kultivēšanas vidē ar vai bez savienojumiem. Kā angioģenēzes standarta inhibitoru izmanto 1 µM JNJ-10198409. Angioģenēzi inducē ar 1 µM PMA (forbol-12-miristats 13-acetāts). Šūnas 24 stundas inkubē 37°C, 5% CO₂ atmosfērā, lai vizualizētu šūnu organizāciju. Endotēlija šūnu diferencēšanos un kapilāru tīkla struktūru veidošanos detektē invertā mikroskopā un fotografē 80x palielinājumā. Kapilāru tīkla struktūras garumu nosaka ar datorprogrammu ImagePro-Plus 4.1., saskaitot kopējo struktūru garumu katrā skatu laukā. Struktūru garumu, kas veidojas PMA klātbūtnē pieņem par 100%.

3.3.7. Superoksīda dismutāzes aktivitātes noteikšana

SOD fermenta aktivitātes noteikšanai izmanto spektrofotometrisku metodi, kuras pamatā ir spontānās adrenalīna oksidēšanās līdz adrenohromam inhibīcija ar SOD bāziskā vidē [253]. Reakcija norit 0.05 M karbonāta buferī, pH=10.2, reakcijas maisījums satur 6 U/ml attīrīta fermenta (cilvēka eritrocītu SOD, Sigma) vai 0.22 mg olbaltv./ml MG-22A šūnu homogenāta vai 0.02 mg olbaltv./ml peļu aknu audu homogenātu un 1.8 mg/ml epinefrīna; ar vai bez testējamiem savienojumiem 100 µM koncentrācijā. Optiskā blīvuma pieaugumu nosaka pie 340 nm ar daudzkanālu spektrofotometru, veicot mērījumus katru minūti, 10 minūtes. SOD aktivitāti izsaka inhibīcijas procentos no adrenalīna oksidēšanās līmeņa.

3.3.8. Glutaciona peroksidāzes aktivitātes noteikšana

Glutaciona peroksidāze ir ferments, kas sadala H_2O_2 reducētā glutaciona klātbūtnē. Tā aktivitāti nosaka spektrofotometriski, pēc oksidētā NADPH daudzuma, kas veidojas reakcijas gaitā un ir proporcionāls Gpx aktivitāte [254].

MG-22A šūnu (0.22 mg olbaltv./ml) vai aknu audu (0.02 mg olbaltv./ml) homogenātu pievieno reakcijas maisījumam, kas satur 1 mM GSH, 0.2 U/ml glutaciona reduktāzes un 0.4 mg/ml NADPH, ar vai bez pārbaudāmajiem savienojumiem 100 μ M koncentrācijā. Maisījumu inkubē 10 min un reakciju uzsāk, pievienojot *t*-butilhidroperoksīdu (0.001%). NADPH oksidēšanās līmeni nosaka mērot paraugu optisko blīvumu pie 340 nm ar daudzkanālu spektrofotometru, mērījumus veic 1 reizi minūtē, 5 minūtes. No iegūtajiem datiem aprēķina reakcijas ātrumu un fermenta inhibīcijas % savienojumu ietekmē, salīdzinot ar kontroli.

3.3.9. Tioredoksīna reduktāzes aktivitātes noteikšana

Tioredoksīna reduktāzes aktivitāti nosaka izmantojot DTNB kā substrātu [255]. Reakcija norit 50 mM kālija fosfāta buferī, pH=7.0. Reakcijas maisījums satur šūnu homogenātu (0.4 mg olbaltv./ml), 1 mM EDTA, 50 mM KCl, 0.2 mg/ml BSA, 0.25 mM NADPH un 0.5 mM DTNB. Absorbijas blīvuma izmaiņas nosaka pie 405 nm uz daudzkanālu spektrofotometra. Tā kā DTNB kā substrātu var izmantot arī citas šūnās esošās reduktāzes [256], lai noteiktu tieši TrxR aktivitāti izmanto 200 μ M zelta tiomalātu, kas ir specifisks TrxR inhibitors. Aprēķinot reakcijas ātrumu starpību ar un bez zelta tiomalāta, nosaka TrxR fermenta aktivitāti un aprēķina fermenta inhibīcijas % savienojumu ietekmē, salīdzinot ar kontroli.

3.3.10. MMP aktivitātes noteikšana

MMP aktivitātes noteikšanai izmanto "MMP Inhibitor Profiling Kit" (BIOMOL). Testēšanas komplekts satur sekojošas metaloproteāžu izoformas: MMP-1 – kollagenāze-1, MMP-2 – želatināze-A, MMP-3 – stromlizīns-1, MMP-7 – matrilizīns-1, MMP-8 – kollagenāze-2, MMP-9 – želatināze-B, MMP-10 – stromlizīns-1, MMP-12 – makrofāgu metaloproteāze, MMP-13 – kollagenāze-3, MMP-14 – membrānas 1-tipa matricas MMP. Kā standarta inhibitors izmantots NNGH (N-izobutil-N-(4-metoksifenilsulfonil)-glicilhidroksāmskābe).

MMP aktivitāti nosaka 96-lauciņu platē, kā reakcijas substrātu izmanto OmniMMPTM fluorescējošo substrātu Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂. Substrāta hidrolīzes ātrumu nosaka pēc fluorescences (Ex/Em – 328/420 nm) intensitātes izmaiņām 10 min 37°C ar daudzkanālu spektrofotometru.

3.4. Eksperimenti *in vivo*

3.4.1. Savienojumu pretvēža efekta noteikšana peļu modeli ar pārpotēto audzēju

Peļu sarkomas S-180 šūnas koncentrācijā 5×10^6 šūnas/uz peli, tika transplantētas ICR pelēm zem ādas lāpstiņu rajonā. Eksperimentā izmanto peļu mātītes (20-23 g), sešu nedēļu vecumā, grupā 5 peles. Savienojumu ievadīšana tika uzsākta 24 stundas pēc audzēja transplantācijas, ievadīšanas veids – i.p.. Savienojumu iedarbību novēro pēc diviem parametriem: audzēja augšanas ātruma inhibīcija (AI%) un dzīvnieku dzīves ilguma izmaiņas (DZ%). Savienojumu iedarbības efekts uz audzēju tika novērtēts pēc formulas:

$AI\% = 100 - C$, kur C - (audzēja apjoms V grupā ar savienojumu/audzēja apjoms V kontroles grupā) $\times 100$. Audzēja apjoms V (mm^3) tika aprēķināts pēc elipsoīda formulas: $V = \frac{4\pi ab^2}{3}$, kur a ir maksimālais audzēja diametrs (mm) un b ir minimālais audzēja diametrs (mm). Savienojumu iedarbības efekts uz dzīves ilgumu tika novērtēts pēc formulas: $DZ = 100 - \frac{De * 100}{Dk}$, kur Dk - dzīves ilgums kontroles grupā, De - dzīves ilgums eksperimenta grupā.

3.4.2. Angioģenēzes pētījumi *in vivo*

Tika pētīta sintezēto savienojumu ietekme uz angioģenēzi *in vivo*, izmantojot vispārpieņemtu modeļu sistēmu – matrigēlu [257]. Darbam *in vivo* izmanto ekstracelulāru matriksu (BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix High Concentration) atbilstoši „BD Biosciences” rekomendācijām, adaptējot metodi laboratorijas apstākļiem. Kā dzīvnieku modelis tika izmantotas Balb/c AnNCrl peļu mātītes. Pelēm veica anestēziju (2% Setona, 10% ketamīna šķīdums) un uz muguras zem ādas lāpstiņas apvidū ievadīja matrigēlu. Kopējais ievadītās vielas tilpums ir 500 μl , no kuriem 400 μl sastāda gēls, bet 100 μl piedevas, kas stimulē vai kavē asinsvadu veidošanos (VEGF, bFGF, DMEM, heparīns, sintezētie savienojumi). Pēc 10 dienām peli eitanizē ar ketamīna - ksilazīna injekciju, matrigēlu izņem un novērtē angioģenēzes procesus. Gatavo audu griezumus (mirotoms LEICA CM 1850), krāso ar hemotoksilīnu-eozīnu un fotografē ar digitālo fotokameru (Nikon Coolpix990) 100x palielinājumā. Asinsvadu skaitu nosaka ar programmu Image-Pro Plus 4.1..

3.5. Brīvo radikāļu neutralizēšanas spējas pētījuma metodes

3.5.1. Peroksila radikāļa noteikšana ar ORAC

Savienojumu spējas neitralizēt peroksila radikāļus nosaka izmantojot ORAC metodi [258]. Peroksila radikālis tiek radīts, izmantojot 2,2'-azobis(2-amino-propāna) dihidrohlorīdu (AAPH), kā detektoru izmanto fluoresceīnu. Reakcija notiek melnās 96-lauciņu platēs, 60 nM Na fluoresceīna šķīdumam (šķīdina 75 mM fosfāta buferī, pH=7.0) pievieno savienojumu dažādās koncentrācijās (4-1000 μM) un inkubē tumsā 37°C, 15 min. Pēc tam pievieno 40 mM AAPH un nolasa fluorescences intensitāti (Ex/Em – 485/535 nm) katru otro minūti vienu stundu. Mērījumi tiek veikti trīs atkārtojumos. Savienojumu efektu izsaka inhibīcijas procentos no maksimālā fluoresceīna fluorescences līmeņa bez savienojuma. IC₅₀ vērtību savienojumiem aprēķina ar programmu GrafPad Prism 3.0.

3.5.2. Riboflavīna/NBT sistēmā ģenerētā O^{2•-} radikāļa noteikšana

Savienojumu spēja neitralizēt superoksīda radikāļa veidošanos tika noteikta testā ar riboflavīnu un krāsvielu *p*-nitro-tetrazolija zilo (NBT) [259]. Reakcija noris 96-lauciņu platē, reakcijas maisījums satur 50 mM fosfāta buferi (pH=7.2), 12 mM EDTA, 1 μg riboflavīna, 10 μl metanola, testējamo savienojumu dažādās koncentrācijās (0,5-1000 μM) un 5 μg NBT. Reakcijas maisījumu 5 min apgaismo ar UV gaismu un absorbcijas intensitāti nosaka pie 590 nm. Savienojumu ietekmi uz superoksīda radikāļu veidošanos aprēķina pēc formulas:

$$\text{inhibīcija \%} = \left[\frac{(\text{OD}_{\text{kontrolē}} - \text{OD}_{\text{savienojums}})}{\text{OD}_{\text{kontrolē}}} \right] \times 100.$$

IC₅₀ vērtību savienojumiem aprēķina ar programmu GrafPad Prism 3.0.

3.5.3. Prooksidantu īpašības noteikšana, superoksīda ģenerācija

Savienojumu spēja ģenerēt superoksīdu GSH klātbūtnē noteikta pēc aprakstītas metodes [260]. Superoksīda daudzums noteikts pēc lucigenīna luminiscences intensitātes. Reakcijas norit 0.05 M nātrija fosfāta buferī (pH=7.4), kuram pievienots 0.025 μg/ml lucigenīna. Paraugi ar tiolu satur 7 mg/ml GSH. Pievieno testējamus savienojumus koncentrācijā 0.5-1000 μM. Luminiscences intensitāti nosaka ar 30 sekundes intervāliem 20 min ar daudzkanāla fluorimetru (Tecan infinite M1000). Luminiscenci nosaka relatīvās vienībās.

SECINĀJUMI

1. Atklāts ka amonija un alkilamonija selenīti un telurīti kavē audzēja šūnu HT-1080, MG-22A, B16 un Neuro2A proliferāciju *in vitro*, efektīvāk nekā nātrija selenīts, kuru parasti izmanto uztura bagātinātajos kā selēna avotu. Trietanolamonija hidroselenīts - aktīvākais šīs sērijas savienojums inhibē sarkomas S-180 augšanu *in vivo* par 81%.
2. Salīdzinot ar zemu aminoskābju, dipeptīdu un tripeptīdu hidroselenītu citotoksisko efektu uz HT-1080 un MG-22A audzēju šūnu līnijām, tikai uz aminoetiķskābes, 3-aminopropānskābes, 4-aminobutānskābes un 2-(3-aminopropoksi)etiķskābes bāzes izveidotie N-aizvietotie betaīna hidroselenīti parādīja lielisku pretvēža aktivitāti *in vitro*, kā arī augstu audzēju inhibīcijas pakāpi *in vivo* 83÷100%.
3. Heterociklisko amonija hidroselenītu pretvēža aktivitāte kopumā raksturojās ar to, ka savienojumiem nav izteiktas struktūras - pretvēža aktivitātes sakarības. Imidazolīnija hidroselenītam ir selektīva ietekme uz audzēju un normālam šūnām ar plašu devas diapazonu, bet *o*-fenantrolīnija, benzimidazolīnija, un 2-tiobenzimidazolīnija hidroselenītiem – devu diapazons ir šaurš.
4. Sililalkilaizvietotie heterocikli ir daudzsoļi citotoksiskie aģenti ar samēra plašu selektivitātes diapazonu uz audzēju un normālam šūnām un zemu vai mērenu aktivitāti *in vivo* benziazola vai purīna atvasinājumu gadījumā.
5. 4-Metil-1,2,3-selenadiazol-5-carboksīate amīdu sērijas savienojumus raksturo zema citotoksicitāte *in vivo* un pretrunīgs efekts *in vivo*. Piemēram, N-pirolidil un N-piperidil(4-metil-1,2,3-selēndiazol-5-il)ketoni kavē sarkomas S-180 augšanu pelēs par 85% un 71%, bet N-[(*S*)- un N-[(*R*)-1-feniletil](4-metil-1,2,3-selēndiazol-5-il)ketoniem konstatēts pretējs efekts, attiecīgi audzēja augšana tiek inhibēta par 20% un stimulēta par 23%.
6. Kondensēti selēnazolīnija sāļi – ūdenī šķīstošie savienojumi ar Se–N⁺ kovalento saiti, uzrāda līdzīgu vai augstāku antiproliferatīvu efektu salīdzinot ar nātrija selenītu.
7. Selenofēn[3,2-*c*] un [2,3-*c*]hinolonu un kumarīnu modificēšana 2. un 3. pozīcijās selenofēna gredzenā noved pie augsta citotoksiskā efekta *in vitro* uz 9 audzēju šūnu līnijām un zemas

bazālās toksicitātes un paver potenciālu iespēju perspektīvas selēnu saturošo pretvēža preparātu struktūras izveidei.

8. Veiktie audzēju šūnu iekššūnu procesu izmaiņas pētījumi selenofēnhinolonu un selenofēnkumarīnu ietekmē ļauj secināt, ka savienojumu zema toksicitāte un augsta antiproliferatīva aktivitāte ir saistīta ar spēju inducēt apoptozi, inhibēt specifiskas antioksidatīvas fermentatīvas sistēmas šūnā, t.i. superoksīda dismutāzi, glutaciona peroksidāzi un tioredoksīna reduktāzi, un samazināt skābekļa aktīvo formu daudzumu šūnā.

LITERATŪRAS SARAKSTS

1. Cesar G. Fraga. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Molecular Aspects of Medicine*. **2005**, 26, 235–244.
2. Oldfield J.E. The two faces of selenium. *J. Nutr.* **1987**, 117, 2002–2008.
3. Schwarz K.; Foltz C.M. Selenium as integral part of factor 3 against dietary liver degeneration. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 3292–3293.
4. Rotruck J.T.; Pope A.L.; Ganther H.E.; Swanson A.B.; Hafeman D.G.; Hoekstra W.G. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. **1973**, 179, 588–590.
5. Rayman M.P. The importance of selenium to human health. *Lancet*. **2000**, 356, 233–241.
6. Lyn Patrick N.D. Selenium Biochemistry and Cancer: A Review of the Literature. *Alternative Medicine Review*. **2004**, 9, 3, 239-258.
7. Spallholz J.E.; Boylan L.M.; Larsen H.S. Advances in Understanding Selenium's Role in the Immune System. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1990**, 587, 123–139.
8. Schrauzer G.N. Selen-essenzielles Spurenelement und Krebschutzfaktor. *Munch Med Wschr.* **1985**, 127, 731-734.
9. Селен. Доклад 58 ВОЗ. Женева. **1989**, с.270.
10. Aaseth J. Optimum selenium levels in animal products for human consumption. *Norweg. J. Agr.Sci.* **1993**, 11, 121-126.
11. Van der Torre H.; Dokkum W.; Schaafsma G. Effects of various levels of Se in wheat and meat on blood Se status indices and on Se balance in Dutch men. *Brit. J. Nutr.* **1991**, 65, 69-80.
12. Meltzer H.M. Supplementation with wheat selenium induces a dose-dependent response in serum and urine of a Se-replete population. *Brit. J. Nutr.* **1992**, 67, 287-294.
13. Whanger P.D. Selenium and its relationship to cancer: an update. *Br. J. Nutr.* **2004**, 91, 11–28.
14. Foster S.J.; Kraus R.J.; Ganther H.E. The metabolism of selenomethionine, S-methylselenocysteine, their selenonium derivatives, and trimethylselenonium in the rat. *Arch. Biochem. Biophys.* **1986**, 251, 77–86.
15. Sunde R.A. Molecular biology of selenoproteins. *Annu. Rev. Nutr.* **1990**, 10, 451-474.
16. Daher R. Characterization of selenocysteinylase in human tissues and its relationship to tissue selenium concentration. *J. Trace. Elem. Electrolytes Health Dis.* **1992**, 6, 3, 189-194.

17. Deagen J.T.; Butler J.A.; Beilstein M.A.; Wranger P.D. Effects of dietary selenite, selenocysteine and selenomethionine on selenocysteinylase and glutathione peroxidase activities and on selenium in rat tissues. *J. Nutr.* **1987**, 117, 1, 91-98.
18. Ip C.; Thompson H.J.; Zhu Z.; Ganther H.E. In vitro and in vivo studies of methylseleninic acid: evidence that a monomethylated selenium metabolite is critical for cancer chemoprevention. *Cancer Res.* **2000**, 60, 2882–2886.
19. Cheng H.; Guangyu D.; Chengyu G.; Jian Z.; Ming K.; Yuan J.; Yifeng H.; Tadashi K.; Jia F. Decreased Selenium-Binding Protein 1 Enhances Glutathione Peroxidase 1 Activity and Downregulates HIF-1 α to Promote Hepatocellular Carcinoma Invasiveness. *Clin. Cancer Res.* **2012**, 18, 3042-3053.
20. Kyung H.L.; Daewon J. Bimodal actions of selenium essential for antioxidant and toxic pro-oxidant activities: The selenium paradox. *Molecular Medicine Reports.* **2012**, 5, 299-304.
21. Sanmartin C.; Plano D.; Sharma A.K.; Palop J-A. Selenium Compounds, Apoptosis and Other Types of Cell Death: An Overview for Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 9649-9672.
22. Zeng H.; Combs G.F. Selenium as an anticancer nutrient: Roles in cell proliferation and tumor cell invasion. *J. Nutr. Biochem.* **2008**, 19, 1–7.
23. Rayman M.P. Selenium in cancer prevention: a review of the evidence and mechanism of action. *Proceedings of the Nutrition Society.* **2005**, 64, 527–542.
24. Letavayova L.; Vlckova V.; Brozmanova J. Selenium: From cancer prevention to DNA damage. *Toxicology.* **2006**, 227, 1–14.
25. Papp L.V.; Lu J.; Holmgren A.; Khanna K.K. From Selenium to Selenoproteins: Synthesis, Identity, and Their Role in Human Health. *Antioxidants & Redox Signaling.* **2007**, 9 (7), 775-806.
26. Sinhaand R.; El-Bayoumy K. Apoptosis is a Critical Cellular Event in Cancer Chemoprevention and Chemotherapy by Selenium Compounds. *Current Cancer Drug Targets,* **2004**, 4, 13-28.
27. Zeng H.; Wu M.; Botnen J.H. Methylselenol, a selenium metabolite, induces cell cycle arrest in G1 phase and apoptosis via the extracellular-regulated kinase 1/2 pathway and other cancer signaling genes. *J. Nutr.* **2009**, 139, 1613–1618.
28. Fang W.; Han A.; Bi X.; Xiong B.; Yang W. Tumor inhibition by sodium selenite is associated with activation of c-jun NH2-terminal kinase 1 and suppression of beta-catenin signaling. *Int. J. Cancer.* **2010**, 127, 32–42.

29. Facompre N.D.; El-Bayoumy K.; Sun Y.W.; Pinto J.T.; Sinha R. 1,4-phenylenebis (methylene)selenocyanate, but not selenomethionine, inhibits androgen receptor and Akt signaling in human prostate cancer cells. *Cancer Prev. Res.* **2010**, 3, 975–984.
30. Sharma A.K.; Kline C.L.; Berg A.; Amin S.; Irby R.B. The Akt inhibitor ISC-4 activates prostate apoptosis response protein-4 and reduces colon tumor growth in a nude mouse model. *Clin. Cancer Res.* **2011**, 17, 4474–4483.
31. MacKenzie S.H.; Schipper J.L.; Clark A.C. The potential for caspases in drug discovery. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* **2010**, 13, 568–576.
32. Wlodkowic D.; Telford W.; Skommer J.; Darzynkiewicz Z. Apoptosis and beyond: Cytometry in studies of programmed cell death. *Methods Cell Biol.* **2011**, 103, 55–98.
33. Park H.H. Structural features of caspase-activating complexes. *Int. J. Mol. Sci.* **2012**, 13, 4807–4818.
34. Xing F.; Li S.; Ge X.; Wang C.; Zeng H.; Li D.; Dong L. The inhibitory effect of a novel organoselenium compound BBSKE on the tongue cancer Tca8113 *in vitro* and *in vivo*. *Oral Oncol.* **2008**, 44, 963–969.
35. Shiah H.S.; Lee W.S.; Juang S.H.; Hong P.C.; Lung C.C.; Chang C.J.; Chou K.M.; Chang J.Y. Mitochondria-mediated and p53-associated apoptosis induced in human cancer cells by a novel selenophene derivative, D-501036. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 73, 610-619.
36. Дубинина Е.Е. Роль активных форм кислорода в качестве сигнальных молекул в метаболизме тканей при состояниях окислительного стресса. *Вопр. мед. химии.* **2001**, 47, 6, 561-581.
37. Меньшикова Е.Б.; Ланкин В.З.; Зенков Н.К. и др. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово, **2006**. 600 с.
38. Cory S.; Adams J.M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat. Rev. Cancer.* **2002**, 2, 9, 647-656.
39. Gouriprasanna R.; Bani K.S.; Prasad P.P.; Muges G. Selenium-containing enzymes in mammals: Chemical perspectives. *J. Chem. Sci.* **2005**, 117, 4, 287–303.
40. Барабой В.А.; Шестакова Е.Н. Селен: биологическая роль и антиоксидантная активность. *Укр. биохим. журн.* **2004**, 76, 1, 23-32.
41. Chen J.J.; Boylan L.M.; Wu C.K.; Spallholz J.E. Oxidation of glutathione and superoxide generation by inorganic and organic selenium compounds. *Biofactors.* **2007**, 31, 55–66.

42. Plano D.; Baquedano Y.; Ibariez E.; Jimenez I.; Palop J.A.; Spallholz J.E.; Sanmartin C. Antioxidant-prooxidant properties of a new organoselenium compound library. *Molecules*. **2010**, 15, 7292–7312.
43. Council N.R. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium, and Carotenoids. *The National Academies Press*. Whashington, DC, USA, **2000**.
44. Schrauzer G.N. Nutritional selenium supplements: producttypes, quality, and safety. *J. Am. Coll.Nutr.* **2001**, 20, 1–4
45. Beilstein M.A.; Whanger P.D. Deposition of dietary organic and inorganic selenium in rat erythrocyte proteins. *J. Nutr.* **1986**, 116, N 9, 1701-1710.
46. Bamsal M. P. Levels and ⁷⁵Se-labelling of specific proteins as a consequence of dietary selenium concentration in mice and rats. *Proc. Soc. Environ. Biol. Med.* **1991**, 196, 147-154.
47. Bedwal R.S. Selenium – its biological perspectives. *Med.Hypotheses*. **1993**, 41, 150-159.
48. Drake E.N. Cancer chemoprevention: Selenium as a prooxidant, not an antioxidant. *Med. Hypotheses*. **2006**, 67, 318-322.
49. Björkhem-Bergman L.; Jönsson K.; Eriksson L.C.; Olsson J.M.; Lehmann S.; Paul C.; Björnstedt M. Drug-resistant human lung cancer cells are more sensitive to selenium cytotoxicity. Effects on thioredoxin reductase and glutathione reductase. *Biochem. Pharmacol.* **2002**, 63, 1875–1884.
50. Selenius M.; Fernandes A.P.; Brodin O.; Björnstedt M.; Rundlöf A.K. Treatment of lung cancer cells with cytotoxic levels of sodium selenite: effects on the thioredoxin system. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, 75, 2092–2099.
51. Xiang N.; Zhao R.; Zhong W. Sodium selenite induces apoptosis by generation of superoxide via the mitochondrial-dependent pathway in human prostate cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2009**, 63, 351–362.
52. Fu L.; Liu Q.; Shen L.; Wang Y. Proteomic study on sodium selenite-induced apoptosis of human cervical cancer HeLa cells. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2011**, 25, 130–137.
53. Rigobello M.P.; Gandin V.; Folda A.; Rundlöf A.K.; Fernandes A.P.; Bindoli A.; Marzano C.; Björnstedt M. Treatment of human cancer cells with selenite or tellurite in combination with auranofin enhances cell death due to redox shift. *Free Radic. Biol. Med.* **2009**, 47, 710–721.
54. Li Z.; Meng J.; Xu T.J.; Qin X.Y.; Zhou X.D. Sodium selenite induces apoptosis in colon cancer cells via Bax-dependent mitochondrial pathway. *Eur. Rev Med. Pharmacol. Sci.* **2013**, 17, 2166–2171.

55. Kralova V.; Benesova S.; Cervinka M.; Rudolf E. Selenite-induced apoptosis and autophagy in colon cancer cells. *Toxicol. in Vitro.* **2012**, 26, 258–268.
56. Olm E.; Jönsson-Videsäter K.; Ribera-Cortada I.; Fernandes A.P.; Eriksson L.C.; Lehmann S.; Rundlöf A.K.; Paul C.; Björnstedt M. Selenite is a potent cytotoxic agent for human primary AML cells. *Cancer Lett.* **2009**, 282, 116–123.
57. Philchenkov A.; Zavelevich M.; Khranovskaya N.; Surai P. Comparative analysis of apoptosis induction by selenium compounds in human lymphoblastic leukemia MT-4 cells. *Exp. Oncol.* **2007**, 29, 257–261.
58. Jönsson-Videsäter K.; Björkhem-Bergman L.; Hossain A.; Söderberg A.; Eriksson L.C.; Paul C.; Rosén A.; Björnstedt M. Selenite-induced apoptosis in doxorubicinresistant cells and effects on the thioredoxin system. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, 67, 513–522.
59. Rudolf E.; Radocha J.; Cervinka M.; Cerman J. Combined effect of sodium selenite and camptothecin on cervical carcinoma cells. *Neoplasma.* **2004**, 51, 127–135.
60. Schroeder C.P.; Goeldner E.M.; Schulze-Forster K.; Eickhoff C.A.; Holtermann P.; Heidecke H. Effect of selenite combined with chemotherapeutic agents on the proliferation of human carcinoma cell lines. *Biol. Trace Elem. Res.* **2004**, 99, 17–25.
61. Tian J.; Ning S.; Knox S.J. Sodium selenite radiosensitizes hormone-refractory prostate cancer xenograft tumors but not intestinal crypt cells in vivo. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2010**, 78, 230–236.
62. Luo H.; Yang Y.; Duan J.; Wu P.; Jiang Q.; Xu C. PTEN-regulated AKT/FoxO3a/Bim signaling contributes to reactive oxygen species-mediated apoptosis in selenitetreated colorectal cancer cells. *Cell Death Dis.* **2013**, 4, 481.
63. An J.J.; Shi K.J.; Wei W.; Hua F.Y.; Ci Y.L.; Jiang Q.; Li F.; Wu P.; Hui K.Y.; Yang Y.; Xu C.M. The ROS/JNK/ATF2 pathway mediates selenite-induced leukemia NB4 cell cycle arrest and apoptosis in vitro and in vivo. *Cell Death Dis.* **2013**, 4, 973.
64. Shi K.; Jiang Q.; Li Z.; Shan L.; Li F.; An J.; Yang Y.; Xu C. Sodium selenite alters microtubule assembly and induces apoptosis in vitro and in vivo. *J. Hematol. Oncol.* **2013**, 6, 7.
65. Corcoran N.M.; Hovens C.M.; Michael M.; Rosenthal M.A.; Costello A.J. Open-label, phase I dose-escalation study of sodium selenate, a novel activator of PP2A, in patients with castration-resistant prostate cancer. *British Journal of Cancer.* **2010**, 103, 4, 462-468.

66. Hurst R.; Elliott R.M.; Goldson A.J.; Fairweather-Tait S.J. Se-methylselenocysteine alters collagen gene and protein expression in human prostate cells. *Cancer Letters*. **2008**, 269, N1, 117-126.
67. Zhang H.; Fang J.; Yao D.; Wu Y.; Ip C.; Dong Y. Activation of FOXO1 is critical for the anticancer effect of methylseleninic acid in prostate cancer cells. *Prostate*. **2010**, 70, 12, 1265-1273.
68. Pinto J.T.; Lee J.I.; Sinha R.; MacEwan M.E.; Cooper A.J. Chemopreventive mechanisms of alpha-keto acid metabolites of naturally occurring organoselenium compounds. *Amino Acids*. **2011**, 41, 1, 29-41.
69. Lee J.I.; Nian H.; Cooper A.J.; Sinha R.; Dai J.; Bisson W.H.; Dashwood R.H.; Pinto J.T. Alpha-keto acid metabolites of naturally occurring organoselenium compounds as inhibitors of histone deacetylase in human prostate cancer cells. *Cancer Prevention Research*. **2009**, 2, 7, 683-693.
70. Yamashita Y.; Yamashita M. Identification of a Novel Selenium-containing Compound, Selenoneine, as the Predominant Chemical Form of Organic Selenium in the Blood of Bluefin Tuna. *J. Biol. Chem*. **2010**, 285/24, 18134-18138.
71. Baines A.; Taylor-Parker M.; Goulet A.C.; Renaud C.; Gerner E.W.; Nelson M.A. Selenomethionine inhibits growth and suppresses cyclooxygenase-2 (COX-2) protein expression in human colon cancer cell lines. *Cancer Biol. Ther*. **2002**, 1, 370-374.
72. Yang Y.; Huang F.; Ren Y.; Xing L.; Wu Y.; Li Z.; Pan H.; Xu C. The anticancer effects of sodium selenite and selenomethionine on human colorectal carcinoma cell lines in nude mice. *Oncol. Res*. **2009**, 18, 1-8.
73. Suzuki M.; Endo M.; Shinohara F.; Echigo S.; Rikiishi H. Differential apoptotic response of human cancer cells to organoselenium compounds. *Cancer Chemother. Pharmacol*. **2010**, 66, 475-484.
74. Poerschke R.L.; Moos P.J. Thioredoxin reductase 1 knockdown enhances selenazolidine cytotoxicity in human lung cancer cells via mitochondrial dysfunction. *Biochem. Pharmacol*. **2011**, 81, 211-221.
75. Pinto J.T.; Sinha R.; Papp K.; Facompre N.D.; Desai D.; El-Bayoumy K. Differential effects of naturally occurring and synthetic organoselenium compounds on biomarkers in androgen responsive and androgen independent human prostate carcinoma cells. *Int. J. Cancer*. **2007**, 120, 1410-1417.

76. Redman C.; Scott J.A.; Baines A.T.; Basye J.L.; Clark L.C.; Calley C.; Roe D.; Payne C.M.; Nelson M.A. Inhibitory effect of selenomethionine on the growth of three selected human tumor cell lines. *Cancer Lett.* **1998**, 125, 103–110.
77. Shin S.H.; Yoon M.J.; Kim M.; Kim J.I.; Lee S.J.; Lee Y.S.; Bae S. Enhanced lung cancer cell killing by the combination of selenium and ionizing radiation. *Oncol. Rep.* **2007**, 17, 209–216.
78. Schroterova L.; Kralova V.; Voracova A.; Haskova P.; Rudolf E.; Cervinka M. Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: comparison of different cytotoxicity assays. *Toxicol. in Vitro.* **2009**, 23, 1406–1411.
79. Sinha R.; Medina D. Inhibition of cdk2 kinase activity by methylselenocysteine in synchronized mouse mammary epithelial tumor cells. *Carcinogenesis.* **1997**, 18, 1541–1547.
80. Bhattacharya A. Methylselenocysteine: a promising antiangiogenic agent for overcoming drug delivery barriers in solid malignancies for therapeutic synergy with anticancer drugs. *Expert Opin. Drug Deliv.* **2011**, 8, 749–763.
81. Cao S.; Durrani F.A.; Toth K.; Rustum Y.M. Se-methylselenocysteine offers selective protection against toxicity and potentiates the antitumour activity of anticancer drugs in preclinical animal models. *Br. J. Cancer.* **2014**, 110, 1733–1743.
82. Cao S.; Durrani F.A.; Rustum Y.M. Selective modulation of the therapeutic efficacy of anticancer drugs by selenium containing compounds against human tumor xenografts. *Clin. Cancer Res.* **2004**, 10, 2561–2569.
83. Chintala S.; Toth K.; Cao S.; Durrani F.A.; Vaughan M.M.; Jensen R.L.; Rustum Y.M. Se-methylselenocysteine sensitizes hypoxic tumor cells to irinotecan by targeting hypoxia-inducible factor 1alpha. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2010**, 66, 899–911.
84. Li Z.; Carrier L.; Belame A.; Thiyagarajah A.; Salvo V.A.; Burow M.E.; Rowan B.G. Combination of methylselenocysteine with tamoxifen inhibits MCF-7 breast cancer xenografts in nude mice through elevated apoptosis and reduced angiogenesis. *Breast Cancer Res. Treat.* **2009**, 118, 33–43.
85. Chen T.; Wong Y.S. Selenocystine induces reactive oxygen species-mediated apoptosis in human cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* **2009**, 63, 105–113.
86. Chen T.; Wong Y.S. Selenocystine induces apoptosis of A375 human melanoma cells by activating ROS-mediated mitochondrial pathway and p53 phosphorylation. *Cell. Mol. Life Sci.* **2008**, 65, 2763–2775.

87. Fan C.; Chen J.; Wang Y.; Wong Y.S.; Zhang Y.; Zheng W.; Cao W.; Chen T. Selenocystine potentiates cancer cell apoptosis induced by 5-fluorouracil by triggering reactive oxygen species-mediated DNA damage and inactivation of the ERK pathway. *Free Radic. Biol. Med.* **2013**, 65, 305–316.
88. Chen T.; Wong Y.S. Selenocystine induces caspase-independent apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells with involvement of p53 phosphorylation and reactive oxygen species generation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, 41, 666–676.
89. Moreno E.; Plano D.; Lamberto I.; Font M.; Encio I.; Palop J.A.; Sanmartin C. Sulfur and selenium derivatives of quinazoline and pyrido[2,3-d]pyrimidine: synthesis and study of their potential cytotoxic activity in vitro. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, 47, 283–298.
90. Posser T.; de Paula M.T.; Franco J.L.; Leal R.B.; da Rocha J.B. Diphenyl diselenide induces apoptotic cell death and modulates ERK1/2 phosphorylation in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Arch. Toxicol.* **2011**, 85, 645–651.
91. Nedel F.; Campos V.F.; Alves D.; McBride A.J.; Dellagostin O.A.; Collares T.; Savegnago L.; Seixas F.K. Substituted diaryl diselenides: cytotoxic and apoptotic effect in human colon adenocarcinoma cells. *Life Sci.* **2012**, 91, 345–352.
92. Ibanez E.; Agliano A.; Prior C.; Nguewa P.; Redrado M.; Gonzalez-Zubeldia I.; Plano D.; Palop J.A.; Sanmartin C.; Calvo A. The quinoline imidoselenocarbamate EI201 blocks the AKT/mTOR pathway and targets cancer stem cells leading to a strong antitumor activity. *Curr. Med. Chem.* **2012**, 19, 3031–3043.
93. Plano D.; Ibanez E.; Calvo A.; Palop J.A.; Sanmartin C. Novel library of selenocompounds as kinase modulators. *Molecules.* **2011**, 16, 6349–6364.
94. Desai D.; Salli U.; Vrana K.E.; Amin S. SelSA, selenium analogs of SAHA as potent histone deacetylase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 2044–2047.
95. Karelia N.; Desai D.; Hengst J.A.; Amin S.; Rudrabhatla S.V.; Yun J. Seleniumcontaining analogs of SAHA induce cytotoxicity in lung cancer cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, 20, 6816–6819.
96. Romano B.; Font M.; Encío I.; Palop J. A.; Sanmartín C. Synthesis and antiproliferative activity of novel methylselenocarbamates. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, 83, 674–684.
97. Ghose A.; Fleming J.; El-Bayoumy K.; Harrison P.R. Enhanced sensitivity of human oral carcinomas to induction of apoptosis by selenium compounds: involvement of mitogen-activated protein kinase and Fas pathways. *Cancer Res.* **2001**, 61, 7479–7487.

98. Pinto J.T.; Sinha R.; Papp K.; Facompre N.D.; Desai D.; El-Bayoumy K. Differential effects of naturally occurring and synthetic organoselenium compounds on biomarkers in androgen responsive and androgen independent human prostate carcinoma cells. *Int. J. Cancer*. **2007**, 120, 1410–1417.
99. Sharma A.K.; Sharma A.; Desai D.; Madhunapantula S.V.; Huh S.J.; Robertson G.P.; Amin S. Synthesis and anticancer activity comparison of phenylalkyl isoselenocyanates with corresponding naturally occurring and synthetic isothiocy- anates. *J. Med. Chem.* **2008**, 51, 7820–7826.
100. Lesser R.; Weiss R. Uber selenhaltige aromatische Verbindungen (VI). *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **1924**, 57, 1077–1082.
101. Engman L.; Cotgreave I.; Angulo M.; Taylor C.W.; Paine-Murrieta G.D.; Powis G. Diaryl chalcogenides as selective inhibitors of thioredoxin reductase and potential antitumor agents. *Anticancer Res.* **1997**, 17, 4599–4605.
102. Yang C.F.; Shen H.M.; Ong C.N. Ebselen induces apoptosis in HepG(2) cells through rapid depletion of intracellular thiols. *Arch. Biochem. Biophys.* **2000**, 374, 142–152.
103. Zhao H.; Lu H.G.; Shi Y.B.; Zhao L.M.; Bai C.; Wang X. Role of enteral nutrition supplemented with ebselen and EHEC in pancreatitis-associated multiple organ dys- function in rats. *Inflamm. Res.* **2006**, 55, 423–429.
104. Lan L.; Zhao F.; Wang Y.; Zeng H. The mechanism of apoptosis induced by a novel thioredoxin reductase inhibitor in A549 cells: possible involvement of nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, 555, 83–92.
105. Peng Z.F.; Lan L.X.; Zhao F.; Li J.; Tan Q.; Yin H.W.; Zeng H.H. A novel thioredoxin reductase inhibitor inhibits cell growth and induces apoptosis in HL-60 and K562 cells. *J. Zhejiang Univ. (Sci. B)*. **2008**, 9, 16–21.
106. Shi C.; Yu L.; Yang F.; Yan J.; Zeng H. A novel organoselenium compound induces cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 309, 578–583.
107. Shi C.J.; Zeng H.H.; Li H.W.; Yang F.G.; Wu X.Q.; Yu L.Z. Induction of apoptosis in prostate cancer cell line PC-3 by BBSKE, a novel organoselenium compound, and its effect in vivo. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* **2003**, 83, 1984–1988.
108. Zhao F.; Yan J.; Deng S.; Lan L.; He F.; Kuang B.; Zeng H. A thioredoxin reductase inhibitor induces growth inhibition and apoptosis infive cultured human carcinoma cell lines. *Cancer Lett.* **2006**, 236, 46–53.

109. Tan Q.; Li J.; Yin H.W.; Wang L.H.; Tang W.C.; Zhao F.; Liu X.M.; Zeng H.H. Augmented antitumor effects of combination therapy of cisplatin with ethaselen as a novel thioredoxin reductase inhibitor on human A549 cell in vivo. *Investig. New Drugs*. **2010**, 28, 205–215.
110. Liu M.; Fu J.; Li J.; Wang L.; Tan Q.; Ren X.; Peng Z.; Zeng H. Preparation of tri-block copolymer micelles loading novel organoselenium anticancer drug BBSKE and study of tissue distribution of copolymer micelles by imaging in vivo method. *Int. J. Pharm.* **2010**, 391, 292–304.
111. Juang S.H.; Lung C.C.; Hsu P.C.; Hsu K.S.; Li Y.C.; Hong P.C.; Shiah H.S.; Kuo C.C.; Huang C.W.; Wang Y.C.; Huang L.; Chen T.S.; Chen S.F.; Fu K.C.; Hsu C.L.; Lin M.J.; Chang C.J.; Ashendel C.L.; Chan T.C.; Chou K.M.; Chang J.Y. D-501036, a novel selenophene-based triheterocycle derivative, exhibits potent in vitro and in vivo antitumoral activity which involves DNA damage and ataxia telangiectasi mutated nuclear protein kinase activation. *Mol. Cancer Ther.* **2007**, 6, 193–202.
112. Yang Y.N.; Chou K.M.; Pan W.Y.; Chen Y.W.; Tsou T.C.; Yeh S.C.; Cheung C.H.; Chen L.T.; Chang J.Y. Enhancement of non-homologous end joining DNA repair capacity confers cancer cells resistance to the novel selenophene compound, D-501036. *Cancer Lett.* **2011**, 309, 110–118.
113. Chen T.; Zheng W.; Wong Y.S.; Yang F. Mitochondria-mediated apoptosis in human breast carcinoma MCF-7 cells induced by a novel selenadiazole derivative. *Biomed. Pharmacother.* **2008**, 62, 77–84.
114. Chen T.; Wong Y.S.; Zheng W.; Liu J. Caspase- and p53-dependent apoptosis in breast carcinoma cells induced by a synthetic selenadiazole derivative. *Chem. Biol. Interact.* **2009**, 180, 54–60.
115. Revelant G.; Huber-Villaume S.; Dunanda S.; Kirsch G.; Schohn H.; Hesse S. Synthesis and biological evaluation of novel 2-heteroarylimino-1,3-thiazolidin-4-ones as potential anti-tumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, 94, 102–112.
116. Srivastava P.C.; Robins R.K. Synthesis and antitumor activity of 2-beta-D-ribofuranosylselenazole-4-carboxamide and related derivatives. *J. Med. Chem.* **1983**, 26, 445–448.
117. Boritzki T.J.; Berry D.A.; Besserer J.A.; Cook P.D.; Fry D.W.; Leopold W.R.; Jackson R.C. Biochemical and antitumor activity of tiazofurin and its selenium analog (2-beta-D-ribofuranosyl-4-selenazolecarboxamide). *Biochem. Pharmacol.* **1985**, 34, 1109–1114.

118. Franchetti P.; Cappellacci L.; Sheikha G.A.; Jayaram H.N.; Gurudutt V.V.; Sint T.; Schneider B.P.; Jones W.D.; Goldstein B.M.; Perra G.; De Montis A.; Loi A.G.; La Colla P.; Grifantini M. Synthesis, structure, and antiproliferative activity of selenophenfurin, an inosine 5'-monophosphate dehydrogenase inhibitor analogue of selenazofurin. *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 1731–1737.
119. Jeong L.S.; Tosh D.K.; Choi W.J.; Lee S.K.; Kang Y.J.; Choi S.; Lee J.H.; Lee H.; Lee H.W.; Kim H.O. Discovery of a new template for anticancer agents: 2'-deoxy-2'-fluoro-4'-selenoarabinofuranosyl-cytosine (2'-F-4'-seleno-ara-C). *J. Med. Chem.* **2009**, 52, 5303–5306.
120. Lin L.; Sheng J.; Momin R.K.; Du Q.; Huang Z. Facile synthesis and anti-tumor cell activity of Se-containing nucleosides. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* **2009**, 28, 56–66.
121. Kim M.; Lee K.H.; Hong I.S.; Hong S.H. p38 mitogen-activated protein kinase is a key regulator of 5-phenylselenyl- and 5-methylselenyl-methyl-2'-deoxyuridine induced apoptosis in human HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, 417, 237–244.
122. Chen X.J.; Duan F.D.; Zhang H.H.; Xiong Y.; Wang J. Sodium selenite-induced apoptosis mediated by ROS attack in human osteosarcoma U2OS cells. *Biol Trace Elem Res.* **2012**, 145 (1), 1-9.
123. Ma Q.; Fang H.; Shang W. et al. Superoxide flashes: early mitochondrial signals for oxidative stress-induced apoptosis. *J Biol Chem.*, **2011**, 286 (31), 27573-81.
124. Mugesh G.; Du Mont W.-W.; Sies H. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem. Rev.*, **2001**, 101, 2125-2179.
125. Третьяк Л.Н.; Герасимов Е.М. Специфика влияния селена на организм человека и животных (применительно к проблеме создания селеносодержащих продуктов питания). *Вестник ОГУ*, 12, **2007**, 136-145.
126. Hussein A.M.; Saleh H.A. Effect of sodium selenite and vitamin E on the renal cortex in rats: an ultrastructure study. *Tissue Cell.* **2014**, 46 (3), 170-177.
127. The transformed cell. Edited by Ivan L Cameron and Thomas B Pool. **1981**, by Academic Press Ink.
128. Stokes W.; Casati S.; Strickland J.; Paris M. Neutral Red Uptake Cytotoxicity Tests for Estimating Starting Doses for Acute Oral Toxicity Tests. *Cur. Protocol. Toxicol.* **2008**, 36: 20.4.1-20.4.20.
129. ICCVAM, Peer Review Panel Report: The Use of *In Vitro* Basal Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Testing. Research Triangle

- Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_scepeerrev.htm
130. Gupta R.A.; Dubois R.N. Combinations for cancer prevention. *Nat Med.*, **2000**, 6, 974–975.
 131. De Flora S.; Izzotti A.; D'Agostini F.; Balansky R.M.; Noonan D., Albini A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation related diseases. *Mutat Res.*, **2001**, 480, 1, 9–22.
 132. Ghorbani A.; Omidvar B.; Parsi A. Protective effect of selenium on cisplatin induced nephrotoxicity: A double-blind controlled randomized clinical trial. *J. Nephropathology*, **2013**, 2 (2), 129-134.
 133. Blasiak J.; Kadlubek M.; Kowalik J.; Romanowicz-Makowska H.; Pertynski T. Inhibition of telomerase activity in endometrial cancer cells by selenium-cisplatin conjugate despite suppression of its DNA-damaging activity by sodium ascorbate. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. **2002**, 22, 1, 73–82.
 134. Arsenjans P.; Šestakova I.; Domračeva I.; Kalviņš I. Amonija selenīti un telurīti kā glutationa peroksidāzes inhibēšanas līdzekļi. LV 14709 B, 20.2, **2014**.
 135. Roumen M. Balansky and Silvio De Flora. Interactions between N-acetylcysteine and sodium selenite in modulating the clastogenicity of urethane and 2-acetylaminofluorene in mice. *Int. J. Cancer*, **2004**, 108, 158–161.
 136. Lukevics E.; Arsenyan P.; Rubina K.; Shestakova I.; Domracheva I.; Nesterova A.; Popelis Ju.; Pudova O. Amino-acid hydroselenites: synthesis and cytotoxicity. *Appl. Organomet. Chem.* **2002**, 16, 235-238.
 137. Nelson David L.; Cox Michael M. Principles of Biochemistry (4th ed.). New York: W. H. Freeman, **2005**, pp.127, 675–77, 844, 854.
 138. Rose M.L.; Madren J.; Bunzendahl H.; Thurman R.G. Dietary glycine inhibits the growth of B16 melanoma tumors in mice. *Carcinogenesis*. **1999**, 20, 5, 793–798.
 139. Waterfield C.J.; Turton J.A.; Scales M.D.; Timbrell J.A. Reduction of liver taurine in rats by beta-alanine treatment increases carbon tetrachloride toxicity. *Toxicology*. **1993**, 77 (1-2), 7-20.
 140. Lee S.Y.; Kim Y.C. Effect of beta-alanine administration on carbon tetrachloride-induced acute hepatotoxicity. *Amino Acids*. **2007**, 33 (3), 543-546.
 141. James M. Pankovich and Kowighi Jimbow. Tyrosine transport in a human melanoma cell line as a basis for selective transport of cytotoxic analogues. *Biochem. J.* **1991**, 280, 721-725.

142. Fu Y.; Meadows G.G. Specific Amino Acid Dependency Regulates the Cellular Behavior of Melanoma. *J. Nutr.* **2007**, 137, 1591–1596.
143. Yoon S.O.; Kim M.M.; Chung A.S. Inhibitory Effect of Selenite on Invasion of HT1080 Tumor Cells. *The Journal of Biological Chemistry.* **2001**, 276, 23 (8), 20085–20092.
144. Hannuniemi R.; Holopainen I.; Korpi E.R.; Oja S.S. Stimulation of amino acid accumulation in neuroblastoma and astrocytoma cells by L-histidine. *Neurochem Res.* **1985**, 10 (4), 483–489.
145. Haak-Frendscho M.; Darvas Z.; Hegyesi H.; Kárpáti S.; Hoffman R.L.; László V.; Bencsáth M.; Szalai C.; Fűrész J.; Timár J.; Bata-Csörgő Z.; Szabad G.; Pivarcsi A.; Pállinger E.; Kemény L.; Horváth A.; Dobozy A.; Falus A. Histidine decarboxylase expression in human melanoma. *J Invest Dermatol.* **2000**, 115 (3), 345–52.
146. Ying J.; Rahbar M.H.; Hallman D.M.; Hernandez L.M.; Spitz M.R.; Forman M.R.; Gorlova O.Y. Associations between Dietary Intake of Choline and Betaine and Lung Cancer Risk. *PLoS One.* **2013**, 8 (2), e54561.
147. Kharbanda K.K.; Todero S.L.; King A.L.; Osna N.A.; McVicker B.L.; Tuma D.J.; Wisecarver J.L.; Bailey S.M. Betaine Treatment Attenuates Chronic Ethanol-Induced Hepatic Steatosis and Alterations to the Mitochondrial Respiratory Chain Proteome. *International Journal of Hepatology.* **2012**, 2012, ID 962183.
148. Benkert O.; Hippus H. Kompendium Der Psychiatrischen Pharmakotherapie (in German) (6th ed.). Springer. **2006**, ISBN 978-3-540-34401-8.
149. Vaz F.M., van Gool S., Ofman R., Ijlst L., Wanders R.J. Carnitine biosynthesis: identification of the cDNA encoding human gamma-butyrobetaine hydroxylase. *Biochem Biophys Res Commun.* **1998**, 250 (2), 506–510.
150. Lindstedt G.; Lindstedt S.; Nordin I. Gamma-butyrobetaine hydroxylase in human kidney. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1983**, 42 (6), 477–85.
151. Leung I.K.; Krojer T.J.; Kochan G.T.; Henry L.; von Delft F.; Claridge T.D; Oppermann U.; McDonough M.A.; Schofield C.J. Structural and mechanistic studies on γ -butyrobetaine hydroxylase. *Chem. Biol.* **2010**, 17 (12), 1316–24.
152. Fujimori D.G. A novel enzymatic rearrangement. *Chem. Biol.* **2010**, 17 (12), 1269–70.
153. Simkhovich B.Z.; Shutenko Z.V.; Meirena D.V.; Khagi K.B.; Mezapuke R.J.; Molodchina T.N.; Kalviņš I.J.; Lukevics E. 3-(2,2,2-Trimethylhydrazinium)propionate (THP)-a novel gamma-butyrobetaine hydroxylase inhibitor with cardioprotective properties. *Biochem. Pharmacol.* **1988**, 37 (2), 195–202.

154. Lukevics E.; Arsenyan P.; Shestakova I.; Domracheva I.; Kanepe I.; Belyakov S.; Popelis J.; Pudova O. Synthesis, structure and cytotoxicity of organoammonium selenites. *Appl. Organomet. Chem.* **2002**, 16, 228-234.
155. Arsenyan P.; Shestakova I.; Rubina K.; Domracheva I.; Nesterova A.; Vosele K.; Pudova O.; Lukevics E. Organoammonium hydroselenites: antitumor action through radical balance regulation. *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, 465, 229-235.
156. Lu X.; Liu X.; Wan B. et al.. Synthesis and evaluation of anti-tubercular and antibacterial activities of new 4-(2,6-dichlorobenzyloxy)phenyl thiazole, oxazole and imidazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **2012**, 49, 164–171.
157. Brown E.G. Ring Nitrogen and Key Biomolecules. Kluwer Academic Press, **1998**.
158. Bispo M.S.; Veloso M-C.C.; Pinheiro H-L.C; De Oliveira R.F.; Reis J-O.N.; De Andrade J.B. Simultaneous Determination of Caffeine, Theobromine, and Theophylline by High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, **2002**, 40, 45-48.
159. Bhatnagar A.; Sharma P.K.; Kumar N. A review on “Imidazoles”: their chemistry and pharmacological potentials. *International Journal of PharmTech Research*, **2011**, 3, 1, 268-282.
160. Lukevics E. Pyridine derivatives in the drug arsenal (150 years of pyridine chemistry). *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **1995**, 31, 6, 639-650.
161. Delijewski M.; Wrzesniok D.; Otreba M.; Beberok A.; Rok J.; Buszman E. Nicotine impact on melanogenesis and antioxidant defense system in HEMn-DP melanocytes. *Mol Cell Biochem.* **2014**, 395, 109–116.
162. Lin Y.S.; Chuang M.T.; Chen C.H.; Chien M.Y.; Hou W.C. Nicotinic acid hydroxamate downregulated the melanin synthesis and tyrosinase activity through activating the MEK/ERK and AKT/GSK3 β signaling pathways. *J. Agric Food Chem.* **2012**, 16, 60(19), 4859-64.
163. Biradha K.; Sarkar M.; Rajput L. Crystal engineering of coordination polymers using 4,4'-bipyridine as a bond between transition metal atoms. *Chemical Communications.* **2006**, 40, 4169–79.
164. Li S.; Crooks P.A.; Wei X.; de Leon J. Toxicity of dipyriddy compounds and related compounds. *Crit Rev Toxicol.* **2004**, 34(5), 447-60.
165. Pilas B.; Sarna T.; Kalyanaraman B.; Swartz H.M. The effect of melanin on iron associated decomposition of hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med.* **1988**, 4(5), 285-93.

166. Ben-Shachar D.; Youdim M.B. Iron, melanin and dopamine interaction: relevance to Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. **1993**, 17 (1), 139-50.
167. Michel-Buono M.; Buono J.-P.; Serre G.; Dumont D.; Bernard P. In vitro cytotoxic effect of 4,4'-bipyridyl on normal human keratinocytes. *Cell Biology and Toxicology*. **1997**, 13, 193-204.
168. Solomon V.R.; Lee H. Quinoline as a privileged scaffold in cancer drug discovery. *Curr Med Chem*. **2011**, 18 (10), 1488-508.
169. Marella A.; Tanwar O.P.; Saha R.; Rahmat M.A.; Srivastava S.; Akhter M.; Shaquiquzzaman M.; Mumtaz Alam M. Quinoline: A versatile heterocyclic. *Saudi Pharmaceutical Journal*. **2013**, 21, 1–12.
170. Orlow S.J.; Komatsu L.N. Quinoline compounds as melanogenesis modifiers and uses thereof. IPC8 Class: AA61K314709FI , USPC Class: 514305.
171. Luman C.R., Castellano F.N. "Phenanthroline Ligands" in *Comprehensive Coordination Chemistry II*. **2003**, Elsevier.
172. Salvesen G.S.; Nagase H. Inhibition of proteolytic enzymes. *Proteolytic enzymes: a practical approach*, **2001**, 2 edn, 1, 105–130.
173. Radha Y.; Manjula A.; Madhava Reddy B.; Vittal Rao B. Synthesis and biological activity of novel benzimidazoles. *Indian Journal of Chemistry*, **2011**, 50, 1762-1773.
174. Anandarajagopal K.; Tiwari R.N.; Bothara K.G.; Anbu Jeba Sunilson J.; Dineshkumar C.; Promwicht P. 2-Mercaptobenzimidazole Derivatives: Synthesis and Anticonvulsant. *Activity Advances in Applied Science Research*. **2010**, 1 (2), 132-138.
175. Pourgholami M.H.; Khachigian L.M.; Fahmy R.G. et al. Albendazole inhibits endothelial cell migration, tube formation, vasopermeability, VEGF receptor-2 expression and suppresses retinal neovascularization in ROP model of angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. **2010**, 397, 729-734.
176. Arsenyan P.; Rubina K.; Shestakova I.; Abele E.; Abele R.; Domracheva I.; Nesterova A.; Popelis Yu.; Lukevics E. Synthesis and cytotoxicity of silylalkylthio-substituted N-heterocycles and their hydroselenites. *Appl. Organomet. Chem*. **2003**, 17 (11), 825-830.
177. Botham P.A. Acute systemic toxicity-prospects for tiered testing strategies. *Toxicology in Vitro*. **2004**, 18, 227-230.
178. Wilber C. G. Toxicology of selenium: a review. *Clin. Toxicol*. **1980**, 17, 171–230.

179. Sayato Y.; Hasegawa T.; Taniguchi S.; Maeda H.; Ozaki K.; Narama I.; Nakamuro K. Acute and subacute oral toxicity of selenocystine in mice. *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health.* **1993**, 39, 289–296.
180. World Health Organization (WHO). Environmental Health Criteria 58, selenium, World Health Organization Publication, Geneva, Switzerland, **1987**.
181. Liochev S.I. and Fridovich I. The effects of superoxide dismutase on H₂O₂ formation. *Free Radic Biol Med.* **2007**, 42, 1465–1469.
182. Bienert G.P.; Moller A.L.; Kristiansen K.A.; Schulz A.; Moller I.M.; Schjoerring J.K.; Jahn T.P. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem.* **2007**, 282, 1183–1192.
183. Eto M.; Kajihara N.; Morita S.; Tominaga R. A novel electron paramagnetic resonance spin-probe technique demonstrates the relation between the production of hydroxyl radicals and ischemia-reperfusion injury. *Eur J Cardiothorac Surg.* **2011**, 39 (4), 465-70.
184. Lubos E.; Loscalzo J.; Handy D.E. Glutathione Peroxidase-1 in Health and Disease: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & redox signaling.* **2011**, 15, 7, 1957-97.
185. Hatanaka N.; Nakaden H.; Yamamoto Y.; Matsuo S.; Fujikawa T.; Matsusue S. Selenium kinetics and changes in glutathione peroxidase activities in patients receiving long-term parenteral nutrition and effects of supplementation with selenite. *Nutrition.* **2000**, 16 (1), 22-6.
186. Petrujkic B.T.; Sefer D.S.; Jovanovic I.B.; Jovicin M.; Jankovic S.; Jakovljevic G.; Beier R.C.; Anderson R.C. Effects of commercial selenium products on glutathione peroxidase activity and semen quality in stud boars. *Animal Feed Science and Technology.* **2014**, 197, 194–205.
187. Pacitti D.; Wanga M.; Martina J.; Sweetmand J.; Feldmann J.; Secombes C.J. Characterization of cytosolic glutathione peroxidase and phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their modulation by in vitro selenium exposure. *Aquatic Toxicology.* **2013**, 130–131, 97–111.
188. Wang Y.X.; Zhan X.A.; Yuan D.; Zhang X.W.; Wu R.J.; Czech J. Effects of selenomethionine and sodium selenite supplementation on meat quality, selenium distribution and antioxidant status in broilers. *Anim. Sci.* **2011**, 56, (7), 305–313.

189. Xianshi W.; Kehe H.; Chengwu W.; Fu C.; Cuiling P. Regulation of cellular glutathione peroxidase by different forms and concentrations of selenium in primary cultured bovine hepatocytes. *J Nutr Biochem.* **2010**, 21 (2),153-61.
190. Wang Y.; Fu L. Forms of selenium affect its transport, uptake and glutathione peroxidase activity in the Caco-2 cell model. *Biol Trace Elem Res.* **2012**, 149(1), 110-116.
191. Carlos M.A.; Pouliquen-Sonaglia I.; Lesgards G.; Marchus-Mouren G.; Puigserver A.; Santimone M. A new kinetic model for the mode of action of soluble and membrane-immobilized glutathione peroxidase from bovine erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **1997**, 247, 248-255.
192. Garberg P.; Engman L.; Tolmachev V.; Lundqvist H.; Gerdes R.G.; Cotgreave I.A. Binding of tellurium to hepatocellular selenoproteins during incubation with inorganic tellurite: consequences for the activity of selenium-dependent glutathione peroxidase. *Int J Biochem Cell Biol.* **1999**, 31(2), 291- 301.
193. Eybl V.; Kotyzova D.; Sykora J.; Topolcan O.; Pikner R.; Mihaljevic M.; Britko J.; Glattere E. Effects of selenium and tellurium on the activity of selenoenzymes glutathione peroxidase and type I Iodothyronine deiodinase, trace elements thyroid level, and thyroid hormone status in rats. *Biological Trace Element Research*, **2007**, 117, 105-14.
194. Mlochowski J.; Kloc K.; Lisiak R.; Potaczek P.; Wojtowicz H. Developments in the chemistry of selenaheterocyclic compounds of practical importance in synthesis and medicinal biology *Arkivoc*, **2007** (vi), 14–46.
195. Hong Y.; Yueyan H.; Guojie S. Synthesis and Cytotoxic Activity of 4-Aryl-4H-chromeno[4,3-d] [1,2,3] selenadiazoles. *Letters in Drug Design & Discovery.* **2010**, 7, 10, 721-725.
196. Gopalakrishnan M.; Sureshkumar P.; Thanusu J.; Kanagarajan V. Design, synthesis, characterization, antibacterial and antifungal activities of a novel class of 5,7-diaryl-4,4-dimethyl-4,5,6,7-tetrahydropyridino[3,4-d]-1,2,3-selenadiazoles. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, **2008**, 23, 3, 347-351.
197. Yuan-Wei L.; Junsheng Z.; Xiaoling L.; Wenjie Z.; Tianfeng C. Selenadiazole derivatives as potent thioredoxin reductase inhibitors that enhance the radiosensitivity of cancer cells. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **2014**, 84, 335–342.
198. Ito H.; Wang J.Z.; Shimura K.; Sakakibara J.; Ueda T. Antitumor effect of a new organic selenium compound, 6-phenyl-7 (6H)-isoselenazolo [4,3-d] pyrimidone (ISP), on the growth of P388 mouse leukemia. *Anticancer Res.* **1990**, 10 (4), 891-895.

199. Kumar Y.; Green R.; Wise D.S.; Wotring L.L.; Townsend L.B. Synthesis of 2,4-disubstituted thiazoles and selenazoles as potential antifilarial and antitumor agents. 2. 2-Arylamido and 2-alkylamido derivatives of 2-amino-4-(isothiocyanatomethyl)thiazole and 2-amino-4-(isothiocyanatomethyl)selenazole. *J. Med. Chem.* **1993**, 26, 36 (24), 3849-52.
200. Arsenyan P.; Rubina K.; Shestakova I.; Domracheva I. 4-Methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides: Antitumor action and cytotoxic effect correlation. *Eur. J. Med. Chem.* **2007**, 42, 635-640.
201. Arsenyan P.; Paegle E.; Belyakov S.; Shestakova I.; Jaschenko E.; Domracheva I.; Popelis J. Synthesis, structure and cytotoxicity of 3-C, N, S, Se substituted benzo[b]selenophene derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry.* **2011**, 46, 3434-3443.
202. Ohashi T.; Oguro Y.; Tanaka T.; Shiokawa Z.; Tanaka Y.; Shibata S.; Sato Y.; Yamakawa H.; Hattori H.; Yamamoto Y.; Kondo S.; Miyamoto M.; Nishihara M.; Ishimura Y.; Tojo H.; Baba A.; Sasaki S. Discovery of the investigational drug TAK-441, a pyrrolo[3,2-c]pyridine derivative, as a highly potent and orally active hedgehog signaling inhibitor: modification of the core skeleton for improved solubility. *Bioorg Med Chem.* **2012**, 15, 20 (18), 5507-17.
203. Gorlitzer K.; Gabriel B.; Froberg P.; Wobst I.; Drutkowski G.; Wiesner J.; Jomaa H. Thieno[2,3-c]quinolines - synthesis and biological investigation. *Pharmazie.* **2004**, 59, 439-442.
204. Gafter-Gvili A.; Fraser A.; Paul M.; Vidal L.; Lawrie T.A.; van de Wetering M.D.; Kremer L.C.; Leibovici L. Antibiotic prophylaxis for bacterial infections in afebrile neutropenic patients following chemotherapy. *Cochrane Database Syst Rev.* **2012**, 18, 1.
205. Chen Y.L. 4-Anilino-furo[3,2-c]quinoline Derivatives, and Preparation Processes and Uses of The Same. **2003**, United States Patent No. 6656949.
206. Arsenyan P.; Vasiljeva J.; Shestakova I.; Domracheva I.; Belyakov S. The synthesis and cytotoxic properties of [3,2-c]- and selenopheno[2,3-c]quinolones. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, **2014**, 49, 11, 1674-1680.
207. Arsenyan P.; Vasiljeva J.; Shestakova I.; Domracheva I.; Jaschenko E.; Romanchikova N.; Leonchiks A.; Rudevica Z.; Belyakova S. Selenopheno[3,2-c]- and [2,3-c]coumarins: Synthesis, cytotoxicity, angiogenesis inhibition, and antioxidant properties. *Comptes Rendus Chimie.* **2015**, 18, 4, 399-409.
208. Venugopala K.N.; Rashmi V.; Odhav B. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *Biomed Res Int.* **2013**; 2013, 963248.

209. Egan D.; O’Kennedy R.; Moran E.; Cox D.; Prosser E.; Thornes R.D. The pharmacology, metabolism, analysis, and applications of coumarin and coumarin-related compounds. *Drug Metab. Rev.* **1990**, 22, 503–529.
210. Santana L.; Uriarte E.; Roleira F.; Milhazes N.; Borges F. Furocoumarins in medicinal chemistry. Synthesis, natural occurrence and biological activity. *Current medicinal chemistry.* **2004**, 11 (24), 3239-3261.
211. Kostova I. Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents.* **2005**, 5, 29–46;
212. Venugopala K.N.; Rashmi V.; Odhav B. Review on Natural Coumarin Lead Compounds for Their Pharmacological Activity. *Bio. Med. Res. Int.* **2013**, ID 963248.
213. Yang D.; Gu T.; Wang T.; Tang Q.; Ma C. Effects of osthole on migration and invasion in breast cancer cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, 74, 1430–1434.
214. Jin Z.; El-Deiry W.S. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* **2005**, 4 (2), 139-163.
215. Raffray M.; Cohen G.M. Apoptosis and necrosis in toxicology: a continuum or distinct modes of cell death? *Pharmacol. Ther.* **1997**, 75 (3), 153–177.
216. Fan T.J.; Han L.H.; Cong R.S.; Liang J. Caspase Family Proteases and Apoptosis. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* **2005**, 37 (11), 719–727.
217. McIlwain D.R.; Berger T.; Mak T.W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* **2013**, 1, 5 (4).
218. Ting J.P.; Willingham S.B.; Bergstralh D.T. NLRs at the intersection of cell death and immunity. *Nat Rev Immunol.* **2008**, 8, 372–379.
219. Siegmund B.; Hans-Anton Lehr H-A.; Fantuzzi G.; Dinarello C.A. IL-1 β -converting enzyme (caspase-1) in intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2001**, 6, 98 (23). 13249–13254.
220. Fink S.L.; Cookson B.T. Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol.* **2006**, 8, 1812–1825.
221. Cookson B.T.; Brennan M.A. Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol.* **2001**, 9, 113–114.
222. Krumschnabel G.; Manzl C.; Villunger A. Caspase-2: Killer, savior and safeguard—Emerging versatile roles for an ill-defined caspase. *Oncogene.* **2009**, 28, 3093–3096.

223. Olsson M.; Vakifahmetoglu H.; Abruzzo P.M.; Hogstrand K.; Grandien A.; Zhivotovsky B. DISC-mediated activation of caspase-2 in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*. **2009**, 28, 1949–1959.
224. Colussi P.A.; Harvey N.L.; Kumar S. Prodomain-dependent nuclear localization of the caspase-2 (Nedd2) precursor. A novel function for a caspase prodomain. *J Biol Chem*. **1998**, 18, 273(38), 24535-42.
225. Guo Y.; Srinivasula M.S.; Druilhe A.; Fernandes-Alnemri T.; Alnemri E.S. Caspase-2 Induces Apoptosis by Releasing Proapoptotic Proteins from Mitochondria. *The Journals of Biological Chemistry*. **2002**, 277, 16, 13430–13437.
226. Janicke R.U.; Patrick N.; Sprengart M.L.; Porter A.G. Caspase-3 Is Required for a-Fodrin Cleavage but Dispensable for Cleavage of Other Death Substrates in Apoptosis. *The Journals of Biological Chemistry*. **1998**, 273, 25, 19, 15540–15545.
227. Mc Geea M.M; Hylanda E.; Campianib G.; Ramunnob A.; Naccib V.; Zisterera D.M. Caspase-3 is not essential for DNA fragmentation in MCF-7 cells during apoptosis induced by the pyrrolo-1,5-benzoxazepine, PBOX-6. *FEBS Letters*. **2002**, 515, 66-70.
228. Liang Y.; Yan C.; Schor N.F. Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene*. **2001**, 20, 6570-6578.
229. Yang X.H.; Sladek T.L.; Liu X.; Butler B.R.; Froelich C.J.; Thor A.D. Reconstitution of Caspase 3 Sensitizes MCF-7 Breast Cancer Cells to Doxorubicin- and Etoposide-induced Apoptosis. *Cancer Research*. **2001**, 61, 348–354.
230. Antioxidant Enzyme. Edited by Mohammed Amr El-Missiry, Publisher: InTech, **2012**.
231. Saccoccia F.; Angelucci F.; Boumis G.; Carotti D.; Desiato G.; Miele A.E.; Bellelli A. Thioredoxin reductase and its inhibitors. *Curr Protein Pept Sci*. **2014**, 15(6), 621-646.
232. Sakurai T.; Kanayama M.; Shibata T.; Itoh K.; Kobayashi A.; Yamamoto M.; Uchida K. Ebselen, a seleno-organic antioxidant, as an electrophile. *Chem Res Toxicol*. **2006**, 19(9), 1196-1204.
233. Liu F.; Ooi V.E.C.; Chang S.T. Free radical scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts. *Life Science*. **1997**, 60, 763-771.
234. Cao G.; Alessio H.M.; Cutler R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. *Free Radical Biol. Med*. **1993**, 14, 303-311.
235. Chen J.J.; Boylan L.M.; Wu C.K.; Spallholz J.E. Oxidation of glutathione and superoxide generation by inorganic and organic selenium compounds. *Biofactors*. **2007**, 31 (1), 55-66.

236. Devasagayam T.P.A.; Tilak J.C.; Bolor K.K.; Sane Ketaki S.; Ghaskadbi Saroj S.; Lele R.D. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. *Journal of Association of Physicians of India (JAPI)*. **2004**, 52, 794-804.
237. Stone J.R.; Yang S. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal*. **2006**, 8 (3-4), 243-70.
238. Gough D.R.; Cotter T.G. Review Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death and Disease*. **2011**, 2, 213.
239. Rhee S.G. Perspective cell signaling H₂O₂, a Necessary Evil for Cell Signaling. *Science*. **2006**, 312, 5782, 1882-1883.
240. Sun Q.; Gao W.; Loughran P.; Shapiro R.; Fan J.; Billiar T.R.; Scott M.J. Caspase-1 activation is protective against hepatocyte cell death by up-regulating beclin1 and mitochondrial autophagy in the setting of redox stress. *The Journal of Biological Chemistry*. **2013**, 288, 22, 15947–15958.
241. Lin B.; Tan X.; Liang J.; Wu S.; Liu J.; Zhang Q.; Zhu R. A reduction in reactive oxygen species contributes to dihydromyricetin-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells. *Scientific Reports*. **2014**, 4, 7041.
242. Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol*. **2000**, 10 (6), 415-433.
243. Gialeli C.; Theocharis A.D.; Karamanos N.K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS Journal*. **2011**, 278, 16–27.
244. Merdad A.; Karim S.; Schulten H.J.; Dallol A.; Buhmeida A.; Al-Thubaity F.; Gari M.A.; Chaudhary A.G.; Abuzenadah A.M.; Al-Qahtani M.H. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. *Anticancer Res*. **2014**, 34 (3), 1355-66.
245. Kessenbrock K.; Plaks V.; Werb Z. Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*. **2010**, 141(1), 52–67.
246. Weis S.M.; David A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Cheresh Nature Medicine*. **2011**, 17, 1359–1370.
247. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. **1983**, 65 (1–2), 55–63.
248. ICCVAM Test Method Evaluation Report: *In Vitro* Cytotoxicity Test Methods for Estimating Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests. Research Triangle Park,

- NC: National Institute for Environmental Health Sciences. Available: [http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_tmer.htm]
249. ICCVAM, Background Review Document: *In Vitro* Basal Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity. Research Triangle Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences. Available: http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/acutetox/inv_nru_brd.htm
250. Ribble D.; Goldstein B.N.; Norris A.D.; Shellman G.Y. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnology*. **2005**, 5:12, 1-7.
251. Eruslanov E.; Kusmartsev S. Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry. *Methods Mol Biol*. **2010**, 594, 57-72.
252. Arnaoutova I.; Kleinman H.K. In vitro angiogenesis: endothelial cell tube formation on gelled basement membrane extract. *Nat Protoc*. **2010**, 5, 628-35.
253. Misra H.P.; Fridovich I. The role of superoxide anion in the autooxidation of epinephrine and simple assay for superoxide dismutase. *J. Biol. Chem*. **1972**, 247, 3170-3175.
254. Wen J.J.; Vyatkina G.; Garg N. Oxidative damage during chagasic cardiomyopathy development: Role of mitochondrial oxidant release and inefficient antioxidant defense. *Free Radic. Biol. Med*. **2004**, 37, 1821–1833.
255. Luthman M.; Holmgren A. Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry*. **1982**, 21, 6628–6633.
256. Jan Y.; Heck D.E; Gray J.P.; Zheng Z.; Casillas R.P.; Laskin D.L.; Laskin J.D. Selective targeting of selenocysteine in thioredoxin reductase by the half mustard 2-chloroethyl ethyl sulfide in lung epithelial cells. *Chem Res Toxicol*. **2010**, 23 (6), 1045–1053.
257. Norrby K. In vivo models of angiogenesis. *J Cell Mol Med*. **2006**, 10 (3), 588-612.
258. Prior R.L.; Hoang H.; Gu L.; Wu X.; Bacchiocca M.; Howard L.; Hampsch-Woodill M.; Huang D.; Ou B.; Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORACFL)) of plasma and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **2003**, 51, 3273–3279.
259. Patel R.M.; Patel N.J. In vitro antioxidant activity of coumarin compounds by DPPH, Super oxide and nitric oxide free radical scavenging methods. *Journal of Advanced Pharmacy Education & Research*. **2011**, 1, 52-68.
260. Plano D.; Baquedano Y.; Ibáñez E.; Jiménez I.; Palop J.A.; Spallholz J.E.; Sanmartín C. Antioxidant-Prooxidant Properties of a New Organoselenium Compound Library. *Molecules*. **2010**, 15, 7292-7312.

Promocijas darbs “**Selēna noteicošā loma struktūras – pretvēža aktivitātes pētījumos**”
izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts pastāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: _____

/I.Domračeva/

2015.gada _____

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Zinātniskais vadītājs: Dr.habil.chem., prof. Grigorijs Veinbergs

Paraksts _____

/G.Veinbergs/

2015.gada _____

Zinātniskais vadītājs: Dr.chem. Pāvels Arsenjans

Paraksts _____

/P.Arsenjans/

2015.gada _____

Darbs iesniegts

LU Ķīmijas nozares Promocijas padomē: _____(datums)

Padomes sekretārs: _____
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

Darbs aizstāvēts Promocijas padomes sēdē:

_____ protokols Nr. _____
(datums) (protokola Nr.)

Padomes sekretārs: _____
(personiskais paraksts) (paraksta atšifrējums)

PIELIKUMS

PUBLIKĀCIJU KOPIJAS



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Comptes Rendus Chimie

www.sciencedirect.com



Full paper/Mémoire

Selenopheno[3,2-*c*]- and [2,3-*c*]coumarins: Synthesis, cytotoxicity, angiogenesis inhibition, and antioxidant properties

Pavel Arsenyan^{a,*}, Jelena Vasiljeva^a, Irina Shestakova^a, Ilona Domracheva^a,
Elina Jaschenko^a, Nadezhda Romanchikova^a, Ainars Leonchiks^b,
Zhanna Rudevica^b, Sergej Belyakov^a

^a Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, 1006 Riga, Latvia

^b Latvian Biomedical Research and Study Centre, Ratsupites 1, 1067 Riga, Latvia



ARTICLE INFO

Article history:

Received 1st May 2014

Accepted after revision 22 September 2014

Available online 11 March 2015

Keywords:

Angiogenesis

Antioxidant

Coumarin

Cytotoxic activity

Selenium

Selenophene

ABSTRACT

A simple method for the synthesis of substituted selenopheno[2,3-*c*] and -[3,2-*c*]coumarins by treatment of the corresponding ethynylcoumarins with *in situ* prepared selenium(IV) bromide in 1,4-dioxane-water was elaborated. Molecular structures for selected derivatives were confirmed by X-ray diffraction measurements. The cytotoxic activity of novel selenophenocoumarins showed higher activity and lower acute toxicity than sodium selenite on various tumor cell lines as well as an ability for inhibiting matrix metalloproteinases (MMP-1 – MMP-14), angiogenesis on matrigel *in vitro* and *in vivo*. The compounds exhibit antioxidant and prooxidant properties.

© 2015 Académie des sciences. Published by Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Since the coumarin system is found in the composition of many natural compounds, derivatives of coumarin have excited considerable attention. Coumarins constitute an important class of compounds, with several types of pharmacological agents possessing anti-cancer, anti-HIV, anticoagulant, spasmolytic and antibacterial activity, among others [1a–c]. Of the many actions of coumarins, antioxidant and antiproliferative effects stand out. A large number of structurally novel coumarin derivatives have ultimately been reported to show substantial cytotoxic activity *in vitro* and *in vivo* [1d,1e]. On this basis, medicinal preparations have been obtained and developed with a

wide range of biological activities (*Psoralen*, *Angelicin*, *Xanthotoxin*, *Bergapten*, *Nodakenetin*, etc.). *Imperatorin* exhibits an ability for inhibiting malicious tumor growth [2a]. *Osthole* is effective in inhibiting the migration and invasion of breast cancer cells by wound healing and Transwell[®] assays and effectively inhibits matrix metalloproteinase promoters and enzyme activity [2b]. Also, unsubstituted coumarin exhibits cytotoxic activity [2c]. On the other hand, selenium has attracted great interest as an essential element and certain diseases have been eradicated by dietary supplementation of this element [3a–c]. Selenium is essential for cell metabolism as a component of glutathione peroxidase and of other enzyme systems. Current interest lies in the prevention of certain cancers by supplementation with selenium [3d–k]. Selenium appears to operate by several mechanisms depending on the chemical form of selenium, the nature of the carcinogenic process, and its dosage. There was no significant difference in the potencies of selenate, selenite,

* Corresponding author at: Department of Medicinal chemistry, Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, 1006 Riga, Latvia.
E-mail address: pavel.arsenyan@lycos.com (P. Arsenyan).

selenium dioxide, selenomethionine and selenocysteine to inhibit the development of mammary tumors, drug-resistant and drug non-resistant human ovarian tumor cells [4a]. We reported previously the synthesis and cytotoxic activity of selenopheno[3,2-*c*]- and -[2,3-*c*]quinolones [4b] and 3-substituted benzo[*b*]selenophenes [4c]. Taking into account the importance of selenium as a trace element in the organism and our previous research [4d–f], the present studies are connected with the elaboration of synthetic methods, cytotoxic activity studies, human matrix metalloproteinases (MMPs), angiogenesis on matrigel *in vitro* and *in vivo* inhibition ability, and antioxidant activity in a series of selenopheno[3,2-*c*] and [2,3-*c*]coumarins.

2. Results and discussion

During the last decade, benzo[*b*]selenophenes have attracted increasing attention in both medicinal chemistry and materials science. From a synthetic point of view, the chemistry of selenium is usually quite complicated [5]. Particularly, the preparation of 2-arylbenzo[*b*]selenophenes requires multistep protocols, complex reaction conditions and the use of toxic and hazardous chemicals [6]. Recently, we reported a novel approach for the cyclization of arylalkynes with selenium(IV) bromide prepared *in situ* by dissolving selenium(IV) oxide in concentrated hydrobromic acid using cyclohexene as a bromine molecule scavenger, as well as the utilization of others selenium(II) and (IV) halides in the same reaction [7].

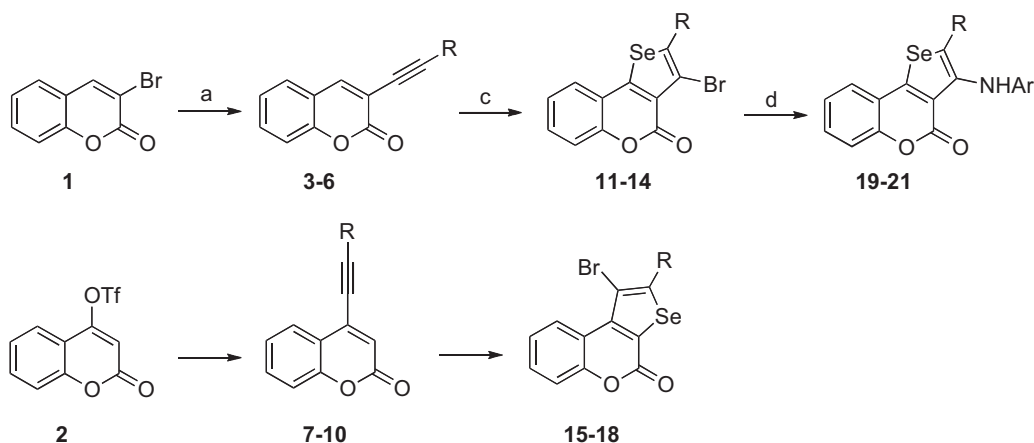
Our synthetic strategies for the insertion of selenophene fragment to coumarins are presented in Scheme 1. We started with the incorporation of an ethynyl substituent in positions 3 or 4 of 3-bromocoumarin (**1**) and 4-(trifluoromethanesulfonyl)coumarin (**2**), correspondingly, by a palladium-catalyzed reaction with 2-methyl-2-hydroxybut-3-yne, *N*-propargylpiperidine, *N*-propargylmorpholine, and *N*-propargyl-*N*-methylpiperazine under

Sonogashira cross-coupling conditions in *N*-methylpyrrolidone (NMP) or DMF media using bis(triphenylphosphino)palladium(II) chloride or tetrakis(triphenylphosphine) palladium(0) as catalysts in the presence of catalytic amounts of copper(I) iodide and triethylamine as a base. The desired ethynylcoumarins **3–6** and **7–10** were successfully prepared in good to excellent yields.

For the formation of the selenophene ring, we used an addition reaction of selenium(IV) bromide to the triple bond. A 1,4-dioxane solution of ethynylcoumarins **3–10** has been treated with *in situ* prepared selenium(IV) bromide from selenium(IV) oxide and concentrated hydrobromic acid at room temperature. Selenophenocoumarins **11–18** were formed in satisfactory yields (61–72%). It opens a simple and elegant way to the synthesis of a wide range of a various substituted selenophenocoumarin derivatives just in one step.

With the purpose of introducing the amino group in position 3 of the selenophene ring, a Buchwald–Hartwig-type coupling has been examined. After optimization of the reaction conditions, Pd₂dba₃ as a source of palladium(0) and xantphos as an appropriate ligand were chosen. 3-Bromo-2-morphol-4-yl-methylselenopheno[3,2-*c*]chromen-4-one (**13**) has been chosen for the modification as a model compound. According to our results, 2-aminopyridine readily reacts with **13**, performing the reaction in xylene at 120 °C using cesium carbonate as a base. The desired 2-morphol-4-ylmethyl-3-(pyrid-2-ylamino)-selenopheno[3,2-*c*]chromen-4-one (**19**) was isolated from the reaction mixture in 90% yield. Pyrid-3-ylamino (**20**) and pyridyl-4-ylamino (**21**) chromenones were obtained in 70% and 65%, correspondingly.

The structures of the studied compounds **11**, **15**, **14** and **21** are shown in Fig. 1. The crystal structures of these compounds are different (Table 1). The molecular packing of **11** is characterized by strong intermolecular halogen bonding between bromide and carbonyl oxygen atoms. The length of Br18...O19 is equal 3.267(4) Å, the angle C3–Br18...O19 is 162.3(2)°. In the crystal structure,



Scheme 1. Synthesis of selenophenocoumarins. Reagents and reaction conditions: a: PdCl₂ (10 mol %), Ph₃P (20 mol %), CuI (10 mol %), terminal acetylene (1.5 equiv), NMP, Et₃N, 55 °C, 20 h; b: (Ph₃P)₄Pd (5 mol %), CuI (20 mol %), terminal acetylene (1.5 equiv), DMF, Et₃N, rt, 20 h; c: SeO₂ (2 equiv), conc. HBr, dioxane, rt, 24–48 h; d: Pd₂dba₃ (5 mol %), xantphos (5 mol %), pyridylamine (1.3 equiv), Cs₂CO₃ (2.7 equiv), xylene, 120 °C, 20 h. **3**, **7**, **11**, **15** (R = CMe₂OH), **4**, **8**, **12**, **16** (R = CH₂N(CH₂)₅), **5**, **9**, **13**, **17** (R = CH₂N(CH₂CH₂)₂O), **6**, **10**, **14**, **18** (R = CH₂N(CH₂CH₂)₂NMe), **19–21** (R = CH₂N(CH₂CH₂)₂O), **19** (Ar = 2-Py), **20** (Ar = 3-Py), **21** (Ar = 4-Py).

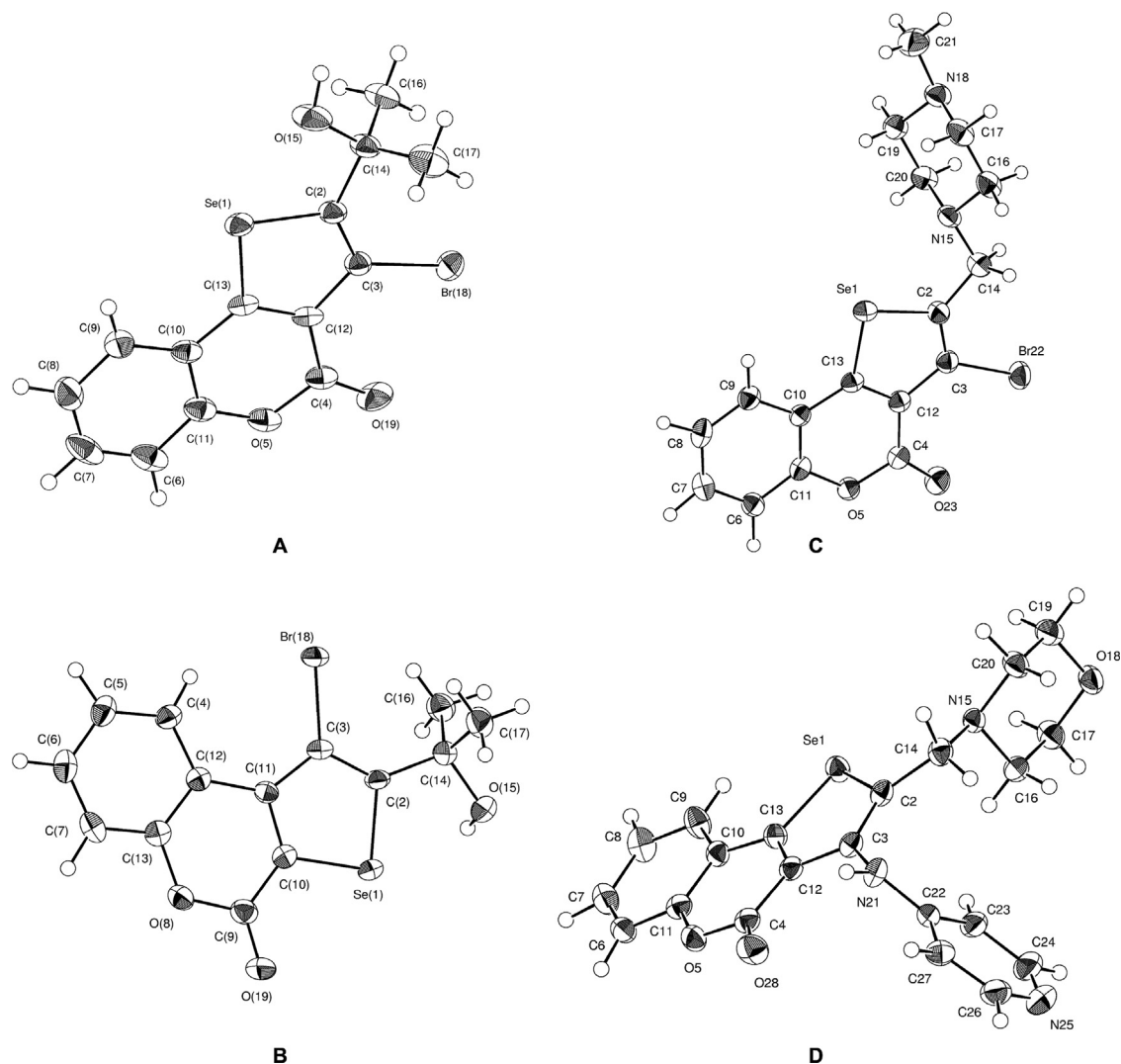


Fig. 1. Oak Ridge Thermal-Ellipsoid Plot Program (ORTEP) molecular structures of **11** (A), **15** (B), **14** (C), **21** (D).

molecules associate with centrosymmetric dimers by means of halogen bonds. Besides, there is a strong intermolecular hydrogen bond of OH...O-type between the hydroxy group and the pyrane oxygen, with a length of 2.828(5) Å (H15...O5 = 2.19 Å, O15–H15...O5 = 130°). By means of these hydrogen bonds, the chains along the crystallographic axis *b* form in the crystal structure. The graph set of these chains is C(8), in accordance with the classification of hydrogen bond motifs in crystals [8]. In the crystal structure of **15**, there is a strong intermolecular OH...O hydrogen bond between the hydroxy group and the carbonyl oxygen (O15...O19 = 2.871(3) Å, H15...O19 = 2.01 Å, O15–H15...O19 = 151°). By means of these bonds, the chains with graph set C(8) form along the crystallographic axis *a*. In this crystal structure, unlike in **11**, there is no sigma-hole interaction with the bromine atom. In molecule **14**, the chair conformation occurs for the piperazine cycle. Also, this conformation is observed for the morpholine cycle in **21**. In the crystal structure of **11**, there are only weak intermolecular CH...O interactions. A moderate intermolecular NH...O-type

hydrogen bond between the amino group and the morpholine oxygen occurs in the crystal structure of **21**. Chain formation [with graph set C(9)] along the monoclinic axis *b* is determined by hydrogen bonds (N21...O18 = 3.108(2) Å, H21...O19 = 2.18 Å, N21–H21...O18 = 165°).

In vitro antiproliferative activity caused by selenophenocoumarins was tested on monolayer tumor cell lines CCL-8 (mouse sarcoma), MDA-MB-435s (human melanoma), MES-SA (human uterus sarcoma), MCF-7 (human breast adenocarcinoma, estrogen-positive), HT-1080 (human fibrosarcoma) and MG-22A (mouse hepatoma). Using the NIH 3T3 (mouse fibroblasts) cell line the borderline concentration, relevant to the highest tolerated dose, is determined for each compound. The basal cytotoxicity is to be used to predict starting doses for *in vivo* acute oral LD₅₀ values in rodent [9] (Table 2). Sodium selenite (Na₂SeO₃) was used as a reference. According to our data 3-bromo-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)selenopheno[3,2-*c*]chromen-4-one (**11**) and its regioisomer **15** has no *in vitro* cytotoxic effect on all studied tumor cell lines, besides, these

Table 1
Crystal data for the studied compounds.

	11	15	14	21
Brutto-formula	C ₁₄ H ₁₁ BrO ₃ Se	C ₁₄ H ₁₁ BrO ₃ Se	C ₁₇ H ₁₇ BrN ₂ O ₂ Se	C ₂₁ H ₁₉ N ₃ O ₃ Se
Formula weight	386.09	386.09	440.20	440.36
Crystal system	Triclinic	Monoclinic	Monoclinic	Monoclinic
a, [Å]	6.7735(5)	12.3871(4)	9.4797(2)	9.6710(2)
b, [Å]	9.4759(7)	6.7767(2)	18.4684(4)	16.4909(3)
c, [Å]	10.5577(9)	15.9261(5)	9.6250(3)	12.1335(3)
α, [°]	90.465(3)	90.0	90.0	90.0
β, [°]	96.238(3)	91.430(1)	94.217(1)	98.296(1)
γ, [°]	94.580(6)	90.0	90.0	90.0
V, [Å ³]	671.39(9)	1336.48(7)	1680.53(7)	1914.84(7)
Space group	P $\bar{1}$	P 2 ₁ /n	P 2 ₁ /c	P 2 ₁ /c
Z	2	4	4	4
μ, [mm ⁻¹]	5.77	5.80	4.62	1.99
Density (calc.) [g/cm ³]	1.910	1.919	1.740	1.527
2θ _{max} for data [°]	57.0	59.0	57.0	59.0
Reflection collected	3838	6022	7507	9208
Independent reflections	3395 (R _{int} = 0.029)	3590 (R _{int} = 0.033)	4202 (R _{int} = 0.028)	5228 (R _{int} = 0.029)
Reflections with I > 3σ(I)	2472	2661	3212	3798
Number of parameters	172	172	208	253
Final R-factor	0.036	0.035	0.050	0.034
wR ₂ index for all data	0.072	0.071	0.131	0.068
Temperature, [°C]	-80	-120	-100	-100
Using programs	SIR97, maXus	SIR97, maXus	SIR97, maXus	SIR94, maXus
CCDC deposition number	913091	913093	913092	913094

selenophenes are not toxic on NIH 3T3, their acute toxicity being more than 2000 mg/kg (Table 2). More promising results were obtained in a series of aminomethylselenophenocoumarins **12–14** and **16–18**. 3-Bromo-2-piperid-1-ylmethylselenopheno[3,2-c]chromen-4-one (**12**) exhibits the highest antiproliferative activity *in vitro* on the studied tumor cell lines. The best results were obtained with mouse sarcoma (CCL-8, IC₅₀ = 16 μM) and human uterus sarcoma (MES-SA, IC₅₀ = 26 μM) cell lines. Morpholylmethyl- **13** and *N*-methylpiperazylmethylcoumarins **14** are less cytotoxic, however, the last one exhibits good activity on MES-SA (IC₅₀ = 9.4 μM), simultaneously with quite high acute toxicity *in vitro* (LD₅₀ = 334 mg/kg). Compounds have tumor tissue-specific effects. Notably, derivative **14** is more cytotoxic than sodium selenite (IC₅₀ = 29 μM). Also, in accordance with the results of cytotoxic activity selenopheno[3,2-c]coumarins **12–14** are more active against cancer cell growth than the corresponding selenopheno[2,3-c]coumarins **16–18**. In a series of 2-morphol-4-ylmethyl-3-(pyridylamino)-selenopheno[3,2-c]chromen-4-ones (**19–21**), we found that 2-pyridylamino derivative **19** has no cytotoxic activity on studied cell lines, however, 3- and 4-pyridylaminocoumarins **20** and **21** exhibit a medium antiproliferative effect

on tumor cell growth. Notably, selenophenocoumarin **21** was able to inhibit human breast adenocarcinoma cells (MCF-7, IC₅₀ = 18 μM). Furthermore, selenophenocoumarins **12–21** (LD₅₀ = 334–2000 mg/kg) are much less toxic than Na₂SeO₃ (LD₅₀ = 105 mg/kg).

Matrix metalloproteinases (MMPs), also designated as matrixins, hydrolyze components of the extracellular matrix. These proteinases play a central role in many biological processes, such as embryogenesis, normal tissue remodeling, wound healing, and angiogenesis, and in diseases such as atheroma, arthritis, cancer, and tissue ulceration. Matrix metalloproteinase MMP-2 (gelatinase A) is very active at degrading extracellular matrix [10]. Inhibition of matrix metalloproteinase enzymes by synthesized selenocoumarins **12–21** were detected on the MMP Inhibitor Fluorimetric Profiling kit using NNGH (*N*-isobutyl-*N*-(4-methoxyphenylsulfonyl)glycylhydroxamic acid) as a standard. According to our data, selenocoumarins **12–18** exhibit no ability to inhibit MMPs (Table 3).

However, the introduction of aminopyridyl moiety bromo substituent in 3-bromo-2-morphol-4-yl-methylselenolo[3,2-c]chromen-4-one (**13**) molecule leads to a selective increase of MMP-2 and MMP-14 inhibition. 2-Pyridylamino **19** and 3-pyridylamino derivative **20** are

Table 2

In vitro cytotoxicity in monolayer tumor cell lines CCL-8 (mouse sarcoma), MDA-MB-435s (human melanoma) MES-SA (human uterus sarcoma), MCF-7 (human breast adenocarcinoma, estrogen-positive), HT-1080 (human fibrosarcoma), MG-22A (mouse hepatoma) and normal cell line NIH 3T3 (mouse fibroblasts) caused by selenophenocoumarins.

Number	CCL-8	MDA-MB-435s	MES-SA	MCF-7	HT-1080	MG-22A	3T3	LD ₅₀ mg/kg
	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	IC ₅₀	
Na ₂ SeO ₃	8	12	29	17	1.7	64	23	105
11	128	^a	^a	^a	^a	246	^a	> 2000
12	16	45	26	39	47	27	156	660
13	104	47	^a	111	^a	^a	^a	> 2000
14	29	40	9.4	44	41	29	40	334
15	96	^a	259	184	93	79	^a	> 2000
16	64	^a	^a	^a	^a	50	2147	> 2000
17	70	156	^a	99	^a	217	653	1476
18	38	44	32	35	43	37	123	572
19	^a	^a	195	134	^a	166	^a	> 2000
20	36	47	34	41	77	42	97	705
21	41	36	44	18	41	27	46	484

IC₅₀: concentration (μM) providing 50% cell killing effect [(CV + MTT)/2].

^a No cytotoxic effect.

able to inhibit MMP-2 up to 26%. The best results, obtained by introducing a 4-pyridylamino group, selenolocoumarin **21** shows selective 54% inhibition of MMP-2 compared to NNGH. In accordance with MMPs inhibition data, three compounds (**14**, **19** and **21**) were chosen for angiogenesis inhibition studies *in vitro* and *in vivo*. An *in vitro* experiment has been performed on Matrigel (BD Biosciences) human umbilical vein endothelial cell line (HUVECs) tube formation model. According to the obtained experimental results, 3-bromo-2-(4-methylpiperaz-1-yl)-methyl-selenolo[3,2-c]chromen-4-one (**14**) is able to inhibit angiogenesis by 84%, also 2- and 4-pyridylaminocoumarins **19** and **21** slow down angiogenesis

by 3% and 95%, correspondingly. The angiogenesis model *in vivo* was based on the use of Matrigel implants in Balb/c AnNCrl mice (20 g, 4 weeks of age). It has been shown that *N*-methylpiperazylcoumarin **14** retard angiogenesis by 30%. However, more interesting results were obtained for pyridylaminocoumarins **19** and **21**. 2-Pyridyl derivative **19** shows 36% angiogenesis inhibition level, but 4-pyridylcoumarin **21** almost completely lost its ability in *in vivo* tests. In our opinion, it could be explainable by coumarin cycle hydrolysis during experiments on a living model. After hydrolysis, compound **19** may form tridentate chelate (pyridyl nitrogen, amino group, and carbonic acid moiety), but with 4-pyridyl derivative **21** only the two-dentate form

Table 3

MMP and angiogenesis *in vitro* and *in vivo* inhibition caused by selenophenocoumarins **12–21**.

Number	MMP 1	MMP 2	MMP 3	MMP 7	MMP 8	MMP 9	MMP 10	MMP 12	MMP 13	MMP 14	Angiogenesis, %	
											<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
NNGH ^a	100	100	100	18.0	100	100	100	100	100	100		
12	8.5	9.0	9.4	3.1	0.0	10.6	11.3	11.6	8.1	19.3		
13	4.5	0.0	7.5	2.0	0.0	7.8	6.5	8.7	23.2	7.3		
14	10.1	14.7	10.0	6.4	0.0	11.2	14.0	13.3	12.2	33.5	84 ± 14	30 ± 4
15	3.9	0.5	12.5	4.2	0.0	14.0	9.2	6.0	12.7	8.7		
16	0.9	10.8	4.5	7.3	0.0	1.5	1.5	0.0	6.1	11.9		
17	0.0	0.0	0.0	4.2	0.0	0.0	0.0	0.0	6.6	8.5		
18	0.0	0.0	0.0	6.5	0.0	2.4	0.0	0.0	7.0	13.7		
19	13.6	31.9	13.4	10.7	16.9	12.7	12.8	12.2	10.6	21.6	3 ± 1	36 ± 8
20	18.5	26.4	14.1	14.2	15.4	15.3	16.3	13.8	23.7	24.6		
21	12.0	54.0	15.8	12.3	12.4	17.0	12.6	14.9	14.9	40.0	95 ± 7	9 ± 4

^a *N*-isobutyl-*N*-(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamic acid.

is obtained. Further research will be connected with profound SAR studies with the purpose to find more active and selective substances.

Nowadays, there is an increased interest in using antioxidants for medical purposes. According to literature data, selenium-containing compounds possess modulating activity of oxidative stress during carcinogenesis [11]. So, we tested selected compounds (Table 4) on free radical, super oxide, nitric oxide, peroxy and hydroxyl radical scavenging activities. Similar to coumarin and 7-hydroxycoumarin, selenophenocoumarins **11–20** were not able to scavenge free radicals, nitric oxide, and hydroxyl radicals. However, 3-pyridylamino coumarin **20** exhibits low activity on super oxide concentration inhibition ($IC_{50} = 160 \mu\text{M}$). Moreover, *N*-methylpiperazylamino-methyl derivatives **14** and **18** are medium peroxy radical scavengers ($IC_{50} = 62$ and $87 \mu\text{M}$, correspondingly). It should be noted that coumarin **20** is only two times less active than 7-hydroxycoumarin in peroxy radical scavenging ($IC_{50} = 4 \mu\text{M}$). Selenium-containing compounds showed high levels of superoxide generation *in vitro* via the oxidation of reduced glutathione [12]. An inspection of superoxide generation ability data showed activity caused by (1-hydroxy-1-methylethyl)selenophenocoumarins **11** and **15** (627 and 950 RLU, correspondingly). Besides, pyridylamino derivative **20** exhibits an 1875 RLU SOD generation level.

3. Conclusions

In summary, we have elaborated a simple method for the synthesis of substituted selenopheno[2,3-*c*] and -[3,2-*c*]coumarins in the reaction of substituted ethynylcoumarins with selenium(IV) bromide. The antiproliferative activity of novel selenophenocoumarins showed higher activity and lower acute toxicity than Na_2SeO_3 on various tumor cell lines. Promising result received on mouse sarcoma (CCL-8, up to $IC_{50} = 16 \mu\text{M}$) and human uterus

Table 4
Radical scavenging activity (IC_{50} , μM) caused by selenophenocoumarins.

Compound	Super oxide, IC_{50}	Peroxy radical, IC_{50}	Super oxide generation, RLU
Coumarin	–	> 1000	–
7-hydroxycoumarin	–	2	–
Resveratrol	17	1	–
11	–	–	627
15	–	–	950
12	–	320	–
16	710	598	–
13	–	1000	–
17	–	398	–
14	260	62	–
18	–	87	–
20	160	4	1875

sarcoma (MES-SA, up to $IC_{50} = 9.4 \mu\text{M}$) cell lines. 3-(4-Pyridylamino)-selenopheno[3,2-*c*]chromen-4-one **21** possesses the ability to inhibit human breast adenocarcinoma cells (MCF-7, $IC_{50} = 18 \mu\text{M}$). Furthermore, selenophenocoumarins ($LD_{50} = 334\text{--}2000 \text{ mg/kg}$) are much less toxic than sodium selenite ($LD_{50} = 105 \text{ mg/kg}$).

Selenophenocoumarin **21** shows a selective inhibition ability of metalloproteinase MMP-2 (54%). Methylpiperazyl substituted selenophenocoumarin **14** is able to inhibit angiogenesis by 84%, also 2- and 4-pyridylaminocoumarins **19** and **21** slow down angiogenesis by 3% and 95%, correspondingly. *N*-Methylpiperazylaminomethyl derivatives **14** and **18** are medium peroxy radical scavengers ($IC_{50} = 62$ and $87 \mu\text{M}$, correspondingly). It should be noted that coumarin **20** is only two times less active than 7-hydroxycoumarin in peroxy radical scavenging ($IC_{50} = 4 \mu\text{M}$). Besides, pyridylamino derivative **20** exhibits prooxidant activity (SOD = 1875 RLU).

4. Experimental

4.1. General

^1H , ^{13}C and ^{77}Se NMR spectra were recorded on a Varian 400 Mercury spectrometer at 400.0, 100.3 and 39.74 MHz correspondingly at 303 K in CDCl_3/TMS or $\text{DMSO}-d_6$ solution. The ^1H chemical shifts are given relative to TMS, ^{13}C – relative to chloroform or DMSO, and ^{77}Se – relative to dimethyl selenide. The melting points were determined on a “Digital melting point analyser” (Fisher), the results are given without correction. Diffraction data were collected on a Nonius KappaCCD diffractometer using graphite monochromated $\text{Mo K}\alpha$ radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). The crystal structures were solved by direct methods and refined by full-matrix least squares. The main crystallographic data and refinement parameters of the crystal structures are listed in Table 1. For further details, see the crystallographic data for these compounds deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as Supplementary Publications. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK.

4.1.1. General procedure for the preparation of 3-alkynylchromen-2-ones 3–6

Argon gas was bubbled for 15 min at 40 °C in a vial charged with palladium(II) chloride (39 mg, 0.22 mmol), triphenylphosphine (115 mg, 0.44 mmol) and copper(I) iodide (42 mg, 0.22 mmol) in 4 mL of dry NMP. Then a solution of **1** (0.5 g, 2.2 mmol) and terminal acetylene (3.3 mmol) in dry NMP (5 mL), and triethylamine (1 mL) was added to the reaction mixture. After 20 h of heating at 55 °C and usual workup, the crude product was purified by flash chromatography on silica gel using the mixture methylene chloride/methanol as an eluent.

4.1.1.1. 3-(3-Hydroxy-3-methyl-but-1-ynyl)chromen-2-one (3): Yield: 46% [13].

4.1.1.1.1. 3-(3-Piperid-1-yl-prop-1-ynyl)chromen-2-one (4). Yield: 42%, mp = 95–97 °C. ^1H NMR (400 MHz,

CDCl_3/TMS) δ (ppm): 1.44–1.49 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.60–1.63 (4H, m, NCH_2CH_2), 2.55–2.58 (4H, m, NCH_2), 3.53 (2H, s, CH_2N), 7.25–7.32 (2H, m, 6-CH, 8-CH), 7.44 (1H, dd, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.6$ Hz, 5-CH), 7.50 (1H, ddd, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 7-CH), 7.84 (1H, s, 4-CH). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 23.8 (NCH_2CH_2), 25.9 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 48.5 (NCH_2), 53.4 (NCH_2CH_2), 78.9 (coumarin-C \equiv C), 92.4 (coumarin-C \equiv C), 112.9, 116.7, 118.7, 124.7, 127.5, 131.9, 144.8 (C–O), 153.2 (4-CH), 159.5 (C=O); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_2$: C 76.38, H 6.41, N 5.24; found: C 76.11, H 6.33, N 5.07.

4.1.1.1.2. 3-(3-morphol-4-yl-prop-1-ynyl)chromen-2-one (5). Yield: 41%, oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 2.64 (4H, t, $J = 4.6$, CH_2N), 3.56 (2H, s, CH_2N), 3.76 (4H, t, $J = 4.6$, OCH_2), 7.27–7.31 (2H, m, 6-CH, 8-CH), 7.45 (1H, dd, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.6$ Hz, 5-CH), 7.52 (1H, ddd, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 7-CH), 7.85 (1H, s, 4-CH). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 48.1 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 52.3 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 66.8 (NCH_2), 79.4 (coumarin-C \equiv C), 91.2 (coumarin-C \equiv C), 112.6 (3-C), 116.7, 118.6, 124.7, 127.6, 132.1, 145.1 (C–O), 153.2 (4-CH), 159.4 (C=O); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_3$: C 71.36, H 5.61, N 5.20; found: C 71.24, H 5.50, N 5.13.

4.1.1.1.3. 3-(3-(4-Methylpiperaz-1-yl)prop-1-ynyl)chromen-2-one (6). Yield: 40%, oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 2.30 (3H, s, CH_3), 2.40–2.58 (4H, m, CH_2NCH_3), 2.65–2.74 (4H, m, NCH_2), 3.58 (2H, s, CH_2N), 7.25–7.32 (2H, m, 6-CH, 8-CH), 7.44 (1H, dd, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.6$ Hz, 5-CH), 7.51 (1H, ddd, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 7-CH), 7.85 (1H, s, 4-CH). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 45.9 (CH_3N), 47.7 (NCH_2), 51.9 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}$), 54.9 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}$), 79.3 (coumarin-C \equiv C), 91.6 (coumarin-C \equiv C), 112.7 (3-C), 116.7, 118.7, 124.7, 127.6, 132.1, 145.1 (C–O), 153.2 (4-CH), 159.4 (C=O); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$: C 72.32, H 6.43, N 9.92; found: C 72.16, H 6.47, N 9.59.

4.1.2. General procedure for the preparation of 4-alkynylchromen-2-ones 7–10

Argon gas was bubbled in a flask charged with 2 (0.5 g, 1.7 mmol), acetylene (2.5 mmol), tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) (98 mg, 0.085 mmol) and copper(I) iodide (64 mg, 0.34 mmol) in 5 mL of dry DMF, then triethylamine (0.7 mL, 5.1 mmol) was added to the reaction mixture. After 20 h of stirring at room temperature and usual workup, the crude product was purified by flash chromatography on silica gel using the mixture methylene chloride/methanol as an eluent.

4.1.2.1. 4-(3-Hydroxy-3-methylbut-1-ynyl)chromen-2-one (7) [14] Yield: 98%.

4.1.2.1.1. 4-(3-Piperid-1-yl-prop-1-ynyl)chromen-2-one (8). Yield: 75%, oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 1.44–1.50 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.63–1.69 (4H, m, NCH_2CH_2), 2.58–2.62 (4H, NCH_2), 3.64 (2H, s, CH_2N), 6.54 (1H, s, 3-CH), 7.29–7.34 (2H, m, 6-CH, 8-CH), 7.54 (1H, ddd, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 5-CH), 7.85 (1H, dd, $J = 1.4$ Hz, $J = 8.2$ Hz, 7-CH). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 23.7 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 25.9 ($\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 48.6 (NCH_2), 53.5 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 78.9 (coumarin-C \equiv C), 99.2 (coumarin-C \equiv C), 116.9, 118.4, 118.9, 124.4, 126.7,

132.2, 137.3 (4-C), 153.5 (C–O), 160.1 (C=O); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_2$: C 76.38, H 6.41, N 5.24; found: C 76.27, H 6.44, N 5.19.

4.1.2.1.2. 4-(3-Morphol-4-yl-prop-1-ynyl)chromen-2-one (9). Yield: 76%, oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 2.66 (4H, t, $J = 4.6$, CH_2N), 3.67 (2H, s, CH_2N), 3.79 (4H, t, $J = 4.6$, OCH_2), 6.54 (1H, s, 3-CH), 7.29–7.33 (2H, m, 6-CH, 8-CH), 7.55 (1H, ddd, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 5-CH), 7.83 (1H, dd, $J = 1.4$ Hz, $J = 8.2$ Hz, 7-CH). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 48.1 (NCH_2), 52.4 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 66.8 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 79.3 (coumarin-C \equiv C), 97.9 (coumarin-C \equiv C), 117.0, 118.3, 119.1, 124.4, 126.5, 132.3, 136.9 (4-C), 153.5 (C–O), 160.0 (C=O); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}_3$: C 71.36, H 5.61, N 5.20; found: C 71.33, H 5.67, N 5.11.

4.1.2.1.3. 4-(3-(4-Methylpiperaz-1-yl)prop-1-ynyl)chromen-2-one (10). Yield: 67%, oil. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 2.29 (3H, s, CH_3), 2.42–2.57 (4H, m, CH_2NCH_3), 2.65–2.76 (4H, m, NCH_2), 3.66 (2H, s, CH_2N), 6.51 (1H, s, 3-CH), 7.25–7.30 (2H, m, 6-CH, 8-CH), 7.52 (1H, ddd, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 5-CH), 7.81 (1H, dd, $J = 1.4$ Hz, $J = 8.2$ Hz, 7-CH). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 45.8 (NCH_3), 47.5 (NCH_2), 51.9 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}$), 54.7 ($\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NMe}$), 78.9 (coumarin-C \equiv C), 98.3 (coumarin-C \equiv C), 116.6, 118.1, 118.7, 124.2, 126.5, 132.0, 136.9 (4-C), 153.2 (C–O), 159.8 (C=O); elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$: C 72.32, H 6.43, N 9.92; found: C 72.24, H 6.40, N 9.69.

4.1.3. General procedure for the preparation of selenopheno[3,2-c], [2,3-c]-coumarins 11–18

3-Alkynyl-chromen-2-one 3–10 (1.0 mmol) in dioxane was added to a solution of selenium dioxide (0.22 g, 2.0 mmol) in HBr (2 mL), and the mixture was stirred at room temperature for 24–48 h. After the consumption of substrate 3–10 (LC-MS), the reaction mixture was basified by aqueous Na_2CO_3 and extracted with methylene chloride. The organic phase was washed with brine, dried over anhydrous Na_2SO_4 , filtered, concentrated, and the residue was purified by flash chromatography on silica gel using the mixture methylene chloride/ethylacetate as an eluent.

4.1.3.1. 3-Bromo-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)selenopheno[3,2-c]chromen-4-one (11). Yield: 71%, mp = 224–225 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 1.84 (6H, s, CH_3), 2.86 (1H, br s, OH), 7.26 (1H, ddd, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 6-CH), 7.35 (1H, dd, $J = 1.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 8-CH), 7.47 (1H, ddd, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 7-CH), 7.57 (1H, dd, $J = 1.4$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 9-CH). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 28.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)\text{OH}$), 74.8 ($\text{C}(\text{CH}_3)\text{OH}$), 102.7, 117.1, 118.6, 124.2, 124.6, 125.4, 130.8, 150.1, 152.5, 155.8, 156.2 (C=O). ^{77}Se NMR (39.74 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 605.9. ESI-MS m/z 387 [$\text{M} + 1$]; elemental analysis calcd (%) for $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{BrO}_3\text{Se}$: C 43.55, H 2.87; found: C 43.46, H 2.88.

4.1.3.2. 3-Bromo-2-piperid-1-ylmethylselenopheno[3,2-c]chromen-4-one (12). Yield: 72%, mp = 224–226 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 1.46–1.52 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.60–1.66 (4H, m, NCH_2CH_2), 2.58–2.65

(4H, m, NCH₂), 3.72 (2H, s, CH₂N), 7.25 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 6-CH), 7.33 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.4 Hz, 8-CH), 7.45 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 7-CH), 7.55 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.8 Hz, 9-CH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 23.9 (NCH₂CH₂CH₂), 26.0 (NCH₂CH₂CH₂), 55.1 (NCH₂), 59.1 (NCH₂CH₂CH₂), 117.1, 118.9, 124.2, 124.6, 130.7, 150.1, 155.6, 158.9 (C=O). ESI-MS *m/z* 426 [M+1]; elemental analysis calcd (%) for C₁₇H₁₆BrNO₂Se: C 48.02, H 3.79, N 3.29; found: C 48.00, H 3.95, N 3.01.

4.1.3.3. 3-Bromo-2-morphol-4-yl-methylselenopheno[3,2-*c*]chromen-4-one (13). Yield: 75%, mp = 215–216 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 2.68 (4H, t, *J* = 4.6, CH₂N), 3.75 (4H, t, *J* = 4.6 Hz, OCH₂), 3.78 (2H, s, CH₂N), 7.26 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 6-CH), 7.35 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.4 Hz, 8-CH), 7.47 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 7-CH), 7.54 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.8 Hz, 9-CH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 53.9 (NCH₂), 58.8 (NCH₂CH₂O), 67.0 (NCH₂CH₂O), 106.7, 117.1, 118.8, 124.2, 124.6, 130.9, 146.9, 150.2, 154.1, 155.5 (C=O). ⁷⁷Se NMR (39.74 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 616.4. ESI-MS *m/z* 428 [M+1]; elemental analysis calcd (%) for C₁₆H₁₄BrNO₃Se: C 44.99, H 3.30, N 3.28; found: C 44.91, H 3.22, N 3.17.

4.1.3.4. 3-Bromo-2-(4-methylpiperaz-1-yl)-methylselenopheno[3,2-*c*]chromen-4-one (14). Yield: 68%, mp > 230 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 2.31 (3H, s, CH₃), 2.42–2.56 (4H, m, CH₂NCH₃), 2.64–2.78 (4H, m, NCH₂), 3.77 (2H, s, CH₂N), 7.25 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 6-CH), 7.34 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.4 Hz, 8-CH), 7.46 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 7-CH), 7.54 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.8 Hz, 9-CH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 46.0 (CH₃N), 53.6 (NCH₂), 55.2 (NCH₂CH₂NMe), 58.4 (NCH₂CH₂NMe), 106.2, 117.1, 118.9, 124.2, 124.6, 130.8, 148.1, 150.2, 154.0, 155.5 (C=O). ⁷⁷Se NMR (39.74 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 618.2. ESI-MS *m/z* 441 [M+1]; elemental analysis calcd (%) for C₁₇H₁₇BrN₂O₂Se: C 46.38, H 3.89, N 6.36; found: C 46.30, H 3.71, N 6.00.

4.1.3.5. 1-Bromo-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)selenopheno[2,3-*c*]chromen-4-one (15). Yield: 70%, mp > 200 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.87 (6H, s, CH₃), 2.94 (1H, br s, OH), 7.33 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 6-CH), 7.42 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.2 Hz, 8-CH), 7.52 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 7-CH), 9.23 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.2 Hz, 9-CH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 28.3 (C(CH₃)OH), 75.3 (C(CH₃)OH), 100.8, 117.9, 118.7, 122.9, 123.8, 126.7, 130.1, 143.9, 153.0, 157.9 (C=O), 169.9 (C=O). ⁷⁷Se NMR (39.74 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 624.4. ESI-MS *m/z* 387 [M+1]; elemental analysis calcd (%) for C₁₄H₁₁BrO₃Se: C 43.55, H 2.87; found: C 43.51, H 2.82.

4.1.3.6. 1-Bromo-2-piperid-1-yl-methylselenopheno[2,3-*c*]chromen-4-one (16). Yield: 64%, mp = 193–195 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.46–1.52 (2H, m, CH₂CH₂CH₂), 1.62–1.67 (4H, m, NCH₂CH₂), 2.62–2.67 (4H, m, NCH₂), 3.69 (2H, s, CH₂N), 7.33 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz,

J = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 6-CH), 7.43 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.2 Hz, 8-CH), 7.52 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 7-CH), 9.12 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.2 Hz, 9-CH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 23.8 (NCH₂CH₂CH₂), 26.2 (NCH₂CH₂CH₂), 55.4 (NCH₂), 60.4 (NCH₂CH₂CH₂), 117.8, 118.5, 123.4, 123.8, 130.0, 143.8, 153.1 (C–O), 158.0 (C=O). ⁷⁷Se NMR (39.74 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 638.2. ESI-MS *m/z* 426 [M-1]; elemental analysis calcd (%) for C₁₇H₁₆BrNO₂Se: C 48.02, H 3.79, N 3.29; found: C 47.88, H 3.61, N 3.11.

4.1.3.7. 1-Bromo-2-morphol-4-yl-methylselenopheno[2,3-*c*]chromen-4-one (17). Yield: 65%, mp > 200 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 2.73 (4H, t, *J* = 4.0, CH₂N), 3.76–3.79 (6H, m, CH₂N, OCH₂), 7.34 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 6-CH), 7.43 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.2 Hz, 8-CH), 7.52 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 7-CH), 9.12 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.2 Hz, 9-CH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 54.2 (NCH₂), 60.1 (NCH₂CH₂O), 67.0 (NCH₂CH₂O), 103.8, 117.8, 123.3, 123.9, 130.2, 143.5, 153.0, 157.8 (C–O), 160.9 (C=O). ⁷⁷Se NMR (39.74 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 616.4. ESI-MS *m/z* 428 [M+1]; elemental analysis calcd (%) for C₁₆H₁₄BrNO₃Se: C 44.99, H 3.30, N 3.28; found: C 44.79, H 3.14, N 3.22.

4.1.3.8. 1-Bromo-2-(4-methylpiperaz-1-yl)-methylselenopheno[2,3-*c*]chromen-4-one (18). Yield: 67%, mp > 200 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 2.34 (3H, s, CH₃), 2.46–2.57 (4H, m, CH₂NCH₃), 2.72–2.80 (4H, m, NCH₂), 3.77 (2H, s, CH₂N), 7.34 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 6-CH), 7.44 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.2 Hz, 8-CH), 7.53 (1H, ddd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 7.2 Hz, *J* = 8.4 Hz, 7-CH), 9.14 (1H, dd, *J* = 1.4 Hz, *J* = 8.2 Hz, 9-CH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 45.9 (CH₃N), 53.8 (NCH₂), 55.2 (NCH₂CH₂NMe), 59.6 (NCH₂CH₂NMe), 103.4, 117.8, 118.4, 123.4, 123.9, 127.6, 130.1, 143.5, 153.1, 157.9 (C–O), 162.0 (C=O). ⁷⁷Se NMR (39.74 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 635.6. ESI-MS *m/z* 441 [M+1]; elemental analysis calcd (%) for C₁₇H₁₇BrN₂O₂Se: C 46.38, H 3.89, N 6.36; found: C 46.27, H 3.81, N 6.20.

4.1.4. General procedure for the preparation of 2-morpholin-4-ylmethyl-3-(pyridinylamino)-selenopheno[3,2-*c*]chromen-4-ones 19–21

Argon gas was bubbled for 15 min in a vial charged with 13 (0.2 g, 0.47 mmol), Pd₂dba₃ (21 mg, 0.023 mmol), xantphos (27 mg, 0.046 mmol) and pyridylamine (57 mg, 0.61 mmol) in 5 mL of xylene. Then freshly dried cesium carbonate (0.412 g, 1.26 mmol) was added and the reaction mixture was heated for 20 h at 120 °C. After usual workup, the crude product was purified by flash chromatography on silica gel using the mixture methylene chloride/methanol as an eluent.

4.1.4.1. 2-Morphol-4-ylmethyl-3-(pyrid-2-ylamino)selenopheno[3,2-*c*]chromen-4-one (19). Yield: 90%, mp = 195–197 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 2.61 (4H, t, *J* = 4.6 Hz, CH₂O), 3.64 (2H, s, CH₂N), 3.73 (4H, t, *J* = 4.6, NCH₂), 6.68 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, 3-CH-Py), 6.74 (1H, ddd, *J* = 0.8 Hz, *J* = 1.2 Hz, *J* = 7.2 Hz, 5-CH-Py), 7.29 (td, *J* = 1.2 Hz,

$J = 7.8$ Hz, 6-CH), 7.36 (1H, dd, $J = 0.8$ Hz, $J = 8.2$ Hz, 8-CH), 7.46 (1H, ddd, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 4-CH-Py), 7.51 (1H, ddd, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.2$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 7-CH), 7.62 (1H, dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 9-CH), 8.04 (1H, br s, NH), 8.17 (1H, dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 6-CH-Py) ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 54.1 (NCH₂), 58.7 (NCH₂CH₂O), 67.1 (NCH₂CH₂O), 110.3, 115.4, 117.1, 119.6, 121.4, 124.0, 124.8, 130.2, 133.9, 137.5, 138.2, 147.8, 149.6, 152.4, 155.8, 158.5 (C=O). ^{77}Se NMR (39.74 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 547.8. ESI-MS m/z 442 [M + 2]; elemental analysis calcd (%) for C₂₁H₁₉N₃O₃Se: C 57.28, H 4.35, N 9.54; found: C 57.21, H 4.33, N 9.50.

4.1.4.2. 2-Morphol-4-ylmethyl-3-(pyrid-3-ylamino)selenopheno[3,2-*c*]chromen-4-one (20). Yield: 70%, mp = 153–155 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 2.55 (4H, t, $J = 4.6$ Hz, CH₂O), 3.38 (2H, s, CH₂N), 3.71 (4H, t, $J = 4.6$ Hz, CH₂N), 7.09 (1H, ddd, $J = 1.6$ Hz, $J = 2.7$ Hz, $J = 8.2$ Hz, 4-CH-Py), 7.17 (1H, dd, $J = 8.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 5-CH-Py), 7.30 (1H, td, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 6-CH), 7.37 (1H, dd, $J = 0.8$ Hz, $J = 8.2$ Hz, 8-CH), 7.47 (1H, br s, NH), 7.49 (1H, ddd, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 7-CH), 7.62 (1H, dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 9-CH), 8.16 (1H, dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz, 6-CH-Py), 8.21 (1H, d, $J = 2.7$ Hz, 2-CH-Py) ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 53.9 (NCH₂), 57.6 (NCH₂CH₂O), 67.0 (NCH₂CH₂O), 117.2, 119.4, 121.2, 123.4, 123.6, 124.0, 124.9, 130.6, 134.2, 136.1, 139.5, 140.5, 141.9, 149.7, 153.3, 158.5 (C=O). ^{77}Se NMR (39.74 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 542.4. ESI-MS: m/z 442 [M + 2]; elemental analysis calcd (%) for C₂₁H₁₉N₃O₃Se: C 57.28, H 4.35, N 9.54; found: C 57.28, H 4.37, N 9.43.

4.1.4.3. 2-Morphol-4-ylmethyl-3-(pyrid-4-ylamino)selenopheno[3,2-*c*]chromen-4-one (21). Yield: 65%, mp = 202–205 °C. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 2.59 (4H, t, $J = 4.6$ Hz, CH₂O), 3.46 (2H, s, CH₂N), 3.72 (4H, t, $J = 4.6$ Hz, NCH₂), 6.60 (2H, d, $J = 5.9$ Hz, 3-CH-Py, 5-CH-Py), 7.31 (1H, td, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 6-CH), 7.37 (1H, dd, $J = 0.8$ Hz, $J = 8.2$ Hz, 8-CH), 7.44 (1H, br s, NH), 7.50 (1H, ddd, $J = 1.6$ Hz, $J = 7.4$ Hz, $J = 8.4$ Hz, 7-CH), 7.62 (1H, dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 7.8$ Hz, 9-CH), 8.33 (2H, d, $J = 5.9$ Hz, 2-CH-Py, 6-CH-Py). ^{13}C NMR (100.6 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 53.9 (NCH₂), 57.6 (NCH₂CH₂O), 67.0 (NCH₂CH₂O), 110.2, 117.3, 119.3, 121.4, 124.1, 124.9, 130.8, 134.2, 138.4, 149.8, 150.3, 150.9, 153.4, 158.0 (C=O). ^{77}Se NMR (39.74 MHz, CDCl_3/TMS) δ (ppm): 548.5. ESI-MS m/z 442 [M + 2]; elemental analysis calcd (%) for C₂₁H₁₉N₃O₃Se: C 57.28, H 4.35, N 9.54; found: C 57.10, H 4.39, N 9.37.

4.2. In vitro cytotoxicity assay

Monolayer tumor cell line: CCL-8 (mouse sarcoma), MDA-MB-435s (human melanoma) MES-SA (human uterus sarcoma), MCF-7 (human breast adenocarcinoma, estrogen-positive), HT-1080 (human fibrosarcoma), MG-22A (mouse hepatoma) and normal cell line NIH 3T3 (mouse fibroblasts) were cultured in standard medium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) without an indicator ("Sigma") supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum ("Sigma"). After the ampoule was thawed, the cells from 1 to 4 passages were used. About

$2\text{--}5 \times 10^4$ cells/mL (depending on line nature) were placed in 96-well plates immediately after compounds had been added to the wells. The control cells without test compounds were cultured on separate plates. The plates were incubated for 72 h, 37 °C, 5% CO₂. The number of surviving cells was determined using tri(4-dimethylaminophenyl)methyl chloride (Crystal Violet) or 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). MTT-test: after incubating with preparations, the culture medium was removed and 200 μL of fresh medium with 10 mM HEPES were added in each well of the plate, than 20 μL MTT (2 mg/mL in HBSS) were added. After incubation (3 h, 37 °C, 5% CO₂), the medium with MTT was removed and 200 μL of DMSO and 25 μL of glycine buffer (pH 10.5) were added at once to each sample. The samples were tested at 540 nm on Anthos HT II photometer. CV-test: after incubating with preparations cell culture was removed and 100 mL of 1% glutaraldehyde in HBSS was added to each well. After incubation (15 min) the HBSS with glutaraldehyde washed off H₂O (1 time) and 0.05% crystal violet were added. After incubation with dye (15 min), the samples were washed off with H₂O (3 times), and citrate buffers (pH 4.2) and ethanol (1:1) were added. The samples were tested at 540 nm.

4.3. MMP assay

Inhibitors of matrix metalloproteinase enzymes were detected with the use of MMP Inhibitor Fluorimetric Profiling kit (Biomol, USA) accordingly to the manufacturer's instructions. MMP activity assays were performed in 96-well plates using the recombinant human MMP-1–10, 12, 13 and 14 catalytic domains and OmniMMPTM fluorogenic substrate Mca-Pro-Leu-Gly-Leu-Dpa-Ala-Arg-NH₂. The test compounds (20 μM) were dissolved in DMSO. The compound NNGH (*N*-isobutyl-*N*-(4-methoxyphenylsulfonyl)-glycylhydroxamic acid) was used as a prototypic control inhibitor. The rate of substrate hydrolysis was determined by fluorescence intensity measurements for 10 min at 37 °C using a fluorescence plate reader (Tecan infinite M1000, Austria) with excitation at 328 nm and emission at 420 nm. Data analysis was performed using program GraphPad Prism[®] 4.0.

4.4. In vitro angiogenesis assay on matrigel

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were purchased from BDTM Biosciences and cultured in Vascular Cell Basal Medium (ATCC PCS-100-030) containing Endothelial Cell Growth kit (ATCC PCS-100-040) with growth factors and 2% fetal bovine serum. Cells were grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂–95% air. HUVECs used for the experiments were between passage 2 and 4.

The *in vitro* Angiogenesis Assay Kit (Item. No. 10009964, Cayman Chemical Company) was used in addition to the HUVEC proliferation assay. The BD Matrigel (BD MatrigelTM Basement Membrane Matrix, High Concentration) was thawed at 4 °C and mixed to homogeneity using cooled pipette tips. Cell culture plates (96-well) were bottom-coated with a thin layer of BD Matrigel (40 $\mu\text{L}/\text{well}$), which

was left to polymerize at 37 °C for 60 min. HUVEC (1×10^4 cells) were stimulated with 0.25 μ M PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate) in 80 μ L of medium and added to each well on the solidified BD Matrigel. The culture medium was added to each well in the presence or in the absence of compounds. The plates were incubated at 37 °C for 18–20 h and the endothelial tubes were quantified using a fluorescent microscope after staining with Calcein AM. Three microscope fields were selected at random and photographed. Tube formation was analyzed with an imaging system (Image-Pro 4.1). Each experiment was performed at least three times.

The murine Matrigel plug assay can be used to evaluate the anti-angiogenic effect. Female Balb/c AnNCrl mice (20 g, 4 weeks of age) were obtained from Charles River Laboratories. Before injection, heparin was incubated with bFGF, VEGF and with or without tested compounds for 5 min, then diluted into phenol red-free Matrigel™ (BD Basement Membrane Matrix High Concentration, Catalog No. 354248) on ice for a final concentration of 60 units/mL heparin, 10 μ g/mL bFGF, 100 ng/mL VEGF. Then, mice were subcutaneously injected under anesthesia (setona/ketamine) with 0.5 mL of Matrigel™ alone or with Matrigel™ containing bFGF, VEGF and tested compounds. PBS was used as a negative control, and VEGF as a positive control. Ten days after injection, mice were euthanized, and the Matrigel plugs were removed, embedded in OCT (Tissue-Tek), and frozen. Forty-micron sections ($n = 5$ sections per plug) were stained with hematoxylin/eosin and analyzed by confocal microscopy (Nikon). The Image-Pro Plus analysis system was used to quantify the percentage of area occupied by the vessel-like structures in each field.

4.5. Free radical scavenging activity [15]

The ability to scavenging the stable free radical, DPPH, was measured as a decrease in absorbance at 517 nm by the method of Brand–Williams et al. with some modifications. Several concentrations of test compounds in DMSO were prepared. The compound solution (0.1 mL) was added to the ethanol DPPH solution (0.1 mL, 0.2 mM) and the mixture was kept in the dark for 120 min. The absorbance at 517 nm was then measured by Tecan infinite M1000 (Tecan) fluorometer. The percentage of scavenging activity was calculated using the following formula:

$$\% \text{ scavenging/inhibition} = \frac{(\text{absorbance of control} - \text{absorbance of test sample})}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

The IC₅₀ values for each compound as well as for the standard preparation were calculated by computer program GraphPad Prism 3.0.

4.6. Superoxide free radical scavenging activity [16]

Ten microliters of a riboflavin solution [0.1 mg/mL], 10 μ L of an EDTA solution [12 mM], 10 μ L of methanol and 5 μ L of a NBT (nitro-blue tetrazolium) solution [1 mg/mL] were mixed in a test tube and the reaction mixture was diluted up to 150 μ L with a phosphate buffer [50 mM]. The

absorbance of the solution was measured at 590 nm using a phosphate buffer as a blank after illumination for 5 min. This was taken as a control. Several solutions with different concentrations of test compounds in DMSO or water were prepared. To each of these, 10 μ L of riboflavin, 10 μ L of EDTA, 10 μ L of methanol, 5 μ L of NBT and 15 μ L of the test compounds were mixed in a 96-well plate and further diluted up to 150 μ L with a phosphate buffer.

Absorbance was measured after illumination for 5 min at 590 nm on fluorometer Tecan infinite M1000 (Tecan). The percent of scavenging activity was calculated using the following formula:

$$\% \text{ scavenging/inhibition} = \frac{(\text{absorbance of control} - \text{absorbance of test sample})}{\text{Absorbance of control}} \times 100$$

The IC₅₀ values for each compound as well as for the standard preparation were calculated by computer program GraphPad Prism 3.0.

4.7. Nitric oxide radical scavenging

At physiological pH, nitric oxide generated from an aqueous sodium nitroprusside (SNP) solution interacts with oxygen to produce nitrite ions, which may be quantified by the Griess reaction. The reaction mixture contained 10 mM SNP, phosphate buffered saline (pH 7.4) and various doses (4–1000 μ M) of the test solution in a final volume of 0.09 mL. After incubation for 30 min at 25 °C, 0.150 mL of Griess reagent (1% sulfanilamide, 2% H₃PO₄, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride) was added and the mixture was incubated for 20 min at 25 °C. The absorbance of the chromophore formed was measured at 546 nm on Tecan infinite M1000 (Tecan) spectrometer. Curcumin was used as the positive control. The percentage of scavenging activity was calculated using the following formula:

$$\% \text{ scavenging/inhibition} = \frac{(\text{absorbance of control} - \text{absorbance of test sample})}{\text{absorbance of control}} \times 100$$

The IC₅₀ values for each compound as well as for the standard preparation were calculated by computer program GraphPad Prism 3.0.

4.8. Peroxyl radical scavenging [17]

Analyses were conducted in a phosphate buffer (pH 7.4 at 37 °C). Peroxyl radicals were generated using 2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)dihydrochloride, which was freshly prepared for each run. Fluorescein was used as the substrate. Fluorescence conditions were as follows: excitation at 485 nm and emission at 520 nm. Sodium fluorescein was dissolved in phosphate buffer solution (PBS) (75 mM, pH = 7.0) to obtain a stock solution of 4.8 mM. The working solution (60 nM) was obtained by subsequent dilution in PBS. A solution of AAPH (2,2'-azo-bis(2-amidinopropane)dihydrochloride) was prepared at a concentration of 40 mM. All measurements were performed

in triplicate. A blank was run with each assay. The analysis was performed using black 96-well microplates (Nunc™) and a Tecan infinite M1000 (Tecan) multilabel counter. The sample (20 μL) was mixed with sodium fluorescein (120 μL) and incubated for 15 min at 37 °C. An AAPH (60 μL) solution was then added to the mixture and the microplate was shaken. The fluorescence ($\lambda_{\text{excitation}} = 485/14 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{emission}} = 535/25 \text{ nm}$) was registered every 2 min for 1 h. The quantitation of the antioxidant capacity was based on the calculation of the area under the curve (AUC).

4.9. Superoxide anion generating activity [11]

The control chemiluminescent (CL) assay cocktail without substrates or GSH was made using a 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing 0.025 μg lucigenin/mL. The assay cocktail with thiol contained 7 mg GSH/mL. To aliquots of thiol containing the assay cocktail was added each selenium compound in various doses (4–1000 μM) of the test solution in DMSO. Chemiluminescent data were recorded at 25 °C in 30-s integrated units over a period of up to 20 min with Tecan infinite M1000 (Tecan). There was a 3-s instrumental delay between integrations.

Acknowledgments

The financial support for this work provided by Latvian Council of Science (447/2012 and 593/2014), and National Research Program 2010–2013 (BIOMEDICINE) is gratefully acknowledged.

References

- [1] (a) L.-L. Kong, J.-F. Hu, N.-H. Chen, *Chinese Pharm. Bull.* 28 (2012) 165–168;
(b) D. Egan, R. O'Kennedy, E. Moran, D. Cox, E. Prosser, R.D. Thornes, *Drug Metab. Rev.* 22 (1990) 503–529;
(c) L. Santana, E. Uriarte, F. Roleira, N. Milhazes, F. Borges, *Curr. Med. Chem.* 11 (2004) 3239–3261;
(d) I. Kostova, *Curr. Med. Chem.—Anti-Cancer Agents* 5 (2005) 29–46;
(e) K.N. Venugopala, V. Rashmi, B. Odhav, *Biomed. Res. Int.* (2013) (ID 963248).
- [2] (a) K.W. Luo, J.G. Sun, J.Y.-W. Chan, L. Yang, S. Wu, K.-P. Fung, F. Liu, *Chemother* 57 (2011) 449–459;
(b) D. Yang, T. Gu, T. Wang, Q. Tang, C. Ma, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74 (2010) 1430–1434;
(c) J. Choi, K.T. Lee, H. Ka, W.T. Jung, H.J. Jung, H. Park, *J. Arch. Pharm. Res.* 24 (2001) 418–423.
- [3] (a) M. Vinceti, G. Dennert, C.M. Crespi, M. Zwahlen, M. Brinkman, M.P.A. Zeegers, M. Horneber, R. D'Amico, C. Del Giovane, *Cochrane Database Syst. Rev.* 3 (2014) CD005195;
(b) U. Peters, Y. Takata, *Mol. Nutr. Food Res.* 52 (2008) 1261–1272;
(c) S. Zhang, F. Li, M. Younes, H. Liu, C. Chen, Q. Yao, *PLoS One* 8 (2013) e63702;
(d) C. Jacob, G.I. Giles, N.M. Giles, H. Sies, *Angew. Chem. Int. Ed.* 42 (2003) 4742–4758;
(e) P. Du, U.M. Viswanathan, K. Khairan, T. Buric, N.E.B. Saidu, Z. Xu, B. Hanf, I. Bazukyan, A. Trchounian, F. Hannemann, I. Bernhardt, T. Burkholz, B. Diesel, A.K. Kiemer, K.-H. Schäfer, M. Montenarh, G. Kirsch, C. Jacob, *Med. Chem. Comm.* 5 (2014) 25–31;
- (f) E.R.T. Tiekink, *Dalton Trans.* 41 (2012) 6390–6395;
- (g) H.-L. Seng, E.R.T. Tiekink, *Appl. Organometal. Chem.* 26 (2012) 655–662;
- (h) Y.-C. Chen, K.S. Prabhu, A.M. Mastro, *Nutrients* 5 (2013) 1149–1168;
- (i) Z. Zhu, W. Jiang, *Biomed. Res. Trace Elem.* 19 (2008) 282–289;
- (j) H. Zeng, G.F. Combs Jr., *J. Nutr. Biochem.* 19 (2008) 1–7;
- (k) M. Ninomiya, D.R. Garud, M. Koketsu, *Coord. Chem. Rev.* 255 (2011) 2968–2990.
- [4] (a) P.B. Caffrey, G.D. Frenkel, *Cancer Lett.* 121 (1997) 177–180;
(b) P. Arsenyan, J. Vasiljeva, I. Shestakova, I. Domracheva, S. Belyakov, *Chem. Heterocycl. Comp.* 49 (2014) 1674–1680;
(c) P. Arsenyan, E. Paegle, S. Belyakov, I. Shestakova, E. Jaschenko, I. Domracheva, J. Popelis, *Eur. J. Med. Chem.* 46 (2011) 3434–3443;
(d) P. Arsenyan, K. Rubina, I. Shestakova, I. Domracheva, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 635–640;
(e) E. Lukevics, P. Arsenyan, K. Rubina, I. Shestakova, I. Domracheva, A. Nesterova, J. Popelis, O. Pudova, *Appl. Organometal. Chem.* 16 (2002) 235–238;
(f) E. Lukevics, P. Arsenyan, I. Shestakova, I. Domracheva, I. Kanepe, S. Belyakov, J. Popelis, O. Pudova, *Appl. Organometal. Chem.* 16 (2002) 228–234.
- [5] (a) C.R.B. Rhodena, G. Zeni, *Org. Biomol. Chem.* 9 (2011) 1301–3013 (and references therein);
(b) J. Vasiljeva, P. Arsenyan, *Chem. Heterocycl. Comp.* 48 (2012) 981–992;
(c) E.T. Pelkey, *Compreh. Heterocycl. Chem.* 3 (2008) 975;
(d) P. Arsenyan, K. Oberite, O. Pudova, E. Lukevics, *Chem. Heterocycl. Comp.* 38 (2002) 1437–1447.
- [6] (a) B. Wu, N. Yoshikai, *Angew. Chem. Int. Ed.* 52 (2013) 10496–10499;
(b) S. Mehta, J.P. Waldo, R.C. Larock, *J. Org. Chem.* 74 (2009) 1141–1147;
(c) T. Sato, I. Nakamura, M. Terada, *Eur. J. Org. Chem.* 32 (2009) 5509–5512;
(d) T. Kashi, S. Shinamura, M. Kohara, E. Miyazaki, K. Takimiya, M. Ikeda, H. Kuwabara, *Org. Lett.* 11 (2009) 2473–2475;
(e) H. Sashida, K. Sadamori, T. Tsuchiya, *Synth. Commun.* 28 (1998) 713–728;
(f) S.S. Racharlawara, D. Shankara, M.V. Karkhelikara, B. Sridharb, P.R. Likhara, *J. Organomet. Chem.* 757 (2014) 14–20.
- [7] (a) P. Arsenyan, *Tetrahedron Lett.* 55 (2014) 2527–2529;
(b) E. Paegle, S. Belyakov, P. Arsenyan, *Eur. J. Org. Chem.* (2014) 3831–3840;
(c) P. Arsenyan, J. Vasiljeva, S. Belyakov, *Mendeleev Commun.* 24 (2014) 32–34.
- [8] A. Altomare, M. Burla, M. Camalli, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. Moliterni, R. Spagna, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 115–119.
- [9] Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity Based on Recommendations from an International Workshop Organized by the Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM) and the National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM) National Toxicology Program. (2001), NIH Publication No. 10-4500, pp. C3–C11, D9–D10.
- [10] P. Devarajan, J.J. Johnston, S.S. Ginsberg, H.E. Van Wart, N. Berliner, *J. Biol. Chem.* 267 (1992) 25228–25232.
- [11] (a) M.-S. Schiedel, C.A. Briehn, P. Baeuerle, *Angew. Chem. Int. Ed.* 40 (2001) 4677–4680;
(b) E.A. Wilhelm, C.R. Jesse, C.F. Bortolatto, C.W. Nogueira, L. Savegnago, *Brain Res. Bull.* 79 (2009) 281–287;
(c) E. Domínguez-Álvarez, D. Plano, M. Font, A. Calvo, C. Prior, C. Jacob, J.A. Palop, C. Sanmartín, *Eur. J. Med. Chem.* 73 (2014) 153–166.
- [12] D. Plano, Y. Baquedano, E. Ibáñez, I. Jiménez, J.A. Palop, J.E. Spallholz, C. Sanmartín, *Molecules* 15 (2010) 7292–7312.
- [13] A.K. Mitra, A. De, N. Karchaudhuri, J. Mitra, *J. Chem. Res. (Synop.)* (1998) 766–767.
- [14] N.P. Cheval, A. Dikova, A. Blanc, J.-M. Weibel, P. Pale, *Chem. Eur. J.* 19 (2013) 8765–8768.
- [15] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *Lebensm. Wiss. Technol.* 28 (1995) 25–30.
- [16] R.M. Patel, N.J. Patel, *J. Adv. Pharm. Edu. Res.* 1 (2011) 52–68.
- [17] R.L. Prior, H. Hoang, L. Gu, X. Wu, M. Bacchiocca, L. Howard, M. Hampsch-Woodill, D. Huang, B. Ou, R. Jacob, *J. Agr. Food Chem.* 51 (2003) 3273–3279.

THE SYNTHESIS AND CYTOTOXIC PROPERTIES OF SELENO-PHENO[3,2-*c*]- AND SELENOPHENO[2,3-*c*]QUINOLONES*

P. Arsenyan^{1**}, J. Vasiljeva¹, I. Shestakova¹, I. Domracheva¹, and S. Belyakov¹

*We have developed a method for the synthesis of novel selenophene-containing polycyclic heterocycles, derivatives of selenopheno[3,2-*c*]- and selenopheno[2,3-*c*]quinolones. The cytotoxic activity of these compounds was studied in vitro. The molecular structure of 3-bromo-5-methyl-2-(piperidin-2-ylmethyl)selenopheno[3,2-*c*]quinolin-4(5H)-one was confirmed by X-ray analysis.*

Keywords: quinolone, selenium, selenophene, cytotoxicity, electrophilic addition, intramolecular cyclization, X-ray structural analysis.

The earliest interest in quinolones was motivated by the antibacterial [1-6] and antimalarial [7] activity of these compounds. The first clinical application of quinolones was found in 1962, when nalidixic acid, an antimicrobial agent of the quinolone family, was obtained as a by-product in the synthesis of the antimalarial drug chloroquine [8]. In the modern medicine a range of quinolone antibiotics, such as ciprofloxacin, norfloxacin, pefloxacin, lomefloxacin, and ofloxacin, are successfully used for the prevention and treatment of various microbial infections, including those of unknown etiology [3].

The derivatives of *N*-methylfuro[3,2-*c*]quinolone are known to inhibit the growth of several cancer cell types, in particular melanoma and gastrointestinal tumors [9]. Close analogs of these compounds are *N*-methylthieno- or selenopheno[3,2-*c*]- and selenopheno[2,3-*c*]quinolones, the synthesis and biological properties of which remain unexplored. Selenium, its organic and inorganic derivatives are known to possess a wide range of biological activity [10-24]. The presence of selenium as a microelement in human diet has been proved strengthen the immune system and reduce the incidence of oncological diseases [10, 11]. Antitumor [12-14, 23, 24], antiviral [15], antimicrobial [16, 17], antiarrhythmic [18, 19], fungicidal [20, 21], and anti-inflammatory [22] activities have been associated with organoselenium derivatives.

This work explores the synthesis and cytotoxic activity of novel heterocycles, the derivatives of selenopheno[3,2-*c*]- and selenopheno[2,3-*c*]quinolones.

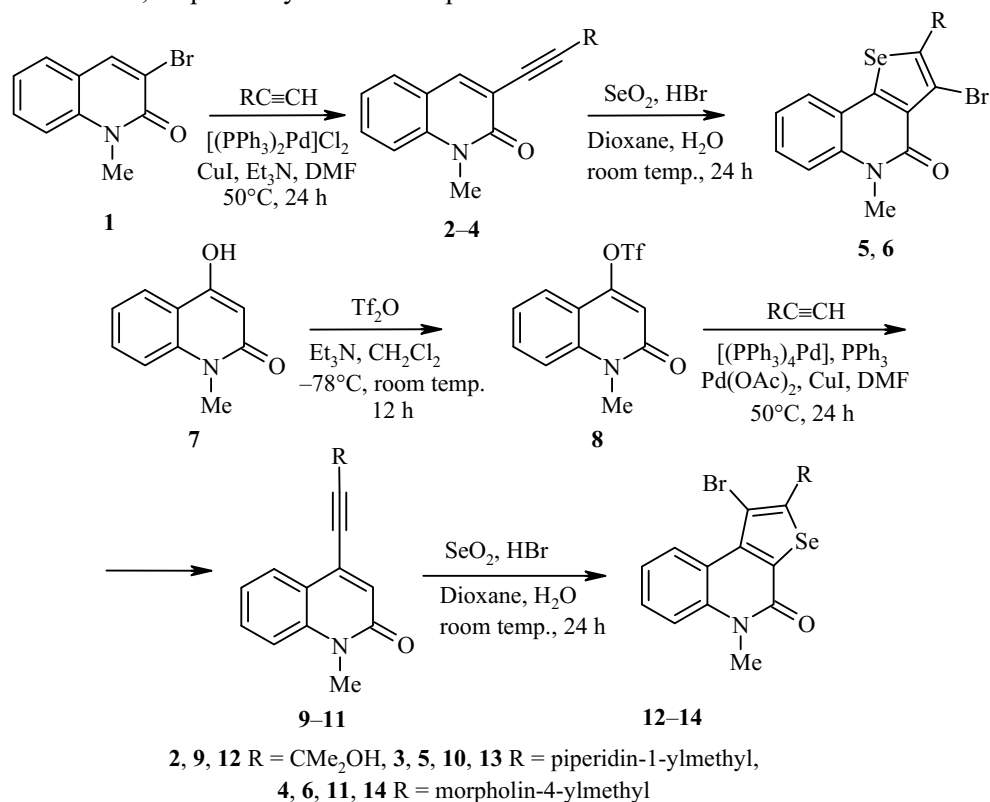
Our approach to the synthesis of selenopheno[3,2-*c*]quinolones started from 3-bromo-*N*-methylquinolin-2(1*H*)-one (**1**), which was available in a high yield from the methylation of 3-bromo-2-quinolone by a method similar to the alkylation of 3-bromo-2-pyridone [25]. The substituted 3-ethynylquinolones **2-4** were obtained in 50-62% yields in a reaction of quinolone **1** with terminal alkynes that was catalyzed by bis(triphenylphosphine)palladium(II) dichloride and copper(I) iodide.

*Dedicated to Academician J. Stradiņš on the occasion of his 80th birthday.

**To whom correspondence should be addressed, e-mail: pavel@osi.lv.

¹Latvian Institute of Organic Synthesis, 21 Aizkraukles St., Riga LV-1006, Latvia.

A dioxane solution of the quinolone **2-4** was added dropwise to a selenium tetrabromide solution which was prepared *in situ* from selenium dioxide and concentrated hydrobromic acid. Selenium tetrabromide addition to the multiple bond of compounds **3** or **4** produced intermediates that underwent an intramolecular cyclization to the selenophenes **5** or **6**, respectively. The electrophilic attack in this case occurred in the non-aromatic ring.



The 1-methyl-4-trifluoromethanesulfonylquinolin-2(1*H*)-one (**8**) as a precursor to selenopheno[2,3-*c*]quinolones was obtained by a reaction of the commercially available compound **7** with triflic anhydride in anhydrous dichloromethane in the presence of triethylamine. The novel ethynyl quinolones **9-11** were obtained in good yields (59-70%) through combining compound **8** with the corresponding alkyne in the presence of tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0), palladium(II) acetate, triphenylphosphine, and copper(I) iodide. The attempts to perform a Sonogashira reaction with bis(triphenylphosphine)palladium dichloride or with tetrakis(triphenylphosphine)palladium(0) without palladium(II) acetate were not successful, as the reaction product yields did not exceed 10%, or were essentially zero when propargylamines were used. The selenopheno[2,3-*c*]quinolones **12-14** were obtained in high yields (87-99%) by the aforementioned method for the synthesis of selenopheno[3,2-*c*]quinolones **5, 6**. We should note that the 4-alkynylquinolone **9**, containing a hydroxyl group, selectively formed the intramolecular cyclization product **12** in a nearly quantitative yield, while the analogous 3-alkynylquinolone **2** did not react. The electrophilic attack at the C-3 atom in this case was facilitated by the corresponding localization of the partial negative charge in the quinolone system.

The spatial structure of 3-bromo-5-methyl-2-(piperidin-1-ylmethyl)selenopheno[3,2-*c*]quinolin-4(5*H*)-one hydrochloride (**5**) is presented below (Fig 1). The piperidine ring assumes a chair conformation, while the condensed tricyclic system is planar. The crystal structure contains an N-H...Cl hydrogen bond between the protonated piperidine nitrogen and the chloride anion. The hydrogen bond length is 3.029(2) Å (H...Cl 2.10 Å, N-H...Cl 174°). An intramolecular C-H...O hydrogen bond can be identified between the methyl group hydrogen atom and the O(22) oxygen atom, with the following parameters: O...C 2.704(3) Å, H...O 2.23 Å, C-H...O 109°. This hydrogen bond forms a part of an additional five-membered ring in the molecular ion **5**.

Several of the synthesized compounds were tested *in vitro* for cytotoxic activity against the following tumor cell lines: HT-1080 (human fibrosarcoma), CCL-8 (mouse sarcoma), MDA-MB-435s (human breast adenocarcinoma-melanoma), MES-SA (human uterine sarcoma), MCF-7 (estrogen-positive human breast adenocarcinoma), as well as the normal cell line NIH 3T3 (mouse fibroblasts). The *in vitro* 50% lethal concentrations of compounds (IC₅₀) (Table 1) were determined by the standard method from the absorption of Crystal Violet (CV) dye in cellular membranes, and interaction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) with mitochondrial enzymes [26]. Our data indicate that 3-bromo-5-methyl-2-(piperidinylmethyl)selenopheno[3,2-*c*]quinolone **5** has a higher cytotoxic activity against tumor cells, compared to its regioisomer **13**. This selectivity was most pronounced in the case of human uterine sarcoma MES-SA (IC₅₀ 6.0 µg/ml). At the same time, substitution of the piperidine substituent for morpholine led to

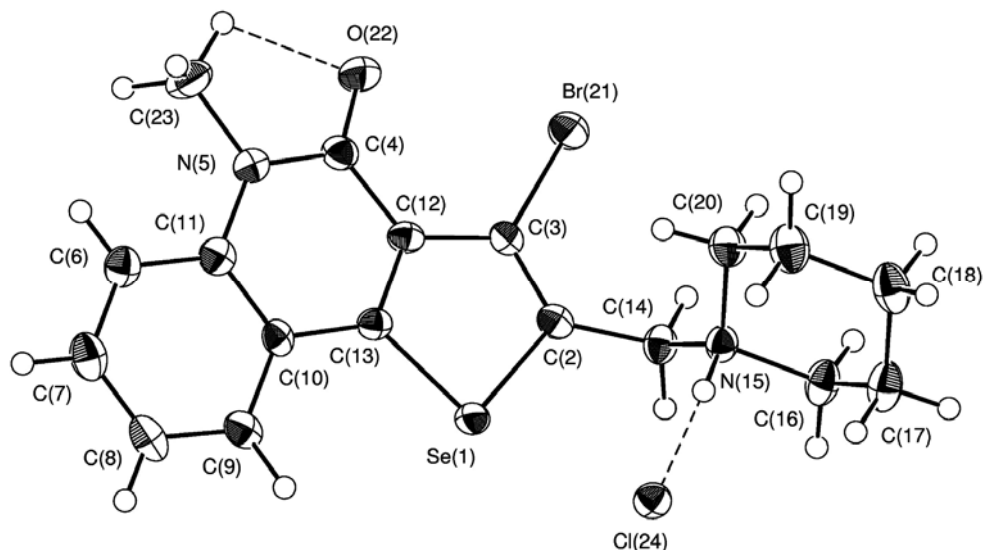


Fig. 1. The molecular structure of compound **5**·HCl with atoms represented by thermal vibration ellipsoids of 50% probability.

TABLE 1. The *in vitro* Cytotoxic Activity of the Selenophenoquinolones **5**, **6**, **13**, **14**

Cell line		Compound			
		5	6	13	14
HT-1080	IC ₅₀ , µg/ml*	16	54	54	41
	NO, %* ²	167	21	29	133
CCL-8	IC ₅₀ , µg/ml	18	>100	90	81
	NO, %	200	4	14	40
MDA-MB-435s	IC ₅₀ , µg/ml	12	>100	96	72
	NO, %	200	3	12	13
MCF-7	IC ₅₀ , µg/ml	13	26	82	42
	NO, %	133	25	15	29
MES-SA	IC ₅₀ , µg/ml	6	19	52	36
	NO, %	200	7	250	250
NIH 3T3	IC ₅₀ , µg/ml	22	75	23	—
	LD ₅₀ , mg/kg	522	906	522	>2000

*The concentration resulting in the death of 50% of cells ((CV + MTT)/2).

*²NO – the level of NO radical production, determined by the method [27] (absorption of CV).

generally lower levels of cytotoxicity. It should be noted that the investigated compounds had a low acute *in vitro* toxicity (522-2000 mg/kg), and 3-bromo-5-methyl-2-(morpholin-4-ylmethyl)selenopheno[3,2-*c*]quinolone (**6**) exhibited a protective effect against free radical production in all of the cell lines ($\leq 25\%$).

Thus, we have developed a convenient method for the synthesis of novel selenophene-containing condensed heterocycles – derivatives of selenopheno[3,2-*c*]– and selenopheno[2,3-*c*]quinolones. The *in vitro* cytotoxic activity of these compounds was studied, and the molecular structure of 3-bromo-5-methyl-2-(piperidin-1-ylmethyl)selenopheno[3,2-*c*]quinolin-4(5*H*)-one was confirmed by X-ray structural analysis.

EXPERIMENTAL

^1H and ^{13}C NMR spectra were acquired on a Varian Mercury 400 instrument (400 and 100 MHz, respectively) in CDCl_3 , the internal standard was hexamethyldisiloxane (^1H , δ 0.05 ppm) or the residual solvent signal (^{13}C , $\delta=77.2$ ppm). Elemental analysis was performed on a Carlo Erba 1108 instrument. Melting points were determined on an Optimelt apparatus and were not corrected. The reaction progress and the purity of the obtained compounds was controlled by TLC on Merck Kieselgel plates with UV visualization.

3-Alkynyl-1-methylquinolin-2(1*H*)-ones 2-4 (General Method). A mixture of the quinolone **1** (300 mg, 1.26 mmol), terminal alkyne (2.52 mmol), DMF (4 ml), and triethylamine (2 ml) was added under an argon atmosphere to a solution of $[(\text{PPh}_3)_2\text{Pd}]\text{Cl}_2$ (80 mg, 0.12 mmol) and CuI (20 mg, 0.12 mmol) in dry DMF (1 ml). The reaction mixture was stirred for 24 h at 50°C and then poured into ethyl acetate (100 ml) and treated with 2% aqueous ammonia (50 ml). The organic layer was washed with a saturated aqueous NaCl solution (3×50 ml) and dried over Na_2SO_4 . The solvent was evaporated at reduced pressure, and the dry residue was purified by silica gel column chromatography (eluent CH_2Cl_2 –EtOAc–MeOH, 10:5:1), giving the pure product.

3-(3-Hydroxy-3-methylbut-1-ynyl)-1-methylquinolin-2(1*H*)-one (2). Yield 184 mg (60%), colorless foam. ^1H NMR spectrum, δ , ppm (*J*, Hz): 1.65 (6H, s, 2CH_3); 2.04 (1H, br. s, OH); 3.74 (3H, s, NCH_3); 7.22-7.24 (1H, m, H-7); 7.34 (1H, d, *J* = 8.5, H-5); 7.51 (1H, d, *J* = 7.8, H-8); 7.57 (1H, ddd, *J* = 1.4, *J* = 7.2, *J* = 8.5, H-6); 7.87 (1H, s, H-4). ^{13}C NMR spectrum, δ , ppm: 30.0; 31.3; 65.5; 77.7; 99.6; 114.2; 116.4; 120.0; 122.5; 128.7; 131.1; 139.5; 141.6; 161.0. Found, %: C 74.63; H 6.12; N 5.72. $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2$. Calculated, %: C 74.67; H 6.27; N 5.80.

1-Methyl-3-[3-(piperidin-1-yl)prop-1-ynyl]quinolin-2(1*H*)-one (3). Yield 220 mg (62%), light-yellow oil. ^1H NMR spectrum, δ , ppm (*J*, Hz): 1.42-1.49 (2H, m, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 1.62-1.68 (4H, m, $\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_2)_2$); 2.59-2.62 (4H, m, $\text{N}(\text{CH}_2)_2$); 3.58 (2H, s, CH_2N); 3.75 (3H, s, CH_3); 7.23 (1H, ddd, *J* = 1.2, *J* = 7.2, *J* = 7.8, H-7); 7.33 (1H, d, *J* = 8.4, H-5); 7.52 (1H, dd, *J* = 1.2, *J* = 7.8, H-8); 7.57 (1H, ddd, *J* = 1.2, *J* = 7.2, *J* = 8.4, H-6); 7.89 (1H, s, H-4). ^{13}C NMR spectrum, δ , ppm: 23.7; 25.8; 29.9; 48.5; 53.2; 80.6; 90.8; 113.9; 116.6; 119.8; 122.2; 128.4; 130.8; 139.3; 141.4; 160.9. Found, %: C 77.16; H 7.11; N 9.82. $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}$. Calculated, %: C 77.11; H 7.19; N 9.99.

1-Methyl-3-[3-(morpholin-4-yl)prop-1-ynyl]quinolin-2(1*H*)-one (4). Yield 204 mg (57%), light-yellow oil. ^1H NMR spectrum, δ , ppm (*J*, Hz): 2.66 (4H, t, *J* = 4.6, $(\text{CH}_2)_2\text{N}$); 3.57 (2H, s, CH_2N); 3.72 (3H, s, CH_3); 3.76 (4H, t, *J* = 4.6, $\text{O}(\text{CH}_2)_2$); 7.20-7.24 (1H, m, H-7); 7.31 (1H, d, *J* = 8.4, H-5); 7.50 (1H, dd, *J* = 1.4, *J* = 7.8, H-8); 7.53-7.57 (1H, m, H-6); 7.87 (1H, s, H-4). ^{13}C NMR spectrum, δ , ppm: 29.7; 47.9; 52.0; 66.6; 80.9; 89.6; 113.9; 116.2; 119.6; 122.1; 128.3; 130.8; 139.2; 141.4; 160.6. Found, %: C 72.18; H 6.48; N 10.02. $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_2$. Calculated, %: C 72.32; H 6.43; N 9.92.

1-Methyl-4-trifluoromethanesulfonylquinolin-2(1*H*)-one (8). Anhydrous triethylamine was added to a stirred suspension of 4-hydroxy-1-methylquinolin-2(1*H*)-one (**7**) (1.0 g, 5.71 mmol) in anhydrous CH_2Cl_2 (20 ml), until the mixture turned into a homogeneous solution. The solution was cooled to -78°C and triflic anhydride (1.3 ml, 7.43 mmol) was added dropwise. The stirring was continued for 12 h at room temperature. Ethyl acetate (150 ml) was then added, and the mixture was washed with a saturated aqueous NaCl solution (2×100 ml). The organic phase was dried over Na_2SO_4 , and the solvent was removed by distillation. The

precipitate was separated by silica gel column chromatography with the 1:2 petroleum ether–ethyl acetate mobile phase. Yield 1.5 g (85%), white powder, mp 69–70°C. ¹H NMR spectrum, δ, ppm (*J*, Hz): 3.73 (3H, s, CH₃); 6.76 (1H, s, H-3); 7.37 (1H, ddd, *J* = 1.2, *J* = 7.2, *J* = 8.0, H-7); 7.45 (1H, d, *J* = 8.5, H-5); 7.71 (1H, ddd, *J* = 1.2, *J* = 7.2, *J* = 8.5, H-6); 7.81 (1H, dd, *J* = 1.2, *J* = 8.0, H-8). ¹³C NMR spectrum, δ, ppm: 29.8; 111.8; 114.7; 116.9; 120.1; 122.9; 123.3; 132.8; 140.1; 153.7; 161.4. Found, %: C 42.97; H 2.72; N 4.61. C₁₁H₈F₃NO₄S. Calculated, %: C 43.00; H 2.62; N 4.56.

4-Alkynyl-1-methylquinolin-2(1H)-ones 9-11 (General Method). A mixture of compound **8** (0.30 g, 0.98 mmol), terminal alkyne (1.46 mmol), DMF (4 ml), and triethylamine (2 ml) was added under an argon atmosphere to a solution of (PPh₃)₄Pd (0.11 g, 0.10 mmol), Pd(OAc)₂ (0.01 g, 0.05 mmol), CuI (0.04 g, 0.20 mmol), and PPh₃ (0.03 g, 0.10 mmol) in anhydrous DMF (2 ml). The reaction mixture was stirred for 24 h at 50°C and then poured into ethyl acetate (100 ml) and treated with aqueous ammonia (50 ml). The organic phase was washed with a saturated aqueous NaCl solution (3×50 ml) and dried over Na₂SO₄. The solvent was evaporated at reduced pressure, and the dry residue was purified by silica gel column chromatography with the 10:5:1 CH₂Cl₂–EtOAc–MeOH mobile phase, giving the pure product.

4-(3-Hydroxy-3-methylbutyn-1-yl)-1-methylquinolin-2(1H)-one (9). Yield 0.20 g (65%), white foam. ¹H NMR spectrum, δ, ppm (*J*, Hz): 1.70 (6H, s, 2CH₃); 3.64 (3H, s, NCH₃); 3.90 (1H, br. s, OH); 6.83 (1H, s, H-3); 7.17–7.21 (2H, m, H-5,7); 7.44–7.48 (1H, m, H-6); 7.82–7.86 (1H, m, H-8). ¹³C NMR spectrum, δ, ppm: 29.4; 31.1; 65.2; 76.5; 104.6; 114.1; 120.0; 122.1; 124.4; 127.0; 130.9; 132.3; 139.3; 161.7. Found, %: C 74.45; H 6.33; N 5.77. C₁₅H₁₅NO₂. Calculated, %: C 74.67; H 6.27; N 5.80.

1-Methyl-4-[3-(piperidin-1-yl)prop-1-ynyl]quinolin-2(1H)-one (10). Yield 0.21 g (59%), yellow oil. ¹H NMR spectrum, δ, ppm (*J*, Hz): 1.45–1.49 (2H, m, CH₂CH₂CH₂); 1.64–1.70 (4H, m, N(CH₂CH₂)₂); 2.60–2.62 (4H, m, N(CH₂)₂); 3.63 (2H, s, CH₂N); 3.71 (3H, s, CH₃); 6.88 (1H, s, H-3); 7.28 (1H, ddd, *J* = 1.2, *J* = 7.2, *J* = 8.0, H-7); 7.36 (1H, d, *J* = 8.5, H-5); 7.59 (1H, ddd, *J* = 1.2, *J* = 7.2, *J* = 8.5, H-6); 8.03 (1H, dd, *J* = 1.2, *J* = 8.0, H-8). ¹³C NMR spectrum, δ, ppm: 23.8; 25.9; 29.4; 48.6; 53.5; 80.0; 95.3; 114.2; 120.2; 122.2; 124.9; 127.5; 131.0; 132.6; 139.8; 161.5. Found, %: C 77.08; H 6.97; N 9.81. C₁₈H₂₀N₂O. Calculated, %: C 77.11; H 7.19; N 9.99.

1-Methyl-4-[3-(morpholin-4-yl)prop-1-ynyl]quinolin-2(1H)-one (11). Yield 0.25 g (70%), yellow oil. ¹H NMR spectrum, δ, ppm (*J*, Hz): 2.68 (4H, t, *J* = 4.6, (CH₂)₂N); 3.65 (2H, s, CH₂N); 3.70 (3H, s, CH₃); 3.78 (4H, t, *J* = 4.6, O(CH₂)₂); 6.87 (1H, s, H-3); 7.28 (1H, ddd, *J* = 1.2, *J* = 7.2, *J* = 8.0, H-7); 7.36 (1H, d, *J* = 8.5, H-5); 7.59 (1H, ddd, *J* = 1.2, *J* = 7.2, *J* = 8.5, H-6); 8.00 (1H, dd, *J* = 1.2, *J* = 8.0, H-8). ¹³C NMR spectrum, δ, ppm: 29.4; 48.1; 52.4; 66.8; 80.5; 94.1; 114.3; 120.0; 122.3; 125.0; 127.3; 131.1; 132.3; 139.8; 161.4. Found, %: C 72.18; H 6.43; N 9.81. C₁₇H₁₈N₂O₂. Calculated, %: C 72.32; H 6.43; N 9.92.

Selenopheno[3,2-*c*]quinolones 5, 6 and selenopheno[2,3-*c*]quinolones 12-14 (General Method). The starting alkynyl-1-methylquinolone **3, 4, 9-11** (1.0 mmol) in dioxane (12 ml) was added to a solution of SeO₂ (444 mg, 4.0 mmol) in concentrated hydrobromic acid (4 ml), and the mixture was stirred for 24 h at room temperature. The mixture was then poured into CH₂Cl₂ (100 ml) and treated with saturated Na₂CO₃ solution to pH 8.0. The organic phase was washed with water (2×50 ml) and dried over Na₂SO₄. The solvent was evaporated, and the dry residue was purified by silica gel column chromatography with the 2:1 petroleum ether–ethyl acetate mobile phase (compounds **13, 14**) or 10:1 CH₂Cl₂–ethyl acetate mobile phase (compound **5**), giving the pure products. Compounds **6** and **12** were obtained in a pure form after the extraction.

3-Bromo-5-methyl-2-(piperidin-1-ylmethyl)selenopheno[3,2-*c*]quinolin-4(5H)-one (5). Yield 339 mg (77%), white crystals, mp 154–156°C. ¹H NMR spectrum, δ, ppm (*J*, Hz): 1.46–1.51 (2H, m, CH₂CH₂CH₂); 1.60–1.67 (4H, m, N(CH₂CH₂)₂); 2.58–2.63 (4H, m, N(CH₂)₂); 3.74 (2H, s, CH₂N); 3.76 (3H, s, CH₃); 7.21–7.27 (1H, m, H-7); 7.38 (1H, d, *J* = 8.4, H-9); 7.53 (1H, ddd, *J* = 1.2, *J* = 7.2, *J* = 8.4, H-8); 7.66 (1H, dd, *J* = 1.2, *J* = 8.0, H-6). ¹³C NMR spectrum, δ, ppm: 21.9; 22.8; 29.5; 52.4; 55.4; 114.8; 117.1; 118.4; 122.7; 125.6; 126.4; 128.3; 131.0; 136.8; 154.6; 157.4. Found, %: C 49.28; H 4.12; N 6.21. C₁₈H₁₉BrN₂OSe. Calculated, %: C 49.34; H 4.37; N 6.39.

3-Bromo-5-methyl-2-(morpholin-4-ylmethyl)selenopheno[3,2-c]quinolin-4(5H)-one (6). Yield 332 mg (75%), white crystals, mp > 200°C. ¹H NMR spectrum, δ, ppm (*J*, Hz): 2.68 (4H, t, *J* = 4.6, (CH₂)₂N); 3.74 (3H, s, CH₃); 3.76 (4H, t, *J* = 4.6, O(CH₂)₂); 3.81 (2H, s, CH₂N); 7.22 (1H, ddd, *J* = 1.2, *J* = 7.2, *J* = 7.8, H-7); 7.36 (1H, d, *J* = 8.5, H-9); 7.52 (1H, ddd, *J* = 1.2, *J* = 7.2, *J* = 8.5, H-8); 7.62 (1H, dd, *J* = 1.2, *J* = 7.8, H-6). ¹³C NMR spectrum, δ, ppm: 29.5; 54.0; 59.0; 67.0; 114.9; 119.4; 122.4; 125.2; 128.5; 129.9; 136.7; 145.0; 146.9; 150.2; 157.9. Found, %: C 46.27; H 3.87; N 6.23. C₁₇H₁₇BrN₂O₂Se. Calculated, %: C 46.39; H 3.89; N 6.36.

1-Bromo-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-5-methylselenopheno[2,3-c]quinolin-4(5H)-one (12). Yield 400 mg (99%), white crystals, mp > 200°C. ¹H NMR spectrum, δ, ppm (*J*, Hz): 1.71 (6H, s, 2CH₃); 3.71 (3H, s, NCH₃); 6.57 (1H, br. s, OH); 7.35-7.39 (1H, m, H-7); 7.64-7.65 (2H, m, H-8,9); 9.40 (1H, dd, *J* = 0.9, *J* = 8.2, H-6). ¹³C NMR spectrum, δ, ppm: 27.7; 29.7; 73.1; 98.9; 116.0; 118.8; 121.5; 122.2; 129.2; 132.5; 138.8; 139.1; 157.2; 168.0. Found, %: C 45.17; H 3.52; N 3.49. C₁₅H₁₄BrNO₂Se. Calculated, %: C 45.14; H 3.54; N 3.51.

1-Bromo-5-methyl-2-(piperidin-1-ylmethyl)selenopheno[2,3-c]quinolin-4(5H)-one (13). Yield 352 mg (80%), white crystals, mp 168-170°C. ¹H NMR spectrum, δ, ppm (*J*, Hz): 1.45-1.52 (2H, m, CH₂CH₂CH₂); 1.62-1.67 (4H, m, N(CH₂CH₂)₂); 2.61-2.65 (4H, m, N(CH₂)₂); 3.73 (2H, s, CH₂N); 3.80 (3H, s, CH₃); 7.30 (1H, ddd, *J* = 1.2, *J* = 7.2, *J* = 8.0, H-7); 7.44 (1H, d, *J* = 8.5, H-9); 7.52-7.57 (1H, m, H-8); 9.37 (1H, dd, *J* = 1.2, *J* = 8.0, H-6). ¹³C NMR spectrum, δ, ppm: 23.9; 26.1; 29.9; 55.3; 60.4; 102.7; 115.1; 119.6; 121.6; 123.8; 128.8; 134.3; 139.0; 139.5; 157.6; 158.5. Found, %: C 49.22; H 4.18; N 6.28. C₁₈H₁₉BrN₂OSe. Calculated, %: C 49.34; H 4.37; N 6.39.

1-Bromo-5-methyl-2-(morpholin-4-ylmethyl)selenopheno[2,3-c]quinolin-4(5H)-one (14). Yield 332 mg (75%), white crystals, mp 188-190°C. ¹H NMR spectrum, δ, ppm (*J*, Hz): 2.71 (4H, t, *J* = 4.6, (CH₂)₂N); 3.78 (4H, t, *J* = 4.6, O(CH₂)₂); 3.80 (2H, s, CH₂N); 3.81 (3H, s, CH₃); 7.33 (1H, ddd, *J* = 1.0, *J* = 7.2, *J* = 8.2, H-7); 7.47 (1H, d, *J* = 8.5, H-9); 7.56-7.60 (1H, m, H-8); 9.39 (1H, dd, *J* = 1.0, *J* = 8.2, H-6). ¹³C NMR spectrum, δ, ppm: 30.1; 54.2; 60.1; 67.0; 103.6; 115.2; 119.6; 121.7; 123.8; 129.0; 134.5; 139.1; 139.6; 156.0; 158.5. Found, %: C 46.28; H 3.94; N 6.22. C₁₈H₁₉BrN₂OSe. Calculated, %: C 46.39; H 3.89; N 6.36.

X-ray structural investigation of compound 5 was performed on a Bruker-Nonius KappaCCD automated X-ray diffractometer. Compound **5** (C₁₈H₁₉BrN₂OSe, *M* 438.23) formed monocrystals of rhombic syngony. The crystal lattice parameters were: *a* 9.9236(1), *b* 11.6855(2), *c* 31.3870(5) Å; *V* 3639.71(9) Å³; *F*(000) 1888; μ 4.41 mm⁻¹; *d*_{calc} 1.732 g·cm⁻³; *Z* 8; space group *Pbca*. The intensities of 4313 independent reflections were measured to 2θ_{max} 56° at -100°C. A total of 3551 reflections with *I* > 3σ(*I*) were used for the calculations. The structure was solved with SIR-97 set [28]. Refinement was performed with the method of least squares in a full-matrix anisotropic approximation with the maXus software package [29]. The final value of the probability factor *R* was 0.045. The complete information about this crystal structure was submitted to the Cambridge Crystallographic Data Center (deposit CCDC 948084).

This project was supported by the Latvian Science Council (grant 2012/447).

REFERENCES

1. V. Gressler, C. Z. Stüker, G. de O. C. Dias, I. I. Dalcol, R. A. Burrow, J. Schmidt, L. Wessjohann, and A. F. Morel, *Phytochemistry*, **69**, 994 (2008).
2. T. Sripisut, T. Ritthiwigrom, T. Promgool, K. Yossathera, S. Deachathai, W. Phakhodee, S. Cheenpracha, and S. Laphookhieo, *Phytochem. Lett.*, **5**, 379 (2012).
3. A. Gafter-Gvili, A. Fraser, M. Paul, M. D. van de Wetering, L. C. M. Kremer, and L. Leibovici, *Antibiotic Prophylaxis for Bacterial Infections in Afebrile Neutropenic Patients Following Chemotherapy*, Wiley Online Library (2009), DOI: 10.1002/14651858.CD004386.pub3.

4. B. S. Jayashree, S. Thomas, and Y. Nayak, *Med. Chem. Res.*, **19**, 193 (2010).
5. D. E. King, R. Malone, and S. H. Lilley, *Am. Fam. Physician*, **61**, 2741 (2000).
6. T. Ohashi, Y. Oguro, T. Tanaka, Z. Shiokawa, S. Shibata, Y. Sato, H. Yamakawa, H. Hattori, Y. Yamamoto, S. Kondo, M. Miyamoto, H. Tojo, A. Baba, and S. Sasaki, *Bioorg. Med. Chem.*, **20**, 5496 (2012).
7. K. Goerlitzer, B. Gabriel, P. Frohberg, I. Wobst, G. Drutkowski, J. Wiesner, and H. Jomaa, *Pharmazie*, **59**, 439 (2004).
8. A. V. Polishchuk, E. T. Karaseva, M. A. Medkov, and V. E. Karasev, *Proceedings of Far Eastern Division of Russ. Acad. Sci.*, No. 2, 128 (2005).
9. Y.-L. Chen, US Pat. Appl. 6656949.
10. J. E. Spallholz, *Bull. Selenium-Tellurium Develop. Assoc.*, 1 (2001).
11. H. Arvilommi, K. Poikonen, I. Jokinen, O. Muukkonen, L. Räsänen, J. Foreman, and J. K. Huttunen, *Infect. Immun.*, **41**, 185 (1983).
12. R. Bohm, *Pharmazie*, **42**, 793 (1987).
13. P. Arsenyan, K. Rubina, I. Shestakova, and I. Domracheva, *Eur. J. Med. Chem.*, **42**, 635 (2007).
14. M. S. Shahabuddin, M. Nambiar, B. Choudhary, G. M. Advirao, and S. C. Raghavan, *Invest. New Drugs*, **28**, 35 (2010).
15. V. Yu. Mortikov, V. P. Litvinov, A. M. Shestopalov, Yu. A. Sharanin, E. E. Apenova, G. A. Galegov, I. I. Abdullaev, T. B. Asadullaev, and F. I. Abdullaev, *Khim.-Farm. Zh.*, **25**, 5, 41 (1991). [*Pharm. Chem. J.*, **25**, 312 (1991).]
16. S. E. Bahaie, M. G. Assy, and M. M. Hassanier, *Pharmazie*, **45**, 791 (1990).
17. J. R. Hwu, L.-L. Lai, G. H. Hakimelahi, and H. Davari, *Helv. Chim. Acta*, **77**, 1037 (1994).
18. T. Ventslavskaja, L. Stazhadze, and V. Korzhova, *Farmakol. Toksikol. (Moscow)*, **47**, 38 (1984).
19. A. Kudrin and L. Zaidler, *Farmakol. Toksikol. (Moscow)*, **31**, 41 (1968).
20. V. G. Beylin, O. P. Goel, A. D. Sercel, and H. D. H. Showalter, US Pat. Appl. 4806654.
21. J. Zakrzewski and M. Krawczyk, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 514 (2011).
22. S. Leycks and M. Parnham, *Agents Actions*, **30**, 426 (1990).
23. P. Arsenyan, I. Shestakova, K. Rubina, I. Domracheva, A. Nesterova, K. Vosele, O. Pudova, and E. Lukevics, *Eur. J. Pharmacol.*, **465**, 229 (2003).
24. P. Arsenyan, E. Paegle, S. Belyakov, I. Shestakova, E. Jaschenko, I. Domracheva, and J. Popelis, *Eur. J. Med. Chem.*, **46**, 3434 (2011).
25. N. C. Becknell, J. A. Lyons, L. D. Aimone, J. A. Gruner, J. R. Mathiasen, R. Raddatz, and R. L. Hudkins, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **21**, 7076 (2011).
26. *Report of the International Workshop on in vitro Methods for Assembling Acute Systemic Toxicity*, NIH Publication, No. 01-4499 (2001), p. 12.
27. D. J. Fast, R. C. Lynch, and R. W. Leu, *J. Leucocyt. Biol.*, **52**, 255 (1992).
28. G. M. Sheldrick, *Acta Crystallogr., Sect. A: Found. Crystallogr.*, **64**, 112 (2008).
29. S. Maskay, C. J. Gilmore, C. Edwards, N. Stewart, and K. Shankland, *maXus. Computer Program for the Solution and Refinement of Crystal Structures*, Bruker Nonius, MacScience, The University of Glasgow (1999).



Original article

Synthesis, structure and cytotoxicity of 3-C, N, S, Se substituted benzo[*b*]selenophene derivatives

Pavel Arsenyan*, Edgars Paegle, Sergey Belyakov, Irina Shestakova, Elina Jaschenko, Ilona Domracheva, Juris Popelis

Department of Medicinal Chemistry, Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, LV-1006 Riga, Latvia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 27 January 2011

Received in revised form

3 May 2011

Accepted 4 May 2011

Available online 13 May 2011

Keywords:

Arylation

Amination

Benzo[*b*]selenophene

Cytotoxic activity

Morphology

Selenium

X-ray

ABSTRACT

Synthesis, molecular structure and cytotoxic activity of a series of 3-C, N, S, Se substituted benzo[*b*]selenophene derivatives on human fibrosarcoma HT-1080, mouse hepatoma MG-22A, and mouse fibroblasts 3T3 cell lines are described. The correlation between compound LD₅₀ 3T3 fibroblast cell line and HT-1080 morphology was shown.

© 2011 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The interest of benzothiophene derivatives stems from the fact that this molecule is found as a chromophore core for drugs. *Raloxifene* and *Arzoxifene* are benzothiophene selective estrogen receptor modulators (SERMs) of clinical use in postmenopausal osteoporosis and treatment of breast cancer and potentially in hormone replacement therapy [1–6]. *Zileuton* is an orally active inhibitor of 5-lipoxygenase, and thus inhibits leukotrienes formation. It is used for the maintenance treatment of asthma. Benzothiophene piperazines and piperidines are fatty acid amide hydrolase (FAAH) inhibitors [7]. Also, it has been shown that 3-thiosubstituted benzothiophenes are serotonin receptors modulators [8]. On the other hand, selenium has attracted great interest as an essential element and certain diseases have been eradicated by dietary supplementation of this element. Selenium is essential for cell metabolism as a component of glutathione peroxidase and other enzyme systems. Current interest lies in the prevention of certain cancers by supplementation with selenium [9–11]. Selenium appears to operate by several mechanisms

depending on the chemical form of selenium, the nature of the carcinogenic process, and its dosage. There was no significant difference in the potency of selenate, selenite, selenium dioxide, selenomethionine and selenocysteine to inhibit the development of mammary tumors, drug-resistant and drug non-resistant human ovarian tumor cells [12]. Taking into account the importance of the selenium as a trace element [13–17] in the organism our present investigation is connected with the elaboration of synthetic protocols and cytotoxic activity studies in a series of 3-C, N, S, Se substituted benzo[*b*]selenophene derivatives.

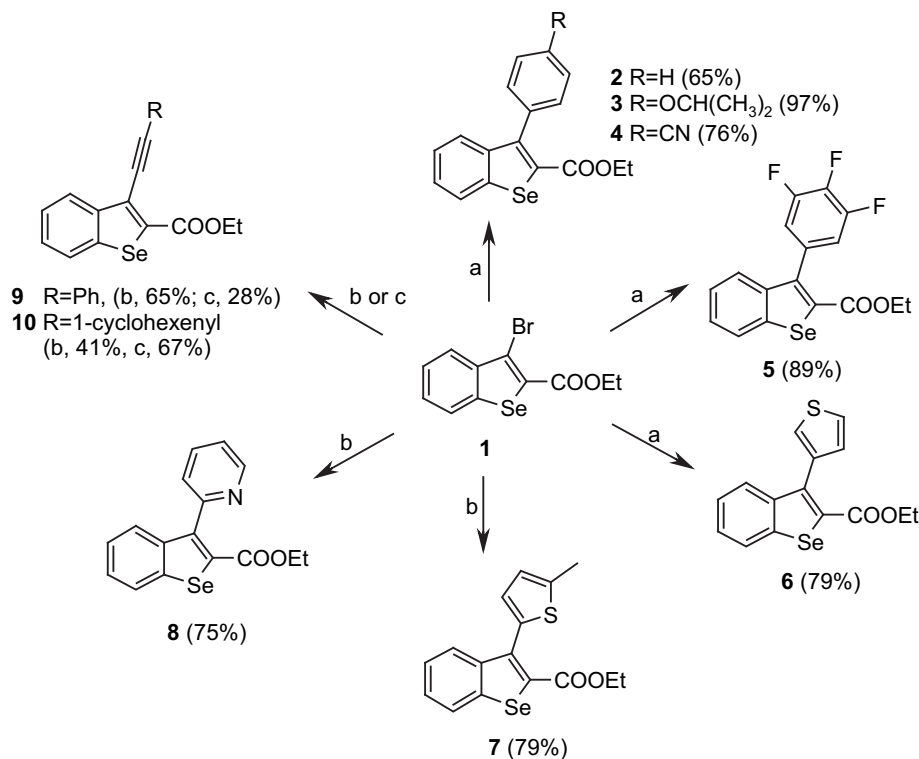
2. Results and discussion

2.1. Chemistry

Our synthetic strategy for the insertion of aryl and hetaryl groups in position 3 of benzo[*b*]selenophene **1** was based on *Suzuki*, *Stille*, and *Sonogashira* type coupling reactions. Interactions of **1** with various aryl(hetaryl)boronic acids, hetaryl stannanes and terminal acetylenes are presented in *Scheme 1*. After the optimization of the reaction conditions it has been found that arylboronic acids readily react with 3-bromobenzo[*b*]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**1**) in the presence of *in situ* prepared

* Corresponding author. Tel.: +371 9849464.

E-mail address: pavel.arsenyan@lycos.com (P. Arsenyan).



Scheme 1. Synthesis of benzo[*b*]selenophenes **2–10**. Reagents and reaction conditions: (a) aryl(hetaryl)boronic acid (2 eq.), Pd(OAc)₂ (10%), tri(*o*-tolyl)phosphine (20%), potassium phosphate (3.4 eq.), xylene/EtOH, 1–6 h; (b) hetaryl stannane (1.4 eq.), (Ph₃P)₄Pd (4%), Ph₃As (7%), xylene, 110 °C, 2–24 h; (c) terminal acetylene (1.46 eq.), PdCl₂ (5%), Ph₃P (10%), CuI (10%), DMF/TEA, 100 °C, 20 h.

palladium catalyst (Pd(OAc)₂ and tri(*o*-tolyl)phosphine) using potassium phosphate as a base. According to GC MS data, reaction completed after heating in xylene/ethanol media (10:1) at 110 °C in half an hour and corresponding 3-aryl(hetaryl)benzo[*b*]selenophenes **2–6** were obtained in good yields (65–97%). It should be noted that almost quantitative yield was obtained in the case of 4-*iso*-propoxyphenyl boronic acid due to arylboronic acids with EWG groups are more stable in basic media [18]. Molecular structures of the compounds **3** and **4** are shown in Fig. 1A and B (Table 1). Both molecules in these crystal structures are characterized by two planar fragments: one of them is benzoselenophene system with ester group and the second is the phenyl ring. The dihedral angles between these fragments are equal to 70.8(4) and 65.7(5)° for **3** and **4**, respectively. Despite the similarity of molecular forms and sizes, the molecular packing in crystals of **3** and **4** is different: the crystal lattice of **3** is characterized by monoclinic space group *P*2₁/*n*, whilst for **4** there is triclinic lattice (space group *P* $\bar{1}$).

3-(5-Methylthienyl)- (**7**) and 3-(2-pyridyl)benzo[*b*]selenophenes (**8**) were prepared using *Stille* coupling protocol, because 2-thiophene and 2-pyridine boronic acids are expensive and not stable in basic media. Typically, the *Stille* coupling of aryl halides with aryl stannanes is performed under anhydrous conditions in aprotic solvents. Xylene is used as a solvent to increase the temperature of reaction. One day heating of corresponding stannanes with **1** in the presence of tetrakis(triphenylphosphino)palladium(0) in xylene at 130 °C leads to the formation of **7** and **8** in medium yields. With the aim of reducing the reaction time and to activate the catalyst, a catalytic amount (7%) of triphenylarsine was added [24] due to the donor-acceptor As–Pd bond being longer than P–Pd bond. As a result desired derivatives **7** and **8** were obtained in higher yields (75–79%) after only 2 h of heating. Then we examined introduction of terminal acetylenes using corresponding

phenylethynyl- and cyclohexenylethynyl trimethylstannanes under the *Stille* protocol. According to experimental data, it was found that corresponding 3-(phenylethynyl)benzo[*b*]selenophene **9** forms in 65% yield after 1 h of heating, but cyclohexenyl analog **10** in moderate yield (28%). However, during interaction of terminal acetylenes with **1** under *Sonogashira* type conditions using classical (Ph₃P)₂PdCl₂ catalyst in DMF/TEA media 3-(cyclohexenylethynyl)benzo[*b*]selenophene (**10**) received in higher yield (67%) than phenylethynyl analog **9**.

With the purpose to introduce amino group in position 3 of benzo[*b*]selenophene **1** ring *Buchwald–Hartwig* type coupling has been examined. The benefits of 3-*N*-substituted benzo[*b*]selenophenes stems from the fact that these compounds could be more bioavailable over 3-*C*-substituted analogs. After reaction conditions optimization Pd₂dba₃ as a source of palladium(0) and xantphos as an appropriate ligand were chosen. According to our results aniline, 3- and 4-aminopyridines readily react with **1** performing reaction in xylene at 120 °C using cesium carbonate as a base. Desired 3-(phenylamino)- (**11**), 3-(3-pyridylamino)- (**12**), 3-(4-pyridylamino)benzo[*b*]selenophenes (**13**) were obtained in a very good yields, besides, in the case of 4-pyridylamino derivative in almost quantitative yield (96%) (Scheme 2). Molecular structure of compound **13** is illustrated in Fig. 1C. The intramolecular hydrogen bond of NH...O type between the amino group and carbonyl oxygen atom O11 was found in the structure of **13**. The hydrogen bond length is 2.825(2) Å (H15...O11 = 2.21 Å, N–H...O = 126°).

Notably, interaction of **1** with 2-aminopyridine under the same reaction conditions leads to the formation of a polycyclic derivative **14**. Seems that after the routine amination in position 3 of benzo[*b*]selenophene ring follows electrophilic attack of the ester group to the nitrogen atom of pyridine ring under the basic reaction conditions, as a result 10*H*-pyrido[1,2-*a*]benzo[*b*]

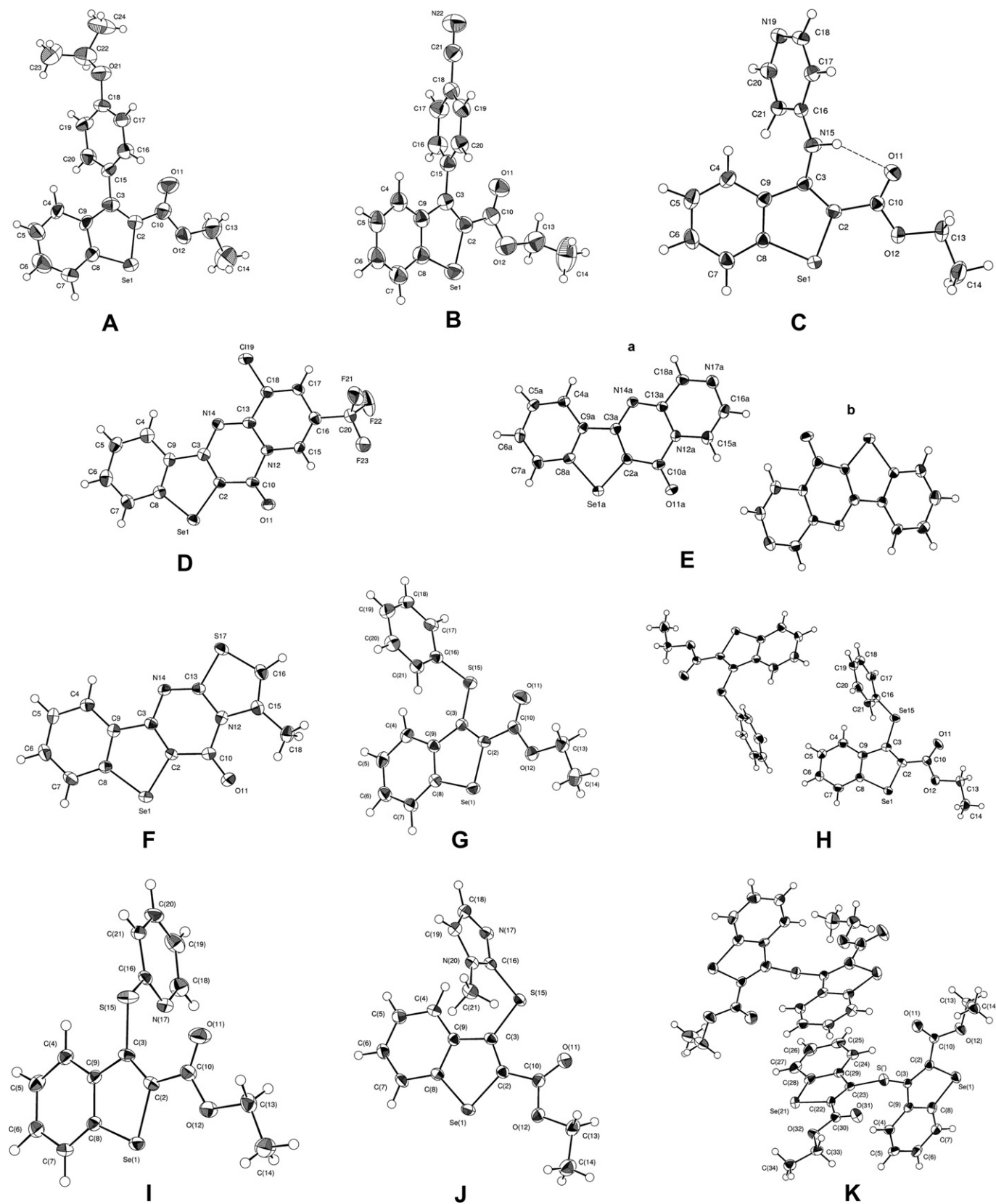


Fig. 1. ORTEP molecular structures of **3** (A), **4** (B), **13** (C), **17** (D), **18** (E), **20** (F), **22** (G), **23** (H), **24** (I), **26** (J), and **28** (K).

Table 1
Crystal data for the studied compounds.

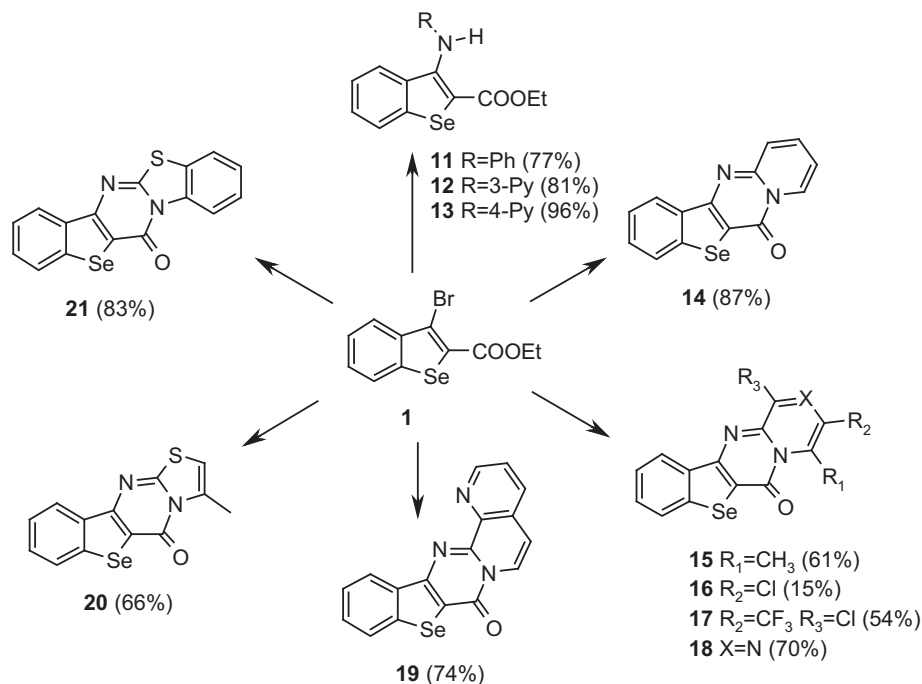
	3	4	13	17	18	20	22
Brutto-formula	C ₂₀ H ₂₀ O ₃ Se	C ₁₈ H ₁₃ NO ₂ Se	C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ Se	C ₁₅ H ₆ ClF ₃ N ₂ OSe	C ₁₃ H ₇ N ₃ OSe	C ₁₃ H ₈ N ₂ OSse	C ₁₇ H ₁₄ O ₂ Sse
Molecular weight	387.32	354.27	345.26	401.63	300.18	319.24	361.32
Crystal system	Monoclinic	Triclinic	Orthorhombic	Tetragonal	Triclinic	Monoclinic	Triclinic
<i>a</i> , [Å]	11.3557(3)	6.4543(3)	7.5384(1)	14.1895(4)	7.4548(2)	7.3309(2)	7.3643(3)
<i>b</i> , [Å]	7.5538(3)	9.7467(4)	19.3170(3)	14.1895(4)	11.1499(4)	12.2720(4)	10.4661(4)
<i>c</i> , [Å]	21.4719(9)	12.8454(7)	20.5094(4)	27.2710(9)	13.9263(5)	13.3016(4)	10.9983(4)
α , [°]	90.00	79.760(2)	90.00	90.00	68.178(2)	90.00	64.099(2)
β , [°]	94.337(1)	78.427(2)	90.00	90.00	82.042(2)	103.607(2)	80.341(2)
γ , [°]	90.00	84.911(3)	90.00	90.00	80.139(2)	90.00	89.727(2)
<i>V</i> , [Å ³]	1836.6(1)	777.86(6)	2986.56(8)	5490.8(2)	1055.19(6)	1163.09(6)	749.49(5)
Space group	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> <i>cab</i>	<i>I</i> 4 ₁ / <i>a</i>	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> $\bar{1}$
<i>Z</i>	4	2	8	16	4	4	2
μ , [mm ⁻¹]	2.058	2.420	2.520	2.969	3.550	3.391	2.640
Density (calc.) [g/cm ³]	1.401	1.513	1.536	1.943	1.890	1.823	1.601
2 θ _{max} for data [°]	55.0	56.0	56.0	65.0	56.0	56.0	58.0
Reflection collected	6904	5818	13081	8506	7098	5043	5617
Independent reflections	4200 (<i>R</i> _{int} = 0.076)	3680 (<i>R</i> _{int} = 0.030)	3592 (<i>R</i> _{int} = 0.029)	4982 (<i>R</i> _{int} = 0.066)	4856 (<i>R</i> _{int} = 0.034)	2764 (<i>R</i> _{int} = 0.032)	3943 (<i>R</i> _{int} = 0.030)
Reflections with <i>I</i> > <i>n</i> σ(<i>I</i>)	2678 (<i>n</i> = 2)	2891 (<i>n</i> = 3)	2806 (<i>n</i> = 3)	2908 (<i>n</i> = 2)	3332 (<i>n</i> = 3)	2180 (<i>n</i> = 3)	3127 (<i>n</i> = 3)
Final <i>R</i> -factor	0.078	0.037	0.028	0.049	0.034	0.061	0.034
<i>wR</i> ² index for all data	0.294	0.081	0.180	0.141	0.080	0.201	0.169
Temperature, [K]	293	293	173	173	193	193	173
Using programs	[19,20]	[20,21]	[19,20]	[22]	[19,20]	[20,23]	[20,23]
CCDC deposition number	CCDC 802935	CCDC 802936	CCDC 804882	CCDC 804883	CCDC 804884	CCDC 804885	CCDC 802440

	23	24	26	28
Brutto-formula	C ₁₇ H ₁₄ O ₂ Se ₂	C ₁₆ H ₁₃ NO ₂ Sse	C ₁₅ H ₁₄ N ₂ O ₂ Sse	C ₂₂ H ₁₈ O ₄ Sse ₂
Molecular weight	408.22	362.31	365.31	536.37
Crystal system	Triclinic	Triclinic	Monoclinic	Triclinic
<i>a</i> , [Å]	7.6940(2)	7.7695(2)	7.4986(1)	10.8102(3)
<i>b</i> , [Å]	10.3688(3)	9.8761(4)	24.4261(5)	11.5709(3)
<i>c</i> , [Å]	19.6867(7)	10.5483(4)	8.9567(2)	17.3054(6)
α , [°]	83.394(1)	76.160(2)	90.00	104.254(1)
β , [°]	79.378(1)	69.384(2)	112.780(1)	100.547(2)
γ , [°]	83.249(2)	77.368(2)	90.00	97.577(1)
<i>V</i> , [Å ³]	1525.91(8)	727.47(4)	1163.09(6)	2026.7(1)
Space group	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> $\bar{1}$	<i>P</i> 2 ₁ / <i>a</i>	<i>P</i> $\bar{1}$
<i>Z</i>	4	2	4	4
μ , [mm ⁻¹]	4.847	2.727	2.625	2.640
Density (calc.) [g/cm ³]	1.777	1.654	1.604	1.601
2 θ _{max} for data [°]	57.0	55.0	58.0	55.0
Reflection collected	10342	4866	6716	13720
Independent reflections	7569 (<i>R</i> _{int} = 0.031)	3307 (<i>R</i> _{int} = 0.035)	4007 (<i>R</i> _{int} = 0.032)	9206 (<i>R</i> _{int} = 0.046)
Reflections with <i>I</i> > <i>n</i> σ(<i>I</i>)	5294 (<i>n</i> = 3)	2385 (<i>n</i> = 3)	3056 (<i>n</i> = 3)	5090 (<i>n</i> = 3)
Final <i>R</i> -factor	0.036	0.029	0.031	0.046
<i>wR</i> ² index for all data	0.101	0.166	0.148	0.160
Temperature, [K]	153	153	153	183
Using programs	[19,20]	[19,20]	[20,23]	[19,20]
CCDC deposition number	CCDC 805117	CCDC 802441	CCDC 802442	CCDC 802443

selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-10-one **14** was formed in a very good yield (87%). In a very good yield (87%). To improve a method we made the same synthetic protocol using 6-methyl-, 4-chloro-, and 3-chloro-4-trifluoromethyl-2-aminopyridines, the corresponding fused benzo[*b*]selenophenes **15–17** were obtained. Notably, reaction of **1** with 2-amino-1,4-pyridazine leads to formation of 10*H*-8-pyrazino-[1,2-*a*]benzo[*b*]selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-10-one (**18**) in 70% yield. Also, fused 8-selena-1,6a,13-triaza-indeno[2,1-*b*]phenanthren-7-one (**19**) was prepared very successfully using 8-aminonaphtyridine-1,7 in impressive yield (74%). It should be noted that current protocol works well also in the case of five member heterocycles. Our attempts to utilize 2-amino-5-methylthiazole and 2-aminobenzothiazole led to the formation of the corresponding 7-methyl-9*H*-thiazolo[3,2-*a*]benzo[*b*]selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-9-one (**20**) and 9*H*-benzothiazolo[3,2-*a*]benzo[*b*]selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-9-one (**21**) in good yields (66% and 83%, correspondingly). Molecular structures of the compounds **17**, **18**, and **20** are given in Fig. 1D, E and F. The condensed heterocyclic system in molecules **17**, **18**, and **20** is

characterized by the planar conformation. The crystal structure of these compounds is totally different. There is intermolecular stacking interaction between molecules in the crystal structure **20**; the distance between the centroid of phenyl ring C4, C5, C6, C7, C8, C9 and hydrogen atom H18A of methylgroup is 2.50 Å. By means of these interactions the centrosymmetrical dimers (space group *P* 2₁/*n*) are formed in the crystal structure. In the crystal structure **18** (space group *P* $\bar{1}$) there are two independent molecules (**a** and **b**) in asymmetric unit; the intermolecular contact C7a...O11b [3.300(3) Å] can describe as a weak hydrogen bond of C...O type (H7a...O11b = 2.56 Å, C7a–H7a...O11b = 134°). In the high symmetrical (space group *I* 4₁/*a*) crystal structure of **17** there is shortened contact (2.922(4) Å) between fluorine atoms F23 of the centrosymmetrically connected molecules.

For the next step of our investigation we have focused on incorporation of sulfur and selenium substituent in position 3 of benzo[*b*]selenophene **1** ring (Scheme 3). As a model we chosen thiophenol and optimized reaction conditions. Unfortunately, according to experimental data well known copper iodide mediated

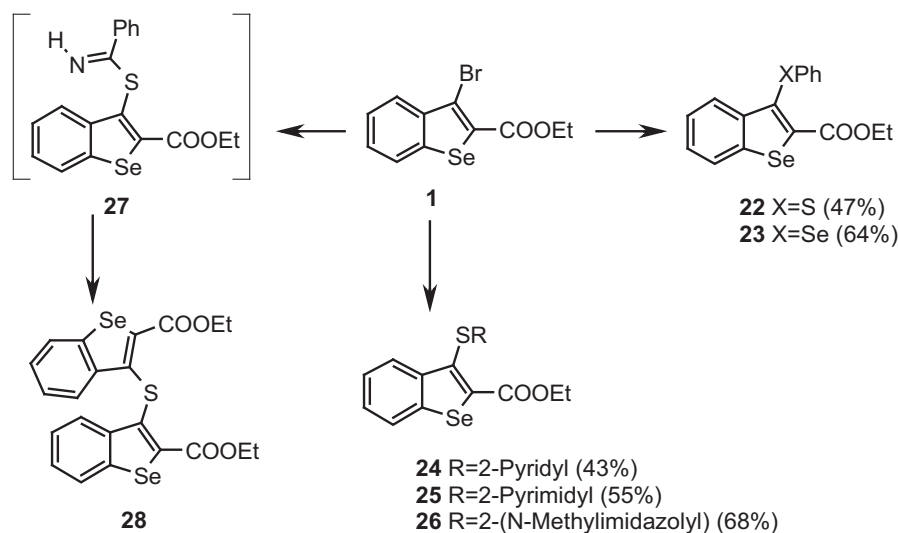


Scheme 2. Synthesis of benzo[*b*]selenophenes **11–21**. Reagents and reaction conditions: arylamine (1.3 eq.), Pd₂dba₃ (5%), xantphos (10%), Cs₂CO₃ (2.7 eq.), xylene, 120 °C, 20 h.

cross coupling leads to the formation of 3-phenylthiobenzo[*b*]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**22**) in a very poor yield. Better result was obtained using 2,2,6,6-tetramethylheptane-3,5-dione as a ligand (21%). However, it has been found that interaction of thiophenol with **1** in dry acetonitrile in the presence of freshly prepared potassium fluoride on Al₂O₃ and 18-crown-6 proceeds in moderate yield (47%) after overnight heating at 80 °C. The general advantage of this copper free method is an experimental simplicity and low price of a catalyst. 3-Phenylselenylbenzo[*b*]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**23**) was prepared under the same reaction conditions from selenolophenol in even better yield (64%) than corresponding sulfur analog **22**. The Fig. 1G and H illustrate the molecular structures of **22** and **23**. The geometrical

parameters in the molecule **22** are near to corresponding values in **23**. In **22** the C3–S15–C16 valence angle value is 104.0(1)°, in **23** the mean value of C3–Se15–C16 angle is equal 100.3(1)°. However, the crystal structures of **22** and **23** are not isomorphous: for **22** there is one molecule in the asymmetric unit, while for **23** there are two molecules connected by pseudoinversion centre.

Heterocyclic thiols also interact with **1** in the presence of KF/Al₂O₃. We have been very satisfied when 3-(2-pyridylthio)benzo[*b*]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**24**) was successfully isolated from the reaction of **1** with 2-thiopyridine in 43% yield under the same synthetic protocol. Besides, 3-(2-pyrimidylthio)benzo[*b*]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**25**) and 3-[2-(*N*-methyl)imidazolylthio]benzo[*b*]selenophene-2-carboxylic acid



Scheme 3. Synthesis of benzo[*b*]selenophenes **22–28**. Reagents and reaction conditions: thiol, thioamide or selenol (1.3 eq.), KF/Al₂O₃ (3 eq.), 18-crown-6 (30%), MeCN, 80 °C, 20 h.

ethyl ester (**26**) were obtained in even higher yields (55% and 68%, correspondingly). Molecular structures of the compounds **24** and **26** are shown in Fig. 11 and J. These molecules considerably differ by conformations. The molecular conformation of these molecule can be characterized by the torsion angle of C3–S15–C16–N17; this angle is equal $-18.0(3)^\circ$ for **24** and $126.4(2)^\circ$ for **24**. The crystal structure of **24** is isomorphous to one of **22**.

Finally, we tried to incorporate thiobenzamide moiety in the position 3 of benzo[*b*]selenophene **1** ring. After overnight heating of **1** with thiobenzamide in acetonitrile in the presence of potassium fluoride on Al₂O₃ diethyl 3,3'-thiodibenzo[*b*]selenophene-2-carboxylate (**28**) was isolated from the reaction mixture as a sole product. Seems, that the introduction of thiobenzamide in the position 3 of **1** proceeds very slowly, but interaction of unreacted **1** with intermediate **27** goes much faster; due to benzimido fragment could be a good leaving group under the reaction conditions. As a result, symmetrical sulfide **28** was obtained in 42% yield. The Fig. 1K shows the molecular structures of **28**. In this structure there are two independent molecules in the asymmetric unit; these molecules are connected by centre of pseudoinversion. The mean value of C3–S1–C23 valence angle is $105.1(1)^\circ$.

2.2. In vitro

The results of these experiments are summarized in Table 2. The initial 3-bromobenzo[*b*]selenophene **1** exhibits no cytotoxic activity on HT-1080 and slight activity on mouse hepatoma MG-22A tumor cell line. In a series of 3-*C*-substituted benzo[*b*]selenophenes **2–10** 3-(5-methylthienyl)benzo[*b*]selenophene (**7**) and 3-ethynyl derivatives **9** and **10** show medium *in vitro* activity on tumor cell lines. Analog **7** containing thiophene cycle shows the highest cytotoxicity ($IC_{50} = 16 \mu\text{g/mL}$ on HT-1080 and $IC_{50} = 19.5 \mu\text{g/mL}$ on MG-22A). According to our experiments polycyclic derivatives **14–21** exhibit more extended activity against HT-1080 and MG-22A tumor cell lines. Possibly, it stems from the fact that their structure recalls known antitumoral agent Batracyclin [25,26]. In fact, 10*H*-pyrido[1,2-*a*]benzo[*b*]selenopheno[3,2-*d*]pyrimidin-10-one (**14**) as well as 4-chloro- (**16**) and 3-chloro-4-trifluoromethyl-2-aminopyridine (**17**) show a very good cytotoxic

effect on tumor cell lines ($IC_{50} = 2.75 \div 3.5 \mu\text{g/mL}$ on HT-1080 and MG-22A), however, insertion of the additional nitrogen atom in the molecule (compound **18**) leads to the complete activity disappearance. It should be noted that in the same concentrations benzo[*b*]selenophenes **14–17** selectively acts against tumor and normal mouse fibroblast (3T3) cells. Inspection of LD₅₀ data shows that all derivatives studied exhibit medium or low acute toxicity (362–2216 mg/kg). The role of NO in biosystems has attracted considerable attention in the last decade. NO is formed by enzymatic and non-enzymatic mechanisms. Because of its molecular weight and high lipophilicity, NO has good diffusion properties. It may act not only in the cell where it is produced, but also in nearby tissues. Biologically produced NO originates from oxygen and L-arginine in the reaction catalyzed by NO synthase. NO, a long-lived radical with a wide range of actions, is known as a regulator of a variety of biological processes [27]. The NO level was determined according [28], NO release was defined using the Greys reagent (by NO₂ concentration in the cultural medium). The yield of nitrite was expressed as NO₂ nmol/200 μL of cultural medium in testing plates for 100% alive cells after CV coloration assay (benzo[*b*]selenophenes concentration 100 $\mu\text{g/mL}$). It was shown (Table 2) that 3-(5-methylthienyl)- **7** and 3-(cyclohexen-1-yl) benzo[*b*]selenophene **10** readily increase NO concentration in the cultural medium ($TG_{100} = 200\text{--}350\%$) on HT-1080 and MG-22A cell lines. However, series of cytotoxic 3-*N*-polycyclic benzo[*b*]selenophenes **14–17** and **21** exhibit very strong NO radical protector activity on both tumor cell lines ($TG_{100} = 2\text{--}40\%$).

2.3. Morphology

The influence of the studied benzo[*b*]selenophenes on the phenotype of mouse fibroblasts 3T3 and human fibrosarcoma HT-1080 was examined (Fig. 2). Figures in the table show the morphological changes after 72 h at 30 °C (visualization by acridine orange). Our experimental data shows that morphology of benzo[*b*]selenophenes on 3T3 cells correlates with cytotoxic data on 3T3 cell line. Fig. 2A and B shows the morphological structure of HT-1080 and 3T3 cells, correspondingly (control). The majority of cells were alive and the cell nucleus was a dark color. The inspection of benzo[*b*]selenophenes influence on 3T3 cell line morphology let us conclude that cytotoxic compounds **14** and **16** induce a slight apoptosis of normal cells (Fig. 2D and F). Besides, derivatives **14** and **16** changed the HT-1080 cell phenotype and powerful cell apoptosis with cell nucleus fragmentation was occurred (Fig. 2C and E). The insertion of trifluoromethyl substituent into molecule (**17**) significantly changed the type of action (Fig. 2G), tumor cells undergoing mitochondrial apoptosis with the change of HT-1080 cell phenotype. Surprisingly, benzothiazole fragment containing derivative **21** evoke gentle apoptosis without the change of cell morphology (Fig. 2I).

3. Experimental section

3.1. General

¹H, ¹³C and ⁷⁷Se NMR spectra were recorded on a Varian 400 Mercury spectrometer at 400, 100.3 and 39.74 MHz correspondingly at 303 K in CDCl₃/TMS or DMSO-*d*₆ solution. The ¹H chemical shifts are given relative to TMS, ¹³C – relative to chloroform or DMSO, and ⁷⁷Se – relative to dimethyl selenide. The melting points were determined on a “Digital melting point analyser” (Fisher), the results are given without correction. Diffraction data were collected on a Nonius KappaCCD diffractometer using graphite monochromated Mo-*K* α radiation ($\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$). The crystal structures were solved by direct methods and refined by full-matrix least

Table 2

In Vitro cytotoxicity in monolayer tumor cell lines [HT-1080 (human fibrosarcoma), MG-22A (mice hepatoma), NIH 3T3 (normal mouse fibroblasts) caused by benzo[*b*]selenophenes^a.

Compound	HT-TD ₅₀ ^a	1080 NO 100% ^b	MG-TD ₅₀	22A NO 100%	NIH 3T3 TD ₅₀	LD ₅₀ , mg/kg
1	c	14	40.5	40	896	2158
2	65	25	c	23	16	362
3	c	9	c	15	c	>2000
4	c	8	c	7	684	1984
5	c	6	81.5	12	100	881
6	c	13	c	14	31	503
7	16	350	19.5	350	15	349
9	76	15	87	10	614	1872
10	32.5	200	32	200	120	858
12	c	12	c	9	1000	2313
14	3	5	3	7	31	470
16	3	3	3	40	32	500
17	3.5	2	2.75	8	31	554
18	c	2	c	7	27	444
19	c	20	c	3	56	665
20	c	2	c	4	21	412
21	8.5	2	9.5	3	27	487
25	c	8	c	7	840	2216

^a TD₅₀ - Concentration ($\mu\text{g/mL}$) providing 50% cell killing effect [(CV + MTT)/2].

^b NO Concentration (%) (CV: coloration).

^c no cytotoxic effect.

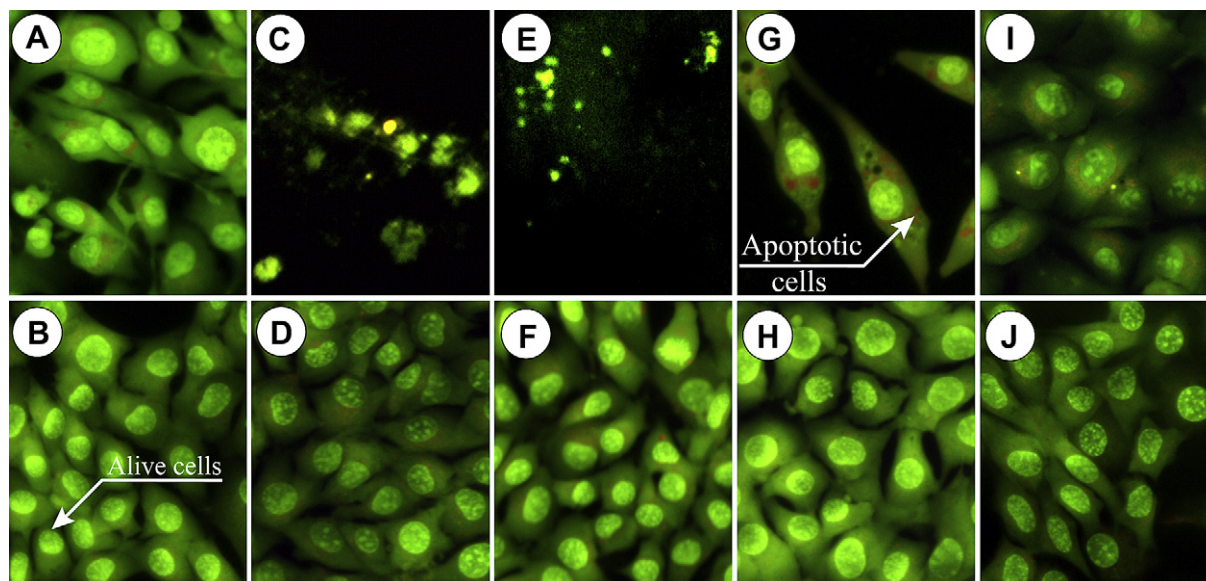


Fig. 2. View of HT-1080 (A) and 3T3 cells (B) visualized by staining the cellular DNA with the dye acridine orange. Living cells exhibit a green color, cells with orange or yellow color are apoptotic; (C) view of HT-1080 with **14**; (D) view of 3T3 with **14**; (E) view of HT-1080 with **16**; (F) view of 3T3 with **16**; (G) view of HT-1080 with **17**; (H) view of 3T3 with **17**; (I) view of HT-1080 with **21**; (J) view of 3T3 with **21**.

squares. The main crystallographic data and refinement parameters of the crystal structures are listed in Table 1. For further details, see crystallographic data for these compounds deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as Supplementary Publications. Copies of the data can be obtained, free of charge, on application to CCDC, 12 Union Road, Cambridge CB2 1EZ, UK.

3.2. General procedure for the preparation of benzo[b]selenophenes 2–6

A vial charged with **1** (0.25 g, 0.753 mmol), palladium(II) acetate (17 mg, 0.0753 mmol), tri(*o*-tolyl)phosphine (69 mg, 0.226 mmol) and potassium phosphate (543 mg, 2.56 mmol) in 5 mL of xylene under argon atmosphere was stirred for 10 min at 40 °C. Then the corresponding aryl(hetaryl)boronic acid (1.28 mmol) in abs. ethanol (0.5 mL) was added and the resulting mixture was heated at 110 °C for 1–6 h. After usual workup crude product was purified by flash chromatography on silica gel using the mixture petroleum ether – ethylacetate as eluent.

3.2.1. 3-Phenylbenzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**2**)

Yield: 65%, mp = 68–69 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.16 (3H, t, CH₃, *J* = 7.6 Hz); 4.19 (2H, q, CH₂, *J* = 7.6 Hz); 7.28–7.52 (8H, m, 8 × ArH); 7.90–7.96 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 13.9; 61.2; 124.9; 125.5; 127.1; 127.6; 127.8; 128.0; 129.3; 131.7; 136.3; 142.0; 142.9; 147.0; 163.7. ⁷⁷Se NMR (39.74 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 544.65. Anal. (C₁₇H₁₄O₂Se) C, H.

3.2.2. 3-(4-Isopropoxyphenyl)benzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**3**)

Yield: 97%, mp = 125–126 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.18 (3H, t, CH₃, *J* = 6.8 Hz); 1.38 (6H, d, 2 × CH₃, *J* = 6.0 Hz); 4.18 (2H, q, CH₂, *J* = 6.8 Hz); 4.61 (1H, sept, CH, *J* = 6.0 Hz); 6.93–7.00 (2H, m, 2 × ArH); 7.22–7.27 (2H, m, 2 × ArH); 7.28–7.34 (1H, m, ArH); 7.35–7.41 (1H, m, ArH); 7.47–7.51 (1H, m, ArH); 7.86–7.91 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.0; 22.1; 61.2; 69.8; 115.1; 124.8; 125.5; 127.0; 127.7; 127.9; 130.7; 131.2; 141.9; 143.1; 147.0; 157.7; 163.8. Anal. (C₂₀H₂₀O₃Se) C, H.

3.2.3. 3-(4-Cyanophenyl)benzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**4**)

Yield: 76%, mp = 147–148 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.20 (3H, t, CH₃, *J* = 7.2 Hz); 4.20 (2H, q, CH₂, *J* = 7.2 Hz); 7.31–7.52 (5H, m, 5 × ArH); 7.75–7.82 (2H, m, 2 × ArH); 7.92–7.99 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 13.9; 61.6; 111.7; 118.7; 125.2; 125.7; 126.8; 127.4; 130.3; 131.7; 132.5; 141.4; 141.9; 142.1; 144.5; 163.1. ⁷⁷Se NMR (39.74 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 555.17. Anal. (C₁₈H₁₃NO₂Se) C, H, N.

3.2.4. 3-(3,4,5-Trifluorophenyl)benzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**5**)

Yield: 89%, mp = 113–115 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.25 (3H, t, CH₃, *J* = 7.0 Hz); 4.24 (2H, q, CH₂, *J* = 7.0 Hz); 6.91–7.08 (2H, m, 2 × ArH); 7.33–7.51 (3H, m, 3 × ArH); 7.91–7.99 (1H, m, ArH). Anal. (C₁₇H₁₁F₃O₂Se) C, H.

3.2.5. 3-(Thien-3-yl)benzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**6**)

Yield: 79%, mp = 74–76 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.21 (3H, t, CH₃, *J* = 7.2 Hz); 4.21 (2H, q, CH₂, *J* = 7.2 Hz); 7.14 (1H, dd, ArH, *J* = 0.8 Hz, *J* = 4.8 Hz); 7.31–7.43 (4H, m, 4 × ArH); 7.55–7.61 (1H, m, ArH), 7.89 (1H, d, ArH, *J* = 8.0 Hz). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.0; 61.3; 124.4; 124.5; 125.0; 125.5; 127.2; 127.5; 129.2; 132.1; 135.4; 141.7; 141.8; 142.8; 163.6. ⁷⁷Se NMR (39.74 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 547.23. Anal. (C₁₅H₁₂O₂S₂Se) C, H.

3.3. General procedure for the preparation of benzo[b]selenophenes 7–10 (Method B)

A vial charged with **1** (0.25 g, 0.753 mmol), tetrakis(triphenylphosphino)palladium(0) (35 mg, 0.03 mmol), triphenylarsine (16 mg, 0.053 mmol) and corresponding stannane (1.05 mmol) in 5 mL of xylene under argon atmosphere was stirred for 2–24 h at 110 °C. After usual workup crude product was purified by flash chromatography on silica gel using the mixture petroleum ether – ethylacetate as eluent.

3.3.1. 3-(5-Methylthien-2-yl)-benzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**7**)

Yield: 79%, mp = 90–91 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.27 (3H, t, CH₃, J = 7.2 Hz); 2.56 (3H, d, CH₃, J = 0.8 Hz); 4.27 (2H, q, CH₂, J = 7.2 Hz); 6.81–6.84 (1H, m, ArH); 6.91 (1H, d, ArH, J = 3.6 Hz); 7.35–7.44 (2H, m, ArH); 7.72–7.75 (1H, m, ArH); 7.88–7.91 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.0; 15.4; 61.4; 125.0; 125.3; 125.4; 125.5; 127.2; 127.6; 128.2; 133.0; 133.5; 139.4; 141.0; 141.4; 142.9; 163.3. ⁷⁷Se NMR (39.74 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 551.74. Anal. (C₁₆H₁₄O₂SSe) C, H.

3.3.2. 3-(2-Pyridyl)-benzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester hydrochloride (**8**)

Free base was converted to hydrochloride salt after purification using HCl solution in dry methanol. Yield: 75%, mp = 156–157 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 1.07 (3H, t, CH₃, J = 7.2 Hz); 4.14 (2H, q, CH₂, J = 7.2 Hz), 7.47 (2H, d, 2 × ArH, J = 3.6 Hz); 7.52–7.60 (1H, m, ArH); 7.90–8.01 (2H, m, 2 × ArH); 8.29 (1H, d, ArH, J = 8.0 Hz); 8.39–8.50 (1H, m, ArH); 8.94 (1H, d, ArH, J = 4.8 Hz). ¹³C NMR (100.6 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 13.6; 61.6; 125.2; 125.8; 126.4; 126.5; 127.2; 127.7; 140.7; 141.7; 162.3. Anal. (C₁₆H₁₄ClNO₂Se) C, H, N.

3.3.3. 3-Phenylethynylbenzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**9**)

Yield: 65%, mp = 68–70 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.45 (3H, t, CH₃, J = 7.2 Hz); 4.45 (2H, q, CH₂, J = 7.2 Hz); 7.38–7.56 (5H, m, 5 × ArH); 7.66–7.73 (2H, m, 2 × ArH); 7.87–7.91 (1H, m, ArH); 8.17–8.21 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.4; 61.7; 84.4; 97.7; 122.9; 125.4; 125.6; 126.4; 127.0; 127.6; 128.4; 128.9; 131.9; 137.7; 141.2; 142.0; 163.2. Anal. (C₁₉H₁₄O₂Se) C, H.

3.3.4. 3-(Cyclohex-1-enylethynyl)benzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**10**)

Yield: 41%, mp = 54–55 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.42 (3H, t, CH₃, J = 7.2 Hz); 1.62–1.78 (4H, m, 2 × CH₂); 2.16–2.24 (2H, m, CH₂); 2.34–2.40 (2H, m, CH₂); 4.41 (2H, q, CH₂, J = 7.2 Hz); 6.40–6.47 (1H, m, CH); 7.38–7.55 (2H, m, ArH); 7.82–7.89 (1H, m, ArH); 8.04–8.10 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.4; 21.5; 22.3; 26.0; 29.1; 61.6; 82.0; 100.1; 120.8; 125.2; 125.5; 127.0; 127.1; 127.5; 136.6; 137.1; 141.1; 142.1; 163.3. Anal. (C₁₉H₁₈O₂Se) C, H.

3.4. General procedure for the preparation of benzo[b]selenophenes **9–10** (Method C)

A vial charged with palladium(II) chloride (7 mg, 0.037 mmol), triphenylphosphine (20 mg, 0.075 mmol) and copper(I) iodide (14 mg, 0.075 mmol) in 5 mL of DMF was barbotated with Ar for 15 min at 40 °C. Then **1** (0.25 g, 0.753 mmol), terminal acetylene (1.1 mmol), and triethylamine (1 mL) was added to the reaction mixture. After 20 h of heating at 100 °C and usual workup crude product was purified by flash chromatography on silica gel using the mixture petroleum ether – ethylacetate as eluent.

3.4.1. 3-Phenylethynylbenzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**9**)

Yield: 28%.

3.4.2. 3-(Cyclohex-1-enylethynyl)benzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**10**)

Yield: 67%.

3.5. General procedure for the preparation of benzo[b]selenophenes **11–21**

A vial charged with **1** (0.25 g, 0.753 mmol), Pd₂dba₃ (34 mg, 0.037 mmol), xantphos (39 mg, 0.075 mmol) and arylamine (0.979 mmol) in 5 mL of xylene was barbotated with Ar for 15 min. Then cesium carbonate (0.663 g, 2.03 mmol) was added and reaction mixture was heated for 20 h at 120 °C. After usual workup crude product was purified by flash chromatography on silica gel using the mixture petroleum ether – ethylacetate as eluent.

3.5.1. 3-Phenylaminobenzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**11**)

Yield: 77%, mp = 63–64 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.37 (3H, t, CH₃, J = 6.8 Hz); 4.33 (2H, q, CH₂, J = 6.8 Hz); 6.97–7.06 (3H, m, 3 × ArH); 7.11–7.17 (1H, m, ArH); 7.20–7.26 (2H, m, 2 × ArH); 7.30–7.36 (1H, m, ArH); 7.41–7.45 (1H, m, ArH); 7.77–7.82 (1H, m, ArH); 8.79 (1H, br s, NH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.4; 61.0; 108.3; 121.2; 123.0; 123.8; 126.3; 127.5; 127.6; 129.0; 135.1; 140.2; 143.0; 148.3; 166.4. Anal. (C₁₇H₁₅NO₂Se) C, H, N.

3.5.2. 3-(Pyrid-3-ylamino)benzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**12**)

Yield: 81%, mp = 174–175 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.39 (3H, t, CH₃, J = 7.2 Hz); 4.36 (2H, q, CH₂, J = 7.2 Hz); 7.15 (1H, dd, ArH, J = 4.4 Hz, J = 8.4 Hz); 7.18–7.23 (2H, m, 2 × ArH); 7.36–7.40 (2H, m, 2 × ArH); 7.84 (1H, dt, ArH, J = 1.4 Hz, J = 8.4 Hz); 8.29 (1H, dd, ArH, J = 1.4 Hz, J = 4.8 Hz); 8.38 (1H, d, ArH, J = 2.8 Hz); 8.72 (1H, br s, NH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.3; 61.3; 110.9; 123.4; 124.3; 126.5; 126.9; 127.0; 124.8; 127.9; 134.6; 139.6; 140.2; 142.5; 143.8; 146.7; 166.2. ⁷⁷Se NMR (39.74 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 474.42. Anal. (C₁₆H₁₄N₂O₂Se) C, H, N.

3.5.3. 3-(Pyrid-4-ylamino)benzo[b]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (**13**)

Yield: 96%, mp = 136–138 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.37 (3H, t, CH₃, J = 7.2 Hz); 4.34 (2H, q, CH₂, J = 7.2 Hz); 6.73 (2H, d, ArH, J = 5.2 Hz); 7.27–7.32 (1H, m, ArH); 7.39–7.44 (1H, m, ArH); 7.58 (1H, d, ArH, J = 4.0 Hz); 7.86 (1H, d, ArH, J = 4.0 Hz); 8.31 (1H, d, ArH, J = 5.2 Hz); 8.40 (1H, br s, NH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.3; 31.5; 112.6; 115.9; 124.5; 126.4; 127.0; 127.9; 135.3; 140.0; 144.2; 150.0; 150.3; 165.5. ESI-MS: 347.3. Anal. (C₁₆H₁₄N₂O₂Se) C, H, N.

3.5.4. 11-Selena-5,9a-diazabenzofluorene-10-one (**14**)

Yield: 87%, mp = 222–223 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 7.14–7.15 (1H, m, ArH), 7.55–7.57 (2H, m, ArH), 7.67–7.68 (1H, m, ArH), 7.69–7.78 (1H, m, ArH), 7.95–7.97 (1H, m, ArH), 8.46–8.49 (1H, m, ArH), 9.08–9.10 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 114.5; 125.3; 126.1; 126.4; 126.5; 129.8; 134.4; 137.0; 142.0; 149.6; 155.7; 156.9. ESI-MS: 300.9. Anal. (C₁₄H₈N₂OSe) C, H, N.

3.5.5. 9-Methyl-11-selena-5,9a-diazabenzofluorene-10-one (**15**)

Yield: 61%, mp = 203–205 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 3.13 (3H, s, CH₃); 6.62–6.63 (1H, m, ArH); 7.36–7.38 (1H, m, ArH); 7.48–7.53 (3H, m, ArH); 7.88–7.91 (1H, m, ArH); 8.35–8.38 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 25.1; 117.6; 125.2; 125.4; 125.9; 126.4; 129.5; 133.6; 136.9; 142.0; 143.1; 152.3; 155.5; 159.5. ESI-MS: 315.2. Anal. (C₁₅H₁₀N₂OSe) C, H, N.

3.5.6. 11-Selena-5,9a-diaza-8-chlorobenzofluorene-10-one (**16**)

Yield: 17%, mp > 230 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 7.55–7.67 (3H, m, 3 × ArH), 7.72–7.76 (1H, m, ArH),

7.95–8.01 (1H, m, ArH), 8.45–8.51 (1H, m, ArH), 9.11–9.14 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 123.2; 124.2; 125.5; 126.2; 126.4; 127.4; 130.0; 135.8; 136.8; 142.1; 147.9; 154.8; 156.7. ESI-MS: 335.0.

3.5.7. 6-Chloro-8-trifluoromethyl-11-Selena-5,9a-diazabenzob[*b*]fluoren-10-one (17)

Yield: 54%, mp = 215–217 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 7.56–7.60 (2H, m, ArH), 7.88 (1H, d, *J* = 2, 0 Hz, ArH), 7.94–7.97 (1H, m, ArH), 8.52–8.55 (1H, m, ArH), 9.30–9.31 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 116.9; 117.3; 117.4; 121.0; 123.7; 124.9; 125.7; 126.3; 126.7; 128.3; 130.4; 132.4; 136.6; 142.5; 146.0; 155.3; 156.2. ESI-MS: 403.0. Anal. (C₁₅H₆ClF₃N₂OSe) C, H, N.

3.5.8. 11-Selena-5,7,9a-triazabenzob[*b*]fluoren-10-one (18)

Yield: 70%, mp > 230 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 7.61–7.65 (2H, m, ArH), 7.99–8.03 (1H, m, ArH), 8.13 (1H, d, *J* = 9.2 Hz, ArH), 8.53–8.57 (1H, m, ArH), 8.75 (1H, d, *J* = 12.4 Hz, ArH), 9.25 (1H, s, ArH). ESI-MS: 302.0. Anal. (C₁₃H₇N₃OSe) C, H, N.

3.5.9. 8-Selena-1,6a,13-triaza-indeno [2,1-*b*]phenanthren-7-one (19)

Yield: 74%, mp > 230 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 7.28 (1H, d, *J* = 7.6 Hz, ArH), 7.57–7.64 (2H, m, 2 × ArH), 7.76 (1H, dd, *J*₁ = 4.4 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, ArH), 7.97–8.03 (1H, m, ArH), 8.13 (1H, dd, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 8.0 Hz, ArH), 8.80–8.86 (1H, m, ArH), 8.97 (1H, d, *J* = 8.0 Hz, ArH), 9.20 (1H, dd, *J*₁ = 1.6 Hz, *J*₂ = 4.4 Hz, ArH). ESI-MS: 352.0. Anal. (C₁₇H₉N₃OSe) C, H, N.

3.5.10. 7-Methyl-9H-thiazolo [3,2-*a*]benzo[*b*]selenopheno [3,2-*d*]pyrimidin-9-one (20)

Yield: 66%, mp > 230 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 2.90 (3H, d, *J* = 1.2 Hz, CH₃), 6.46 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, ArH), 7.49–7.56 (2H, m, 2 × ArH), 7.89–7.95 (1H, m, ArH), 8.30–8.36 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 18.7; 105.5; 125.3; 125.8; 126.4; 129.3; 135.8; 136.3; 141.9; 155.4; 159.0; 162.6. ESI-MS: 320.9. Anal. (C₁₃H₈N₂OSSe) C, H, N.

3.5.11. 9H-Benzthiazolo [3,2-*a*]benzo[*b*]selenopheno [3,2-*d*]pyrimidin-9-one (21)

Yield: 83%, mp > 230 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 7.49–7.60 (4H, m, 4 × ArH), 7.70–7.75 (1H, m, ArH), 7.94–7.99 (1H, m, ArH), 8.37–8.43 (1H, m, ArH), 9.14–9.19 (1H, m, ArH). ESI-MS: 357.1. Anal. (C₁₆H₈N₂OSSe) C, H, N.

3.6. General procedure for the preparation of benzo[*b*]selenophenes 22–28

A vial charged with **1** (0.25 g, 0.753 mmol), KF/Al₂O₃ (0.7 g) thiol (1.1 mmol), and 18-crown-6 (0.05 g, 0.225 mmol) in 5 mL of acetonitrile was heated for 20 h at 80 °C. Then solvent was evaporated under reduced pressure and crude product was purified by flash chromatography on silica gel using the mixture petroleum ether – ethylacetate as eluent.

3.6.1. 3-Phenylthiobenzo[*b*]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (22)

Yield: 47%, mp = 71–72 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.32 (3H, t, CH₃, *J* = 7.2 Hz); 4.33 (2H, q, CH₂, *J* = 7.2 Hz); 7.06–7.18 (5H, m, 8 × ArH); 7.32–7.742 (2H, m, ArH); 7.88–7.89 (1H, m, ArH); 7.96–7.99 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.2; 61.9; 125.3; 125.6; 125.7; 127.4; 127.6; 127.7; 128.9; 132.7; 136.7; 139.2; 141.4; 142.3; 162.8. Anal. (C₁₇H₁₄O₂SSe) C, H.

3.6.2. 3-Phenylselenobenzo[*b*]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (23)

Yield: 64%, mp = 60–61 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.35 (3H, t, CH₃, *J* = 7.2 Hz); 4.36 (2H, q, CH₂, *J* = 7.2 Hz); 7.10–7.18 (3H, m, 3 × ArH); 7.25–7.31 (3H, m, 3 × ArH); 7.32–7.38 (1H, m, ArH); 7.84–7.89 (1H, m, ArH); 7.91–7.96 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.2; 61.9; 125.2; 125.5; 126.6; 127.3; 129.0; 129.3; 130.8; 132.1; 137.2; 142.1; 143.0; 163.2. Anal. (C₁₇H₁₄O₂Se₂) C, H.

3.6.3. 3-(Pyrid-2-ylthio)benzo[*b*]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (24)

Yield: 43%, mp = 124–125 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.28 (3H, t, CH₃, *J* = 7.2 Hz); 4.31 (2H, q, CH₂, *J* = 7.2 Hz); 6.76–6.80 (1H, m, ArH); 6.92–6.98 (1H, m, ArH); 7.33–7.46 (3H, m, 3 × ArH); 7.89–7.94 (1H, m, ArH); 7.99–8.04 (1H, m, ArH); 8.34–8.38 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.1; 61.9; 119.9; 121.1; 125.5; 125.6; 127.5; 127.6; 130.3; 136.6; 140.5; 141.5; 142.4; 149.5; 159.8; 162.8. Anal. (C₁₇H₁₃NO₂SSe) C, H, N.

3.6.4. 3-(2-Pyrimidylthio)benzo[*b*]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (25)

Yield: 55%, mp = 95–97 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.28 (3H, t, CH₃, *J* = 7.2 Hz); 4.30 (2H, q, CH₂, *J* = 7.2 Hz); 6.95 (1H, m, ArH); 7.36–7.51 (2H, m, 2 × ArH); 7.89–7.98 (1H, m, ArH); 8.02–8.11 (1H, m, ArH); 8.43 (2H, d, 2 × ArH, *J* = 4.6 Hz). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.1; 61.7; 117.0; 125.3; 125.6; 127.0; 127.4; 129.1; 140.2; 141.3; 142.5; 157.4; 162.7; 171.5. ⁷⁷Se NMR (39.74 MHz, CDCl₃), δ (ppm): 588.14. Anal. (C₁₅H₁₂N₂O₂SSe) C, H, N.

3.6.5. 3-[2-(*N*-Methylimidazolylthio)]benzo[*b*]selenophene-2-carboxylic acid ethyl ester (26)

Yield: 68%, mp = 105–106 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.41 (3H, t, CH₃, *J* = 7.6 Hz); 3.56 (3H, s, CH₃); 4.40 (2H, q, CH₂, *J* = 7.6 Hz); 6.89 (1H, s, CH); 7.07 (1H, s, CH); 7.33–7.40 (2H, m, ArH); 7.83–7.85 (1H, m, ArH); 8.05–8.08 (1H, m, ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.3; 33.8; 61.9; 123.3; 125.5; 127.5; 127.6; 129.7; 132.0; 134.9; 138.1; 141.2; 141.8; 162.9. Anal. (C₁₅H₁₄N₂O₂SSe) C, H, N.

3.6.6. Diethyl 3,3'-thiodibenzo[*b*]selenophene-2-carboxylate (28)

Yield: 42%, mp = 128–129 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 1.29 (6H, t, 2 × CH₃, *J* = 7.2 Hz); 4.28 (4H, q, 2 × CH₂, *J* = 7.2 Hz); 7.18–7.25 (2H, m, 2 × ArH); 7.28–7.35 (2H, m, 2 × ArH); 7.73–7.77 (2H, m, 2 × ArH); 7.79–7.83 (2H, m, 2 × ArH). ¹³C NMR (100.6 MHz, CDCl₃/TMS) δ (ppm): 14.2; 61.8; 125.2; 125.7; 126.6; 127.3; 133.9; 134.5; 140.8; 141.7; 162.9. Anal. (C₂₂H₁₈O₄SSe₂) C, H.

3.7. In vitro cytotoxicity assay

Monolayer tumor cell line: HT-1080 (human fibrosarcoma), MG-22A (mice hepatoma), and NIH 3T3 (normal mouse fibroblasts) were cultured in standard medium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) without an indicator ("Sigma") supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum ("Sigma"). After the ampoule was thawed the cells from 1 to 4 passages were used. About 2–5.10⁴ cells/mL (depending on line nature) were placed in 96-well plates immediately after compounds were added to the wells. The control cells without test compounds were cultured on separate plate. The plates were incubated for 72 h, 37 °C, 5% CO₂. The number of surviving cells was determined using tri(4-dimethylaminophenyl)methyl chloride (Crystal Violet) or 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT),

and the concentration of nitric oxide (NO) was determined according to [28]. MTT-test: after incubating with preparations culture medium was removed and 200 μ L fresh medium with 10 mM HEPES was added in each well of the plate, than 20 μ L MTT (2 mg/mL in HBSS) was added. After incubation (3 h, 37 °C, 5% CO₂) the medium with MTT was removed and 200 μ L DMSO and 25 μ L glycine buffer pH 10.5 were added at once to each sample. The samples were tested at 540 nm on Anthos HT II photometer. CV-test: after incubating with preparations cell culture was removed and 100 ml 1% glutaraldehyde in HBSS was added to each well. After incubation (15 min) the HBSS with glutaraldehyde the samples washed off H₂O (1 time) and 0.05% crystal violet were added. After incubation with dye (15 min) the samples washed off H₂O (3 times) and citrate buffers pH 4.2 and ethanol (1:1) was added. The samples were tested at 540 nm.

3.8. Morphology assay

The change in cell morphology caused by benzo[b]selenophenes was investigated under inverted fluorescence microscope Nikon ECLIPSE TE 300. Acridine orange stain (Sigma) was used. Stain solution: 10 μ g/mL acridin orange in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. After incubating with benzo[b]selenophenes 72 h, 37 °C, 5% CO₂ the adherent cells were stained in 96-wells cell culture plate (Sarstedt AG). Cell culture mediums were removed and 40 μ L stain solution was added in each well. After 2 min the dye was removed and samples once washed with PBS. Then 40 μ L PBS was added to the samples and they were investigated under microscope control. Chromatin condensation in apoptotic cells was visualized by staining the cellular DNA with the dye acridine orange [29]. Living cells stained green, apoptotic cells orange or yellow, and necrotic cells red (Fig. 2).

Acknowledgment

The financial support for this work provided by ESF project Nr. 2009/0197/1DP/1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/014 and Latvian Council of Science (09.1588) is gratefully acknowledged.

References

[1] J.A. Dodge, C.W. Lugar, S. Cho, J.J. Osborne, D.L. Phillips, A.L. Glasebrook, C.A. Frolik, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7 (1997) 993–996.

[2] D.A. Bradley, A.G. Godfrey, C.R. Schmid, *Tetrahedron Lett.* 40 (1999) 5155–5159.

[3] T.A. Grese, S. Cho, D.R. Finley, A.G. Godfrey, C.D. Jones, C.W. Lugar III, M.J. Martin, K. Matsumoto, L.D. Pennington, M.A. Winter, M. Dee Adrian, H.W. Cole, D.E. Magee, D. Lynn Phillips, E.R. Rowley, L.L. Short, A.L. Glasebrook, H.U. Bryant, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 146–167.

[4] M.J. Martin, T.A. Grese, A.L. Glasebrook, K. Matsumoto, L.D. Pennington, D. Lynn Phillips, L.L. Short, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 7 (1997) 887–892.

[5] A.D. Palkowitz, A.L. Glasebrook, K. Jeff Thrasher, K.L. Hauser, L.L. Short, D. Lynn Phillips, B.S. Muehl, M. Sato, P.K. Shetler, G.J. Cullinan, T.R. Pell, H.U. Bryant, *J. Med. Chem.* 40 (1997) 1407–1416.

[6] C.R. Schmid, J.P. Sluka, K.M. Duke, *Tetrahedron Lett.* 40 (1999) 675–678.

[7] D.S. Johnson, K. Ahn, S. Kesten, S.E. Lazerwith, Y. Song, M. Morris, L. Fay, T. Gregory, C. Stiff, J.B. Dunbar Jr., M. Liimatta, D. Beidler, S. Smith, T.K. Nomanbhoy, B.F. Cravatt, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 2865–2869.

[8] J. Kehler, K. Juhl, B. Norgaard, *US2009/0192213 A1*, July 30 (2009).

[9] M. Hill, J. Meat, *Eur. J. Clin. Nutr.* 56 (2002) S36–S41.

[10] M.A. Moyad, *Urology* 59 (2002) 9–19.

[11] J.E. Spallholz, *Bull. Selenium-Tellurium* 05 (2001) 1–6.

[12] P.B. Caffrey, G.D. Frenkel, *Cancer Lett.* 121 (1997) 177–180.

[13] E. Lukevics, P. Arsenyan, I. Shestakova, I. Domracheva, I. Kanepis, S. Belyakov, J. Popelis, O. Pudova, *Appl. Organometal. Chem.* 16 (2002) 228–234.

[14] E. Lukevics, P. Arsenyan, K. Rubina, I. Shestakova, I. Domracheva, A. Nesterova, J. Popelis, O. Pudova, *Appl. Organometal. Chem.* 16 (2002) 235–238.

[15] P. Arsenyan, K. Rubina, I. Shestakova, I. Domracheva, *Eur. J. Med. Chem.* 42 (2007) 635–640.

[16] P. Arsenyan, I. Shestakova, K. Rubina, I. Domracheva, A. Nesterova, K. Vosele, O. Pudova, E. Lukevics, *Eur. J. Pharmacol.* 465 (2003) 229–235.

[17] P. Arsenyan, K. Rubina, I. Shestakova, E. Abele, R. Abele, I. Domracheva, A. Nesterova, J. Popelis, E. Lukevics, *Appl. Organometal. Chem.* 17 (2003) 825–830.

[18] D.G. Hall (Ed.), *Boronic Acids. Structure, Properties, and Preparation of Boronic Acid Derivatives. Overview of Their Reactions and Applications*, Wiley-VCH Verlag GmbH, 2005.

[19] A. Altomare, M. Burla, M. Camalli, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, A. Moliterni, R. Spagna, *J. Appl. Cryst.* 32 (1999) 115–119.

[20] S. Mackay, W. Dong, C. Edwards, A. Henderson, C.J. Gilmore, N. Stewart, K. Shankland, A. Donald, *maXus, Integrated Crystallography Software*. Bruker-Nonius and University of Glasgow, 2003.

[21] A.F. Mishnev, S.V. Belyakov, *Krystallografiya* 33 (1988) 835–837.

[22] G.M. Sheldrick, *Acta Crystallogr.* A64 (2008) 112–122.

[23] A. Altomare, G. Cascarano, C. Giacovazzo, A. Guagliardi, M.C. Burla, G. Polidori, M. Camalli, *J. Appl. Cryst.* 27 (1994) 435–436.

[24] P. Arsenyan, M. Ikaunieks, S. Belyakov, *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 961–964.

[25] C.M. Martinez-Vitturo, D. Domingues, *Tetrahedron Lett.* 48 (2007) 1023–1026.

[26] J. Guillaumel, S. Leonce, A. Pierre, P. Renard, B. Pfeiffer, P.B. Arimondo, C. Monneret, *Eur. J. Med. Chem.* 41 (2006) 379–386.

[27] G. Bauer, S. Dormann, I. Engelmann, A. Schulz, M. Sarah, *Reactive oxygen species and apoptosis*. in: R.G. Cameron, G. Feuer (Eds.), *Apoptosis and its Modulation by Drugs*. Springer, Berlin, 2000, pp. 275–318.

[28] D.J. Fast, R.C. Lynch, R.W. Leu, *J. Leucocyt. Biol.* 52 (1992) 255–261.

[29] A.S. Loweth, N.G. Morgan, *Methods for the study of NO-induced apoptosis in cultured cells*. in: M.A. Titheradge (Ed.), *Methods in Molecular Biology, Nitric Oxide Protocols*, vol. 100. Humana Press Inc., Totowa, 1998, pp. 311–320.

Original article

4-Methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides: Antitumor action and cytotoxic effect correlation

Pavel Arsenyan*, Kira Rubina, Irina Shestakova, Ilona Domracheva

Department of Medicinal chemistry, Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, Riga LV-1006, Latvia

Received 26 December 2005; received in revised form 29 November 2006; accepted 13 December 2006

Available online 8 January 2007

Abstract

Synthesis and cytotoxic activity of a series of 4-methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides on human fibrosarcoma HT-1080, mouse hepatoma MG-22A, and mouse fibroblasts 3T3 cell lines are described. The correlation between compound LD₅₀ and 3T3 fibroblast cell line morphology was shown. *In vivo* evaluation of amides on mouse sarcoma S-180 confirms high antitumor activity (58–85%). © 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Selenium; 1,2,3-Selenadiazole; Cytotoxic activity; Morphology

1. Introduction

Selenium has attracted great interest as an essential element and certain diseases have been eradicated by dietary supplementation of this element. Selenium is essential for cell metabolism as a component of glutathione peroxidase and other enzyme systems. Current interest lies in the prevention of certain cancers by supplementation with selenium [1–3]. One proposed mechanism for this activity is a cytotoxic effect of selenium on tumor cells [4,5]. Brief exposure of HeLa cells to micromolar concentrations of selenite resulted in significant inhibition of tumor cell colony formation, indicating that this is an assay for selenite cytotoxicity [6]. However, selenium appears to operate by several mechanisms depending on the chemical form of selenium, the nature of the carcinogenic process, and its dosage. There was no significant difference in the potency of selenate, selenite, selenium dioxide, selenomethionine and selenocysteine to inhibit the development of mammary tumors, drug-resistant and drug non-resistant human ovarian tumor cells [7]. The anti-proliferative effects of selenium have been studied both *in vivo* and *in vitro*. The

anti-leukemic effect of sodium selenite is associated with inhibition of DNA replication, transcription and translation. It was shown that 6-phenyl-7(6*H*)-isoselenazolo[4,3-*d*]pyrimidone markedly inhibited the growth of P388 mouse leukemia at dose of 100 µg/mouse per day × 10 with no sign of toxicity [8] and 2-amino-4-substituted-selenazoles exhibit high inhibiting activity on leukemia L1210 cell proliferation (TD₅₀ = 0.2–8 µmol/ml) [9,10]. Taking into account the importance of the selenium as a trace element in the organism our present investigation [11–15] is connected with the synthesis and antitumor activity studies in a series of 4-methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides.

2. Results and discussion

2.1. Chemistry

The general synthetic route chosen for preparation of 4-methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides included amide formation from 4-methyl-5-ethoxycarbonyl-1,2,3-selenadiazole and corresponding amine (Scheme 1). The reaction was carried out in ethanol/water solution at room temperature in darkness to prevent selenadiazole cycle photodegradation. The ¹H, ¹³C and ⁷⁷Se NMR data confirm

* Corresponding author. Tel.: +317 9849464.

E-mail address: pavel.arsenyan@lycos.com (P. Arsenyan).



Scheme 1.

the formation of 4-methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides. The selenium signal in the ^{77}Se NMR spectra for all compounds appears in 1542.3–1563.9 ppm region. Transamidation of ester proceeds very slowly from 10 to 25 days, however heating is prohibited due to selenadiazole cycle thermolability. 4-Methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid ethyl ester reacts with amines to obtain amides in 17–95% yields.

2.2. *In vitro*

The results of these experiments are summarized in Table 1. The majority of tested 4-methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides **1–7** exhibited slight activity *in vitro* on human fibrosarcoma HT-1080 and mouse hepatoma MG-22A tumor cell lines. The 4-methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid dimethylamide (**1**) and di(*iso*-propyl)amide analogue **2** have no cytotoxic activity on HT-1080 cell line. 4-Methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid (*S*)-(1-phenyl-ethyl)-amide (**4**, 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$) is more active than its (*R*) enantiomer **3** (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). In a series of cyclic amides **5–7** pyrrolidino derivative **5** shows the highest cytotoxicity

($\text{TD}_{50} = 19 \mu\text{g}/\text{mL}$ on HT-1080). It should be noted that in the same concentrations 4-methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides **1–7** selectively act against tumor and normal mouse fibroblast (3T3) cells, moreover this series exhibits low LD_{50} toxicity (800–1442 mg/kg).

The role of NO in biosystems has attracted considerable attention in the last decade. NO is formed by enzymatic and non-enzymatic mechanisms. Because of its molecular weight and high lipophilicity, NO has good diffusion properties. It may act not only in the cell where it is produced, but also in nearby tissues. Biologically produced NO originates from oxygen and L-arginine in the reaction catalyzed by NO synthase. NO, a long-lived radical with a wide range of actions, is known as a regulator of a variety of biological processes [16]. The NO level was determined accordingly [17], NO release was defined using the Greys reagent (by NO_2 concentration in the cultural medium). The yield of nitrite was expressed as NO_2 nmol/200 μL of cultural medium in testing plates for 100% alive cells after CV coloration assay (selenadiazole's concentration 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). It was shown (Table 1) that dimethylamide **1** is a NO radical protector on MG-22A cell line, but di(*iso*-propyl)amide analogue **2** exhibits an opposite effect. (*R*) Enantiomer **3** is a free radical protector on human fibrosarcoma cell line, besides (*S*) analogue **4** which readily increase NO concentration in the cultural medium ($\text{TG}_{100} = 200\text{--}300\%$). (4-Methyl-1,2,3-selenadiazol-5-yl)-pyrrolidin-1-yl-methanone (**5**) and piperidine derivative **6** are NO inducers ($\text{TG}_{100} = 100\text{--}400\%$).

Table 1
In vitro cytotoxicity in monolayer tumor cell lines [HT-1080 (human fibrosarcoma), MG-22A (mice hepatoma), NIH 3T3 (normal mouse fibroblasts) and inhibition of tumor growth (sarcoma S-180)] caused by 1,2,3-selenadiazoles **1–7**^a

R	Structure	HT-1080		MG-22A		NIH 3T3	LD_{50} (mg/kg)	S-180 Inhibition (%)	Toxic effect (%)
		TD_{50} ^a	NO 100% ^b	TD_{50}	NO 100%	TD_{50}			
1		^c	10	35	63	351	1134	58	17
2		^c	29	31	200	718	1755	–32	0
3		100	17	29	400	195	1029	20	3
4		31	300	32	200	407	1442	–23	0
5		19	350	33	350	214	977	85	23
6		31	100	27	400	123	800	71	8
7		^c	11	34	250	280	1145	^c	8

^a TD_{50} – concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$) providing 50% cell killing effect [(CV + MTT)/2].

^b No concentration (%) (CV: coloration).

^c No cytotoxic effect.

2.3. Morphology

The influence of the studied 4-methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides **1–7** on the phenotype of mouse fibroblasts, human fibrosarcoma HT-1080, and mouse hepatoma MG-22A cells was examined (Fig. 1). Figures in the table show the morphological changes after 72 h at 30 °C (visualization by acridine orange). Our experimental data shows that morphology of selenadiazoles **1–7** on 3T3 cells correlates with cytotoxic data on 3T3 cell line. Derivatives **1**, **3**, **5**, and **6** are more toxic than **2**, **4** and **7**. Dimethylamide derivative **1** induced apoptosis and polyploidy of fibrosarcoma cells (Table 2), but di(*iso*-propyl) analogue **2** increases the amount of tumor cells. (*S*)-(1-Phenyl-ethyl)-amide **4** changed the cell phenotype and mitotic mechanism, however, its (*R*) analogue **3** has no influence on the fibrosarcoma cell phenotype. The introduction of piperidiny fragment into the molecule (**6**) leads to the increase in cell volume and formation of more than one apoptotic nucleus. The inspection of selenadiazole amides **1–7** influence on mouse hepatoma MG-22A phenotype shows

that only dimethylamide **1** and pyrrolidine derivative **5** evoke apoptosis.

2.4. In vivo

Antitumor activity of 4-methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides **1–7** against sarcoma S-180 was determined for male ICR mice (18–20 g). The 4-methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid dimethylamide (**1**) inhibits sarcoma growing by 58% in dose 2 mg/kg in two days, but negatively influences on mice respiratory system due to its toxic effect (17%). Di(*iso*-propyl)amide analogue **2** undesirably increases the tumor growth by 32%. The introduction of optical center in the core molecule [**3** – (*R*)-isomer; **4** – (*S*)-isomer] shows an opposite activity: (*R*) analogue slightly inhibits sarcoma growing, however, (*S*)-isomer increases the tumor growth by 23% in 8 days. Experimental data for cyclic amides **5–7** show mice weight decrease by 8–23%. Pyrrolidine amide **5** possesses the sarcoma S-180 inhibition ability by 85% with simultaneous loss of mice weight by 23%.

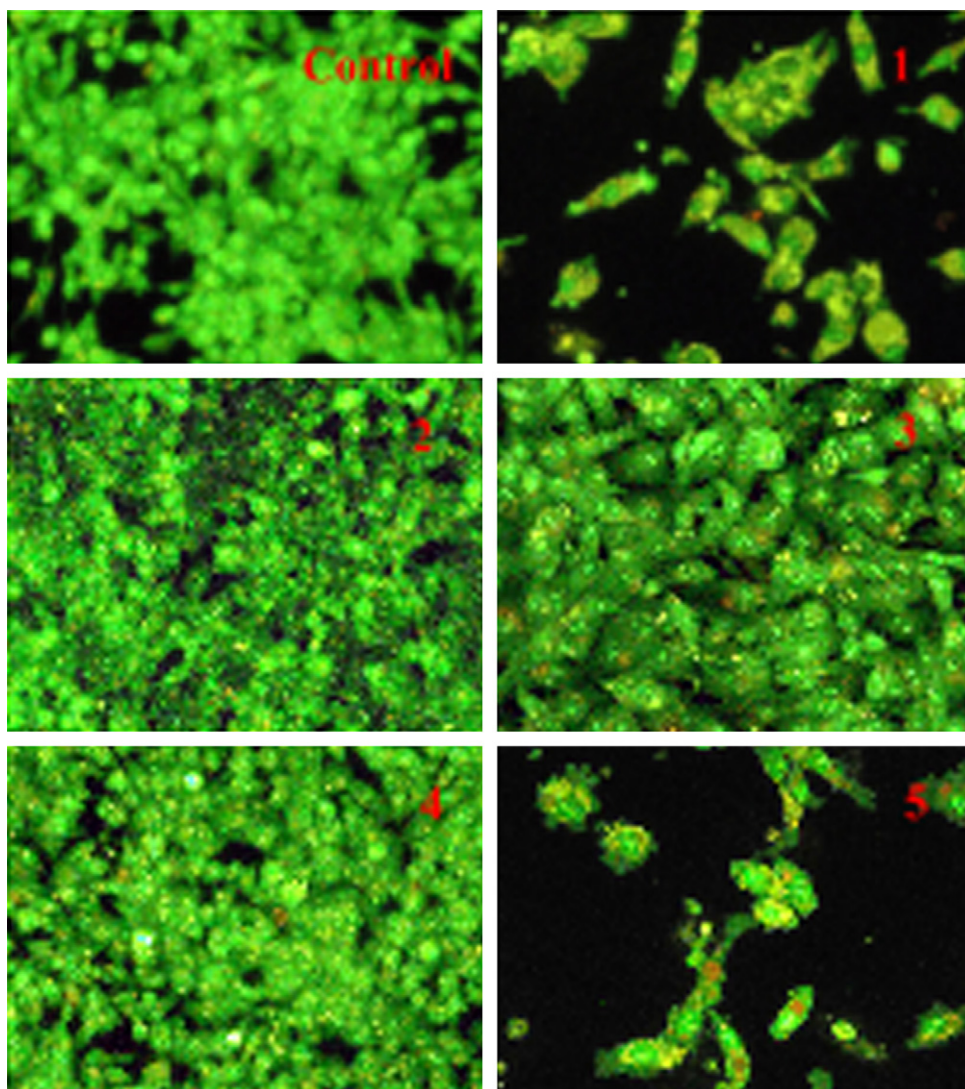


Fig. 1. 4-Methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides **1–5** morphology data (HT-1080 cell line).

Table 2
¹H, ¹³C and ⁷⁷Se NMR spectra and elemental analysis data of 4-methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides **1–7**

Compound	Yield (%)	M.p. (°C)	¹ H NMR, δ, ppm		¹³ C NMR, δ, ppm		⁷⁷ Se NMR, δ, ppm	Elemental analysis						
			-NR ₂		C=O			Calculated		Found		H	C	N
			Me (s, 3H)	Me (s, 3H)	Me	Diazolyl cycle		H	C	H	C			
1	67	82–84	2.75 (s, 3H)	2.92 and 3.15 (2s, 3H, NMe)	13.6	149.4, 155.8	164.2	35.3, 38.6 (NCH ₃)	4.16	33.04	19.26	4.12	32.99	19.27
2	35	140	2.95 (s, 3H)	1.34 (d, 12H, J = 6 Hz, 4Me), 3.32 (septet, 2H, J = 6 Hz, 2CH)	14.3	156.9, 157.5	166.4	18.9 (NCCH ₃), 46.4 (CH)	6.25	43.80	15.32	6.23	43.78	15.33
3	21	168	2.73 (s, 3H)	1.53 (d, 3H, J = 6.8 Hz, Me), 4.20 (q, 1H, J = 6.8 Hz, CH), 7.22 (s, 5H, Ph), 8.46 (bs, 1H, NH)	14.3	150.6, 157.8	168.1	21.4 (CHMe), 51.4 (CMe), 126.0, 128.8 (<i>p</i> -), 129.0, 138.3 (<i>i</i> -)	4.45	48.99	14.28	4.43	49.00	14.27
4	22	152	2.73 (s, 3H)	1.53 (d, 3H, J = 6.8 Hz, Me), 4.20 (q, 1H, J = 6.8 Hz, CH), 7.22 (s, 5H, Ph), 8.63 (bs, 1H, NH)	14.3	154.8, 157.8	168.2	21.3 (CHMe), 51.4 (CMe), 126.0, 128.8 (<i>p</i> -), 129.0, 138.3 (<i>i</i> -)	4.45	48.99	14.28	4.44	49.0	14.29
5	95	Oil	2.65 (s, 3H)	1.81–1.90 (m, 4H, H-3, H-4), 3.10 (t, 2H, J = 6 Hz, NCH ₂), 3.51 (t, 2H, J = 6 Hz, NCH ₂)	13.5	149.7, 156.1	162.1	24.0 and 25.6 (C–C), 46.0 and 48.5 (N–C)	4.54	39.36	17.21	4.54	39.32	17.24
6	71	84–85	2.75 (s, 3H)	1.51 (m, 2H, <i>p</i> -CH ₂), 1.67 (m, 4H, 2 <i>m</i> -CH ₂), 3.24 and 3.73 (2m, 2H, NCH ₂)	13.4	149.5, 155.4	162.3	24.0, 25.3 and 26.2 (C–C), 43.1 and 48.2 (N–C)	5.08	41.87	16.28	5.06	41.85	16.33
7	17	122–123	2.77 (s, 3H)	3.30 and 3.64–3.76 (2m, 8H)	13.7	148.4, 155.9	163.0	42.7 and 47.4 (N–C), 66.56 (O–C)	4.26	36.93	16.15	4.25	36.92	16.13

Piperidino analogue **6** shows high inhibition level (71%) and relatively slight influence on mice weight. Besides, introduction of the oxygen atom in the amide cycle (**7**) leads to disappearance of the tumor growth inhibition ability.

2.5. Conclusions

4-Methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides were prepared by convenient synthetic way. The correlation between compound LD₅₀ and 3T3 fibroblast cell line morphology was shown. 4-Methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides show a potency *in vitro* against HT-1080 and MG-22A tumor cell lines. *In vivo* evaluation of amides **1**, **3**, and **6** also confirms high antitumor activity against sarcoma S-180 (58–85%).

3. Experimental section

3.1. General

¹H and ⁷⁷Se NMR spectra were recorded on a Varian 200 Mercury spectrometer at 200 and 39.74 MHz correspondingly at 303 K in CDCl₃/TMS solution. The ¹H chemical shifts are given relative to TMS, ¹³C – relative to chloroform, and ⁷⁷Se – relative to dimethyl selenide. The melting points were determined on a “digital melting point analyser” (Fisher) and the results are given without correction.

3.2. Synthesis of 4-methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid amides

The mixture of 4-Methyl-1,2,3-selenadiazole-5-carboxylic acid ethyl ester (0.02 mol) and amine (0.04 mol) in 50% ethanol solution in water was stirred in darkness at room temperature (TLC control). After reaction completion the solvent was evaporated under reduced pressure. Crude product was purified on silica gel using ethyl acetate/ethanol mixture as an eluent with the following recrystallization from ethyl acetate. ¹H, ¹³C, and ⁷⁷Se NMR data and elemental analysis data are presented in Table 2.

3.3. *In vitro* cytotoxicity assay

Monolayer tumor cell line: HT-1080 (human fibrosarcoma), MG-22A (mice hepatoma), and NIH 3T3 (normal mouse fibroblasts) were cultured in standard medium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) without an indicator (“Sigma”) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (“Sigma”). After the ampoule was thawed the cells from one to four passages were used. About 2–5 × 10⁴ cells/ml (depending on line nature) were placed in 96-well plates immediately after compounds added to the wells. The control cells without test compounds were cultured on separate plate. The plates were incubated for 72 h at 37 °C in 5% CO₂. The number of surviving cells was determined using tri(4-dimethylaminophenyl)methyl chloride (crystal violet) or 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium

bromide (MTT), and the concentration of nitric oxide (NO) was determined according to Ref. [11].

MTT-test: After incubating with preparations culture medium was removed and 200 μl fresh medium with 10 mM HEPES was added in each well of the plate, then 20 μl MTT (2 mg/ml in HBSS) was added. After incubation (3 h, 37 °C, 5% CO₂) the medium with MTT was removed and 200 μl DMSO and 25 μl glycine buffer pH 10.5 were added once to each sample. The samples were tested at 540 nm on Anthos HT II photometer.

CV-test: After incubating with preparations cell culture was removed and 100 ml of 1% glutaraldehyd in HBSS was added to each well. After incubation (15 min) the HBSS with glutaraldehyd samples washed off H₂O (1 time) and 0.05% crystal violet was added. After incubation with dye (15 min) the samples washed off H₂O (3 times) and citrate buffers pH 4.2 and ethanol (1:1) were added. The samples were tested at 540 nm.

3.4. *In vivo* activity assay

The compounds were tested *in vivo* against sarcoma S-180 cells. Sarcoma S-180 (5 × 10⁶) cells were inoculated s.c. into male ICR mice (six weeks old, 18–20 g) on day 0. Drugs were administered i.p.; the treatment was started 24 h after tumor transplantation. The number of mice used in each group was between 6 and 10. The daily dose was 10 mg/kg; duration of treatment was nine days. The efficacy of the treatment was estimated by the ellipsoid formula, *V* of control group was taken in calculations for 100%. The tumor volume (*V*) was calculated from equation: $V = 4\pi ab^2/3$, where *a* and *b* are ellipsoid maximum and minimum diameters (calculated volume was reduced by 2 times in the case of flat tumor shape).

3.5. Morphology assay

The change in cell morphology caused by selenadiazole amides **1–7** was investigated under inverted fluorescence microscope Nikon ECLIPSE TE 300. Acridine orange stain (Sigma) was used. Stain solution: 10 μg/ml acridine orange in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. After incubating with selenadiazole amides for 72 h at 37 °C in 5% CO₂ the adherent cells were stained in 96-wells cell culture plate (Sarsted AG). Cell culture mediums were removed and 40 μl stain solution was added in each well. After 2 min the dye was removed and samples were once washed with PBS. Then 40 μl PBS was added to the samples and they were investigated under microscope control. Chromatin condensation in apoptotic cells was visualized by staining the cellular DNA with the dye acridine orange [18,19]. Living cells stained green, apoptotic cells orange or yellow, and necrotic cells red (Fig. 1). (For interpretation of the references to colors in the text, the reader is referred to the web version of this article.)

References

- [1] M. Hill, J. Meat, Eur. J. Clin. Nutr. 56 (2002) S36–S41.
- [2] M.A. Moyad, Urology 59 (2002) 9–19.

- [3] J.E. Spallholz, *Bull. Selenium–Tellurium* 05 (2001) 1–6, 10 (2001) 1–12.
- [4] G. Mugesh, W.-W. Du Mont, H. Sies, *Chem. Rev.* 101 (2001) 2125–2179.
- [5] M.S. Alaejos, F.J. Diaz Romero, C. Diaz Romero, *Nutrition* 16 (2000) 376–383.
- [6] P.B. Caffrey, G.D. Frenkel, *Mol. Pharmacol.* 39 (1991) 281–284.
- [7] P.B. Caffrey, G.D. Frenkel, *Cancer Lett.* 121 (1997) 177–180.
- [8] H. Ito, J.Z. Wang, K. Shimura, J. Sakakibara, T. Ueda, *Anticancer Res.* 10 (1990) 891–895.
- [9] Y. Kumar, R. Green, D.S. Wise, L.L. Wotring, L.B. Townsend, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 3849–3852.
- [10] Y. Kumar, R. Green, K.Z. Borysko, D.S. Wise, L.L. Wotring, L.B. Townsend, *J. Med. Chem.* 36 (1993) 3843–3848.
- [11] E. Lukevics, P. Arsenyan, I. Shestakova, I. Domracheva, I. Kanep, S. Belyakov, J. Popelis, O. Pudova, *Appl. Organometal. Chem.* 16 (2002) 228–234.
- [12] E. Lukevics, P. Arsenyan, K. Rubina, I. Shestakova, I. Domracheva, A. Nesterova, J. Popelis, O. Pudova, *Appl. Organometal. Chem.* 16 (2002) 235–238.
- [13] P. Arsenyan, K. Oberte, O. Pudova, E. Lukevics, *Chem. Heterocycl. Comp.* (2002) 1627–1639.
- [14] P. Arsenyan, I. Shestakova, K. Rubina, I. Domracheva, A. Nesterova, K. Vosele, O. Pudova, E. Lukevics, *Eur. J. Pharmacol.* 465 (2003) 229–235.
- [15] P. Arsenyan, K. Rubina, I. Shestakova, E. Abele, R. Abele, I. Domracheva, A. Nesterova, J. Popelis, E. Lukevics, *Appl. Organometal. Chem.* 17 (2003) 825–830.
- [16] G. Bauer, S. Dormann, I. Engelmann, A. Schulz, M. Sarah, *Reactive oxygen species and apoptosis*, in: R.G. Cameron, G. Feuer (Eds.), *Apoptosis and its Modulation by Drugs*, Springer, Berlin, 2000, pp. 275–318.
- [17] D.J. Fast, R.C. Lynch, R.W. Leu, *J. Leucocyt. Biol.* 52 (1992) 255–261.
- [18] W. Eventoff, *J. Mol. Biol.* 103 (1976) 799–801.
- [19] A.S. Loweth, N.G. Morgan, *Methods for the study of NO-induced apoptosis in cultured Cells*, in: M.A. Titheradge (Ed.), *Methods in Molecular Biology, Nitric Oxide Protocols*, vol. 100, Humana Press Inc., Totowa, 1998, pp. p311–p320.

Organoammonium hydroselenites: antitumor action through radical balance regulation

Pavel Arsenyan*, Irina Shestakova, Kira Rubina, Ilona Domracheva, Alena Nesterova, Kristina Vosele, Olga Pudova, Edmunds Lukevics

Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, Riga, LV-1006, Latvia

Received 16 September 2002; received in revised form 14 February 2003; accepted 21 February 2003

Abstract

Organoammonium hydroselenites were synthesized and investigated as potential selective, anticancer prodrugs. These compounds were studied *in vitro* on human fibrosarcoma (HT-1080), hamster kidney endothelial (BHK 21) and normal mouse embryonic fibroblasts (NIH 3T3). Most of them were very active against HT-1080 (0.6–5.3 g/ml). Amino acid hydroselenites readily increased the nitric oxide (NO) concentration in the culture medium of HT-1080 cells (up to $TG_{100} = 1500\%$); however, 4-amidohydroximinomethylpyridinium hydroselenite ($TG_{100} = 24\%$) and *o*-phenanthroline hydroselenite ($TG_{100} = 50\%$) were free radical inhibitors. All compounds were glutathione peroxidase inhibitors; some of them could also prevent hydrogen peroxide degradation by inhibition of catalase. The influence of the investigated ammonium hydroselenites on tumor cell (HT-1080) morphology was examined. The substances studied were also active *in vivo* against sarcoma S-180. The role of organoammonium hydroselenites as free radical regulators and their therapeutic antitumor are discussed.

© 2003 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Antitumor activity; Catalase; Hydroselenite; Glutathione peroxidase; Morphology; Nitric oxide (NO); Selenium

1. Introduction

Selenium has attracted great interest as an essential element and certain diseases have been eradicated by dietary supplementation of this element. Selenium is essential for cell metabolism as a component of glutathione peroxidase and other enzyme systems. Current interest lies in the prevention of certain cancers by supplementation with selenium (Hill and Meat, 2002; Moyad, 2002; Spallholz, 2001). One proposed mechanism for this activity is a cytotoxic effect of selenium on tumor cells (Mugesh et al., 2001; Alaejos et al., 2000). Brief exposure of HeLa cells to micromolar concentrations of selenite resulted in significant inhibition of tumor cell colony formation, indicating that this is an assay for selenite cytotoxicity (Caffrey and Frenkel, 1991). However, selenium appears to operate by several mechanisms depending on the chemical form of selenium, the nature of the carcinogenic process and its dosage. There was no significant difference in the potency

of selenate, selenite, selenium dioxide, selenomethionine and selenocysteine to inhibit the development of mammary tumors, drug-resistant and drug nonresistant human ovarian tumor cells (Caffrey and Frenkel, 1997). The antiproliferative effects of selenium have been studied both *in vivo* and *in vitro*. The antileukemic effect of sodium selenite is associated with inhibition of DNA replication, transcription and translation. Selenocystine and sodium selenite have antitumor activity and these are also the only compounds, which demonstrate significant redox chemistry, including depletion of cellular glutathione, stimulation of glutathione reductase and stimulation of oxygen consumption. The interaction of these two compounds with glutathione suggests an intriguing potential role for them in cancer therapy (Batist et al., 1986). Significant chemopreventive effects have been produced with sodium selenite in the following rodent model carcinogenesis systems: mouse skin papillomas, rat mammary adenocarcinoma, hamster tracheal squamous cell carcinoma and mouse bladder carcinoma, mouse colon and lung adenocarcinoma, rat and mouse colon adenocarcinoma (Boone et al., 1992). Sodium selenite may provide protection against *cis*-diaminedichloroplatinum(II) nephrotoxicity when it is given before *cis*-

* Corresponding author. Tel.: +371-9849464; fax: +371-7550338.
E-mail address: pavel.arsenyan@lycos.com (P. Arsenyan).

diaminedichloroplatinum(II). Moreover, selenium has anti-neoplastic activity against several tumors. Administration of sodium selenite reduces cisplatin toxicity without inhibiting the antitumor activity of cisplatin. The combination of these qualities may open new perspectives in cancer chemotherapy (Baldeu et al., 1989; Olas and Wachowicz, 1997).

The majority of tested organic base hydroselenites exhibit high activity in vitro in investigated tumor cell lines. *o*-Phenanthroline and imidazolium selenites exhibit the highest cytotoxic effect on HT-1080, MG-22A, B16 and Neuro 2A cell lines. In addition, that most synthesized selenites are very active (0.5–0.6 µg/ml) against mouse melanoma B16. Of a series of ethanolamine derivatives, *N*-methylethanolammonium selenite is more active in experiments with Neuro 2A cells ($TD_{50}=1$ µg/ml), while triethanolammonium selenite is toxic against HT-1080 cells ($TD_{50}=2.3$ µg/ml), being less toxic against normal cells 3T3 ($TD_{50}=47.7$ µg/ml) (Lukevics et al., 2002a). Previously, we reported that hydroselenites are able to activate nitric oxide generation in various tumor cell cultures (Lukevics et al., 2002b). The activation of nitric oxide production is especially prolonged in HT-1080 and MG-22A cell lines. The amount of nitric oxide produced depends on the type of tumor and the cation structure. According to the literature and our results, we propose that the antitumor effect of hydroselenites stems from the fact that they are able to regulate the free radical balance in vitro and in vivo.

In the current study, we report the cytotoxic activity of selected organoammonium hydroselenites in vitro against HT-1080, BHK 21 and NIH 3T3 cell lines, their activity against glutathione peroxidase and catalase, and in vivo against sarcoma S-180 and their effect on cell morphology. The role of organoammonium hydroselenites as free radical regulators and the therapeutic antitumor effect of a balanced generation of free radicals are discussed.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of hydroselenites

To a solution of the amine (4-hydroximinomethylpyrrolidine, 4-amidohydroximinomethylpyrrolidine, benzimidazole, 2-mercaptobenzimidazole, *o*-phenanthroline, triethanolamine, β-Ala, L-Ser, L-Pro, Gly–Gly, Gly–Gly–Gly, L-Ala–Gly–Pro–ONb) (0.02 mol) in 50 ml of water or a mixture of water/ethanol (1:1), the equimolar amount of selenium dioxide was added. The reaction mixture was stirred 1 h at room temperature. The residue was recrystallized from ethanol or purified on silica gel. The structure was confirmed by the 1H , ^{13}C , ^{77}Se nuclear magnetic resonance (NMR) data, and in the case of triethanolammonium hydroselenite $[HN^+(CH_2CH_2OH)_3HSeO_3^-]$ by X-ray analysis (Lukevics et al., 2002a,b).

2.2. In vitro cytotoxicity assay

Monolayer tumor cell lines, HT-1080 (human fibrosarcoma), NIH 3T3 (normal mouse fibroblasts) and BHK21 (hamster kidney endothelial) cells, were cultured in standard medium Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) without an indicator ("Sigma") supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum ("Sigma"). After the ampoule was thawed, the cells from one to four passages were used. About $2-5 \times 10^4$ cells/ml (depending on line nature) were placed in 96-well plates immediately after compounds were added to the wells. The control cells without test compounds were cultured on separate plate. The plates were incubated for 72 h, 37 °C, 5% CO₂. The number of surviving cells was determined using tri(4-dimethylaminophenyl)methyl chloride (crystal violet) or 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), and the concentration of nitric oxide (NO) was determined according to Lukevics et al. (2002a). Glutathione peroxidase activity and catalase activity were determined according to Eventoff (1976).

2.3. In vivo activity assay

The compounds were tested in vivo against sarcoma S-180 cells. Sarcoma S-180 (5×10^6) cells were inoculated s.c. into male ICR mice (6 weeks old, 18–20 g) on day 0. Drugs were administered i.p.; the treatment was started 24 h after tumor transplantation. The number of mice used in each group was between 6 and 10. The daily dose was 10 mg/kg; duration of treatment was 9 days. The efficacy of the treatment was estimated by the ellipsoid formula; V of control group was taken in calculations for 100%. The tumor volume (V) was calculated from equation: $V=4\pi ab^2/3$, where a and b are ellipsoid maximum and minimum diameters (calculated volume was reduced by two times in the case of flat tumor shape).

2.4. Morphology assay

The change in cell morphology caused by hydroselenites was investigated on Nikon ECLIPSE TE 300 microscope slides. Crystal violet and acridine orange stains were used. The adherent cells were stained in the plate wells following culture of the cells with hydroselenites. Chromatin condensation in apoptotic cells was visualized by staining the cellular DNA with the dye acridine orange (Loweth and Morgan, 1998). Living cells stained green, apoptotic cells orange or yellow and necrotic cells red (Fig. 2).

3. Results

The results of cytotoxic activity studies of organoammonium hydroselenites 1–12 in vitro on HT-1080, BHK 21

and NIH 3T3 cells are summarized in Table 1. The majority of the compounds tested, such as 4-amidohydroximinomethylpyridinium hydroselenite (**2**) (3.6 $\mu\text{g/ml}$), o-phenanthroline hydroselenite (**5**) (0.6 $\mu\text{g/ml}$), triethanolammonium hydroselenite (**6**) (3.15 $\mu\text{g/ml}$) and prolinium hydroselenite (**9**) (1.7 $\mu\text{g/ml}$), exhibited a high activity in vitro on human fibrosarcoma HT-1080 cells.

Glutathione peroxidase and catalase inhibition data for the organoammonium hydroselenites **1–12** are given in

Table 1. All compounds studied were glutathione peroxidase inhibitors. Some derivatives also prevented hydrogen peroxide degradation by inhibiting catalase.

Compounds **1–12** mostly increased the NO concentration in the culture medium. This effect was especially expressed in the case of compounds **7–11** ($\text{TG}_{100} = 600\text{--}1500\%$) incubated with HT-1080 cells. The effect on NO generation of compounds **2** ($\text{TG}_{100} = 24\%$) and **5** ($\text{TG}_{100} = 50\%$) showed that they were free radical inhibitors.

Table 1

In vitro cytotoxicity in monolayer tumor cell lines [HT-1080 (human fibrosarcoma), NIH 3T3 (normal mouse fibroblasts) and BHK21 (hamster kidney endothelial)] and inhibition of tumor growth (sarcoma S-180) and enzyme activity (glutathione peroxidase and catalase) caused by hydroselenites **1–12**^a

No.	(Amine)H ⁺ HSeO ₃ ⁻	HT-TD ₅₀	1080 NO, 100%	NIH 3T3 TD ₅₀	BHK21 TD ₅₀	S-180 Inhibition, %	GSH-Px Inhibition, %	Catalase Inhibition, %
1		>50	5	37	22	25	26 ± 2	17 ± 3
2		3.6	24	6.6	3.4	27	50 ± 5	15 ± 3
3		5.3	200	4.0	>10	51	46 ± 6	5 ± 3
4		40.0	250	22.5	22	-37	36 ± 2	12 ± 7
5		0.6	50	0.9	>10	39	52 ± 10	20 ± 1
6		3.15	150	48.5	>50	81	60 ± 3	-2 ± 1
7		3.6	800	1.1	3.1	-4	62 ± 3	99 ± 1
8		10	1150	2.5	31.5	51	26 ± 8	100 ± 3
9		1.7	1500	1.5	2.5	1	21 ± 1	12 ± 7
10		20	800	47	40	33	35 ± 6	99 ± 1
11		10	600	21	5	-46	42 ± 6	-11 ± 2
12		2	80	7.9	56.2	36	46 ± 2	13 ± 3

^a TD₅₀ concentration ($\mu\text{g/ml}$) providing 50% cell killing effect [(CV + MTT)/2]; NO concentration (%) (CV: coloration); “-” tumor growth activation.

The influence of the studied ammonium hydroselenites **1–12** on tumor cell (fibrosarcoma HT-1080) morphology was examined. Figs. 2 and 3 present the changes in morphology after 72 h (visualization by acridine orange and crystal violet).

The antitumor activity of hydroselenites **1–12** was tested against sarcoma S-180 in male ICR mice (18–20 g). 4-Hydroximinomethylpyridinium hydroselenite (**1**) exhibited antitumor activity, without having a cytotoxic effect. Pyridinium hydroselenites **1** and **2** inhibited tumor growth by 25% and 27%, respectively (Table 1). Inspection of the tumor inhibition activity of compounds **7–12** showed that β -alanine hydroselenite (**7**) and prolinium hydroselenite (**9**) had no influence on sarcoma growth.

4. Discussion

The cytotoxic activity results showed that the studied hydroselenites are cytotoxic against human fibrosarcoma HT-1080 cells. It should be noted that, at the same concentrations, many hydroselenites were toxic against both fibrosarcoma and normal cells (NIH 3T3 and BHK 21). Benzimidazolium hydroselenite (**3**) and 2-mercaptobenzimidazolium hydroselenite (**4**) had comparable NO generating activity, but the insertion of a mercapto substituent into the benzimidazole ring (**4**) considerably decreased cytotoxicity against fibrosarcoma HT-1080. In a series of compounds (**7–12**), **9** was the most active in the experiments with HT-1080, while tripeptide derivative **12** had the highest selectivity ($TD_{50} = 2.0 \mu\text{g/ml}$ on HT-1080), being less toxic against normal cells 3T3 ($TD_{50} = 7.9 \mu\text{g/ml}$ on NIH 3T3).

The regulation of the glutathione peroxidase/glutathione reductase system may affect free radical balance in tumors. Glutathione peroxidase may scavenge various peroxides. Overprotection of this enzyme was observed to suppress reactive oxygen species inducing apoptotic death. The extent of enzymes inhibition strongly depended on the nature of the cation structure. Compounds **6** and **7** demonstrated the greatest inhibition glutathione peroxidase (60–62%). However, they showed opposite activity on catalase: hydroselenite **6** has no influence (–2%), but **7** completely inhibited catalase activity (99%). Also, serine (**8**) and glycylglycine (**10**) hydroselenites even at a concentration 1×10^{-4} M completely inhibited catalase (99–100%).

The role of NO in biosystems has attracted considerable attention in the last decade. NO is formed by enzymatic and nonenzymatic mechanisms. Because of its molecular weight and high lipophilicity, NO has good diffusion properties. It may act not only in the cell where it is produced, but also in nearby tissues. NO and oxygen anion (O_2^-) have a similar number of electrons and compete in biosystems. The understanding the role of NO, NO derivatives and NO inhibitors in the therapy of cancer is difficult because the data in the literature are contradictory. The multitude of actions and dynamics of NO suggest that regulatory compounds and NO-

dependent processes lead to the transformation of cells into tumor cells under pathological conditions and to the normal action of NO under normal conditions (Fig. 1). We present a model with the four vectors pointing towards different biomolecules (RSNO, NO_x , $[M \cdot NO]$, $ONOO^-$). The bottom of the cone represents the normal level of NO-dependent system. Any biochemical or photochemical impulse from outside the system leads to the activation of NO system. The top of the cone represents the maximum activation of the system without pathological process occurring. If the impulse is too strong, the process by which a normal cell is converted into a tumor starts. The addition of selenium-containing derivatives **1–12** reduced the activation level to the inactivated state. It is necessary to regulate the entire system, not just one of the components. Our results indicate that the investigated organoammonium hydroselenites may be promising antitumor agents with an action mediated by the regulation of radical formation. The hydroselenite compounds **1–12** disrupt the different radical-dependent systems and slowly normalize the biochemical processes in the cell.

Biologically produced NO originates from oxygen and L-arginine in the reaction catalyzed by NO synthase. NO, a long-lived radical with a wide range of actions, is known as a regulator of a variety of biological processes (Bauer et al., 2000). In the case of hydroselenites **1–12**, the role of thiol is played by glutathione. Moreover, hydroselenites may regulate the level of glutathione in the cell because selenium-containing derivatives are glutathione peroxidase inhibitors.

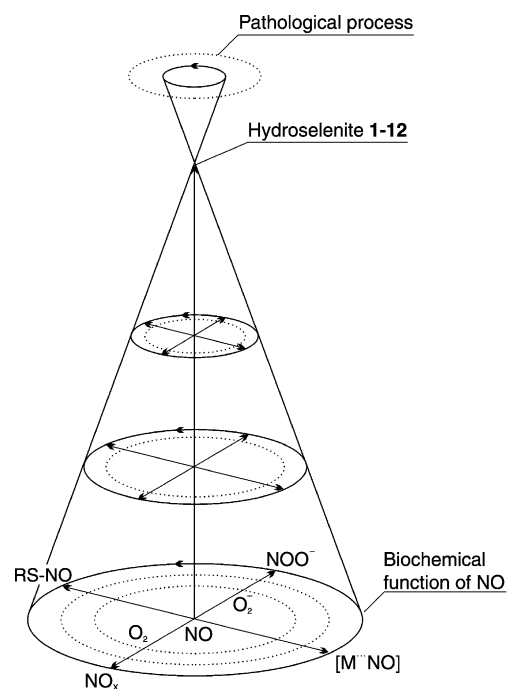


Fig. 1. The major reactive pathways of NO under physiological conditions. The extent and dynamics of NO action suggest the formation of regulatory compounds and NO-dependent processes to transform the tumor cell under pathological conditions to a normal state of NO action [the four vectors toward different biomolecules (RSNO, NO_x , $[M \cdot NO]$, $ONOO^-$)].

According to our results, there is no correlation between the ability to inhibit glutathione peroxidase and the efficacy to generate NO. The increase in NO depends on the type of tissue, prodrug dose, etc. According to the literature, the conversion of L-arginine to L-citrulline with production of NO is catalyzed by heme iron (Pufahl and Marletta, 1993). The NO-inhibiting activity of compounds **2** and **5** may stem from their ability to make complexes with iron by amidoxime and two nitrogen fragments, respectively. Compounds **3**, **4** and especially amino acid hydroselenites **7–11**, unlike L-arginine and L-ornithine derivatives (Mayer et al., 1991; Stuehr et al.,

1991), readily increased the NO concentration in the culture medium of HT-1080 cells ($TG_{100} = 600–1500\%$). The amino acid derivatives studied nonspecifically activated NO generation in the cell. There was no correlation between NO generation and the cytotoxic effect of the salts studied that related to specific features of the cell lines.

The influence of the studied ammonium hydroselenites **1–12** on the phenotype of fibrosarcoma HT-1080 cells was examined. Figs. 2 and 3 show the morphological changes after 72 h (visualization by acridine orange and crystal violet). Figs. 2A and 3A show the morphological structure

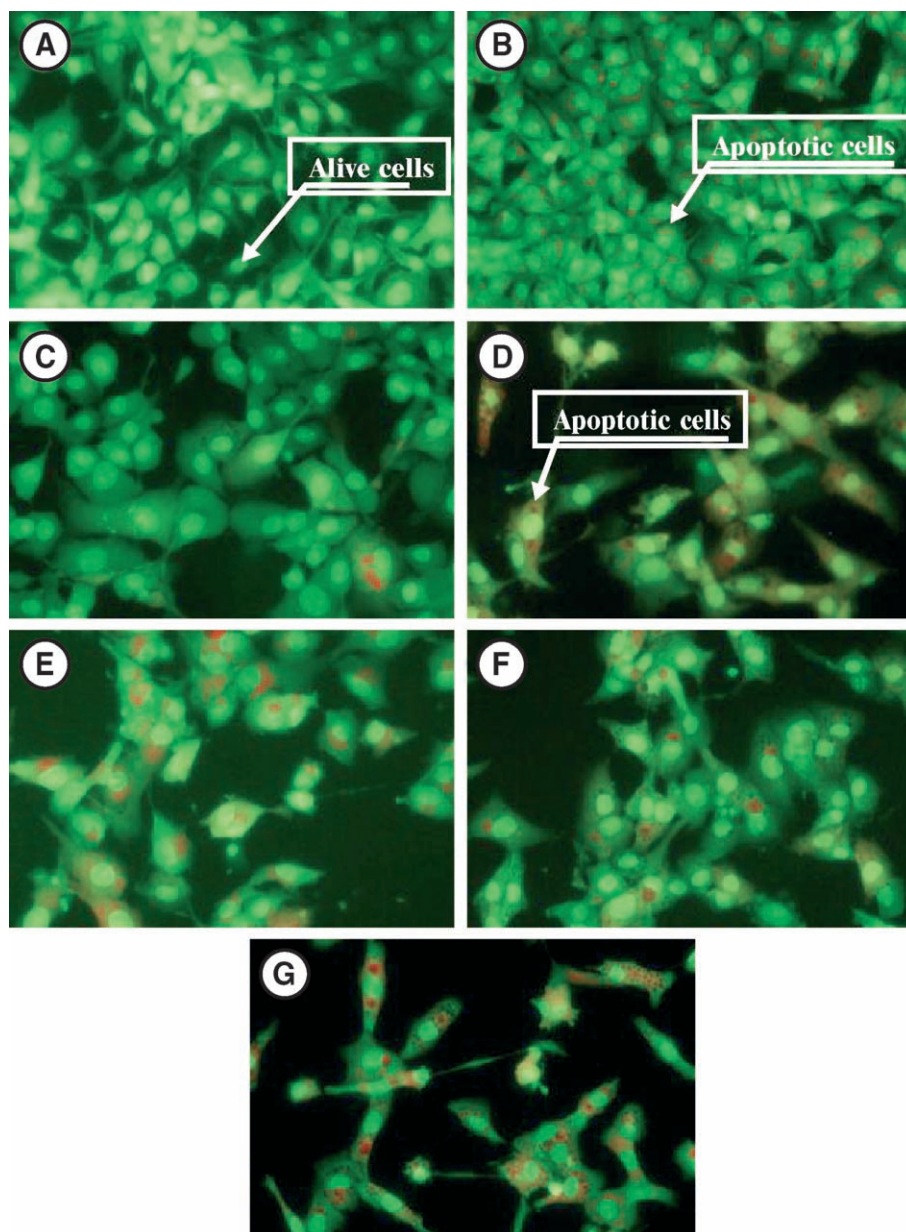


Fig. 2. (A) View of human fibrosarcoma HT-1080 cells (24 °C, 72 h) visualized by staining the cellular DNA with the dye acridine orange. Living cells exhibit a green color, cells with orange or yellow color are apoptotics, and cells with a red color are necrotics; (B) view of human fibrosarcoma HT-1080 cell phenotype with benzimidazolium hydroselenite **3**; (C) with 2-mercaptobenzimidazolium hydroselenite **4**; (D) with phenantrolinium hydroselenite **5**; (E) with serine hydroselenite **8** in dose 0.3 µg/ml; (F) with serine hydroselenite **8** in dose 3.0 µg/ml; (G) with tripeptide hydroselenite **12**.

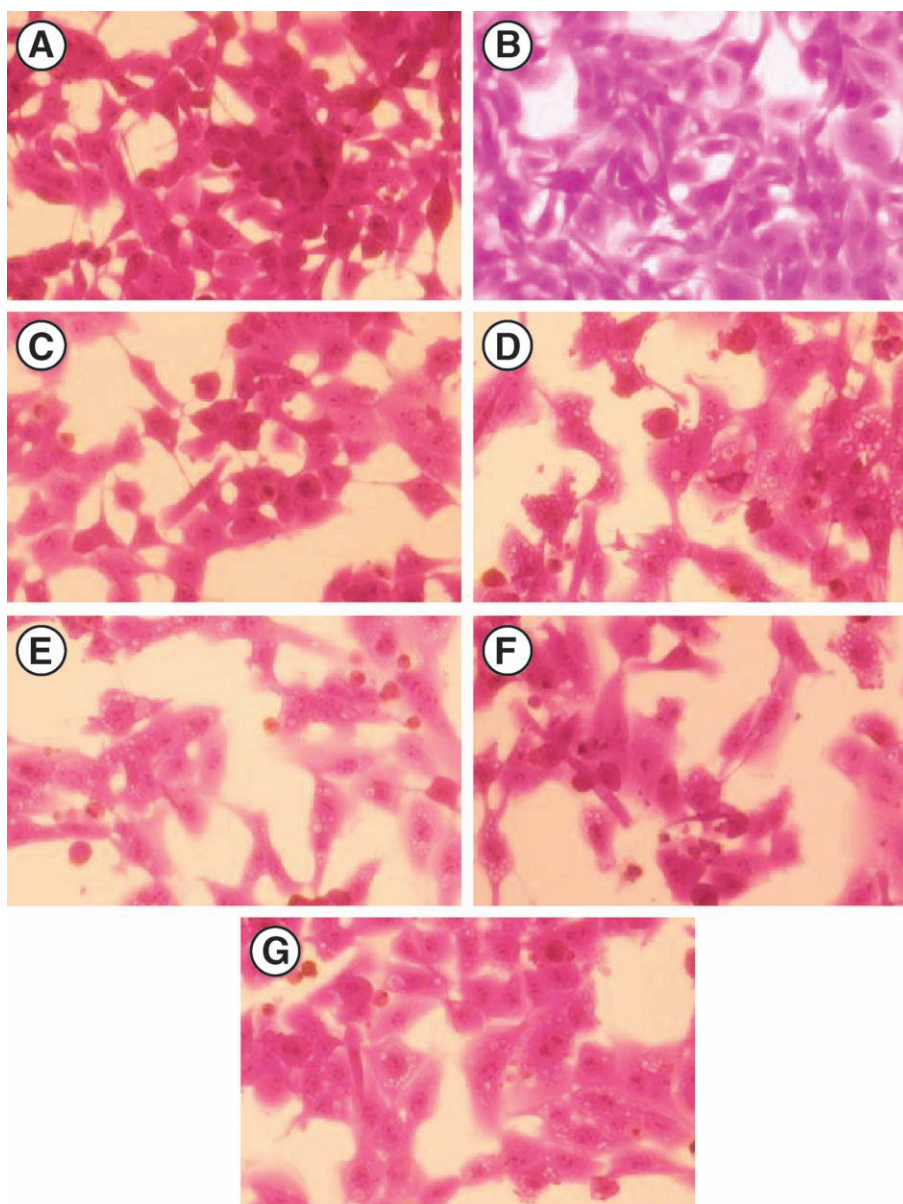


Fig. 3. (A) View of human fibrosarcoma HT-1080 cells (24 °C, 72 h) visualized with crystal violet; (B) view of human fibrosarcoma HT-1080 cell phenotype with benzimidazolium hydro-selenite **3**; (C) with 2-mercaptobenzimidazolium hydro-selenite **4**; (D) with phenantrolium hydro-selenite **5**; (E) with serine hydro-selenite **8** in dose 0.3 µg/ml; (F) with serine hydro-selenite **8** in dose 3.0 µg/ml; (G) with tripeptide hydro-selenite **12**.

of human fibrosarcoma HT-1080 cells at 30 °C (control). The majority of tumor cells were alive and the cell nucleus was a dark color. Compound **3** induced apoptosis of fibrosarcoma cells (Figs. 2B and 3B). Derivative **3** changed the cell phenotype and mitotic mechanism. The cells increased in volume and contained more than one apoptotic nucleus. The insertion of a thiol substituent into the benzimidazole ring (**4**) significantly changed the type of action (Figs. 2C and 3C), with only few tumor cells undergoing apoptosis, as in the control. The action of hydro-selenite **5** (Figs. 2D and 3D) was similar to that of hydro-selenite **3** with more extensive cell polyploidy and high level of dispersity. To establish the dose-apoptotic activity relationship, the effect on cell morphology

of serine hydro-selenite (**8**) was studied at a dose of 0.3 (Figs. 2E and 3E) and 3 µg/ml (Figs. 2F and 3F). With the low dose, the tumor cells became friable, with two to five apoptotic nuclei. Increasing the dose of compound **8** by 10 times led to full apoptosis: the cells started to round off and their volume decreased. The increase in apoptosis depending on serine hydro-selenite (**8**) concentration could be due to the high level of NO generation (TG₁₀₀=1150%). The tripeptide hydro-selenite (**12**) strongly induced the extensive apoptosis, polyploidy and cell nucleus fragmentation (Figs. 2G and 3G). It should be noted that pyridinium hydro-selenites (**1** and **2**), triethanolammonium hydro-selenite (**6**) and amino acid hydro-selenites (**7**, **9**, **10** and **11**) had no effect on tumor cell

morphology. An increase in NO level leads to apoptosis, whereas an increase in the oxygen radical level leads to necrosis. Fig. 3 shows that, in general, tumor cells die by apoptosis (Blanco et al., 1995). So, the way a tumor cell dies reflects the radical balance in the system. In our case, NO radical regulation has a dominant role.

Pyridinium hydroselenites **1** and **2** inhibited tumor growth by 25% and 27%, respectively; however, compound **1** had no cytotoxic effect (Table 1). Hydroselenites **3** and **4** had a different effect on cell morphology and on opposite influence on the speed of sarcoma S-180 growth. Tumor growth was inhibited by 51% after 9 days of hydroselenite **3** treatment. The insertion of a mercapto substituent into the benzimidazole ring (**4**) led to a stimulation of cancer growth by 37%. The most active compound in vitro, hydroselenite **5** and the most selective compound **6** were toxic (LD_{50} = 12.9 mg/kg for hydroselenite **5** and 25.8 mg/kg for compound **6**, i.p.). Selenite **5** at a dose of 10 mg/kg had undesirable effects and decreased tonus; however, a 39% inhibition of tumor growth was observed. The same concentration of compound **6** inhibited the tumor growth by 81%. At a dose of 8 mg/kg, the inhibition of tumor growth by compound **6** was slightly decreased (73%); however, at this dose, no undesirable side effects were detected. Inspection of the tumor inhibition ability of the compounds **7–12** shows that hydroselenites **7** and **9** had no influence on sarcoma growth. Compound **10** (dipeptide with a slight cytotoxicity) inhibited S-180 growth by 33%. However, the addition of one more glycine fragment (tripeptide **11**) led to an undesirable effect, namely stimulation of tumor growth by 46%. Of the derivatives **7–12**, **8** caused the greatest inhibition of tumor growth (51%).

We report the cytotoxic activity of a series of organoammonium hydroselenites. All the compounds studied are glutathione peroxidase inhibitors. Some derivatives may also prevent hydrogen peroxide degradation by inhibiting catalase. The investigated organoammonium hydroselenites are potential antitumor agents and act by regulating the free radical balance. In general, tumor cells die by apoptosis under the action of selenium derivatives **1–12**. Nitric oxide production plays a major role. A correlation between the cell morphology changes and antitumor activity was found. Human fibrosarcoma HT-1080 cell apoptosis caused by hydroselenite testifies that the compound is able to inhibit tumor growth.

Acknowledgements

The financial support for this work provided by the Latvian Council of Science (grant no. 189) is gratefully acknowledged. We thank Prof. Ivars Kalvinsh for his helpful discussions.

References

- Alaejos, M.S., Diaz Romero, F.J., Diaz Romero, C., 2000. Selenium and cancer: some nutritional aspects. *Nutrition* 16, 376–383.
- Baldew, G.S., Van den Hamer, C.J., Los, G., Vermeulen, N.P., De Goeij, J.J., McVie, J.G., 1989. Selenium-induced protection against *cis*-diamminedichloroplatinum(II) nephrotoxicity in mice and rats. *Cancer Res.* 49, 3020–3023.
- Batist, G., Katki, A.G., Klecker Jr., R.W., Myers, C.E., 1986. Selenium-induced cytotoxicity of human leukemia cells: interaction with reduced glutathione. *Cancer Res.* 46, 5482–5485.
- Bauer, G., Dormann, S., Engelmann, I., Schulz, A., Sarah, M., 2000. Reactive oxygen species and apoptosis. In: Cameron, R.G., Feuer, G. (Eds.), *Apoptosis and its Modulation by Drugs*. Springer, Berlin, pp. 275–318.
- Blanco, F.J., Ochs, R.L., Schwarz, H., Lotz, M., 1995. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am. J. Pathol.* 146, 75–85.
- Boone, C.W., Steele, V.E., Kelloff, G.J., 1992. Screening for chemopreventive (anticarcinogenic) compounds in rodents. *Mutat. Res.* 267, 251–255.
- Caffrey, P.B., Frenkel, G.D., 1991. Inhibition of cell colony formation by selenite: involvement of glutathione. *Mol. Pharmacol.* 39, 281–284.
- Caffrey, P.B., Frenkel, G.D., 1997. Sensitivity of melphalan-resistant tumors to selenite in vivo. *Cancer Lett.* 121, 177–180.
- Eventoff, W., 1976. Crystalline bovine liver catalase. *J. Mol. Biol.* 103, 799–801.
- Hill, M., Meat, J., 2002. Cancer and dietary advice to the public. *Eur. J. Clin. Nutr.* 56, S36–S41.
- Loweth, A.C., Morgan, N.G., 1998. Methods for the study of NO-induced apoptosis in cultured cells. In: Titheradge, M.A. (Ed.), *Methods in Molecular Biology: Nitric Oxide Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 311–320.
- Lukevics, E., Arsenyan, P., Shestakova, I., Domracheva, I., Kanepe, I., Belyakov, S., Popelis, J., Pudova, O., 2002a. Synthesis, structure and cytotoxicity of organoammonium selenites. *Appl. Organomet. Chem.* 16, 228–234.
- Lukevics, E., Arsenyan, P., Rubina, K., Shestakova, I., Domracheva, I., Nesterova, A., Pudova, O., 2002b. Aminoacids hydroselenites: synthesis and cytotoxicity. *Appl. Organomet. Chem.* 16, 235–238.
- Mayer, B., John, M., Heinzel, B., Werner, E.R., Wachter, H., Schultz, G., Böhme, E., 1991. Brain nitric oxide synthase is a biopterin- and flavin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett.* 288, 187–191.
- Moyad, M.A., 2002. Selenium and vitamin E supplements for prostate cancer: evidence or embellishment? *Urology* 59, 9–19.
- Mugesh, G., Du Mont, W.-W., Sies, H., 2001. Chemistry of biologically important synthetic organoselenium compounds. *Chem. Rev.* 101, 2125–2179.
- Olas, B., Wachowicz, B., 1997. Selenium in the cytotoxicity of cisplatin. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 51, 95–108.
- Pufahl, R.A., Marletta, M.A., 1993. Oxidation of *N*^G-hydroxy-L-arginine by nitric oxide synthase—evidence for the involvement of the heme in catalysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193, 963–970.
- Spallholz, J.E., 2001. Selenium and the prevention of cancer: Part I. Evidence for the carcinostatic activity of Se compounds. *Bull. Selenium-Tellurium* 05, 1–6. Selenium and the prevention of cancer: Part II. Mechanisms for the carcinostatic activity of Se compounds. *Bull. Selenium-Tellurium* 10, 1–12.
- Stuehr, D.J., Kwon, N.S., Nathan, C.F., Griffith, O.W., Feldman, P.L., Wiseman, J., 1991. *N*-ω-Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J. Biol. Chem.* 266, 6259–6263.

Synthesis and cytotoxicity of silylalkylthio-substituted *N*-heterocycles and their hydroselenites

Pavel Arsenyan*, Kira Rubina, Irina Shestakova, Edgars Abele, Ramona Abele, Ilona Domracheva, Alena Nesterova, Juris Popelis and Edmunds Lukevics

Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, Riga LV-1006, Latvia

Received 8 January 2003; Revised 4 July 2003; Accepted 4 July 2003

New hydroselenites of the different silylalkylthio-substituted *N*-heterocycles have been prepared by the reaction of selenium dioxide with *N*-heterocycles in an aqueous medium. Their structure was confirmed by ^1H , ^{13}C , and ^{77}Se NMR data. Most of these silylalkylthio-substituted *N*-heterocycles and their hydroselenites have an expressed cytotoxic activity on the MG-22A (mouse hepatoma), HT-1080 (human fibrosarcoma), B16 (mouse melanoma), and Neuro 2A (mouse neuroblastoma) cell lines. Some of the hydroselenites exhibit free-radical protection simultaneously with a high cytotoxic effect. The substances studied were also active *in vivo* against sarcoma S-180. Copyright © 2003 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: antitumor activity; cytotoxicity; morphology; selenium; silicon

INTRODUCTION

Selenium is an essential trace element that has been shown to have anticarcinogenic activity. One mechanism that has been proposed for this activity is a cytotoxic effect of selenium on tumor cells.^{1–3} A number of selenium compounds have been found to inhibit tumorigenesis in a variety of animal and cell models. Reactive oxygen species (ROS) mediate apoptosis induced by Na_2SeO_3 , and mitochondria may be a major source of Na_2SeO_3 -induced ROS.⁴ The combination of ascorbic acid and sodium selenite may be a potent anticancer treatment option for human hepatoma cells. It may induce the redifferentiation of hepatoma cells and inhibit cell growth by virtue of enhancing the activities of antioxidative enzymes and by reducing the formation of hydrogen peroxide (H_2O_2), and altering the cell redox status.⁵ Ammonium selenite–cisplatin conjugate $(\text{NH}_3)_4\text{PtCl}_2\text{SeO}_3$ may specifically inhibit telomerase activity in endometrial cancer cells.⁶ The majority of organic base hydroselenites tested exhibited high activity *in vitro* on the tumor cell lines investigated. *o*-Phenanthroline selenite and imidazolium selenite exhibit the highest cytotoxic effect on HT-1080, MG-22A, B16 and Neuro 2A cell lines. Besides that, most of

the selenites synthesized are very active ($0.5\text{--}0.6\ \mu\text{g ml}^{-1}$) against mouse melanoma B16. In a series of ethanalamine derivatives, *N*-methylethanalammonium selenite is more active in experiments with Neuro 2A ($\text{TD}_{50} = 1\ \mu\text{g ml}^{-1}$), while triethanalammonium selenite effectively inhibits HT-1080 ($\text{TD}_{50} = 2.3\ \mu\text{g ml}^{-1}$), being less toxic against normal cells 3T3 ($\text{TD}_{50} = 47.7\ \mu\text{g ml}^{-1}$).⁷ Hydroselenites are able to activate the nitric oxide generation level in various tumor cell cultures. The activation of nitric oxide production is especially increased on HT-1080 and MG-22A cell lines. The amount of nitric oxide depends on the type of tumor and the cation structure. According to the literature data and our results, we propose that the antitumor effect of hydroselenites stems from the fact that they are able to regulate the free radical balance *in vitro* and *in vivo*.⁸ All the compounds studied are glutathione peroxidase inhibitors. Some derivatives may also prevent H_2O_2 degradation by inhibiting catalase. In general, tumor cells die by the apoptotic route under the action of selenium derivatives. Nitric oxide radical regulation plays the main role. A correlation between the cell morphology results and antitumor activity was found. Human fibrosarcoma HT-1080 cell apoptosis caused by hydroselenite testifies that the compound is able to inhibit tumor growth.⁹

Taking into account the importance of selenium as a trace element in the organism, our present investigation is connected with synthesis and antitumor activity studies in a series of hydroselenites of different silylalkylthio-substituted *N*-heterocycles.

*Correspondence to: Pavel Arsenyan, Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, Riga LV-1006, Latvia.

E-mail: pavel.arsenyan@lycos.com

Contract/grant sponsor: Latvian Council of Science; Contract/grant number: 189.

MATERIALS AND METHODS

Instrumental

^1H , ^{13}C , and ^{77}Se NMR spectra were recorded on a Varian 200 Mercury spectrometer at 200 MHz, 50.3 MHz and 39.74 MHz respectively at 303 K in CDCl_3 or $\text{DMSO}-d_6$ solution. The ^1H and ^{13}C chemical shifts are given relative to tetramethylsilane; ^{77}Se chemical shifts relative to dimethyl selenide. Mass spectra were recorded on a Hewlett Packard apparatus (HP-6890, GC with HP5MS, 70 eV).

Synthesis

Preparation of silylalkylthio-substituted *N*-heterocycles (**1–10**)^{10,11}

Finely powdered dry K_2CO_3 (25 mmol, 3.5 g) was added to a solution of 10 mmol of the thiol (**1** or **6**), 10 mmol of corresponding silyl-substituted alkyl iodide and 18-crown-6 (1 mmol, 264 mg) in 25 ml of toluene. The mixture was refluxed with stirring to achieve the disappearance of the substrates (gas chromatography control), filtered over the thin silica gel layer and concentrated under reduced pressure. The residue was purified by column chromatography using a toluene–ethyl acetate mixture as eluent.

2-[(Trimethylsilylmethyl)thio]quinoline (**1**). MS, m/z (I, %): 247 (M^+ , 30). ^1H NMR δ ppm: 0.16 (s, 9H, SiMe_3); 2.54 (s, 2H, CH_2); 7.12–7.28, 7.33–7.44, 7.56–7.72, 7.78–7.98 (m, 6H, ring protons). ^{13}C NMR δ ppm: –1.56, 14.86, 120.50 (C-3), 124.97 (C-6), 125.26 (C-4a), 125.89 (C-5), 127.56 (C-7), 127.84 (C-8), 128.19 (C-4), 129.00 (C-8a), 129.49 (C-2). Anal. Found: C, 63.16; H, 6.88; N, 5.51; S, 13.10. Calc. for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NSSi}$: C, 63.10; H, 6.93; N, 5.66; S, 12.96%.

2-[(3-Trimethylsilylpropyl)thio]quinoline (**6**). MS, m/z (I, %): 275 (M^+ , 3). ^1H NMR δ ppm: 0.01 (s, 9H, SiMe_3); 0.76 (m, 2H, SiCH_2); 1.80 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3.35 (m, 2H, SCH_2); 7.20–8.00 (m, 6H, ring protons). ^{13}C NMR δ ppm: –1.68, 16.59, 24.30, 33.20, 121.04 (C-3), 125.03 (C-6), 125.87 (C-4a), 127.55 (C-5), 128.01 (C-7), 129.48 (C-8), 135.11 (C-4), 148.36 (C-8a), 159.60 (C-2). Anal. Found: C, 65.32; H, 7.61; N, 5.10; S, 11.72. Calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NSSi}$: C, 65.40; H, 7.68; N, 5.08; S, 11.64%.

Preparation of hydroselenites of silylalkylthio-substituted *N*-heterocycles

To a suspension of selenium dioxide (1 mmol, 110 mg) in 1 ml of water and 1 ml of ethanol, an equimolar amount of the corresponding silicon-containing heterocyclic sulfide **11–19** was added. The reaction mixture was stirred at room temperature until homogenization and then evaporated. The residue was washed with diethyl ether and recrystallized from ethanol or purified on silica gel.

2-[(Trimethylsilylmethyl)thio]quinolinium hydroselenite (**11**). ^1H NMR δ ppm: 0.14 (s, 9H, SiMe_3); under DMSO (m, 2H, CH_2); 6.4 (bs, 1H, NH); 7.48 (m, 2H, H-5, H-6); 7.70 (m, 1H, H-7); 7.87 (m, 2H, H-3, H-4); 8.13 (m, 1H, H-8). ^{13}C NMR δ ppm: –1.6, 14.1, 120.50 (C-3), 125.3 (C-6), 125.7 (C-4a), 127.3 (C-5), 128.0 (C-7), 129.9 (C-8), 135.6 (C-4), 147.6 (C-8a), 160.4 (C-2). ^{77}Se NMR δ ppm: 1321.88. Anal. Found: C, 41.41; H,

5.12; N, 3.80; S, 8.41. Calc. for $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{SSeSi}$: C, 41.48; H, 5.09; N, 3.72; S, 8.52%.

N-Methyl-2-[(trimethylsilylmethyl)thio]imidazolium hydroselenite (**12**). ^1H NMR δ ppm: 0.06 (s, 9H, SiMe_3); 2.30 (s, 2H, CH_2); 3.56 (s, 3H, NCH_3); 4.70 (bs, 1H, NH); 6.91 and 7.21 (each d, 1H, $J = 1.24$ Hz, imidazole protons). ^{13}C NMR δ ppm: –1.58, 18.41, 123.16 (C-5), 127.44 (C-4), 142.30 (C-2), 32.89 (NCH_3). ^{77}Se NMR δ ppm: 1333.31. Anal. Found: C, 29.12; H, 5.47; N, 8.41; S, 9.65. Calc. for $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{SSeSi}$: C, 29.17; H, 5.51; N, 8.51; S, 9.74%.

2-[(Trimethylsilylmethyl)thio]benzothiazolium hydroselenite (**13**). ^1H NMR δ ppm: 0.16 (s, 9H, SiMe_3); 2.63 (s, 2H, SCH_2); 5.07 (bs, 1H, NH); 7.33 (t, 1H, $J = 7.2$ Hz, H-6); 7.46 (t, 1H, $J = 6.8$ Hz, H-5); 7.84 (d, 1H, $J = 8.0$ Hz, H-7); 7.99 (d, 1H, $J = 7.6$ Hz, H-3). ^{13}C NMR δ ppm: –1.84, 18.26, 120.97 (C-7), 121.69 (C-4), 124.15 (C-6), 126.31 (C-5), 134.70 (C-7a), 153.10 (C-3a), 169.92 (C-2). ^{77}Se NMR δ ppm: 1325.19. Anal. Found: C, 36.41; H, 4.87; N, 3.55; S, 16.18. Calc. for $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{NO}_3\text{S}_2\text{SeSi}$: C, 36.35; H, 4.83; N, 3.53; S, 16.18%.

6-[(Trimethylsilylmethyl)thio]-9-(trimethylsilylmethyl)purinium hydroselenite (**14**). ^1H NMR δ ppm: 0.04 and 0.14 (each s, 9H, SiMe_3); 2.56 (s, 2H, SCH_2); 3.88 (s, 2H, NCH_2); 4.62 (bs, 1H, NH); 8.34 (s, 1H, H-8); 8.70 (s, 1H, H-2). ^{13}C NMR δ ppm: –2.57, –1.8, 12.4, 34.4, 130.4 (C-5), 144.4 (C-8), 148.1 (C-4), 151.1 (C-2), 160.4 (C-6). ^{77}Se NMR δ ppm: 1321.58. Anal. Found: C, 34.43; H, 5.80; N, 12.35; S, 7.08. Calc. for $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3\text{SSeSi}_2$: C, 34.42; H, 5.78; N, 12.35; S, 7.07%.

2-[(3-Trimethylsilylpropyl)thio]quinolinium hydroselenite (**15**). ^1H NMR δ ppm: 0.04 (s, 9H, SiMe_3); 0.73 (m, 2H, SiCH_2); 1.78 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3.34 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, SCH_2); 7.38–7.97 (m, 5H, ring protons); 8.19 (m, 1H, H-8). ^{13}C NMR δ ppm: –1.58, 15.9, 24.0, 32.3, 121.0 (C-3), 125.3 (C-6), 125.7 (C-4a), 127.3 (C-5), 128.0 (C-7), 130.0 (C-8), 135.9 (C-4), 147.7 (C-8a), 159.0 (C-2). ^{77}Se NMR δ ppm: 1322.12. Anal. Found: C, 44.61; H, 5.77; N, 3.50; S, 7.95. Calc. for $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{SSeSi}$: C, 44.54; H, 5.73; N, 3.46; S, 7.93%.

N-Methyl-2-[(3-trimethylsilylpropyl)thio]imidazolium hydroselenite (**16**). ^1H NMR δ ppm: 0.03 (s, 9H, SiMe_3); 0.09 (s, 9H, SiMe_3); 0.71 (m, 2H, CH_2Si); 1.68 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}$); 3.11 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, SCH_2); 3.72 (s, 3H, NCH_3); 6.18 (bs, 1H, NH); 7.11 and 7.38 (each d, 1H, $J = 1$ Hz, in the imidazole ring). ^{13}C NMR δ ppm: –1.16, 15.39, 24.20, 37.07, 123.11 (C-5), 127.94 (C-4), 140.27 (C-2), 32.98 (NCH_3). ^{77}Se NMR δ ppm: 1330.24. Anal. Found: C, 33.65; H, 6.22; N, 7.87; S, 9.04. Calc. for $\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_3\text{SSeSi}$: C, 33.61; H, 6.20; N, 7.84; S, 8.97%.

2-[(3-Trimethylsilylpropyl)thio]pyrimidinium hydroselenite (**17**). ^1H NMR δ ppm: 0.05 (s, 9H, SiMe_3); 0.70 (m, 2H, CH_2Si); 1.74 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$); 3.19 (t, 2H, $J = 7.2$ Hz, SCH_2); 3.98 (bs, 1H, NH); 7.27 (t, 1H, $J = 4.8$ Hz, H-5); 8.70 (d, 2H, $J = 4.8$ Hz, H-4, H-6). ^{13}C NMR δ ppm: –1.70, 15.8, 23.7, 33.4, 117.0 (C-5), 157.6 (C-4, C-6), 171.2 (C-2). ^{77}Se NMR δ ppm: 1322.30. Anal. Found: C, 34.04; H, 5.15; N, 7.94; S, 9.07. Calc. for $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3\text{SSeSi}$: C, 33.99; H, 5.13; N, 7.93; S, 9.07%.

2-[(3-Trimethylsilylpropyl)thio]benzothiazolium hydroselenite (**18**). ^1H NMR δ ppm: –0.01 (s, 9H, SiMe_3); 0.66 (m,

concentrations of silylalkylthio-substituted *N*-heterocycles **1–10** are toxic both against tumor and normal mouse fibroblast and hamster endothelial cells. A preliminary analysis of the structure–activity relationship for the cytotoxic action clearly indicates the strong influence of the introduction of selenium on toxic effects *in vitro* (Table 1). 2-[(Trimethylsilylmethyl)thio]quinolinium hydroselenite (**11**) shows specific cytotoxic activity on HT-1080 ($TD_{50} = 0.42 \mu\text{g ml}^{-1}$); however, the trimethylsilylpropyl analogue **15** has no selectivity on the cell lines studied ($TD_{50} =$

$1.0\text{--}3.5 \mu\text{g ml}^{-1}$). Inspection of trimethylsilylthio-substituted *N*-methylimidazolium hydroselenite **12** and benzothiazolium hydroselenite **13** cytotoxic data shows extended activity against human fibrosarcoma, mouse melanoma and neuroblastoma ($0.4\text{--}3.5 \mu\text{g ml}^{-1}$), except mouse hepatoma MG-22A. The introduction of the trimethylsilylpropyl chain (**16**, **18**) leads to high cytotoxicity on MG-22A ($1.0\text{--}5.5 \mu\text{g ml}^{-1}$). Silylalkylated purinium hydroselenites **14** ($1.3\text{--}7.5 \mu\text{g ml}^{-1}$) and **19** ($1.0\text{--}5.0 \mu\text{g ml}^{-1}$) exhibit similar cytotoxic activity.

Table 1. *In vitro* cell cytotoxicity and the ability of intracellular NO generation caused by substituted *N*-heterocycles **1–10** and their hydroselenites **11–19**^a

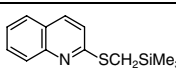
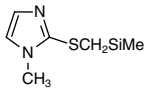
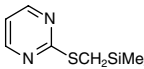
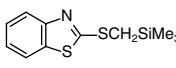
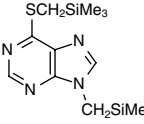
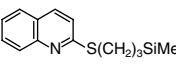
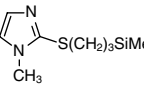
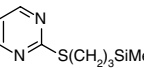
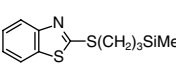
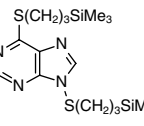
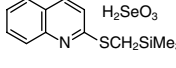
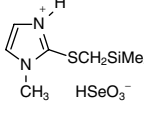
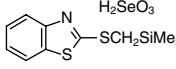
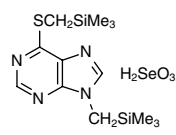
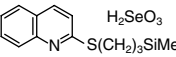
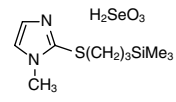
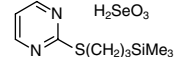
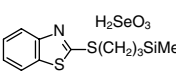
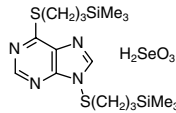
		HT-1080		MG-22A		B16		Neuro 2A		NIH 3T3 TD ₅₀	BHK 21 TD ₅₀
		TD ₅₀	NO 100%	TD ₅₀	NO 100%	TD ₅₀	NO 100%	TD ₅₀	NO 100%		
1		2	250	3.5	125	1.5	150	8.5	500	20	6
2		20.5	300	15.5	400	5.5	650	13	800	**	4
3		*	13	120	14	9.5	300	20	60	**	21
4		2	450	6	200	3	150	9	500	2.5	37
5		1.5	650	4	250	11	350	2	550	4.5	22
6		72	250	3.8	200	2.5	1100	28	1100	**	27
7		1	500	1	300	1.5	250	2	600	1	12
8		18	450	2	300	1.7	300	*	11	*	12
9		32	117	22	350	*	9	*	18	*	67
10		13	450	2	500	4	300	12	500	23	3
11		0.42	250	18.5	450	4	600	4	750	122	2.4
12		0.4	300	47	43	3.5	650	2	800	7	2
13		3.5	30	22	40	3	300	1.2	400	4	1.9

Table 1. (Continued)

		HT-1080		MG-22A		B16		Neuro 2A		NIH 3T3 TD ₅₀	BHK 21 TD ₅₀
		TD ₅₀	NO 100%	TD ₅₀	NO 100%	TD ₅₀	NO 100%	TD ₅₀	NO 100%		
14		1.3	250	7.5	300	3.5	250	17	217	2	7
15		2	250	3.5	450	1	250	17	500	4	26
16		1	500	1	250	1.25	300	1.67	40	0.15	0.22
17		1	250	7.5	600	1	200	*	11	*	1.4
18		2	200	5.5	400	3	150	11	500	2.5	35
19		1	40	18.5	250	4	300	5	500	13	15

^a TD₅₀: concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$) providing 50% cell killing effect [(CV+MTT)/2]. NO concentration (%) (CV: coloration).

* no cytotoxic effect.

** not tested.

The role of NO in biosystems has attracted considerable attention in the last decade. NO is formed by enzymatic and non-enzymatic mechanisms. Because of its low molecular weight and high lipophilicity, NO has good diffusion properties. It may act not only in the cell where it is produced, but also in nearby tissues. Biologically produced NO originates from oxygen and L-arginine in a reaction catalyzed by NO synthase. NO, a long-lived radical with a wide range of actions, is known as a regulator of a variety of biological processes.¹⁶ The NO level was determined according to Ref 12, and NO release was defined using the Greys reagent (by NO₂ concentration in the culture medium). The yield of nitrite was expressed as nanomoles of NO₂/200 μl of cultural medium in testing plates for 100% alive cells after CV coloration assay (selenites concentration 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). It was shown (Table 1) that compounds 1–10 readily increase NO concentration in the culture medium on all cell lines. This effect is especially expressed in the case of 2-[(3-trimethylsilylpropyl)thio]quinoline (6, TG₁₀₀ = 1100%) on B16 and Neuro 2A tumor cell lines. In the series of hydroselenites 11–19, free-radical protection was also present. 2-[(Trimethylsilylmethyl)thio]benzothiazolium hydroselenite (13) inhibits nitric oxide generation by 70% (TG₁₀₀ = 30% on HT-1080). *N*-Methylimidazolium hydroselenite 12 (TG₁₀₀ = 43% on MG-22A), trimethylsilylpropyl analogue 26 (TG₁₀₀ = 40% on Neuro 2A), and purinium hydroselenite 19 (TG₁₀₀ = 40% on HT-1080) also exhibit free-radical protection activity simultaneously with high cytotoxic effect (Table 1). In the case of the hydroselenites

11–19, the role of thiol is played by glutathione. Moreover, hydroselenites may regulate the level of glutathione in the cell, because selenium-containing derivatives are glutathione peroxidase inhibitors. According to our results, there is no correlation between the ability to inhibit glutathione peroxidase and the efficacy to generate NO. The increase in NO depends on the type of tissue, the prodrug dose, etc. According to the literature, the conversion of L-arginine to L-citrulline with the production of NO is catalyzed by heme iron.¹⁷ Our results indicate that the organoammonium hydroselenites investigated may be promising antitumor agents with an action mediated by the regulation of radical formation. The hydroselenite compounds 11–19 disrupt the different radical-dependent systems and slowly normalize the biochemical processes in the cell.

Antitumor activity of silylalkylthio-substituted *N*-heterocycles 1–10 against sarcoma S-180 was determined for male ICR mice (18–20 g). 2-[(Trimethylsilylmethyl)thio]quinoline (1), increases sarcoma growth by 45% at a dose of 2 mg kg⁻¹ in 9 days. Besides, prolongation of the silylalkyl chain leads to the opposite effect (6, inhibition by 12%). Trimethylsilylmethyl pyrimidine 3 has no effect on the speed of S-180 growth; however, the silylpropyl analogue 8 undesirably increases tumor growth by 87%. The best result in the series of hydroselenites of silylalkylthio-substituted *N*-heterocycles 1–10 is shown by 6-[(3-trimethylsilylpropyl)thio]-9-(3-trimethylsilylpropyl)purine (10, inhibition by 51%). Generally, the conversion of bases

1–10 into their hydroselenites (**11–19**) leads to more effective tumor growth inhibition. Inspection of the *in vivo* activity of hydroselenites **13–17** shows sarcoma inhibition by 10–39% in 9 days. In the series of hydroselenites **11–19**, 6-[(trimethylsilylmethyl)thio]-9-(trimethylsilylmethyl)purinium hydroselenite (**14**, inhibition by 39%) shows the greatest level of tumor growth inhibition, but introduction of a silylpropyl chain into the molecule (**19**) completely removed sarcoma S-180 inhibiting properties.

CONCLUSIONS

It has been found that silylalkylthio-substituted *N*-heterocycles and their hydroselenites show significant potency *in vitro* against different tumor cell lines. Inspection of the cytotoxicity shows that hydroselenites are more active than the initial *N*-heterocycles. Some of the hydroselenites exhibit free-radical protection simultaneously with a high cytotoxic effect. *In vivo* evaluation of silylalkylated *N*-heterocycles and their hydroselenites confirmed antitumor activity against sarcoma S-180.

Acknowledgements

The financial support of this work by the Latvian Council of Science (grant no. 189) is gratefully acknowledged.

REFERENCES

- Flohé L, Andreesen JR, Brigelius-Flohé R, Maiorino M, Ursini F. *IUBMB Life* 2000; **49**: 411.
- Rayman MP. *Lancet* 2000; **356**: 233.
- Fleming J, Ghose A, Harrison PR. *Nutr. Cancer* 2001; **40**: 42.
- Wang HT, Yang XL, Zhang ZH, Lu JL, Xu HB. *Biol. Trace Elem. Res.* 2002; **85**: 241.
- Zheng QS, Zheng RL. *Pharmazie* 2002; **57**: 265.
- Asiak J, Kubek M, Kowalik J, Romanowicz-Makowska H, Pertyski T. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 2002; **22**: 73.
- Lukevics E, Arsenyan P, Shestakova I, Domracheva I, Kanepe I, Belyakov S, Popelis J, Pudova O. *Appl. Organometal. Chem.* 2002; **16**: 228.
- Lukevics E, Arsenyan P, Rubina K, Shestakova I, Domracheva I, Nesterova A, Popelis J, Pudova O. *Appl. Organometal. Chem.* 2002; **16**: 235.
- Arsenyan P, Shestakova I, Rubina K, Domracheva I, Nesterova A, Vosele K, Pudova O, Lukevics E. *Eur. J. Pharm.* 2003; **465**(3): 229.
- Abele E, Rubina K, Abele R, Sleiksa I, Lukevics E. *Chem. Heterocycl. Compd.* 1999; **35**(9): 1052.
- Rubina K, Abele E, Arsenyan P, Abele R, Veveris M, Lukevics E. *Met. Based Drugs* 2001; **8**(2): 85.
- Fast DJ, Lynch RC, Leu RW. *J. Leucocyt. Biol.* 1992; **52**: 255.
- Freshney PJ. *Culture of Animal Cells (A Manual of Basic Technique)*. Wiley-Liss: New York, 1994; 296–297.
- Sofyina ZP, Sirkin AB, Goldin A, Clain A. *Experiments of Antitumor Drugs in USSR and USA*. Medicina: Moscow, 1979; 128.
- Odom JD, Dawson WH, Ellis PD. *J. Am. Chem. Soc.* 1979; **101**: 5815.
- Bauer G, Dormann S, Engelmann I, Schulz A, Sarah M. Reactive oxygen species and apoptosis. In *Apoptosis and its Modulation by Drugs*, Cameron RG, Feuer G (Eds). Springer: Berlin: 2000; 275–318.
- Pufahl RA, Marletta MA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; **193**: 963.

Synthesis, structure and cytotoxicity of organoammonium selenites[†]

Edmunds Lukevics*, Pavel Arsenyan, Irina Shestakova, Ilona Domracheva, Iveta Kanepe, Sergej Belyakov, Juris Popelis and Olga Pudova

Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, Riga LV-1006, Latvia

Received 11 May 2001; Accepted 7 December 2001

New selenites of different organic bases have been prepared by the reaction of selenium dioxide with aliphatic and heterocyclic amines in an aqueous medium. Their structure was confirmed by ¹H, ¹³C and ⁷⁷Se NMR data and, in the case of triethanolammonium hydroselenite [HN⁺(CH₂CH₂OH)₃HSeO₃], by X-ray analysis. Most of these selenites have an expressed cytotoxic activity on the MG-22A (mouse hepatoma), HT-1080 (human fibrosarcoma), B16 (mouse melanoma), and Neuro 2A (mouse neuroblastoma) cell lines. The substances studied were also active *in vivo* against sarcoma S-180. Copyright © 2002 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: antitumor activity; cytotoxicity; morphology; selenium; X-ray

INTRODUCTION

Selenium ranks 70th in abundance among the elements and constitutes approximately 10⁻⁵% of the Earth's crust.¹ In biology it was long considered as a dangerous poison, until it was identified as an essential trace element for animals. The fundamental importance of selenium for biology has become increasingly clear as new research has shown an unsuspected role of this element for human health.^{2,3} As selenocysteine, selenium is a component of selenoproteins, some of which have important enzymic functions, in this context being best known as an antioxidant and catalyst in the reduction of hydrogen peroxide; and the family of selenium-dependent glutathione peroxidases is involved on the processing of lipid or phospholipid hydroperoxides to harmless products.⁴ Selenium has additional important effects, particularly in relation to the immune function.⁵ Selenium deficiency is also linked to the progress of some viral infections.⁶ Administration of trace quantities of Na₂SeO₃ or Na₂SeO₄ can successfully treat Keshan disease.⁷

Organic and inorganic selenium derivatives are effective in inhibition of a wide range of tumors. There is evidence that selenium protects against certain human cancers.^{3,8–11} In order to investigate the relationship between serum sele-

mium content and the risk of cancer, some thousands of serum samples were obtained from cancerous and non-cancerous patients. In this cohort, the incidence of cancer in the non-cancerous patients was followed for the subsequent 3 years. The serum selenium level of non-cancerous patients who later developed cancer during the 3 years was determined and compared with that of the non-cancerous patients. A higher incidence of cancer was observed in the lower serum selenium patients of the non-cancerous group. The serum selenium level in cancerous patients was significantly lower than in non-cancerous patients. These results suggest that the low serum selenium level in cancerous patients may not be induced by the tumor, but it was more likely already present before the tumor. The ratio between the non-cancerous and cancerous groups was estimated to be 1.95:1, suggesting a higher risk of cancer in the low serum selenium group.¹⁰

Taking into account the importance of the selenium element in the organism, pyridinium, quinolinium, bipyridinium, phenanthroline, imidazolium, benzimidazolium and ethanolammonium selenites were synthesized to study the influence of cation structure on cytotoxic effect. Their antitumor activity on HT-1080, MG-22A, B-16 and Neuro 2A cell lines and *in vivo* (S-180) was investigated.

MATERIALS AND METHODS

Crystal data determination

The crystals of compound **13** are monoclinic, space group

*Correspondence to: E. Lukevics, Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, Riga LV-1006, Latvia.
E-mail: pavel.arsenyan@lycos.com

[†]This paper is based on work presented at the 5th International Conference on Environmental and Biological Aspects of Main-Group Organometals (ICEBAMO-5) held at Schielleiten, near Graz, Austria, 5–9 June 2001.

$P2_1$; the lattice constants are as follows: $a = 8.043(1)$, $b = 5.3468(8)$, $c = 12.543(1)$ Å, $\beta = 93.66(1)^\circ$, $Z = 2$, $V = 538.3(1)$ Å³, $F(000) = 284$, $D_c = 1.716(1)$ g cm⁻³; Mo $K\alpha$ radiation, $\lambda = 0.71069$ Å, $\mu = 3.494$ mm⁻¹. A single crystal of dimensions $0.25 \times 0.40 \times 0.40$ mm³ was used for X-ray measurements at room temperature on a Syntex P 2₁ diffractometer. The intensity data were collected to a maximum 2θ of 50° by θ - 2θ scans. The total number of independent reflections measured was 1077, of which 979 reflections were considered as observed by criterion $|F| > 4.0\sigma(F)$. No absorption correction was applied. The structure was solved by the heavy-atom method and refined by full-matrix least squares with anisotropic temperature factors to $R = 0.0434$ for observed data ($R = 0.0479$ for all data; goodness of fit is 1.061). Flack's x parameter is 0.02(3). All calculations were carried out using the SHELXL-93 program.¹² Atomic coordinates and components of temperature factor tensors are deposited at the Cambridge Crystallographic Data Centre (the CCDC deposition number is 141712).

Instrumental

¹H, ¹³C, and ⁷⁷Se NMR spectra were recorded on a Varian 200 Mercury spectrometer at 200 MHz, 50.3 MHz and 39.74 MHz respectively at 303 K in D₂O–Me₃COH solution. The ¹H and ¹³C chemical shifts are given relative to tetramethylsilane (TMS); ⁷⁷Se is relative to dimethyl selenide.

Synthesis of hydroselenites

To a solution of the base (0.02 mol) in 50 ml of water an equimolar amount of selenium dioxide was added. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The residue was recrystallized from ethanol or purified on silica gel.

Pyridinium hydroselenite (1)

The pure product was isolated by column chromatography on silica gel with ethanol as eluent. Oil. ¹H NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 7.25–7.32 (2H, m, arom); 7.62–7.70 (1H, m, arom); 8.6–8.63 (2H, m, arom). ¹³C NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 125.45, 139.1, 145.2. ⁷⁷Se NMR (D₂O/SeO₂) δ (ppm): 1283.7. Found: C, 29.01; H, 3.21; N, 6.65. Calc. for C₅H₇NO₃Se: C, 28.86; H, 3.39; N, 6.73%.

4-Hydroximinomethylpyridinium hydroselenite (2)

The pure product was isolated by column chromatography on silica gel with ethanol as eluent. Oil. ¹H NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 7.71 (2H, dd, $J = 1.6$ Hz, $J = 4.4$ Hz); 8.74 (2H, dd, $J = 1.6$ Hz, $J = 4.4$ Hz). ¹³C NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 116.0, 119.8, 125.5, 148.9. ⁷⁷Se NMR (D₂O/SeO₂) δ (ppm): 1282.4. Found: C, 28.71; H, 2.85; N, 11.28. Calc. for C₆H₇N₂O₄Se: C, 28.82; H, 2.82; N, 11.2%.

4-Amidohydroximinomethylpyridinium hydroselenite (3)

The pure product was isolated by column chromatography on silica gel with ethanol as eluent. Oil. ¹H NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 8.2 (2H, dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 6$ Hz); 8.5 (2H, dd, $J = 1.8$ Hz, $J = 6$ Hz). ¹³C NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 122.8, 142.0, 146.3, 150.9. ⁷⁷Se NMR (D₂O/SeO₂) δ (ppm): 1281.6. Found: C, 27.11; H, 3.14; N, 15.8. Calc. for C₆H₈N₃O₄Se: C, 27.18; H, 3.04; N, 15.85%.

Quinolinium hydroselenite (4)

The pure product was isolated by column chromatography on silica gel with ethanol as eluent. Oil. ¹H NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 7.85–7.92 (1H, m); 8.0–8.16 (4H, m); 9.02 (1H, d, $J = 8.2$ Hz); 9.14 (1H, d, $J = 5.2$ Hz). ¹³C NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 118.0; 119.6, 126.5, 127.0, 128.0, 141.9, 145.2. ⁷⁷Se NMR (D₂O/SeO₂) δ (ppm): 1287.4. Found: C, 41.75; H, 3.43; N, 5.30. Calc. for C₉H₉NO₃Se: C, 41.88; H, 3.51; N, 5.43%.

6-Bromoquinolinium hydroselenite (5)

The pure product was isolated by column chromatography on silica gel with ethanol as eluent. Oil. ¹H NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 7.81–7.9 (1H, m); 8.1–8.26 (3H, m); 9.22 (1H, d, $J = 8.2$ Hz); 9.28 (1H, d, $J = 5.2$ Hz). ¹³C NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 118.4; 120.6, 127.5, 127.8, 131.0, 143.9, 148.1. ⁷⁷Se NMR (D₂O/SeO₂) δ (ppm): 1288.5. Found: C, 32.11; H, 2.25; N, 4.03. Calc. for C₉H₈BrNO₃Se: C, 32.07; H, 2.39; N, 4.16%.

o-Phenanthroline hydroselenite (6)

M.p. 123–124°C (from ethanol–water). ¹H NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 7.5 (2H, s); 7.78 (2H, dd, $J = 4.8$ Hz, $J = 8.2$ Hz); 8.34 (2H, dd, $J = 1.4$ Hz, $J = 8.2$ Hz); 8.78 (2H, dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 4.8$ Hz). ¹³C NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 124.1, 125.9, 127.9, 136.0, 140.0, 146.0. ⁷⁷Se NMR (D₂O/SeO₂) δ (ppm): 1291.8. Found: C, 46.42; H, 3.12; N, 9.16. Calc. for C₁₂H₁₀N₂O₃Se: C, 46.62; H, 3.23; N, 9.06%.

2,2'-Bipyridinium hydroselenite (7)

M.p. 53–54°C (from ethanol). ¹H NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 7.86 (2H, dt, $J = 2.8$ Hz, $J = 5.6$ Hz, $J = 11.2$ Hz); 8.31–8.37 (4H, m); 8.8 (2H, d, $J = 5.2$ Hz). ¹³C NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 121.6, 124.9, 140.8, 144.4, 146.0. ⁷⁷Se NMR (D₂O/SeO₂) δ (ppm): 1290.1. Found: C, 42.12; H, 3.55; N, 9.88. Calc. for C₁₀H₁₀N₂O₃Se: C, 42.12; H, 3.53; N, 9.82%.

4,4'-Bipyridinium hydroselenite (8)

M.p. 184–185°C (from ethanol). ¹H NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 8.14 (4H, dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 5$ Hz); 8.85 (4H, dd, $J = 1.2$ Hz, $J = 5$ Hz). ¹³C NMR (Me₃COH–D₂O/TMS) δ (ppm): 126.8, 148.8, 151.7. ⁷⁷Se NMR (D₂O/SeO₂) δ (ppm): 1290.4. Found: C, 42.1; H, 3.47; N, 9.78. Calc. for C₁₀H₁₀N₂O₃Se: C, 42.12; H, 3.53; N, 9.82%.

Imidazolinium hydroselenite (9)

The pure product was isolated by column chromatography on silica gel with ethanol as eluent. Oil. ^1H NMR ($\text{Me}_3\text{COH-D}_2\text{O/TMS}$) δ (ppm): 7.49 (2H, s); 8.67 (1H, s). ^{13}C NMR ($\text{Me}_3\text{COH-D}_2\text{O/TMS}$) δ (ppm): 117.6, 118.2, 132.6. ^{77}Se NMR ($\text{D}_2\text{O/SeO}_2$) δ (ppm): 1288.4. Found: C, 18.15; H, 3.07; N, 14.18. Calc. for $\text{C}_3\text{H}_6\text{N}_2\text{O}_3\text{Se}$: C, 18.28; H, 3.07; N, 14.21%.

Benzimidazolinium hydroselenite (10)

The pure product was isolated by column chromatography on silica gel with ethanol as eluent. Oil. ^1H NMR ($\text{Me}_3\text{COH-D}_2\text{O/TMS}$) δ (ppm): 7.58 (4H, dq, $J = 3.2$ Hz, $J = 25.2$ Hz); 9.00 (1H, s). ^{77}Se NMR ($\text{D}_2\text{O/SeO}_2$) δ (ppm): 1323.9. Found: C, 33.04; H, 3.40; N, 11.12. Calc. for $\text{C}_7\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3\text{Se}$: C, 34.03; H, 3.26; N, 11.34%.

N-Methylethanolammonium hydroselenite (11)

The pure product was isolated by column chromatography on silica gel with ethanol as eluent. Oil. ^1H NMR ($\text{Me}_3\text{COH-D}_2\text{O/TMS}$) δ (ppm): 2.74 (3H, s); 3.17 (2H, t, $J = 5.4$ Hz); 3.84 (2H, t, $J = 5.4$ Hz). ^{13}C NMR ($\text{Me}_3\text{COH-D}_2\text{O/TMS}$) δ (ppm): 30.8, 48.6, 54.6. ^{77}Se NMR ($\text{D}_2\text{O/SeO}_2$) δ (ppm): 1289.4. Found: C, 17.55; H, 5.33; N, 6.71. Calc. for $\text{C}_3\text{H}_{11}\text{NO}_4\text{Se}$: C, 17.65; H, 5.43; N, 6.86%.

N-Methyldiethanolammonium hydroselenite (12)

The pure product was isolated by column chromatography on silica gel with ethanol as eluent. Oil. ^1H NMR ($\text{Me}_3\text{COH-D}_2\text{O/TMS}$) δ (ppm): 2.96 (3H, s); 3.37 (4H, t, $J = 5$ Hz); 3.94 (4H, t, $J = 5$ Hz). ^{13}C NMR ($\text{Me}_3\text{COH-D}_2\text{O/TMS}$) δ (ppm): 38.7, 53.3, 55.5. ^{77}Se NMR ($\text{D}_2\text{O/SeO}_2$) δ (ppm): 1293.3. Found: C, 24.03; H, 5.93; N, 5.43. Calc. for $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{NO}_5\text{Se}$: C, 24.20; H, 6.09; N, 5.65%.

Triethanolammonium hydroselenite (13)

M.p. 94 °C (from ethanol-water). ^1H NMR ($\text{Me}_3\text{COH-D}_2\text{O/TMS}$) δ (ppm): 3.51 (6H, t, $J = 4.2$ Hz); 3.99 (6H, t, $J = 4.2$ Hz). ^{13}C NMR ($\text{Me}_3\text{COH-D}_2\text{O/TMS}$) δ (ppm): 53.3, 53.6. ^{77}Se NMR ($\text{D}_2\text{O/SeO}_2$) δ (ppm): 1293.0. Found: C, 25.88; H, 6.15; N, 5.03. Calc. for $\text{C}_6\text{H}_{17}\text{NO}_6\text{Se}$: C, 25.90; H, 6.21; N, 4.94%.

In vitro cytotoxicity assay

Monolayer tumor cell lines: MG-22A (mouse hepatoma), HT-1080 (human fibrosarcoma), B16 (mouse melanoma), Neuro 2A (mouse neuroblastoma) and normal mouse fibroblast cells were cultivated with standard medium (Dulbecco's modified Eagle's medium) without an indicator ('Sigma') supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum ('Sigma'). After the ampoule was defrosted the cells were used for only one to four passages. Cells in the range of $(2-5) \times 10^4$ (cells/ml) (depending on line nature) were placed on 96-well plates immediately after compounds were inoculated to wells. The control cells, without test compounds, were cultivated on separate plates. The plates

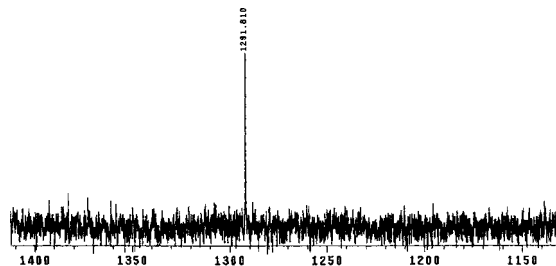


Figure 1. ^{77}Se NMR spectrum of *o*-phenanthroline hydroselenite (6).

were cultivated for 72 h, at 17 °C, in 5% CO_2 . The quantity of surviving cells was determined using crystal violet (CV) or 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT). The quantity of live cells on the control plate was taken in calculations as 100%.^{13,14} The concentration of NO was determined according to the Gryess method (by NO_2 level in cultural medium). Sodium nitrite standard solution was used for the calibration curve.¹³

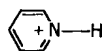
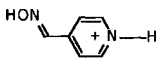
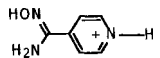

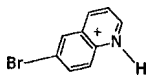
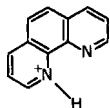
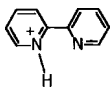
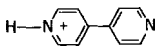


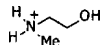
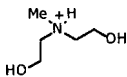
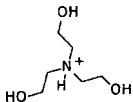
In vivo activity assay

The compounds were tested *in vivo* against sarcoma S-180 cells. Sarcoma S-180, 5×10^6 cells were inoculated *s.c.* to male ICR mice (6 weeks old, 18–20 g) on day 0. Drugs were administered *i.p.*; the treatment was started 4 h after tumor transplantation. The number of mice used in each group was between six and ten. The efficacy of the treatment was estimated by the ellipsoid formula; the volume V (mm^3) of tumor in the control group was taken in calculations as 100%.

RESULTS AND DISCUSSION**Chemistry**

An aqueous solution of ammonia reacts with selenium dioxide to form $\text{NH}_4\text{H}_3(\text{SeO}_3)_2$.¹⁵ $(\text{NH}_4)_2\text{Se}_2\text{O}_5$ crystallizes from a selenic acid solution, half-neutralized with NH_4OH , above 32 °C.¹⁶ We have shown that aromatic and aliphatic amines readily react with selenic acid (H_2SeO_3), forming during solution of selenium(IV) oxide in water, to give the corresponding ammonium hydroselenites **1–13**. Reaction proceeds easily at room temperature with good to excellent yields (67–94%) (Scheme 1, Table 1). The ^1H , ^{13}C , and ^{77}Se NMR data confirm the formation of ammonium selenites. The selenium signal in the ^{77}Se NMR spectra for all compounds appears in the 1281.6–1293.3 ppm region. A typical ^{77}Se NMR spectrum for *o*-phenanthroline hydroselenite (6) is presented in Fig. 1. The chemical shift of H_2SeO_3 (1292 ppm)¹⁷ is similar to that for the selenites **1–13**. The molecular structure of triethanolammonium hydroselenite (**13**) (the compound that provided the best crystals) was determined by X-ray diffraction (Fig. 2). Three intramolecular hydrogen N–H \cdots O bonds determine the conformation of the cation **13** framework. A similar situation occurs in other

Table 1. Triorganylammonium selenites 1–13

No.	BaseH ⁺	Compound	Yield (%)
1		<i>N</i> -Pyridinium hydroseleinite	68
2		4-Hydroximinomethylpyridinium hydroseleinite	80
		4-Amidohydroximinomethylpyridinium hydroseleinite	94
4		Quinolinium hydroseleinite	87
5		6-Bromoquinolinium hydroseleinite	67
6		<i>o</i> -Phenanthroline hydroseleinite	78
7		2,2'-Bipyridinium hydroseleinite	81
8		4,4'-Bipyridinium hydroseleinite	80
9		Imidazolium hydroseleinite	94
10		Benzimidazolium hydroseleinite	80
11		<i>N</i> -Methylethanolammonium hydroseleinite	79
12		<i>N</i> -Methyldiethanolammonium hydroseleinite	76
13		Triethanolammonium hydroseleinite	75

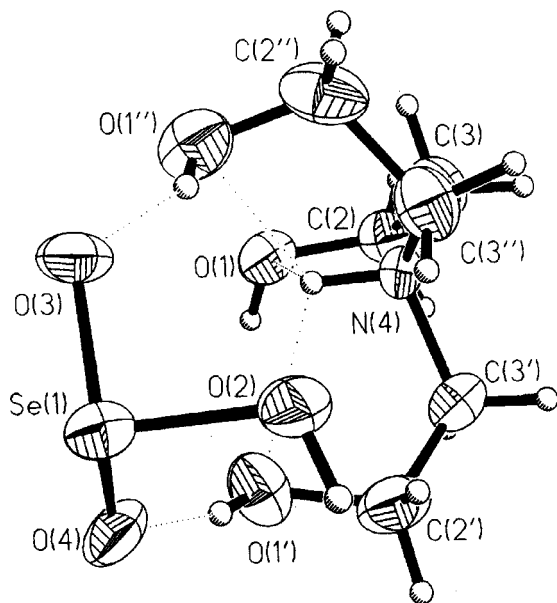
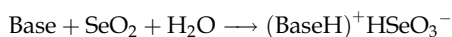


Figure 2. Molecular structure of the triethanolammonium hydroselenite (**13**).

triethanolammonium salts. By means of these intramolecular bonds the triethanolammonium cations of chloride,¹⁸ bromide,¹⁹ iodide,²⁰ nitrate,²¹ perchlorate,²² *p*-chlorophenylthioacetate,²³ tetrachloroantimonate,²⁴ as well as selenite **13**, form a tricyclic system analogous to atranes.^{25–27} The deviation of the nitrogen atom from the C3, C3', C3'' plane in compound **13** is 0.425(6) Å. It should be noted that the tricyclic system is not formed in the triethanolamine structure,^{28,29} where intramolecular hydrogen bonds are absent. The crystal structure of **13** is stabilized by intermolecular hydrogen bonds of the O–H···O type. The packing diagram for the structure **13** is illustrated in Fig. 3. Table 2 gives the parameters of the hydrogen bonds in selenite **13**.



Scheme 1.

Antitumor activity

Cytotoxic activity of the synthesized selenites **1–13** was

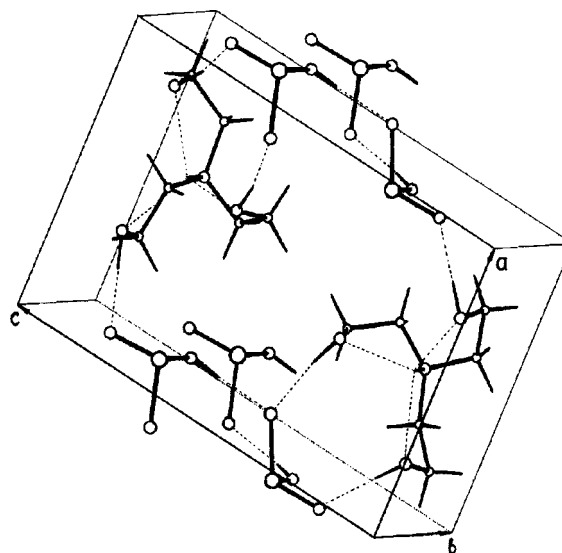


Figure 3. Unit cell of the triethanolammonium hydroselenite (**13**).

tested *in vitro* on four monolayer tumor cell lines: MG-22A (mouse hepatoma), HT-1080 (human fibrosarcoma), B16 (mouse melanoma), Neuro 2A (mouse neuroblastoma) and normal mouse fibroblast cells. Concentrations providing 50% of tumor death effect (TD₅₀) were determined according to known procedures³⁰ using 96-well plates and two independent coloration methods: (a) coloration with CV, specifying the integrity of cell membranes; (b) coloration with MTT, characterizing the redox activity in cells.

The results of these experiments are summarized in Table 3. The majority of compounds tested exhibited high activity *in vitro* on the tumor cell lines investigated. *o*-Phenanthroline selenite (**6**) and imidazolinium selenite (**9**) have the highest cytotoxic effect, on HT-1080, MG-22A, B16 and Neuro 2A cell lines. Besides that, most of the selenites synthesized (**3**, **5**, **7**, **8** and **9**) are very active (0.5–0.6 μg ml⁻¹) against mouse melanoma B16. It should be noted that, in the same concentrations, selenite **6** is toxic against both tumor and normal mouse fibroblast cells. Compound **9** more selectively inhibits tumor cells. 2,2'-Bipyridinium selenite (**7**) and its 4,4'-isomer **8** have a comparable cytotoxic activity; however, 4,4'-bipyridinium selenite (**8**) is considerably less

Table 2. Hydrogen bond parameters in triethanolammonium hydroselenite (**13**)

Hydrogen bridge D–H···A	D···A (Å)	D–H (Å)	H···A (Å)	D–H···A (deg)	Atom A symmetry
N4–H4···O1	2.778(7)	0.957	2.297	110.3	<i>x</i> , <i>y</i> ,
N4–H4···O1'	2.735(7)	0.957	2.296	107.1	<i>x</i> , <i>y</i> ,
N4–H4···O1''	2.806(7)	0.957	2.335	109.6	<i>x</i> , <i>y</i> ,
O1'–H1'···O4	2.680(6)	0.934	1.758	168.3	– <i>x</i> , <i>y</i> – ½, 1 – <i>z</i>
O1''–H1''···O3	2.722(6)	1.023	1.784	150.5	– <i>x</i> , <i>y</i> – ½, 1 – <i>z</i>
O1–H1···O1	2.684(6)	0.995	1.689	179.7	1 – <i>x</i> , <i>y</i> – ½, 1 –
O2–H2···O4	2.687(8)	0.887	1.802	174.6	– <i>x</i> , <i>y</i> + ½, 1 –

Table 3. *In vitro* cell cytotoxicity and the ability of intracellular NO generation caused by selenites 1–13

No.	HT-1080			MG-22A			Neuro 2A			B16			3T3	
	TD ₅₀ (µg ml ⁻¹)		TG ₁₀₀	TD ₅₀ (µg ml ⁻¹)		TG ₁₀₀	TD ₅₀ (µg ml ⁻¹)		TG ₁₀₀	TD ₅₀ (µg ml ⁻¹)		TG ₁₀₀	TD ₅₀ (µg ml ⁻¹)	
	CV ^a	MTT ^b	NO (%) ^c	CV ^a	MTT ^b	NO (%) ^c	CV ^a	MTT ^b	NO (%) ^c	CV ^a	MTT ^b	NO (%) ^c	CV ^a	MTT ^b
1	4.2	4.7	100	6.7	8	67	4	3	300	7	7	100	– ^d	– ^d
2	– ^e	– ^e	5	– ^e	– ^e	7	– ^d	– ^d	– ^d	– ^d	– ^d	– ^d	– ^d	– ^d
	4.4	2.7	24	5.5	3.6	13	3.3	2.3	38	0.6	0.7	50	6.5	6.6
4	5.6	6.2	150	5	10	200	9	10	300	52.5	44	19	– ^e	46.2
5	5.3	5	38	6	5.4	21	2	1.6	33	0.5	0.8	80	– ^e	– ^e
6	0.6	0.5	50	0.1	0.7	750	0.5	0.6	200	1.5	6	42	0.8	0.9
7	5	5	50	3	3.3	43	3	1	45	0.6	0.7	150	8.2	12
8	5.6	3.3	38	4.8	3.6	21	0.8	0.9	38	0.5	0.6	200	– ^e	– ^e
9	0.85	0.8	70	0.9	0.8	25	0.8	0.8	31	0.5	0.6	133	9	8.2
10	5.3	4	200	7.2	7.2	200	7.9	5.9	21	4.7	5.6	250	3.7	4.2
11	6.5	7	350	6	10	40	1.7	1	400	6.6	5.7	125	13	9.2
12	4.25	4.5	400	7	10	88	6	5	267	58.4	7.6	30	10.7	13.4
13	3.15	4	150	7.6	6.7	100	7	10	32	80	140	32	47.7	50

^a CV: coloration.
^b MTT: coloration.
^c NO concentration (CV: coloration).
^d Not tested.
^e No cytotoxic effect.

toxic on fibroblasts than its 2,2'-analogue 7. In the series of the ethanolamine derivatives 11–13, *N*-methylethanolammonium selenite (11) is more active in experiments with Neuro 2A (TD₅₀ = 1 µg ml⁻¹ in the MTT test), whereas triethanolammonium selenite (13) effectively inhibits HT-1080 (TD₅₀ = 2.3 µg ml⁻¹ in the CV test) and is less toxic against normal 3T3 cells (TD₅₀ = 47.7 µg ml⁻¹ in the CV test).

The NO level (as a possible indicator of cytotoxic activity) was determined according to Ref. 13. NO release was defined using the Gryess reagent (by NO₂ concentration in the cultural medium). The yield of nitrite was expressed as NO₂ nmol/200 µl of cultural medium in testing plates for 100% alive cells after CV coloration assay (selenites concentration 100 µg ml⁻¹). It was shown (Table 3) that compounds 1, 4, and 10–13 readily increase NO concentration in the cultural medium on the HT-1080 line. This effect is

especially expressed in the case of ethanolammonium selenites 11 and 12 (TG₁₀₀ = 350–400%). Hydroselenites 6 and 11 show the highest NO generation in MG-22A (TG₁₀₀ = 750%) and Neuro 2A (TG₁₀₀ = 400%) cell lines respectively. There is no correlation between NO generation ability and the cytotoxic effects of the salts studied, which is obviously connected with specific tissue features of the cell lines.

However, according to our investigations, the ammonium selenites studied change the cell phenotype. The changes in normal cell phenotype and the combination of high cytotoxicity can lead to an unfavorable influence on experiments *in vivo*. Some of the substances studied changed fibroblast morphology: increasing cell sizes and forming stretched cell units. That is why we have studied *in vivo* two compounds: *o*-phenathrolinium hydroselenite (6; salt with high *in vitro* cytotoxicity) and triethanolammonium hydro-

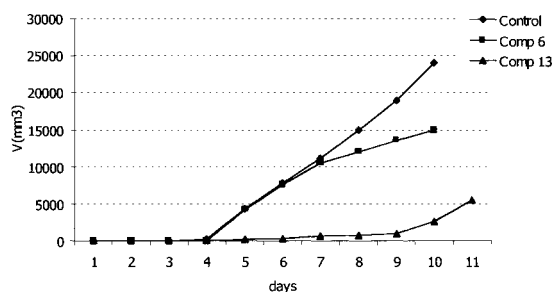


Figure 4. Inhibition of sarcoma S-180 volume growth *V* by hydroselenites 6 and 13.

Table 4. Antitumor activity of hydroselenites (ICR mice; S-180)

Compound	Dose (mg kg ⁻¹)	Scheme of administration, <i>i.p.</i> (days)	Inhibition of S-180 growth (control 9 days) (%)
6	10	1, 2, 4, 7, 8	39 ± 6.2
13	10	1, 2, 4, 7, 8, 9	81 ± 3.8
13	8	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10	73 ± 2.5

selenite (**13**; derivative with slight influence on normal cell morphology and medium cytotoxicity) (Table 3).

o-Phenanthroline hydro-selenite (**6**), the most active *in vitro*, and triethanolammonium selenite (**13**), the most selective, were selected for extended investigations of antitumor activity against sarcoma S-180 determined for male ICR mice (18–20 g). These compounds are very toxic ($LD_{50} = 12.9 \text{ mg kg}^{-1}$ for *o*-phenanthroline hydro-selenite (**6**) and 25.8 mg kg^{-1} for triethanolammonium hydro-selenite (**13**), *i.p.*). A dose of 10 mg kg^{-1} of selenite **6** has undesirable effects and leads to tonus decrease after injection. However, a 39% inhibition of tumor growth was observed. The same concentration of triethanolammonium selenite (**13**) inhibited tumor growth by 81%. In a dose of 8 mg kg^{-1} the tumor inhibition by compound **13** was slightly decreased (73%), however, in this case the undesirable influence was not detected (Fig. 4, Table 4).

REFERENCES

- Edmonds JS and Morita M. *Appl. Organomet. Chem.* 2000; **14**: 133.
- Flohé L, Andreesen JR, Brigelius-Flohé R, Maiorino M and Ursini F. *IUBMB Life* 2000; **49**: 411.
- Rayman MP. *Lancet* 2000; **356**: 233.
- Helmy MH, Ismail SS, Fayed H and El-Bassiouni EA. *Toxicology* 2000; **144**: 57.
- Kiremidjian-Schumacher L, Roy M, Wishe HI, Cohen MW and Stotzky G. *Biol. Trace Elem. Res.* 1994; **41**: 115.
- Taylor EW, Nadimpalli RG and Ramanathan CS. *Biol. Trace Elem. Res.* 1997; **56**: 63.
- Wendel A. *Selenium in Biology and Medicine*. Springer-Verlag: Berlin, 1989.
- Schrauzer GN. *Biol. Trace Elem. Res.* 1992; **33**: 51.
- Sanz Alaejos M, Díaz Romero FJ and Díaz Romero C. *Nutrition* 2000; **16**: 376.
- Wu W, Murakami K, Koketsu M, Yomada Y and Saiki I. *Anticancer Res.* 1999; **19**: 5375.
- Shen HM, Yang CF and Ong CN. *Int. J. Cancer* 1999; **81**: 820.
- Sheldrick GM. *Crystallographic Computing 6*. JUCr and Oxford University Press: 1993; 110–122.
- Fast DJ, Lynch RC and Leu RW. *J. Leucocyt. Biol.* 1992; **52**: 255.
- Freshney PJ. *Culture of Animal Cells (A Manual of Basic Technique)*. Wiley-Liss: New York, 1994; 296–297.
- Tellgren R and Liminga R. *Acta Crystallogr. Sect. B* 1974; **30**: 2497.
- Simon A and Paetzold R. *Z. Anorg. Allgem. Chem.* 1960; **303**: 39.
- Odom JD, Dawson WH and Ellis PD. *J. Am. Chem. Soc.* 1979; **101**: 5815.
- Mootz D, Brodalla D and Wiebche M. *Acta Crystallogr. Sect. C* 1990; **46**: 754.
- Parkanyi L, Hencsei P and Nyulaszi L. *J. Mol. Struct.* 1996; **27**: 377.
- Voegelé JC, Fischer J and Weiss R. *Acta Crystallogr. Sect. B* 1974; **30**: 66.
- Braculi AJ. *J. Crystallogr. Spectrosc. Res.* 1993; **23**: 669.
- Naiini AN, Pinkas J, Plass W, Young VG and Verkade JG. *Inorg. Chem.* 1994; **33**: 2137.
- Shklover VE, Gridunova GV, Struchkov YuT, Voronkov MG, Kryukova YuI and Mirskova AN. *Dokl. Akad. Nauk SSSR* 1983; **269**: 387.
- Brodalla D and Lipka A. *Z. Naturforsch. Teil B* 1984; **39**: 1167.
- Lukevics E and Pudova O. *Chem. Heterocycl. Compol.* 1996; 1381.
- Lukevics E, Belyakov S, Arsenyan P and Popelis J. *J. Organomet. Chem.* 1997; **549**: 163.
- Lukevics E, Ignatovich L and Belyakov S. *J. Organomet. Chem.* 1999; **588**: 222.
- Brodalla D and Mootz D. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1981; **20**: 791.
- Mootz D, Brodalla D and Wiebche M. *Acta Crystallogr. Sect. C* 1989; **45**: 754.
- Riddell RJ, Clothier RH and Balls MF. *Chem. Toxicol.* 1986; **24**: 469.

Amino-acid hydroselenites: synthesis and cytotoxicity[†]

E. Lukevics*, P. Arsenyan, K. Rubina, I. Shestakova, I. Domracheva, A. Nesterova, J. Popelis and O. Pudova

Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, Riga LV-1006, Latvia

Received 8 June 2001; Accepted 5 December 2001

Amino acids, di- and tri-peptides readily react with selenic acid (H₂SeO₃, formed during solution of selenium(IV) oxide in water) to give the corresponding ammonium hydroselenites. Most selenites synthesized are very active (0.4–11 µg ml⁻¹) against mouse hepatoma MG-22A and readily increase NO concentration in the cultural medium on the HT-1080 line (up to TG₁₀₀ = 1500%). The amino-acid hydroselenites studied influenced the cell phenotype. Copyright © 2002 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: cell phenotype; cytotoxicity; hydroselenite; selenium

INTRODUCTION

Selenium is an essential trace element that has been shown to have anticarcinogenic activity. One mechanism that has been proposed for this activity is a cytotoxic effect of selenium on tumor cells.^{1,2} Brief exposure of HeLa cells to micromolar concentrations of selenite resulted in significant inhibition of tumor cell colony formation, indicating that this is an assay for selenite cytotoxicity.³ There was no significant difference in the potency of inhibition of development of mammary tumors, drug resistant and drug non-resistant human ovarian tumor cells by selenate, selenite, selenium dioxide, selenomethionine and selenocysteine.^{4–7} Sodium selenite and ebselen (a stimulator and a mimic respectively of glutathione (GSH) peroxidase activity) displayed remarkable protective effects against 15(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (15-HPETE)-induced cytotoxicity. These results suggest that intracellular GSH plays a pivotal role in the protection against 15-HPETE-induced endothelial cell injury, and that decreased activity of GSH peroxidase activity is involved in 15-HPETE-induced cytotoxicity.⁸ Selenocysteine and sodium selenite demonstrated significant redox chemistry, including depletion of cellular GSH, stimulation of GSH reductase, and stimulation of oxygen consumption. The interaction of these two compounds with GSH suggests an intriguing potential role for them in cancer therapy.⁹ The majority of organic base hydroselenites tested exhibited high

activity *in vitro* on the tumor cell lines investigated. *o*-Phenanthroline selenite and imidazolium selenite exhibit the highest cytotoxic effect on HT-1080, MG-22A, B16 and Neuro 2A cell lines. Besides that, most selenites synthesized are very active (0.5–0.6 µg ml⁻¹) against mouse melanoma B16. In a series of ethanolamine derivatives, *N*-methylethanolammonium selenite is more active in experiments with Neuro 2A (IC₅₀ = 1 µg ml⁻¹), whereas triethanolammonium selenite effectively inhibits HT-1080 (IC₅₀ = 2.3 µg ml⁻¹) and is less toxic against normal 3T3 cells (IC₅₀ = 47.7 µg ml⁻¹). The substances studied were also active *in vivo* against sarcoma S-180.¹⁰

In the current part of the work we present the synthesis of various hydroselenites of amino acids, di- and tri-peptides. Their cytotoxic activity *in vitro* on HT-1080, MG-22A, B-16, Neuro 2A, BHK 21 and NIH 3T3 cell lines was determined.

MATERIALS AND METHODS

Instrumental

¹H and ⁷⁷Se NMR spectra were recorded on a Varian 200 Mercury spectrometer at 200 MHz and 39.74 MHz respectively at 303 K in D₂O–Me₃COH solution. The ¹H chemical shifts are given relative to tetramethylsilane; ⁷⁷Se is relative to dimethyl selenide. Elemental analyses (C, N, H) of hydroselenites are in agreement with calculated values.

Synthesis of hydroselenites

To a solution of the amino acid (0.02 mol) in 50 ml of water an equimolar amount of selenium dioxide was added. The reaction mixture was stirred for 1 h at room temperature. The residue was recrystallized from ethanol or purified on silica gel.

*Correspondence to: E. Lukevics, Latvian Institute of Organic Synthesis, Aizkraukles 21, Riga, LV-1006, Latvia.
E-mail: pavel.arsenyan@lycos.com

[†]This paper is based on work presented at the 5th International Conference on Environmental and Biological Aspects of Main-Group Organometals (ICEBAMO-5) held at Schielleiten, near Graz, Austria, 5–9 June 2001.

Table 1. Triorganylammonium selenites **1–12**

No.	Amino-acidH ⁺ HSeO ₃ ⁻	Yield (%)	M.p. (°C)	¹ H NMR	⁷⁷ Se NMR
1		91	116–118	4.59 (2H, m).	1318.6
2		88	-	2.74 (2H, t, J = 6.6 Hz); 3.25 (2H, t, J = 6.6 Hz).	1320.7
3		76	181–183	3.99 (2H, m); 4.11 (1H, m).	1314.6
4		84	>230	2.36 (3H, d, J = 7.2 Hz); 3.81 (1H, m); 4.32 (1H, m).	1312.5
5		75	126–128	2.74 (2H, m); 3.25 (2H, t, J = 6.6 Hz); 4.25 (1H, m).	1318.2
6		81	182–185 (decomp.)	4.70–4.4.82 (3H, m); 6.88 (2H, d, J = 8.2 Hz); 7.17 (2H, d, J = 8.2 Hz).	1314.3
7		86	217 (decomp.)	1.76–1.87 (3H, m); 2.10–2.21 (1H, m); 3.07–3.23 (2H, m); 3.79–3.86 (1H, m).	1336.4
8		74	142 (decomp.)	3.34 (2H, d, J = 6.8 Hz); 4.05 (1H, t, J = 6.8 Hz); 7.39 (1H, s); 8.65 (1H, s).	1322.8
9		90	-	3.89 (2H, s); 4.00 (2H, s).	1319.2
10		94	121–123	1.65 (6H, d, J = 6.8 Hz), 2.23–2.45 (3H, m); 3.94 (2H, s); 4.12 (1H, d, J = 7.1 Hz).	1318.8

Table 1. continued.

No.	Amino-acidH ⁺ HSeO ₃ ⁻	Yield (%)	M.p. (°C)	¹ H NMR	⁷⁷ Se NMR
11		95	-	3.90 (2H, s); 3.92–3.94 (1H, m); 4.79 (2H, m).	1316.23
12		85	-	3.91 (2H, s); 3.96 (2H, s); 4.05 (2H, s).	1319.5

In vitro cytotoxicity assay

Monolayer tumor cell lines: MG-22A (mouse hepatoma), HT-1080 (human fibrosarcoma), B16 (mouse melanoma), Neuro 2A (mouse neuroblastoma), NIH 3T3 (normal mouse embryonic fibroblasts) and BHK 21 (hamster neuroblasts) cells were cultivated with standard medium Dulbecco's Modified Eagle's Medium without an indicator ('Sigma') supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum ('Sigma'). After the ampoule was defrosted the cells were used only for one to four passage. Cells in the range of $(2-5) \times 10^4$ (cells/ml) (depending on line nature) were placed on 96-well plates immediately after compounds were inoculated to wells. The control cells, without the test compounds, were cultivated on separate plates. The plates were cultivated for 72 h, at 17 °C, in 5% CO₂. The quantity of surviving cells was determined using crystal violet (CV, coloration of live cell membranes) or 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, coloration shows the activity of mitochondrial

enzymes in live cells). The quantity of live cells on the control plate was taken in calculations as 100%.^{11,12} The concentration of NO was determined according to the Gryess method (by NO₂ level in the cultural medium). Sodium nitrite standard solution was used for the calibration curve.¹¹

RESULTS AND DISCUSSION

Chemistry

We have shown that amino acids, di- and tri-peptides readily react with selenic acid (H₂SeO₃), forming during solution of selenium(IV) oxide in water, to give the corresponding ammonium hydroselenites **1-12**. Reaction proceeds easily at room temperature with good to excellent yields (74–95%) (Table 1). The ¹H and ⁷⁷Se NMR data confirm the formation of amino-acid hydroselenites. The selenium signal in the ⁷⁷Se NMR spectra for all compounds appears in the 1312.5–1336.4 ppm region.

Table 2. *In vitro* cell cytotoxicity and the ability of intracellular NO generation caused by hydroselenites **1-12**^a

No.	Amino acid ⁺ HSeO ₃ ⁻	HT-1080		MG-22A		B16		Neuro 2A		NIH 3T3	BHK 21
		TD ₅₀	NO 100%	TD ₅₀	NO 100%	TD ₅₀	NO 100%	TD ₅₀	NO 100%	TD ₅₀	TD ₅₀
1	Gly H ⁺	2	950	3	650	20.5	192	4	186	5	4.5
2	β-Ala H ⁺	3.6	800	0.4	650	2.5	63	- ^b	- ^b	1.1	3.1
3	Ser H ⁺	10	1150	3	117	31.5	74	3	144	2.5	31.5
4	Tre H ⁺	13	200	36.5	550	65	71	34	1300	30	36.5
5	Glu H ⁺	23	650	25	133	100	24	89	31	50	25
6	Tyr H ⁺	35	183	40	76	- ^c	20	72	50	32.5	20
7	Pro H ⁺	1.7	1500	1.25	1300	3	1150	3	700	1.5	2.5
8	His H ⁺	5	340	4	325	54	32	- ^c	50	5.5	3
9	Gly-Gly H ⁺	20	800	11	100	- ^c	18	- ^c	14	47	40
10	Gly-Leu H ⁺	15	440	16.5	208	100	44	100	21	52	48
11	Gly-Ser H ⁺	15	600	- ^c	41	- ^c	12	- ^c	16	20	10.5
12	Gly-Gly-Gly H ⁺	10	600	3.5	73	100	23	53	45	21	5

^a TD₅₀: concentration (μg ml⁻¹) providing 50% cell killing effect [(CV + MTT)/2]; NO concentration (%) (CV: coloration).

^b Not tested.

^c No cytotoxic effect.

Cytotoxic activity

Cytotoxic activity of the synthesized selenites **1–12** was tested *in vitro* on four monolayer tumor cell lines: MG-22A (mouse hepatoma), HT-1080 (human fibrosarcoma), B16 (mouse melanoma), Neuro 2A (mouse neuroblastoma) and normal fibroblast cells (NIH 3T3 and BHK 21). Concentrations providing 50% of tumor death effect (TD₅₀) were determined according to known procedures¹¹ using 96-well plates and two independent coloration methods: (a) coloration with CV, specifying the integrity of cell membranes; (b) coloration with MTT, characterizing the redox activity in cells.

The results of these experiments are summarized in Table 2. A preliminary analysis of the structure–activity relationship for the cytotoxic action clearly indicates the strong influence of the amino acid nature on toxic effects *in vitro*. Glycine (**1**), β -alanine (**2**) and proline (**7**) hydroselenites have the highest cytotoxic effect, on HT-1080, MG-22A, B16 and Neuro 2A cell lines. Besides that, most selenites synthesized (**2**, **3**, **7**, **8** and **12**) are very active (0.4–11 $\mu\text{g ml}^{-1}$) against mouse hepatoma MG-22A. Unfortunately, all amino-acid hydroselenites **1–12** are toxic against both tumor and normal mouse fibroblast cells. However, the tripeptide hydroselenite **12** inhibits MG-22A (TD₅₀ = 3.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) tumor cells more selectively than NIH 3T3 (TD₅₀ = 21.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Tyrosine **6**, glycylglycine **9** and glycylserine **11** did not express cytotoxic effects on all the cell lines studied, but they possessed medium toxicity on the NIH 3T3 and BHK 21 normal cells. In the series of glycine derivatives **1**, **9** and **12**, the initial glycine **1** (TD₅₀ = 3.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) is more active than its dipeptide **9** (TD₅₀ = 11.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) and tripeptide **12** (TD₅₀ = 3.5 $\mu\text{g ml}^{-1}$) on MG-22A.

The NO level was determined according to Ref. 11. NO release was defined using the Gryess reagent (by NO₂ concentration in the cultural medium). The yield of nitrite was expressed as NO₂ nmol/200 μl of cultural medium in testing plates for 100% alive cells after CV coloration assay (hydroselenites concentration 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). The NO radical, which is relatively stable and can pass cellular membranes, is involved in a multitude of biological effects, such as regulation of the vascular tone, antiplatelet and antileukocyte activity, and modulation of cell growth.¹³ It has also been implicated in the induction and the inhibition of apoptosis. Modulation of apoptosis by NO can lead to physiological or pathophysiological consequences. NO is

involved in natural tumor defense mechanisms.^{14–16} It was shown (Table 2) that compounds **1–3**, **7**, **9**, **11** and **12** readily increase NO concentration in the cultural medium on the HT-1080 line (up to TG₁₀₀ = 1500%). This effect is especially expressed in the case of proline hydroselenite **7** on all the tumor cell lines studied (TG₁₀₀ = 700–1500%). NO correlation between NO generation ability and cytotoxic effect of the salts studied was found.

According to our investigations, some of the amino-acid hydroselenites studied influenced the cell phenotype. Serine (**3**), treonine (**4**), tyrosine (**6**), histidine (**8**), glycylglycine (**9**), glycylserine (**11**) and diglycylglycine (**12**) hydroselenites changed NIH 3T3 fibroblast morphology, increasing cell size, starting at a concentration of 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Treonine (**4**), glutamic acid (**5**) and proline (**7**) hydroselenites transformed BHK 21 cells (substance concentration 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$). Also, glycine (**1**), serine (**3**) and glycylserine (**11**) hydroselenites were able to change the mouse melanoma B16 cell phenotype. This means that only two compounds, β -alanine (**2**) and glycylleucine (**10**), had no influence on cell morphology.

REFERENCES

- Flohé L, Andreesen JR, Brigelius-Flohé R, Maiorino M and Ursini F. *IUBMB Life* 2000; **49**: 411.
- Rayman MP. *Lancet* 2000; **356**: 233.
- Caffrey PB and Frenkel GD. *Mol. Pharmacol.* 1991; **39**: 281.
- Ip C and White G. *Carcinogenesis* 1987; **8**: 1763.
- Caffrey PB and Frenkel GD. *Cancer Lett.* 1997; **121**: 177.
- Caffrey PB and Frenkel GD. *Cancer Lett.* 1992; **52**: 4812.
- Caffrey PB and Frenkel GD. *Cancer Lett.* 1994; **81**: 59.
- Ochi H, Morita I and Murota S. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992; **294**: 407.
- Batist G, Katki AG, Klecker RW Jr and Myers CE. *Cancer Res.* 1986; **46**: 5482.
- Lukevics E, Arsenyan P, Shestakova I, Domracheva I, Kanepe I, Belyakov S, Popelis J and Pudova O. *Appl. Organomet. Chem.* this issue.
- Riddell RJ, Clothier RH and Balls MF. *Chem. Toxicol.* 1986; **24**: 469.
- Fast DJ, Lynch RC and Leu RW. *J. Leucocyt. Biol.* 1992; **52**: 255.
- Lopez Farre A, Rodriguesfe JA, Demiguel LS, Rico L and Casado S. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1998; **30**: 1095.
- Lopez Farre A, De Miguel LS, Caramelo C, Gomez Macias J, Garcia R, Mosquera JR, De Frutos T, Millas I, Rivas F, Echezarreta G and Casado S. *Am. J. Physiol.* 1997; **272**: H760.
- Brockhaus F and Bruene B. *Exp. Cell Res.* 1998; **238**: 33.
- Edmiston KH, Shoji Y, Mizoi T, Ford R, Nachman A and Jessup JM. *Cancer Res.* 1998; **58**: 1524.