

УДК 576.08;616-006.6;547.831
DOI: 10.17721/1728.2748.2023.94.15-22

Павло ВІРИЧ¹, канд. біол. наук, наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0002-1463-1992
e-mail: pavlo.virych@knu.ua

Віталій СМОКАЛ¹, канд. хім. наук, ст. наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0001-6832-8625
e-mail: vitalii.smokal@knu.ua

Оксана ХАРЧЕНКО¹, канд. хім. наук, наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0001-6900-514X
e-mail: oksana_kharchenko@ukr.net

Наталія КУЦЕВОЛ¹, д-р хім. наук, пров. наук. співроб.
ORCID ID: 0000-0002-1468-4111
e-mail: nataliya.kutsevol@knu.ua

Петро ВІРИЧ², асп.
ORCID ID: 0000-0001-6201-3892
e-mail: anabenas@gmail.com

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, Київ, Україна
²Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького, Київ, Україна

ХЕЛАТУВАННЯ ДВОВАЛЕНТНИХ КАТІОНІВ ТА АНТИРАКОВА АКТИВНІСТЬ ПОХІДНИХ 8-ГІДРОКСИСТИРИЛХІНОЛІНІВ *IN VITRO*

Вступ. У зв'язку зі швидким набуттям резистентності до традиційних хіміопрепаратів та їхньою токсичністю пошук нових методів лікування та діагностики раку залишається актуальним. Похідні 8-гідроксихінолінів мають широкий спектр біологічної активності та необхідні властивості для флуоресцентної діагностики раку. Метою дослідження було визначити хелатування катіонів кальцію, магнію та цинку похідними 8-гідроксистирилхіноліну (8HQ), 2-[2-(4-хлорофеніл)етеніл]хінолін-8-олом (STQ-Cl) та 2-[2-(4-нітрофеніл)етеніл]хінолін-8-олом (STQ-NO₂) у фізіологічному розчині; дослідити стабільність утворених комплексів і токсичність сполук щодо ліній клітин раку передміхурової та молочної залози *in vitro*. Об'єкт дослідження – похідні 8-гідроксистирилхінолінів, 2-[2-(4-хлорофеніл)етеніл]хінолін-8-ол та 2-[2-(4-нітрофеніл)етеніл]хінолін-8-ол.

Методи. Використано похідні 8HQ, STQ-Cl та STQ-NO₂. Готували розчини катіонів Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ методом двократних розведень у діапазоні концентрацій 0,5–0,0078125 мМ на основі 0,9 % NaCl. Використано як окремі розчини кожного катіона, так і суміш у еквівалентному молярному співвідношенні. Концентрації похідних 8HQ – 0,05 мМ. Реєстрували оптичне поглинання у діапазоні довжин хвиль 200–700 нм. Цитотоксичність досліджували на лініях клітин раку молочної (MDA-MB-231) та передміхурової залози (DU-145). До інкубаційного розчину додавали похідні STQ-Cl та STQ-NO₂ у ДМСО методом чотирикратних розведень (0,125–0,00003 мМ). Для люмінесцентних досліджень клітини MDA-MB-231 та DU-145 вирощували на покривних скельцях. Кінцева концентрація похідних 8HQ – 5 мМ. Клітини витримували протягом 5, 10, 20 та 30 хв. Реєстрували люмінесценцію за однакових умов для всіх зразків, час експозиції 10 мс.

Результати. Mg²⁺ та Ca²⁺ (0,03125 мМ) сприяє зниженню інтенсивності максимумів оптичного поглинання STQ-Cl у 1,6 та 1,3 рази, відповідно. Ефект найбільш виражений за концентрації Zn²⁺ 0,015625 мМ. Слабкі відмінності оптичного поглинання розчинів спостерігаються під час інкубування STQ-NO₂ з різними концентраціями катіонів кальцію та магнію. Інтенсивність поглинання водного розчину STQ-NO₂ збільшувалася за концентрації Zn²⁺ 0,015625 та 0,03125 мМ. Максимальна цитотоксичність щодо клітин MDA-MB-231 для STQ-Cl – близько 80 %, а STQ-NO₂ – 60 % за концентрації 0,04 мМ. Клітини DU-145 виявилися більш чутливими до STQ-NO₂ (EC₅₀ = 0,011 мМ), але слабо чутливими до STQ-Cl (50 % за 0,125 мМ). Максимальна інтенсивність люмінесценції досягається через 20 хв інкубування клітин обох ліній з STQ-Cl та STQ-NO₂ (5 мМ) і не змінюється із часом.

Висновки. Зниження максимумів оптичного поглинання водних розчинів STQ-Cl за наявності катіонів магнію, кальцію, цинку є наслідком агрегаційних процесів. Це явище ймовірно є причиною різної цитотоксичності сполук STQ-Cl та STQ-NO₂, а також дії інших механізмів на ракові клітини. Отримані результати є наслідком різної спорідненості похідних 8-гідроксихінолінів до катіонів магнію, кальцію та цинку, розчинності у воді, стабільності, схильності до агрегації утворених комплексів та вільних речовин.

Ключові слова: 8-гідроксистирилхіноліни, цинк, кальцій, магній, ракові клітини, цитотоксичність.

Вступ

Рак є однією з головних причин смертності у світі і розробка ефективних та малотоксичних методів лікування має велике значення. Висока ефективність цисплатину значно підвищила інтерес до протипухлинних металопрепаратів. Але їхнє застосування обмежується високою токсичністю та швидкою адаптацією ракових клітин, що призводить до резистентності. Сполуки на основі 8-гідроксихінолінів (8HQ) мають широкий спектр біологічної активності, яка включає антибактеріальну, протираккову, противірусну та антигрибкову. Молекула зберігає властивості піримідину і бензолу та здатна

хелатувати ряд катіонів: Mg²⁺, Ca²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Fe³⁺, Al³⁺, Mn²⁺ тощо. (Shoji et al., 2003). Похідні 8-гідроксихінолінів розчиняються в ацетоні, хлороформі, бензолі та водних розчинах мінеральних кислот. Прищеплення різних замісників до основної молекули забезпечує створення фармакологічно активних сполук із заданими властивостями, низькою токсичністю та високою селективністю. Хелатування металів є одним із механізмів дії похідних 8-гідроксихінолінів під час лікування нейродегенеративних розладів. Взаємодія нітросоліну з раковими клітинами ініціює виробництво активних форм кисню (АФК). 8HQ та їхні комплекси з металами інтеркалюють у ДНК,

що є причиною антибактеріальної, фунгіцидної та протиракової активності (Gupta, Luxami, & Paul, 2021). Сполуки на основі 8-гідроксистирилхінолінів можуть бути інгібіторами протеаз та потенційними кандидатами під час лікування СНІДу (Zheng et al., 2005; Jacobsen et al., 2011).

Іони металів є важливим компонентом біологічних систем і беруть участь у підтримці клітинного гомеостазу, регуляції метаболізму, синтезі речовин, передачі сигналів тощо. Порушення обміну катіонів металів впливає на фізіологічні функції клітин та може призвести до смерті (Liu et al., 2021; Gumienka-Konteska et al., 2013). Це вказує, що катіони металів мають специфічні механізми індукції загибелі клітин і можуть бути корисними у ході розробки методів лікування раку. Не менш важливою є діагностика раку. Технології біовізуалізації передбачають використання контрастуючих агентів. Недоліками таких сполук є недостатній час циркуляції *in vivo*, короткий період напіврозпаду радіоактивних ізотопів та висока токсичність. У зв'язку з цим інтенсивно проводиться пошук нових нанозондів з більш специфічними фізичними та хімічними характеристиками (Hu et al., 2022). 8-гідроксистирилхіноліни та їхні похідні використовуються для синтезу високочутливих флуоресцентних хемосенсорів, які можуть бути індикаторами наявності біологічно важливих катіонів металів (Heiskanen et al., 2007; Rohini, Paul, & Luxami, 2020).

Метою дослідження було визначити здатність до хелатування катіонів кальцію, магнію та цинку гідрофобними похідними 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl і STQ-NO₂ у фізіологічному розчині, стабільність утворених комплексів та токсичність сполук щодо ліній клітин раку передміхурової та молочної залози *in vitro*.

Об'єкт дослідження. Похідні 8-гідроксистирилхінолінів, 2-[2-(4-хлорофеніл)етеніл]хінолін-8-ол та 2-[2-(4-нітрофеніл)етеніл]хінолін-8-ол.

Методи

Хелатування катіонів похідними 8-гідроксистирилхінолінів. Використано похідні 8HQ STQ-Cl та STQ-NO₂. Готували розчини катіонів Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ методом двократних розведень у діапазоні концентрацій 0,5–0,0078125 мМ. Використано як окремі розчини кожного катіона, так і суміш в еквівалентному молярному співвідношенні. У кожну пробірку додавали тестову сполуку до досягнення концентрації 0,05 мМ. Оптичне поглинання вимірювали на спектрофотометрі Perkin Elmer Lambda 365 UV (США) у діапазоні довжин хвиль 200–700 нм через 5, 20, 40 і 60 хв. Повторність дослідів трикратна.

Цитотоксичність для ракових клітин *in vitro*. Дослідження проведено на лініях клітин раку молочної залози MDA-MB-231 та передміхурової залози DU-145. Клітини отримано з банку клітинних ліній тканин людини і тварин Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р.Є. Кавецького. Клітини інкубували в середовищі DMEM з 10 % фетальної сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину в атмосфері 5 % CO₂ за 37 °С. До інкубаційного розчину додавали похідні 8HQ у ДМСО методом чотирикратних розведень у діапазоні концентрацій 0,125–0,00003 мМ. Кінцева концентрація ДМСО у розчині інкубації не перевищувала 0,25 %. У контрольні лунки додавали еквівалентну кількість розчинника та проводили аналогічні маніпуляції але без тестових сполук.

Через 48 год середовище видаляли. У кожну лунку додавали 50 мкл 0,5 % розчину кристалічного фіолетового в 70 % метанолі. Барвник видаляли через 10 хв. Лунки тричі промивали дистильованою водою. Кількість клітин визначали фотометрично за допомогою планшетного спектрофотометра на довжині хвилі 540 нм. Будували криві "доза-ефект" та розраховували EC50 за рівнянням Хілла (Pulukuri et al., 2020). Обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення OriginLab 8. Повторність досліджень трикратна.

Люмінесцентні дослідження. Лінії клітин молочної залози MDA-MB-231 та передміхурової залози DU-145 інкубували на покривних скельцях у середовищі DMEM з підвищеною концентрацією глюкози та пірувату, 10 % фетальної сироватки теляти, 40 мкг/мл гентаміцину в атмосфері 5 % CO₂ за 37 °С. Інкубаційне середовище видаляли та додавали тестові похідні 8HQ у фізіологічному розчині. Кінцева концентрація 5 мМ. Клітини фарбували протягом 5, 10, 20 та 30 хв, промивали 1 хв фізіологічним розчином. Люмінесценцію досліджували на мікроскопі Carl Zeiss з камерою AxioCam ICs5 та люмінесцентним блоком HXP 120 V. Для збудження люмінесценції використовували широкосмуговий ультрафіолетовий світлофільтр 330–380 нм. Усі зразки фотографували в однакових умовах, час експозиції 10 мс. Люмінесценцію клітин аналізували за допомогою програмного забезпечення ImageJ. Визначали ділянки з високою яскравістю люмінесценції за шкалою градації сірого. Дані представлено у вигляді медіани та кuartилів. Кількість вимірювань для кожного зразка – 50. Обробку даних проводили за допомогою програмного забезпечення OriginLab 8. Дослідження повторювали 10 разів.

Результати

Похідні 8-гідроксистирилхінолінів застосовуються як оптичні перемикачі, засоби збереження даних, нелінійні оптичні пристрої, флуоресцентні зонди тощо. Такі властивості, у комплексі з хелатуючою здатністю, можуть виявитися корисними для визначення вмісту катіонів у клітинах та тканинах. Перешкодою їхнього застосування є низька розчинність у воді та схильність до агрегації. Переважна більшість досліджень хелатування катіонів металів похідними 8HQ проведено в умовах повної розчинності тестових сполук у гідрофобних розчинниках чи їхніх сумішах (Monzon, Burke, & Coey, 2011). У водних розчинах властивості втрачаються. У зв'язку з цим існує потреба модифікації молекули з метою підвищення гідрофільності. Пошук оптимальної конструкції кінцевої молекули має важливе значення для прикладного її застосування в біологічних системах, у тому числі тераностики раку.

Перевірено можливість хелатування похідними 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl та STQ-NO₂ катіонів Mg²⁺, Ca²⁺ та Zn²⁺ у фізіологічному розчині. Наявність Mg²⁺ та Ca²⁺ сприяє зниженню інтенсивності максимумів оптичного поглинання STQ-Cl у 1,6 та 1,3 раза відповідно за концентрації катіонів у середовищі 0,03125 мМ (рис. 1, а, б). Зважаючи на погану розчинність STQ-Cl у воді, припускаємо, що відбувається осадження утворених комплексів. Ефект найбільш виражений за концентрації Zn²⁺ 0,015625 мМ (рис. 1, в).

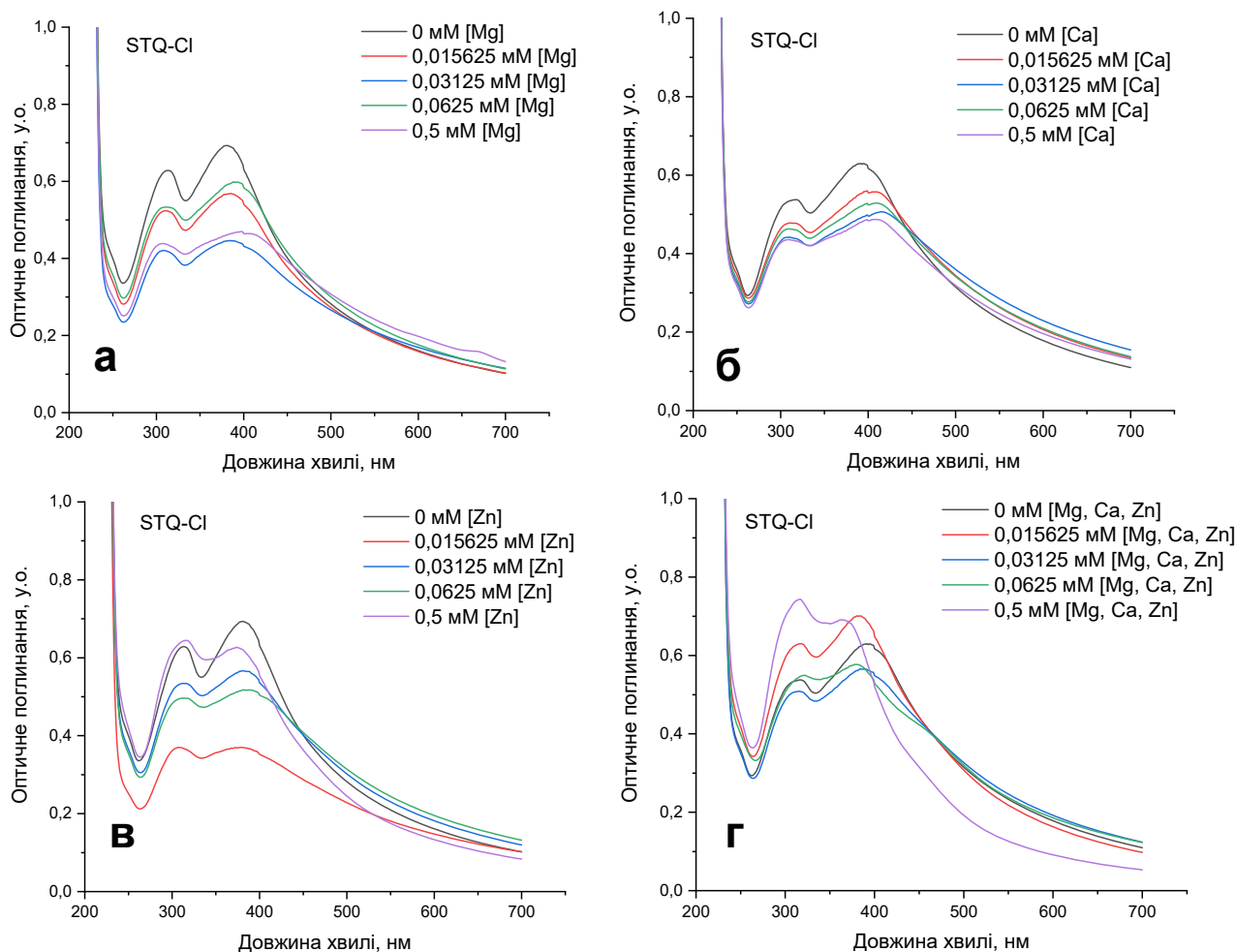


Рис. 1. Оптичне поглинання похідного 8-гідроксистирилхіноліну STQ-Cl (0,05 мМ) у фізіологічному розчині за наявності катіонів Mg^{2+} (а), Ca^{2+} (б), Zn^{2+} (в) та їхньої суміші в однаковому молярному співвідношенні (г). Тривалість інкубації STQ-NO₂ з катіонами 5 хв

Виявлено збільшення максимумів 320 і 380 нм STQ-Cl за концентрації Mg^{2+} , Ca^{2+} та Zn^{2+} 0,5 мМ і 0,015625 мМ (рис. 1, г). Ми припускаємо складні конкурентні взаємодії між катіонами за сайт зв'язування хінолінової структури, можливого формування перехідних станів за участі різних катіонів та декількох молекул похідних 8-гідроксистирилхінолінів, які виражаються у зміні форми спектра оптичного поглинання водного розчину STQ-Cl. Не виключено, що отримані ефекти є наслідком утворення агрегатів.

Слабкі відмінності оптичного поглинання розчинів спостерігаються під час інкубування STQ-NO₂ з різними концентраціями катіонів кальцію та магнію (рис. 2, а, б). Інтенсивність поглинання водного розчину STQ-NO₂ збільшувалася за концентрації Zn^{2+} 0,015625 та 0,03125 мМ (рис. 2, в), що відповідає молярному співвідношенню катіон : хелатор менше 1:1. Зі збільшенням цього співвідношення спостерігається зниження оптичного поглинання щодо початкового розчину STQ-NO₂. У суміші Mg^{2+} , Ca^{2+} та Zn^{2+} суттєвих змін інтенсивності

оптичного поглинання STQ-NO₂ не виявлено. Варто вказати лише на незначне збільшення максимумів за концентрації катіонів 0,0625 мМ. Припускаємо, що зареєстровані зміни інтенсивності оптичного поглинання є проявом відмінностей розчинності утворених комплексів у воді та їхньої схильності до агрегації.

Отримані результати дуже важливі для розуміння взаємодії похідних 8-гідроксистирилхінолінів з найпоширенішими двовалентними катіонами в біологічних системах.

Цитотоксичність похідних 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl та STQ-NO₂ перевіряли на культурах клітин раку молочної (MDA-MB-231) та передміхурової залози (DU-145). Відомо, що розвиток раку цих органів часто супроводжується порушенням метаболізму цинку, кальцію та магнію (Zhao et al., 2016; Cui et al., 2007; Dai et al., 2011). Ці елементи є важливими регуляторами біохімічних процесів та внутрішньоклітинного сигналіngu. Клітини раку молочної залози схильні до акумуляції цинку (Rusch et al., 2021), для передміхурової залози спостерігається протилежний ефект (Xue et al., 2019).

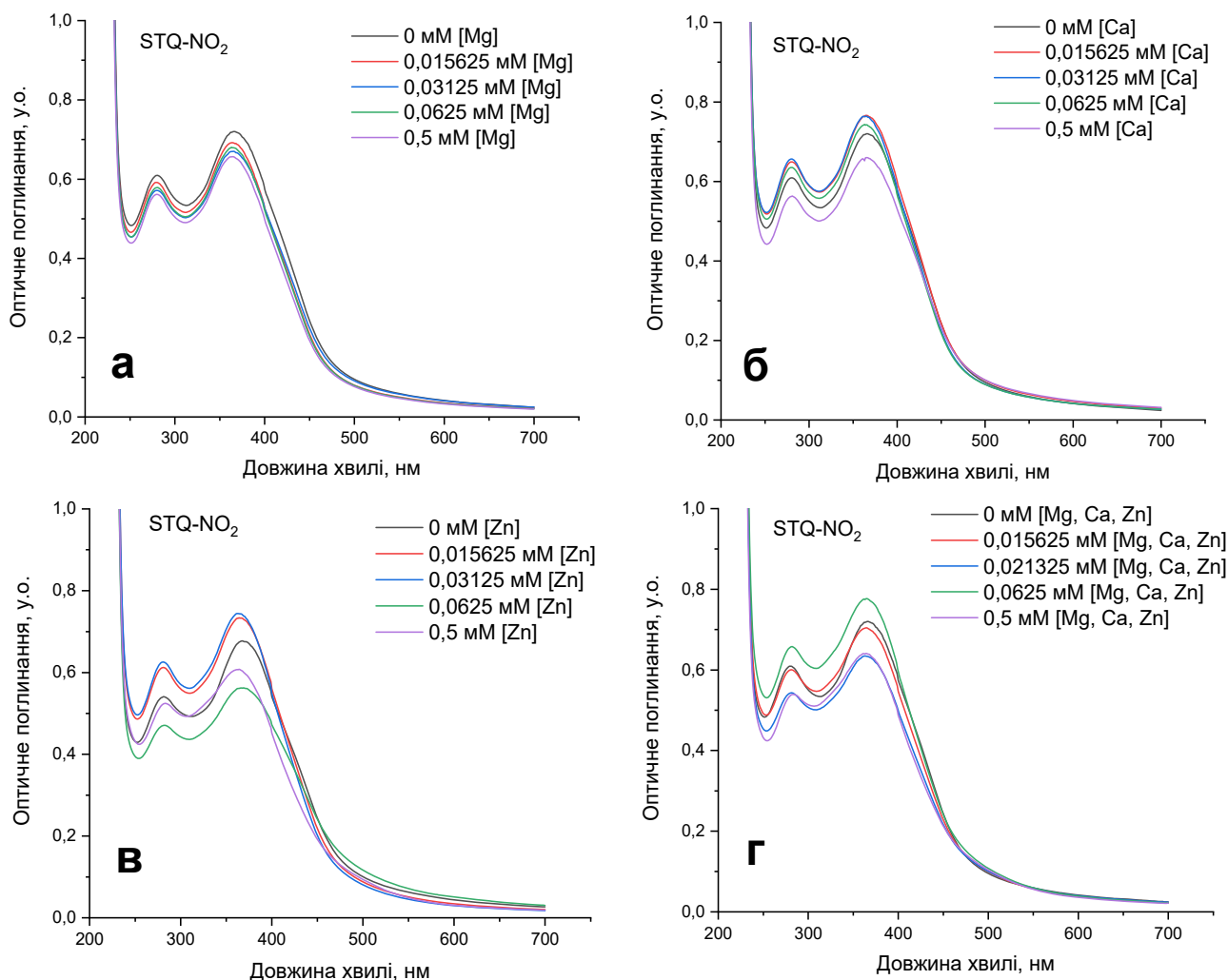


Рис. 2. Оптичне поглинання похідного 8-гідроксистирилхіноліну STQ-NO₂ (0,05 мМ) у фізіологічному розчині за наявності катіонів Mg²⁺ (а), Ca²⁺ (б), Zn²⁺ (в) та їхньої суміші в однаковому молярному співвідношенні (г). Тривалість інкубації STQ-NO₂ з катіонами 5 хв

Виявлено відмінності цитотоксичності похідних 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl та STQ-NO₂ щодо лінії клітин раку молочної залози MDA-MB-231 (рис. 3, а). Максимальний ефект близько 80 % досягається за концентрації STQ-Cl у середовищі інкубації 0,04 мМ, а STQ-NO₂ – 60 %.

Клітини раку передміхурової залози DU-145 виявилися більш чутливими до STQ-NO₂ (EC₅₀ = 0,011 мМ). Максимальна цитотоксичність (близько 100 %) досягається за концентрації вище 0,02 мМ (рис. 2, б). Ця лінія клітин виявилася слабо чутливою до STQ-Cl. Виявлено максимальну цитотоксичність 50 % за концентрації 0,125 мМ.

Отже, виявлено різну цитотоксичність похідних 8НҚ щодо ліній клітин передміхурової та молочної залоз. Вважаємо, що одним з основних механізмів дії 8НҚ є зв'язування катіонів металів у цитоплазмі клітин. У зв'язку з цим можна припустити їхню різну важливість для проліферації клітин. Рак передміхурової залози характери-

зується зниженою концентрацією цинку в клітинах (Хуе et al., 2019). Підвищення вмісту елемента може інгібувати поділ клітини та ініціювати апоптоз (То et al., 2020). У зв'язку з неселективним хелатуванням Zn²⁺, Ca²⁺ та Mg²⁺ похідні 8-гідроксистирилхінолінів можуть знижувати концентрацію кальцію і магнію в цитоплазмі, а також перешкоджати протіканню магнієзалежних біохімічних процесів. Припускаємо, що слабку чутливість цих клітин до дії STQ-Cl можна пояснити значно гіршою розчинністю сполуки у водних розчинах та швидкою інактивацією через агрегаційні процеси та осадження під час утворення комплексів з кальцієм або магнієм, як було показано попередньо. Крім того, існують інші механізми цитотоксичності похідних 8-гідроксистирилхінолінів, які пов'язані з порушенням функціонування ензимів з катіонами металів як кофакторами (Chen et al., 2019; Conan et al., 2022). Блокування активних центрів порушує нормальний перебіг біохімічних реакцій та призводить до загибелі клітин.

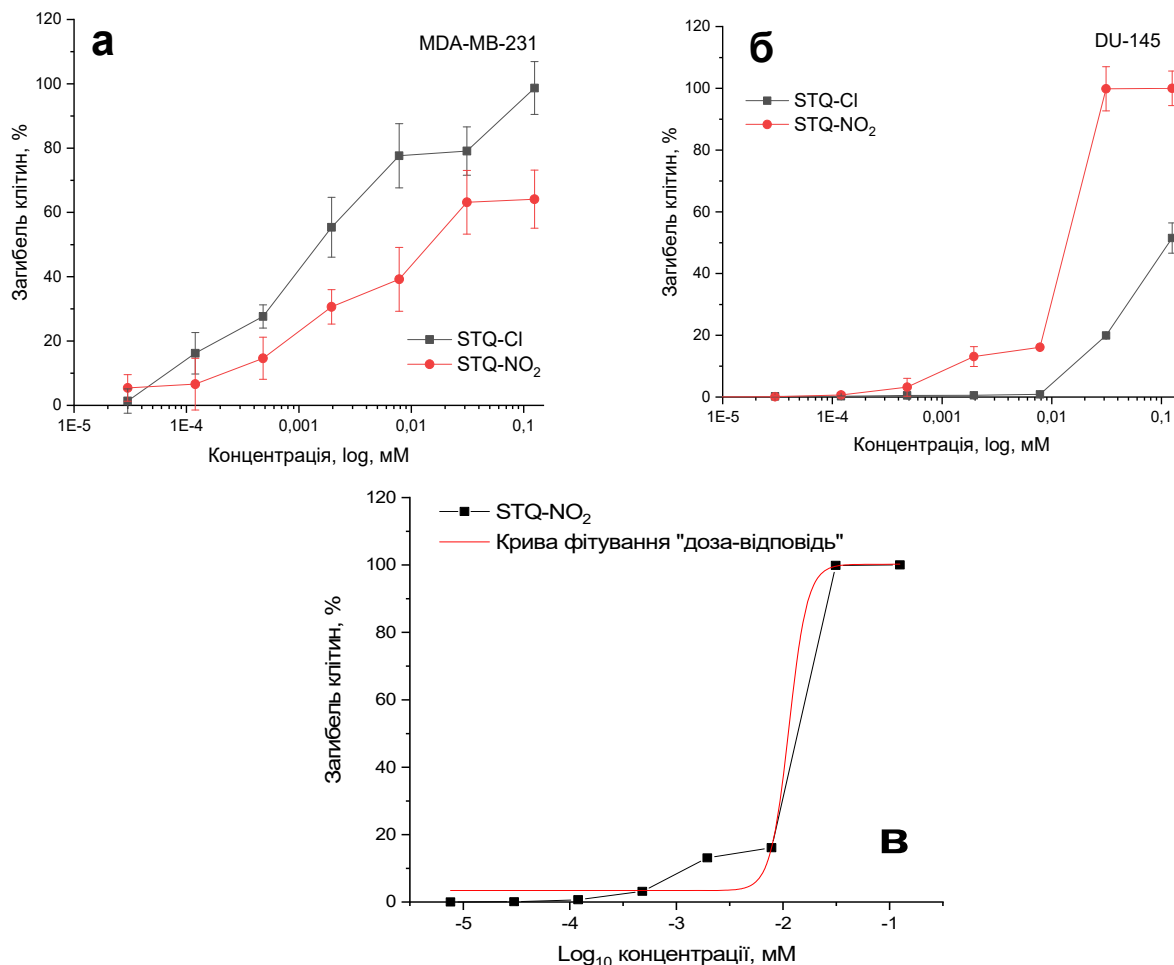


Рис. 3. Цитотоксичність похідних 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl, STQ-NO₂ щодо раку молочної залози MDA-MB-231 (а) і передміхурової залози DU-145 (б); крива фітування даних цитотоксичності STQ-NO₂ (в) щодо лінії клітин DU-145 (pEC50 = -1,94, коефіцієнт Хілла = 5,03); (M ± SD, n = 3)

Фізіологічні особливості клітин раку молочної залози щодо акумуляції цинку протилежні до раку передміхурової залози (Rusch et al., 2021). Спостерігається значне накопичення Zn²⁺ у цитоплазмі ракових клітин щодо нормальних оточуючих тканин. Процес важливий для швидкої проліферації клітин та росту пухлини. Наявність хелатора зв'язує певну частку іонів цинку, що уповільнює швидкість розмноження. На це вказує зниження відносної кількості клітин за мінімальної наявності похідних 8-гідроксистирилхінолінів (рис. 3, а). Відмінності в цитотоксичності STQ-Cl та STQ-NO₂ щодо MDA-MB-231 можливо пов'язані з різною розчинністю сполук у воді та наявністю інших клітинних мішеней.

Похідні 8-гідроксистирилхінолінів є флуороогенними лігандами під час хелатування іонів металів. Завдяки таким властивостям вони використовуються як флуоресцентні детектори та засоби кількісного аналізу катіонів металів. Безпосередньо молекула 8HQ є слабким флуорофором з коротким часом життя. Надшвидке протонування та депротонування є причиною ультракороткої флуоресценції вільного хелатора, тоді як зв'язування катіона металу

перешкоджає цьому процесу. Як наслідок, тривалість флуоресценції значно зростає (Park et al., 2016). Ми використали цю властивість для визначення акумуляції та хелатування двовалентних катіонів у цитоплазмі ліній клітин раку молочної (MDA-MB-231) та передміхурової залози (DU-145). У зв'язку з відносно низькою концентрацією катіонів металів у цитоплазмі клітин інтенсивність виявленої флуоресценції була слабка. Проте через 20 хв інкубування клітин обох ліній з STQ-Cl (5 мМ) досягається максимальний рівень флуоресценції та не змінюється з часом (рис. 4, а, в). Аналогічні результати отримано після додавання STQ-NO₂ (рис. 4, б, г).

Отже, похідні 8HQ STQ-Cl та STQ-NO₂ проникають у ракові клітини молочної та передміхурової залози за короткий проміжок часу (до 30 хв). Враховуючи швидкість агрегації STQ-Cl, сполука малоприсадна для визначення вмісту катіонів металів у цитоплазмі клітин, але механізми її цитотоксичності потребують подальших досліджень.

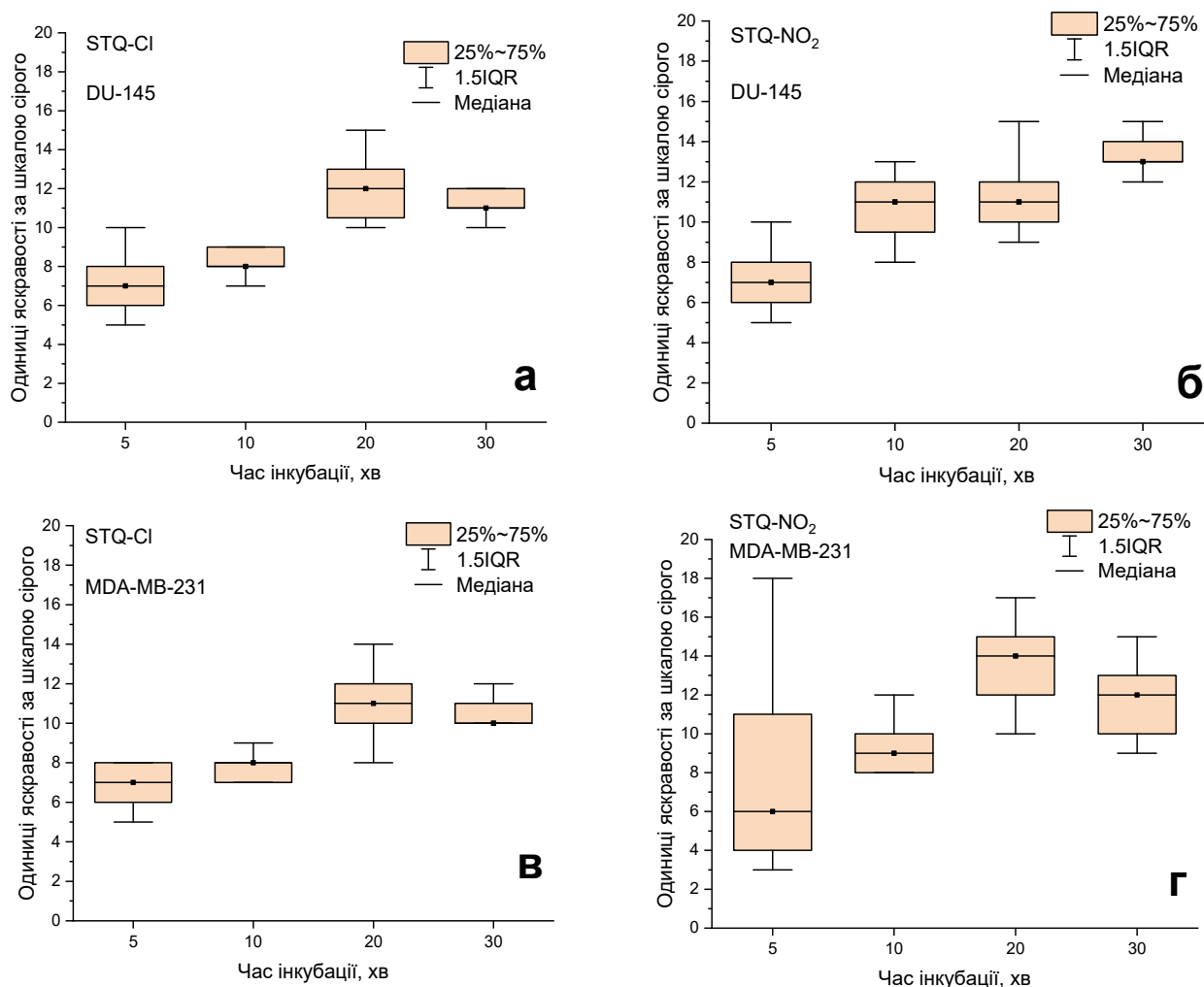


Рис. 4. Люмінесценція клітин раку передміхурової залози DU-145 (а, б) та молочної залози MDA-MB-231 (в, г) після інкубації з похідними 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl (а, в) та STQ-NO₂ (б, г) протягом 5, 10, 20, 30 хв; медіана і кватилі, $n = 10$

Дискусія і висновки

Виявлено зниження максимумів оптичного поглинання водних розчинів похідних 8-гідроксистирилхінолінів STQ-Cl за наявності Mg^{2+} (0,03125 мМ), Ca^{2+} (0,03125 мМ), Zn^{2+} (0,015625 мМ), що найбільш імовірно є наслідком агрегаційних процесів утворених комплексів. Відносно кращу стабільність демонструє сполука STQ-NO₂ за аналогічних умов. Спектри оптичного поглинання змінювалися не суттєво. Виявлено відмінності цитотоксичності STQ-Cl та STQ-NO₂ щодо лінії клітин раку молочної (MDA-MB-231) та передміхурової (DU-145) залоз. Виявлено високу цитотоксичність STQ-NO₂ щодо клітин DU-145 ($EC_{50} = 0,011$ мМ), а STQ-Cl мав слабкий вплив на виживання цих клітин. Максимальна цитотоксичність сполук STQ-Cl та STQ-NO₂ клітин MDA-MB-231 була в межах 90 % та 60 %, відповідно. Отримані результати є наслідком різної спорідненості похідних 8-гідроксистирилхінолінів до катіонів магнію, кальцію та цинку, розчинності у воді, стабільності, схильності до агрегації утворених комплексів та вільних речовин.

Внесок авторів: Павло Вірич – методологія, написання (оригінальна чернетка), написання (перегляд і редагування); Віталій Смокал – написання (оригінальна чернетка), валідація даних; Оксана Харченко – методологія, формальний аналіз; Наталія Куцевол – концептуалізація, формальний аналіз; Петро Вірич – методологія, валідація даних.

Подяки, джерела фінансування. Дослідження виконано за підтримки Міністерства освіти і науки України, проєкт 0122U001818.

Список використаних джерел

- Chen, C., Yang, X., Fang, H., & Hou, X. (2019). Design, synthesis and preliminary bioactivity evaluations of 8-hydroxyquinoline derivatives as matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 181, 111563. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111563>
- Conan, P., Léon, A., Gourdel, M., Rollet, C., Chair, L., Caroff, N., Le Goux, N., Le Jossic-Corcos, C., Sinane, M., Gentile, L., Maillebois, L., Loäc, N., Martin, J., Vilaine, M., Corcos, L., Mignen, O., Croyal, M., Voisset, C., Bihel, F., & Friocourt, G. (2022). Identification of 8-Hydroxyquinoline Derivatives That Decrease Cystathionine Beta Synthase (CBS) Activity. *International journal of molecular sciences*, 23(12), 6769. <https://doi.org/10.3390/ijms23126769>
- Cui, Y., Vogt, S., Olson, N., Glass, A.G., & Rohan, T.E. (2007). Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 16(8), 1682–1685. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0187>
- Dai, Q., Motley, S. S., Smith, J.A. Jr., Concepcion, R., Barocas, D., Byerly, S., & Fowke, J. H. (2011). Blood magnesium, and the interaction with calcium, on the risk of high-grade prostate cancer. *PloS one*, 6(4), e18237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018237>
- Gumienna-Kontecka, E., Nurchi, V.M., Szebesczyk, A., Biliska, P., Krzywoszynska, K., & Kozłowski, H. (2013). Chelating agents as tools for the treatment of metal overload. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 639, 1321–1331. <https://doi.org/10.1002/zaac.201300064>
- Gupta, R., Luxami, V., & Paul, K. (2021). Insights of 8-hydroxyquinolines: A novel target in medicinal chemistry. *Bioorganic chemistry*, 108, 104633. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104633>

Heiskanen, J.P., Omar, W.A.E., Ylikunnari, M.K., Haavisto, K.M., Juan, M.J., & Hormi O.E.O. (2007). Synthesis of 4-Alkoxy-8-hydroxyquinolines. *The Journal of Organic Chemistry*, 72(3), 920–922. <https://doi.org/10.1021/jo062175i>

Hu, H., Xu, Q., Mo, Z., Hu, X., He, Q., Zhang, Z., & Xu, Z. (2022). New anti-cancer explorations based on metal ions. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 457. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01661-w>

Jacobsen, J.A., Fullagar, J.L., Miller, M.T., & Cohen, S.M. (2011). Identifying chelators for metalloprotein inhibitors using a fragment-based approach. *Journal of medicinal chemistry*, 54(2), 591–602. <https://doi.org/10.1021/jm101266s>

Liu, Y., Wang, Y., Song, S., & Zhang, H. (2021). Cancer therapeutic strategies based on metal ions. *Chemical science*, 12(37), 12234–12247. <https://doi.org/10.1039/d1sc03516a>

Monzon, L.M.A., Burke, F., & Coey, J.M.D. (2011). Optical, Magnetic, Electrochemical, and Electrical Properties of 8-Hydroxyquinoline-Based Complexes with Al^{3+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} . *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(18), 9182–9192. <https://doi.org/10.1021/jp201019c>

Park, S.-Y., Ghosh, P., Park, S.O., Lee, Y.M., Kwak, S.K., & Kwon, O.-H. (2016). Origin of ultraweak fluorescence of 8-hydroxyquinoline in water: photoinduced ultrafast proton transfer. *RSC Advanced*, 6, 9812–9821. <https://doi.org/10.1039/C5RA23802A>

Pulukuri, S. M., Gondi, C. S., Lakka, S. S., Jutla, A., Estes, N., Gujrati, M., & Rao, J. S. (2020). Retraction: RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 295(37), 13136. <https://doi.org/10.1074/jbc.RX120.015588>

Rohini, Paul, K., & Luxami, V. (2020). 8-Hydroxyquinoline Fluorophore for Sensing of Metal Ions and Anions. *Chemical record*, 20(12), 1430–1473. <https://doi.org/10.1002/tcr.202000082>

Rusch, P., Hirner, A.V., Schmitz, O., Kimmig, R., Hoffmann, O., & Diel, M. (2021). Zinc distribution within breast cancer tissue of different intrinsic subtypes. *Archives of gynecology and obstetrics*, 303(1), 195–205. <https://doi.org/10.1007/s00404-020-05789-8>

Shoji, E., Miyatake, K., Hlil, A., Hay, A., Maindrone, T., Jousseau, V., Dodelet, J., Tao, Y., & D'Iorio, M. (2003). Immiscible polymers in double spin-coated electroluminescent devices containing phenyl-substituted Tris (8-Hydroxyquinoline) aluminum derivatives soluble in a host polymer. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41, 3006–3016. <https://doi.org/10.1002/pola.10883>

To, P.K., Do, M.H., Cho, J.H., & Jung, C. (2020). Growth Modulatory Role of Zinc in Prostate Cancer and Application to Cancer Therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2991. <https://doi.org/10.3390/ijms21082991>

Xue, Y.N., Yu, B.B., Liu, Y.N., Guo, R., Li, J.L., Zhang, L.C., Su, J., Sun, L.K., & Li, Y. (2019). Zinc promotes prostate cancer cell chemosensitivity to paclitaxel by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and inducing apoptosis. *The Prostate*, 79(6), 647–656. <https://doi.org/10.1002/pros.23772>

Zhao, J., Wu, Q., Hu, X., Dong, X., Wang, L., Liu, Q., Long, Z., & Li, L. (2016). Comparative study of serum zinc concentrations in benign and malignant prostate disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Scientific reports*, 6, 25778. <https://doi.org/10.1038/srep25778>

Zheng, H., Weiner, L.M., Bar-Am, O., Epsztejn, S., Cabantchik, Z.I., Warshawsky, A., Youdim, M.B., & Fridkin, M. (2005). Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(3), 773–783. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.10.037>

References

Chen, C., Yang, X., Fang, H., & Hou, X. (2019). Design, synthesis and preliminary bioactivity evaluations of 8-hydroxyquinoline derivatives as matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 181, 111563. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111563>

Conan, P., Léon, A., Gourdel, M., Rollet, C., Chair, L., Caroff, N., Le Goux, N., Le Jossic-Corcos, C., Sinane, M., Gentile, L., Maillebois, L., Loaec, N., Martin, J., Vialre, M., Corcos, L., Mignen, O., Croyal, M., Voisset, C., Bihel, F., & Friocourt, G. (2022). Identification of 8-Hydroxyquinoline Derivatives That Decrease Cystathionine Beta Synthase (CBS) Activity. *International journal of molecular sciences*, 23(12), 6769. <https://doi.org/10.3390/ijms23126769>

Cui, Y., Vogt, S., Olson, N., Glass, A.G., & Rohan, T.E. (2007). Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored*

by the American Society of Preventive Oncology, 16(8), 1682–1685. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0187>

Dai, Q., Motley, S.S., Smith, J.A. Jr, Concepcion, R., Barocas, D., Byerly, S., & Fowke, J.H. (2011). Blood magnesium, and the interaction with calcium, on the risk of high-grade prostate cancer. *PloS one*, 6(4), e18237. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018237>

Gumienna-Kontecka, E., Nurchi, V.M., Szebesczyk, A., Bilska, P., Krzywoszynska, K., & Kozłowski, H. (2013). Chelating agents as tools for the treatment of metal overload. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 639, 1321–1331. <https://doi.org/10.1002/zaac.201300064>

Gupta, R., Luxami, V., & Paul, K. (2021). Insights of 8-hydroxyquinolines: A novel target in medicinal chemistry. *Bioorganic chemistry*, 108, 104633. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104633>

Heiskanen, J.P., Omar, W.A.E., Ylikunnari, M.K., Haavisto, K.M., Juan, M.J., & Hormi O.E.O. (2007). Synthesis of 4-Alkoxy-8-hydroxyquinolines. *The Journal of Organic Chemistry*, 72(3), 920–922. <https://doi.org/10.1021/jo062175i>

Hu, H., Xu, Q., Mo, Z., Hu, X., He, Q., Zhang, Z., & Xu, Z. (2022). New anti-cancer explorations based on metal ions. *Journal of nanobiotechnology*, 20(1), 457. <https://doi.org/10.1186/s12951-022-01661-w>

Jacobsen, J.A., Fullagar, J.L., Miller, M.T., & Cohen, S.M. (2011). Identifying chelators for metalloprotein inhibitors using a fragment-based approach. *Journal of medicinal chemistry*, 54(2), 591–602. <https://doi.org/10.1021/jm101266s>

Liu, Y., Wang, Y., Song, S., & Zhang, H. (2021). Cancer therapeutic strategies based on metal ions. *Chemical science*, 12(37), 12234–12247. <https://doi.org/10.1039/d1sc03516a>

Monzon, L.M.A., Burke, F., & Coey, J.M.D. (2011). Optical, Magnetic, Electrochemical, and Electrical Properties of 8-Hydroxyquinoline-Based Complexes with Al^{3+} , Cr^{3+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} . *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(18), 9182–9192. <https://doi.org/10.1021/jp201019c>

Park, S.-Y., Ghosh, P., Park, S.O., Lee, Y.M., Kwak, S.K., & Kwon, O.-H. (2016). Origin of ultraweak fluorescence of 8-hydroxyquinoline in water: photoinduced ultrafast proton transfer. *RSC Advanced*, 6, 9812–9821. <https://doi.org/10.1039/C5RA23802A>

Pulukuri, S.M., Gondi, C.S., Lakka, S.S., Jutla, A., Estes, N., Gujrati, M., & Rao, J.S. (2020). Retraction: RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival, and tumorigenicity in vivo. *The Journal of biological chemistry*, 295(37), 13136. <https://doi.org/10.1074/jbc.RX120.015588>

Rohini, Paul K., & Luxami, V. (2020). 8-Hydroxyquinoline Fluorophore for Sensing of Metal Ions and Anions. *Chemical record*, 20(12), 1430–1473. <https://doi.org/10.1002/tcr.202000082>

Rusch, P., Hirner, A.V., Schmitz, O., Kimmig, R., Hoffmann, O., & Diel, M. (2021). Zinc distribution within breast cancer tissue of different intrinsic subtypes. *Archives of gynecology and obstetrics*, 303(1), 195–205. <https://doi.org/10.1007/s00404-020-05789-8>

Shoji, E., Miyatake, K., Hlil, A., Hay, A., Maindrone, T., Jousseau, V., Dodelet, J., Tao, Y., & D'Iorio, M. (2003). Immiscible polymers in double spin-coated electroluminescent devices containing phenyl-substituted Tris (8-Hydroxyquinoline) aluminum derivatives soluble in a host polymer. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41, 3006–3016. <https://doi.org/10.1002/pola.10883>

To, P.K., Do, M.H., Cho, J.H., & Jung, C. (2020). Growth Modulatory Role of Zinc in Prostate Cancer and Application to Cancer Therapeutics. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2991. <https://doi.org/10.3390/ijms21082991>

Xue, Y.N., Yu, B.B., Liu, Y.N., Guo, R., Li, J.L., Zhang, L.C., Su, J., Sun, L.K., & Li, Y. (2019). Zinc promotes prostate cancer cell chemosensitivity to paclitaxel by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and inducing apoptosis. *The Prostate*, 79(6), 647–656. <https://doi.org/10.1002/pros.23772>

Zhao, J., Wu, Q., Hu, X., Dong, X., Wang, L., Liu, Q., Long, Z., & Li, L. (2016). Comparative study of serum zinc concentrations in benign and malignant prostate disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Scientific reports*, 6, 25778. <https://doi.org/10.1038/srep25778>

Zheng, H., Weiner, L.M., Bar-Am, O., Epsztejn, S., Cabantchik, Z.I., Warshawsky, A., Youdim, M.B., & Fridkin, M. (2005). Design, synthesis, and evaluation of novel bifunctional iron-chelators as potential agents for neuroprotection in Alzheimer's, Parkinson's, and other neurodegenerative diseases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 13(3), 773–783. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.10.037>

Отримано редакцією журналу / Received: 31.08.23
Прорецензовано / Revised: 31.08.23
Схвалено до друку / Accepted: 29.09.23

Pavlo VIRYCH¹, PhD (Biol.), Researcher
ORCID ID: 0000-0002-1463-1992
e-mail: pavlo.virych@knu.ua

Vitaliy SMOKAL¹, PhD (Chem.), Senior Researcher
ORCID ID: 0000-0001-6832-8625
e-mail: vitalii.smokal@knu.ua

Oksana KHARCHENKO¹, PhD (Chem.), Researcher
ORCID ID: 0000-0001-6900-514X
e-mail: oksana_kharchenko@ukr.net

Natalia KUTSEVOL¹, DSc (Chem.), Leading Researcher
ORCID ID: 0000-0002-1468-4111
e-mail: nataliya.kutsevol@knu.ua

Petro VIRYCH², PhD Student
ORCID ID: 0000-0001-6201-3892
e-mail: anabenas@gmail.com

¹Taras Shevchenko National University of Kyiv, Kyiv, Ukraine

²R.E. Kavetsky Institute for Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, Kyiv, Ukraine

CHELATION OF DIVALENT CATIONS AND ANTI-CANCER ACTIVITY OF 8-HYDROXYSTYRYLQUINOLINE DERIVATIVES IN VITRO

Background. The search for new methods of cancer treatment and diagnosis are important. The disadvantages of chemotherapy drugs are the rapid acquisition of resistance and high toxicity. 8-hydroxyquinoline derivatives have a wide spectrum of biological activity and have the necessary properties for fluorescent cancer diagnosis. The aim of the study was to determine the chelation of calcium, magnesium and zinc cations by hydrophobic derivatives of 8-hydroxystyrylquinolines (8HQ) 2-(4-chlorostyryl)quinolin-8-ol (STQ-Cl) and 2-(4-nitrostyryl)quinolin-8-ol (STQ-NO₂) in physiological solution, the stability of the complexes and the cytotoxicity of the compounds to prostate and breast cancer cell lines in vitro.

Methods. 8HQ derivatives STQ-Cl and STQ-NO₂ were used. Solutions of Ca²⁺, Mg²⁺, Zn²⁺ cations were prepared by the method of two-fold dilutions in 0.5-0.0078125 mM concentration range based on 0.9 % NaCl. Both individual solutions of each cation and a mixture in an equivalent molar ratio were used. The concentration of 8HQ derivatives were 0.05 mM. Optical absorption was registered in 200-700 nm wavelength range. Cytotoxicity was investigated on breast (MDA-MB-231) and prostate (DU-145) cancer cell lines. STQ-Cl and STQ-NO₂ derivatives in DMSO were added to the incubation solution by four-fold dilutions (0.125–0.00003 mM). For luminescence studies, MDA-MB-231 and DU-145 cells were grown on coverslips. The final concentration of 8HQ derivatives were 5 mM. Cells were kept for 5, 10, 20 and 30 min. Luminescence was recorded under the same conditions for all samples, with an exposure time of 10 ms.

Results. Mg²⁺ and Ca²⁺ (0.03125 mM) were contributed to reduce the intensity of optical absorption maxima of STQ-Cl by 1.6 and 1.3 times, respectively. The effect was most pronounced at 0.015625 mM Zn²⁺. Weak differences in the optical absorption of solutions were detected when STQ-NO₂ was incubated with different concentrations of Mg²⁺ and Ca²⁺. The optical absorption intensity of the STQ-NO₂ aqueous solution was increased at 0.015625 and 0.03125 mM Zn²⁺. The maximum cytotoxicity against MDA-MB-231 cells for STQ-Cl was about 80 %, and STQ-NO₂ was 60 % at 0.04 mM Zn²⁺. DU-145 cells were more sensitive to STQ-NO₂ (EC₅₀ = 0.011 mM), but weakly sensitive to STQ-Cl (50 % at 0.125 mM). The maximum luminescence intensity was after 20 min of incubation with STQ-Cl and STQ-NO₂ (5 mM) for both cells lines and was not change over time.

Conclusions. The decrease of optical absorption maxima of STQ-Cl aqueous solutions in the presence of magnesium, calcium, and zinc cations was a consequence of aggregation processes. This phenomenon was probably the reason for the different cytotoxicity of STQ-Cl and STQ-NO₂, as well as the presence of other mechanisms of action to cancer cells. Results was a consequence of different affinity of 8-hydroxyquinoline derivatives to magnesium, calcium and zinc cations, solubility in water, stability, aggregation of metal complexes and free compounds.

Keywords: 8-hydroxystyrylquinolines, zinc, magnesium, calcium, cytotoxicity, anticancer.

Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів. Спонсори не брали участі в розробленні дослідження; у зборі, аналізі чи інтерпретації даних; у написанні рукопису; в рішенні про публікацію результатів.

The authors declare no conflicts of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript; in the decision to publish the results.