



Pāvels Dimitrijevs

Izoselenazolija sāļu ietekme uz vēža metabolismu

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes
Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija
Apakšnozare – farmaceutiskā farmakoloģija

Rīga, 2023



RĪGAS STRADIŅA
UNIVERSITĀTE

Pāvels Dimitrijevs

ORCID 0000-0002-6332-2395

Izoselenazoliņa sāļu ietekme
uz vēža metabolismu

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija

Apakšnozare – farmaceutiskā farmakoloģija

Rīga, 2023

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūtā

Promocijas darba vadītājs:

Dr. chem. LZA īstenais loceklis Pāvels Arsenjans,
Latvijas Organiskās sintēzes institūts

Oficiālie recenzenti:

Dr. pharm. profesore Dace Bandere,
Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Dr. med. sci. profesore Una Riekstiņa,
Latvijas Universitāte

Dr. med. sci. profesors Ago Rinken,
Tartu Universitāte, Igaunija

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Medicīnas bāzes zinātņu, tai skaitā farmācijas promocijas padomes atklātā sēdē 2024. gada 15. janvārī plkst. 14.00 Hipokrāta auditorijā, Dzirciema ielā 16, Rīgas Stradiņa universitātē, un attālināti, tiešsaistes platformā *Zoom*

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA
Eiropas Reģionālās
attīstības fonds

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Promocijas darbs tika izstrādāts *ERAF* “Jauna, spēcīga PARP inhibitora izstrāde” (Nr. 1.1.1.1/19/A/016) un *BioMedPharm* (Nr. VPP-EM-BIOMEDICĪNA-2022/1-0001) projektu ietvaros.

Promocijas padomes sekretāre:

Dr. chem. asociētā profesore Māra Plotniece

Satura rādītājs

Darbā izmantotie saīsinājumi.....	4
Ievads.....	8
Darba mērķis.....	9
Darba uzdevumi.....	9
Darba hipotēze.....	10
Darba novitāte.....	10
1. Rezultāti.....	11
1.1. Izoselenazolija sāļu ietekme uz vēža metabolismu.....	11
1.1.1. Izoselenazolija sāļu citotoksicitāte.....	11
1.1.2. Ietekme uz mitohondriālo elpošanu un ROS veidošanos.....	13
1.1.3. Ietekme uz NAD ⁺ homeostāzi.....	16
1.1.4. Poli(ADP-ribozes)polimerāzes 1 inhibējošā aktivitāte.....	17
1.1.5. Mijiedarbība ar kardiolipīnu.....	17
1.2. Jaunā, pret kardiolipīnu specifiskā fluorescējošā marķiera izstrāde.....	19
1.2.1. Jaunā, pret kardiolipīnu specifiskā fluorescējošā marķiera sintēze.....	20
1.2.2. Kardiolipīna kvantitatīvā analīze.....	25
1.2.3. Uz fluorescenci balstīta konkurējošās saistīšanās metode.....	27
1.2.4. Izoselenazolija sāļu afinitāte pret kardiolipīnu.....	30
1.3. Izoselenazolija sāļu otrā paaudze un tās darbības mehānisms.....	31
1.3.1. Jauno izoselenazolija atvasinājumu sintēze.....	31
1.3.2. Jauno izoselenazolija sāļu citotoksicitāte.....	34
1.3.3. Ietekme uz mitohondriālo elpošanu, ROS veidošanos un elektronu transporta ķēdes sajūgšanas stāvokli.....	36
1.3.4. Izoselenazolija sāļu enzimatiskais skrīnings.....	41
1.3.5. Piruvāta kināzes M2 inhibīcijas mehānismi.....	43
1.3.6. Ietekme uz piruvāta kināžu M2 un M1 mRNS ekspresiju.....	48
1.3.7. Piruvāta kināzes M2 kodola translokācijas novēršana.....	49
2. Diskusija.....	53
Secinājumi.....	58
Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu.....	59
Literatūras saraksts.....	60
Pateicības.....	66

Darbā izmantotie saīsinājumi

ADP	adenozīna difosfāts (angl. <i>adenosine diphosphate</i>)
ANOVA	dispersijas analīze (angl. <i>analysis of variance</i>)
AO	akridīns oranžais (angl. <i>acridine orange</i>)
ATP	adenozīna trifosfāts (angl. <i>adenosine triphosphate</i>)
Bcl-2	B-šūnu limfomas 2 proteīns (angl. <i>B-cell lymphoma 2 protein</i>)
CI	elektronu transporta sistēmas komplekss I, (angl. <i>respiratory complex I</i>), NADH:ubikvīnons oksidoreduktāze
CII	elektronu transporta sistēmas komplekss II, (angl. <i>respiratory complex II</i>), sukcināta dehidrogenāze
CIII	elektronu transporta sistēmas komplekss III, (angl. <i>respiratory complex III</i>), ubikvīnola-citohroma c reduktāze
CL	kardioliipīns (angl. <i>cardiolipin</i>)
Cyt c	citohroms c (angl. <i>cytochrome c</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindols (angl. <i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DCM	dihlormetāns (angl. <i>dichloromethane</i>)
DMF	dimetilformamīds (angl. <i>dimethylformamide</i>)
DMSO	dimetilsulfoksīds (angl. <i>dimethyl sulfoxide</i>)
DNS	dezoksiribonukleīnskābe (angl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DOPC	1,2-dioleil- <i>sn</i> -glicero-3-fosfoholīns (angl. <i>1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine</i>)
DSF	diferenciālā skenējošā fluorimetrija (angl. <i>differential scanning fluorimetry</i>)
EC ₅₀	puse no maksimālās efektīvās koncentrācijas (angl. <i>the half-maximal effective concentration</i>)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimīds (angl. <i>1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide</i>)

ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa, and Enterobacter spp.</i>
ETS	elektronu transporta sistēma (angl. <i>electron transfer system</i>)
FBP	fruktozes 1,6-bifosfāts (angl. <i>fructose 1,6-bisphosphate</i>)
FI	fluorescences intensitāte (angl. <i>fluorescence intensity</i>)
G	glutamāts (angl. <i>glutamate</i>)
HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazīna etānsulfonskābe (angl. <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid</i>)
HOBt	1-hidroksibenzotriazols (angl. <i>1-hydroxybenzotriazole</i>)
IC ₅₀	puse no maksimālās inhibējošās koncentrācijas (angl. <i>the half-maximal inhibitory concentration</i>)
IMM	iekšējā mitohondriālā membrāna (angl. <i>inner mitochondrial membrane</i>)
ITC	izotermālā titrēšanas kalorimetrija (angl. <i>isothermal titration calorimetry</i>)
KApp,M	šķīstamā Mihaelisa-Mentenas konstante (angl. <i>apparent Michaelis-Menten constant</i>)
LDH	laktāta dehidrogenāze (angl. <i>lactate dehydrogenase</i>)
LEAK	elektronu transporta sistēmas ar oksidatīvo fosforilēšanu nesaistīts miera stāvoklis (angl. <i>non-phosphorylating resting state of mitochondrial respiration</i>)
M	malāts (angl. <i>malate</i>)
MeOH	metanols (angl. <i>methanol</i>)
mRNA	matrices ribonukleīnskābe (angl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolīnija bromīds (angl. <i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>)
N	NADH ražojošie substrāti (angl. <i>NADH-generating substrates</i>)
NAD ⁺	nikotīnamīda adenīna dinukleotīds (angl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide</i>)

NADH	nikotīnamīda adenīna dinukleotīds, reducēts (angl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide, reduced</i>)
NADPH	nikotīnamīda adenīna dinukleotīda fosfāts, reducēts (angl. <i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced</i>)
NAMPT	nikotīnamīda fosforiboziltransferāze (angl. <i>nicotinamide phosphoribosyltransferase</i>)
NAO	10- <i>N</i> -nonilakridīns oranžais (angl. <i>10-N-nonyl acridine orange</i>)
NMN	nikotīnamīda mononukleotīds (angl. <i>nicotinamide mononucleotide</i>)
NMR	kodolu magnētiskā rezonanse (angl. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
NS	NADH un sukcinātu ražojošie substrāti (angl. <i>NADH and succinate generating substrates</i>)
OCR	skābekļa patēriņa ātrums (angl. <i>oxygen consumption rate</i>)
OXPHOS	oksidatīvā fosforilēšana (angl. <i>oxidative phosphorylation</i>)
P	piruvāts (angl. <i>pyruvate</i>)
PA	L- α -fosfatīdskābe (angl. <i>L-α-phosphatidic acid</i>)
PAr	poli(ADP-riboze) (angl. <i>poly(ADP-ribose)</i>)
PARP	poli(ADP-ribozes)polimerāze (angl. <i>poly(ADP-ribose) polymerase</i>)
PE	L- α -fosfatidiletanolamīns (angl. <i>L-α-phosphatidyl-ethanolamine</i>)
PEP	fosfoenolpiruvāts (angl. <i>phosphoenolpyruvate</i>)
PI	L- α -fosfatidilinozīts (angl. <i>L-α-phosphatidylinositol</i>)
PKM1	piruvāta kināzes M1 izoforma (angl. <i>pyruvate kinase isoform M1</i>)
PKM2	piruvāta kināzes M2 izoforma (angl. <i>pyruvate kinase isoform M2</i>)
PKR	piruvāta kināzes R izoforma (angl. <i>pyruvate kinase isoform R</i>)
PS	L- α -fosfatidilserīns (angl. <i>L-α-phosphatidylserine</i>)

qPCR	kvantitatīva polimerāzes ķēdes reakcija (angl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i>)
ROS	reaktīvie skābekļa savienojumi (angl. <i>reactive oxygen species</i>)
rot	rotenons (angl. <i>rotenone</i>)
S	sukcināts (angl. <i>succinate</i>)
SAR	struktūras-aktivitātes likumsakarība (angl. <i>structure-activity relationship</i>)
SD	standarta novirze (angl. <i>standard deviation</i>)
SEC	izmēru izslēgšanas hromatogrāfija (angl. <i>size exclusion chromatography</i>)
STAT3	signāla devējs un transkripcijas aktivators 3 (angl. <i>signal transducer and activator of transcription 3</i>)
TPP	trifenilfosfonija grupa (angl. <i>triphenylphosphonium group</i>)
TTAPE-Me	1,1,2,2-tetrakis[4-(2-trimetilamonioetoksi)-feniletēns (angl. <i>1,1,2,2-tetrakis[4-(2-trimethylammonioethoxy)-phenylethane</i>)
V _{App,max}	šķietamais maksimālais reakcijas ātrums (angl. <i>apparent maximum reaction velocity</i>)
V ₀	sākotnējais reakcijas ātrums (angl. <i>initial reaction velocity</i>)
Water-LOGSY	magnetizācijas pārnese eksperiments no ūdens molekulām uz ligandu caur kodolu Overhauzera efektu (angl. <i>Water-ligand observed via gradient spectroscopy</i>)
Φ	fotoluminiscences kvantu iznākums (angl. <i>photoluminescence quantum yield</i>)

Ievads

Vēzis ir slimību grupa, kam raksturīga ģenētisku mutāciju uzkrāšanās un neregulēta gēnu ekspresija, kas izraisa nekontrolētu šūnu proliferāciju. Lai nodrošinātu nepārtrauktu augšanu, vēža šūnām jāapmierina liels enerģijas pieprasījums, jāražo biomasas pamatelementi un jāsaglabā oksidēšanās-reducēšanās līdzsvars. Tas tiek panākts, izmantojot tā saukto metabolisko pārprogrammēšanu, kas ietver glikozes transporta un galveno glikolītisko enzīmu regulēšanu, veicinot aerobo glikolīzi (Upadhyay et al., 2013). Turklāt mitohondriālais metabolisms ir vienlīdz svarīgs adenozīna trifosfāta (ATP) ražošanai, apoptozes regulēšanai un audzēju attīstībai (Zu and Guppy, 2004; Weinberg et al., 2010; Fan et al., 2013; Weinberg and Chandel, 2015). Vēža šūnas uztur augstāku reaktīvo skābekļa savienojumu (ROS) līmeni nekā parastās šūnas, taču, neskatoties uz palielinātu antioksidantu kapacitāti, ir jutīgākas pret papildu ROS veidošanos (Gorrini, Hariss and Mak, 2013).

Līdz ar selēna un selēnproteīnu lomu atklāšanu vielmaiņas un antioksidantu sistēmās, kā arī progresu selēnorganiskās ķīmijas jomā, ir sākusies intensīva jaunu organisko selēnu saturošo zāļu vielu izstrāde (Gandin et al., 2018). Lai gan kā pretvēža aģenti ir pētītas dažādas selēna savienojumu klases, neņemot vērā daudzsoļus preklīniskus rezultātus, neviena selēnorganiskā viela nav atradusi vietu aptiekas plauktā. Klīnisko izmantošanu bieži ierobežo prasība pēc lielām devām, kas izraisa toksisku selēnu saturošu metabolītu uzkrāšanos (selenozi) un nopietnas blakusparādības, piemēram, zāļu izraisītu aknu bojājumu, imūnsupresiju, anēmiju un neauglību (Johnson et al., 2008; Garbo et al., 2022). Izplatīta problēma selēnu saturošiem līdzekļiem ir neskaidrs vai tikai virspusēji pētīts darbības mehānisms, kas kavē konkrētas savienojumu klases attīstības procesu (Lenardão, Sancineto, and Santi, 2018; Chuai et al., 2021). Šo problēmu risināšanai nepieciešama padziļināta izpratne par darbības mehānismu, nosakot objektīvu molekulāro mērķi, kā arī jaunu selēnu saturošu

savienojumu ar augstāku antiproliferatīvo aktivitāti atklāšana, lai samazinātu efektīvo devu un selenozes risku.

Nesen atklāta jauna selēnorganisko savienojumu grupa – izoselenazolija sāļi, heterocikliskā sistēma ar Se-N⁺ saiti (Arsenyan et al., 2015). Ir parādīts, ka šie savienojumi ir prooksidanti ar augstu reaģētspēju, kas izraisa dezoksiribonukleīnskābes (DNS) dubultpavedienu bojājumu un uzrāda lielisku antibakteriālu iedarbību pret *ESKAPE* patogēniem (Arsenyan un Vasiljeva, 2017; Rendekova et al., 2017; Witek et al., 2017). Tomēr šo savienojumu ķīmijterapeitiskais potenciāls nebija izpētīts. Šajā promocijas darbā ir aprakstīta izoselenazolija sāļu antiproliferatīvā aktivitāte, struktūras un aktivitātes likumsakarības pētījumi, darbības mehānisms, zinātniskie izaicinājumi un atrastie risinājumi.

Darba mērķis

Izpētīt izoselenazolija sāļu antiproliferatīvo aktivitāti un molekulāros darbības mehānismus, lai, veicot turpmākas strukturālas izmaiņas, palielinātu efektivitāti.

Darba uzdevumi

Promocijas darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Novērtēt izoselenazolija sāļu citotoksicitāti ļaundabīgās un normālās šūnu līnijās.
2. Atklāt izoselenazolija sāļu darbības mehānismu un atrast potenciālos molekulāros mērķus.
3. Izpētīt izoselenazolija atvasinājumu struktūras-aktivitātes likumsakarības, pamatojoties uz *in vitro* farmakoloģiskās aktivitātes datiem.

Darba hipotēze

Modulējot vēža metabolismu, aizvietotiem izoselenazolija hlorīdiem piemīt augsta antiproliferatīvā aktivitāte.

Darba novitāte

Promocijas darbā aprakstīta izoselenazolija sāļu antiproliferatīvā aktivitāte un ietekme uz vēža metabolismu. Pētījuma ietvaros izstrādāta jauna, uz fluorescenci balstīta konkurējošās saistīšanās metode, lai noteiktu savienojumu afinitāti pret kardiolipīnu, tādējādi veicinot uz mitohondrijiem mērķēto savienojumu izpēti. Otrās paaudzes izoselenazolija atvasinājumu izstrādes rezultātā atklāti efektīvi duāli PARP1 un PKM2 inhibitori. Iegūtie rezultāti palīdzēs turpināt fundamentālos pētījumus par PKM2 lomu vēža metabolismā un dod pamatu jaunas zāļu kandidātu grupas ar unikālu molekulāro mehānismu izpētei. Pētījuma novitāti apliecina divi starptautiski patenti par specifiskiem fluorescējošiem kardiolipīna marķieriem un konkurējošās saistīšanās metodi, kā arī PCT pieteikums par jaunajiem PKM2 inhibitoriem.

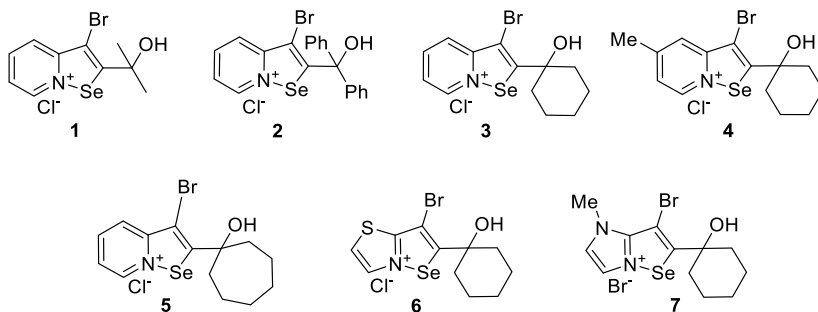
1. Rezultāti

1.1. Izoselenazolija sāļu ietekme uz vēža metabolismu

1.1.1. Izoselenazolija sāļu citotoksicitāte

Izoselenazolija sāļu **1–7** (1.1. attēls) citotoksicitāti noteica krūts vēža un normālās šūnās, izmantojot MTT testu (1.1. tabula). Vēža šūnās visām vielām bija augstāka citotoksiskā aktivitāte, salīdzinot ar kontroles vielu Na_2SeO_3 . Savienojumu **1–7** IC_{50} vērtības bija līdzīgas doksorubicīnam, tomēr krūts karcinomas (4T1) šūnās bija jutīgākas pret jaunsintezētajiem izoselenazolija sāļiem.

Lai novērtētu kondensētā heterocikla ietekmi uz citotoksisko aktivitāti, piridīna fragments tika aizstāts ar tiazola vai imidazola gredzeniem, iegūstot attiecīgas tiazolo- un imidazoloizoselenazolija heterocikliskās sistēmas. Tiazola (**6**) vai imidazola (**7**) gredzenu ieviešana samazināja citotoksicitāti audzēja šūnās, tomēr jāatzīmē, ka savienojums **7** uzrādīja augstāku toksicitāti normālās šūnās nekā savienojums **6**. Lai izpētītu kondensēto izoselenazolija sāļu iespējamās darbības mehānismus, tika izvēlēti savienojumi **3**, **6** un **7**.



1.1. attēls. Izoselenazolija sāļu **1–7** struktūras

Savienojumu 1–7 citotoksiskā aktivitāte pret krūts vēža un normālo šūnu līnijām

Savienojums	Citotoksicitāte, IC ₅₀ , μM									
	Krūts vēža šūnu līnijas			Normālas šūnu līnijas						
	MCF-7	4T1	H9C2	3T3	HEKa	MDCK	A7R5			
Na ₂ SeO ₃	17,10 ± 2,40	4,90 ± 0,60	1,50 ± 0,30	22,30 ± 3,60	13,30 ± 1,10	6,30 ± 0,40	39,40 ± 8,20			
Doksorubicīns	1,00 ± 0,30	0,16 ± 0,06	11,00 ± 1,00	0,75 ± 0,09	n.p.	57,00 ± 6,10	1,82 ± 0,35			
1	3,10 ± 0,03	0,30 ± 0,03	1,80 ± 0,10	0,13 ± 0,02	2,31 ± 0,02	3,26 ± 0,40	2,89 ± 0,42			
2	0,39 ± 0,03	1,10 ± 0,08	4,20 ± 0,30	1,60 ± 0,30	2,78 ± 0,08	6,27 ± 0,29	1,87 ± 0,26			
3	0,50 ± 0,02	0,044 ± 0,005	2,20 ± 0,10	0,39 ± 0,05	2,21 ± 0,02	2,91 ± 0,13	1,85 ± 0,22			
4	1,48 ± 0,04	0,45 ± 0,02	2,90 ± 0,10	0,79 ± 0,02	2,05 ± 0,05	2,54 ± 0,57	1,93 ± 0,16			
5	0,29 ± 0,01	0,41 ± 0,05	9,30 ± 0,20	0,98 ± 0,03	2,01 ± 0,08	1,51 ± 0,37	1,92 ± 0,44			
6	3,23 ± 0,03	1,70 ± 0,20	3,70 ± 0,20	7,40 ± 0,80	2,84 ± 0,08	6,58 ± 0,33	1,97 ± 0,27			
7	1,48 ± 0,02	0,94 ± 0,06	0,67 ± 0,02	2,20 ± 0,30	2,19 ± 0,09	4,28 ± 0,34	1,66 ± 0,25			

*Rezultāti ir parādīti kā vidējais ± SD no 3 neatkarīgiem eksperimentiem.

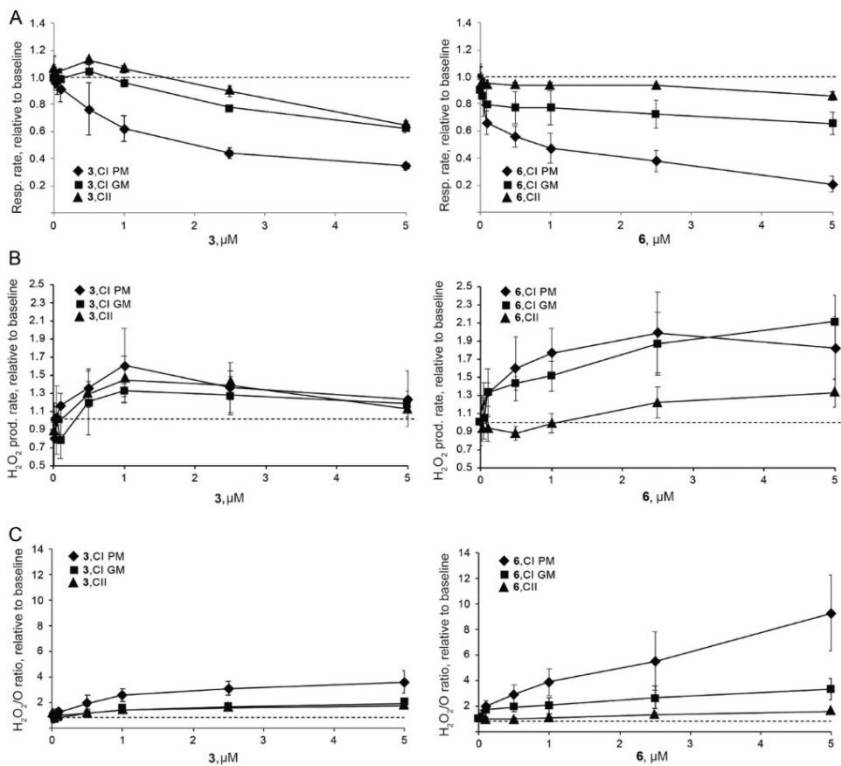
n.p. – nav pārbaudīts.

1.1.2. Ietekme uz mitohondriālo elpošanu un ROS veidošanos

Viens no svarīgākajiem oksidēšanās-reducēšanās procesiem šūnā notiek ETS mitohondrijos, kas arī ir galvenā intracelulāro ROS ražošanas vieta. Tā kā izoselenazolija sāļi H_2O_2 klātbūtnē ir spēcīgi oksidētāji, būtiski bija noskaidrot to ietekmi uz mitohondriālo funkcionalitāti.

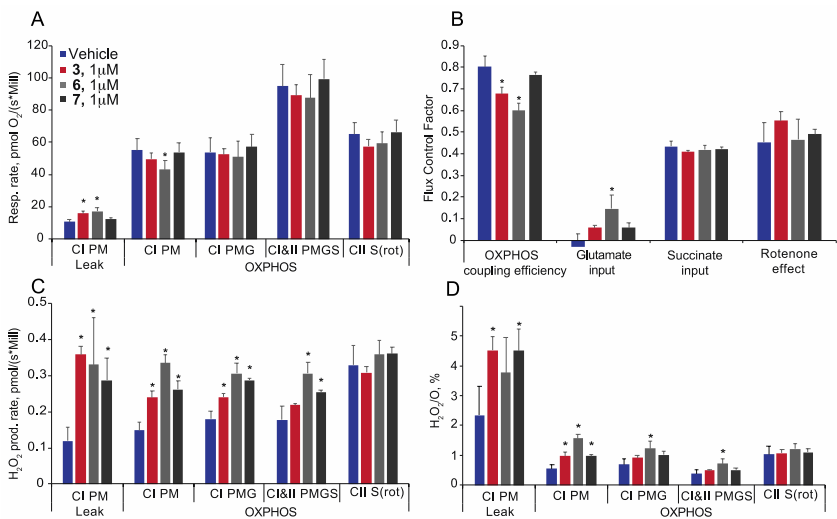
Vispirms tika noteikta savienojumu **3** un **6** ietekme uz kompleksa I (no NADH atkarīgiem) un kompleksa II (no sukcināta atkarīgiem) ceļiem. Abas vielas no koncentrācijas atkarīgā veidā kavēja mitohondriālās elpošanas ātrumu un palielināja H_2O_2 veidošanos CI substrātu (gan piruvāta un malāta, gan glutamāta un malāta) klātbūtnē (1.2. A un B attēls). Turklāt netika novērotas nozīmīgas mitohondriju funkcijas izmaiņas ar CII saistītā OXPHOS stāvoklī. Neskatoties uz savienojumu aktivitātes atšķirību, visizteiktāko H_2O_2/O attiecības palielināšanos izoselenazolija sāļu **3** un **6** klātbūtnē novēroja, kad piruvāts un malāts tika izmantoti kā substrāti (1.2. C attēls). Iegūtie rezultāti liecināja, ka izoselenazolija sāļi, visticamāk, ietekmē no piruvāta atkarīgo mitohondriālo metabolismu.

Lai noteiktu, vai novērotie izoselenazolija sāļu efekti saistīti ar ietekmi uz metabolisko ceļu, atkarīgu no piruvāta, bet ne ar tiešu CI kavēšanu, mitohondriju funkciju permeabilizētās krūts vēža šūnās (4T1) novērtēja savienojumu **3**, **6** un **7** klātbūtnē ($1 \mu M$). Lai gan tikai savienojums **6** samazināja skābekļa patēriņu OXPHOS stāvoklī piruvāta un malāta klātbūtnē (1.3. A un E attēls), savienojumi **3** un **6** ievērojami samazināja OXPHOS sajūgšanas efektivitāti (1.3. B attēls). Cita no NADH atkarīga CI substrāta glutamāta pievienošana kompensēja elpošanas samazināšanos piruvāta un malāta klātbūtnē, par to liecināja palielināts glutamāta plūsmas kontroles faktors (raksturo individuāla substrāta/ceļa ieguldījumu ETS darbībā). Tā kā rotenona plūsmas kontroles faktors netika samazināts, rezultāti liecina, ka izoselenazolija sāļi tiešā veidā nekavē CI.



1.2. attēls. No koncentrācijas atkarīgie savienojumu 3 un 6 efekti uz mitohondriālo funkciju permeabilizētās 4T1 šūnās. A) no koncentrācijas atkarīgas izmaiņas mitohondriālās elpošanas ātrumā; B) H₂O₂ ražošanas ātrums; C) H₂O₂/O attiecība OXPHOS stāvoklī CI vai CII substrātu klātbūtnē*

* P – piruvāts; M – malāts; G – glutamāts. Rezultāti ir parādīti kā vidējais ± SD no 3 līdz 5 neatkarīgiem eksperimentiem un ir salīdzināti ar bāzes līniju (pārtrauktā līnija) – pirms savienojuma pievienošanas.



1.3. attēls. Izoselenazolija sāļu 3, 6 un 7 ietekme 1 μM koncentrācijā uz mitohondriālo elpošanu permeabilizētās 4T1 šūnās. A) elpošanas ātrums; B) plūsmas kontroles faktori; C) H₂O₂ ražošanas ātrums; D) H₂O₂/O₂ attiecība; E) reprezentatīvais respirometrijas eksperiments (zaļš – kontrole, DMSO, sarkans – sav. 6); F) H₂O₂ ražošanas ātruma mērījums (gaiši zaļš – kontrole, DMSO, violets – sav. 6)*

* CI – komplekss I; CII – komplekss II; LEAK – elpošanas ātrums nefosforilējošā miera stāvoklī; OXPHOS – oksidatīvas fosforilēšanas stāvoklis; P – piruvāts; M – malāts; G – glutamāts; S – sukcināts; Rot – rotenons, AmA – antimicīns A. OXPHOS sajūgšanas efektivitāte tiek aprēķināta kā 1-elpošanas kontroles attiecība⁻¹. Plūsmas kontroles faktors raksturo individuāla substrāta/metaboliska ceļa ieguldījumu ETS darbībā. Rezultāti ir parādīti kā vidējais ± SD no 3 līdz 4 neatkarīgiem eksperimentiem. Statistiski nozīmīga atšķirība (*) tika uzskatīta, kad p < 0,05 (ANOVA dispersija analīze), salīdzinot ar kontroles grupu (DMSO).

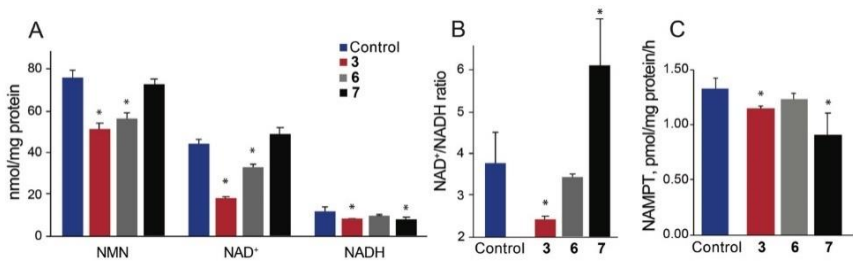
Visi trīs pārbaudītie izoselenazolija atvasinājumi **3**, **6** un **7** izraisīja tūlītēju un būtisku H₂O₂ ražošanas ātruma un H₂O₂/O attiecības palielināšanos no piruvāta atkarīgā OXPHOS stāvoklī (1.3. C, D un F attēls). Visizteiktākā bija savienojuma **6** ietekme uz H₂O₂ ražošanas ātrumu un H₂O₂/O attiecību (attiecīgi pieaugums 2,3 un 2,8 reizes). Kopumā iegūtie rezultāti liecina, ka kondensētie izoselenazolija sāļi kavē no piruvāta atkarīgo mitohondriālo elpošanu un veicina ROS veidošanos.

1.1.3. Ietekme uz NAD⁺ homeostāzi

NAD⁺ un tā metabolīti tiek izmantoti vairākos šūnu procesos, un to līmenis ir kritisks vēža šūnu proliferācijai (Houtkooper et al., 2010; Poljsak, 2016; Zhu et al., 2019; Katsyuba et al., 2020).

Savienojumi **3** un **6** samazināja NMN līmeni MCF-7 šūnās attiecīgi par 33 % un 26 %. Turklāt savienojums **3** būtiski samazināja NAD⁺ un NADH līmeni par 59 % un 33 %, tā rezultātā NAD⁺/NADH attiecība tika samazināta par 38 % (1.4. A un B attēls). Savienojums **6** samazināja NAD⁺ līmeni par 25 %, neietekmējot NADH daudzumu vai NAD⁺/NADH attiecību šūnās. Atšķirībā no savienojuma **6** savienojums **7** samazināja NADH līmeni, neietekmējot NAD⁺ koncentrāciju, un rezultātā palielināja NAD⁺/NADH attiecību. Savukārt NAMPT aktivitāte netika būtiski ietekmēta, un tikai imidazoloizoselenazolija sāls **7** samazināja NAMPT aktivitāti (par 31 %) 2 μM koncentrācijā (1.4. C attēls).

Kopumā šie rezultāti liecina, ka kondensētie izoselenazolija sāļi ietekmē NAD⁺ homeostāzi krūts audzēja šūnās, taču neaizskar esošu NAD⁺ pārstrādi (angl. *salvage pathway*).



1.4. attēls. Izoselenazolijs sāļu 3, 6 un 7 ietekme uz NMN, NAD⁺, NADH līmeņiem un NAMPT aktivitāti MCF-7 šūnās. A) NMN, NAD⁺ un NADH koncentrācijas; B) NAD⁺/NADH attiecība; C) 3, 6 un 7 (2 μM) ietekme uz NAMPT aktivitāti*

* Rezultāti ir parādīti kā vidējais ± SD (n = 6). Statistiski nozīmīga atšķirība (*) tika uzskatīta, kad $p < 0,05$ (ANOVA dispersija analīze), salīdzinot ar kontroles grupu (DMSO).

1.1.4. Poli(ADP-ribozes)polimerāzes 1 inhibējošā aktivitāte

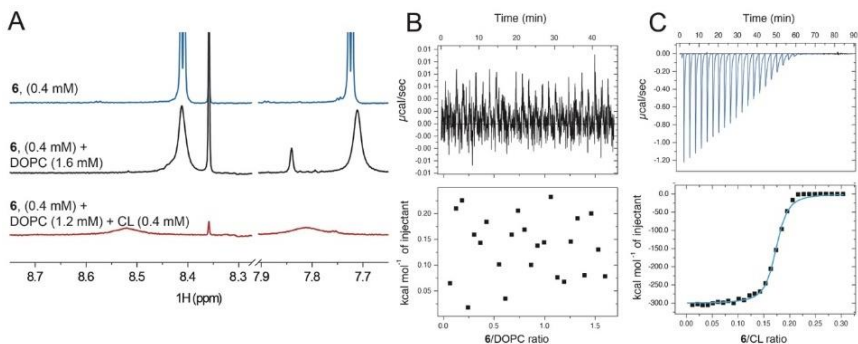
Poli(ADP-ribozes)polimerāzes (PARP) enzīmi tiek aktivizēti pēc pārmērīga DNS bojājuma un dramatiski samazina NAD⁺ līmeni pat līdz 20–30 % no normālā līmeņa. (Houtkooper et al., 2010). Tā kā izoselenazolijs sāļi ietekmēja NAD⁺ homeostāzi, bija svarīgi pārbaudīt, vai tiek modulēta PARP aktivitāte. Pārsteidzoši, tika konstatēts, ka savienojumi 3 un 7 inhibēja PARP1 ar $IC_{50} = 0,970 \pm 0,030$ un $0,880 \pm 0,010$ μM, savukārt savienojums 6 bija visaktīvākais ar $IC_{50} = 0,140 \pm 0,010$ μM. Līdz ar to NAD⁺ koncentrācijas samazināšanās nav saistīta ar PARP1 pārmērīgu aktivāciju.

1.1.5. Mijiedarbība ar kardioliipīnu

Kardioliipīns (CL) ir unikāls fosfolipīds, kas sintezēts un lokalizēts iekšējā mitohondriju membrānā (IMM), kur veido aptuveni 20 % no kopējā IMM fosfolipīdu kopuma. Tagad ir plaši atzīts, ka CL ir svarīga loma mitohondriju membrānas morfoloģijā, stabilitātē, dinamikā un tas nepieciešams vairāku

mitochondriju membrānas proteīnu, piemēram, ETS kompleksu un citohroma c (cyt c), optimālai aktivitātei (Paradies et al., 2019).

Lai pārbaudītu, vai kondensētie izoselenazolija sāļi tiešā veidā mijiedarbojas ar CL, tika noteikta savienojuma **6** mijiedarbība ar CL/1,2-dioleoil-*sn*-glicerol-3-fosfolīna (DOPC) liposomām. Savienojuma **6** spektrā (1.5. A attēls) ir redzami asi protonu signāli ar skaidri atšķiramām spinu mijiedarbībām. DOPC liposomu klātbūtnē savienojuma **6** signāli aromātiskajā reģionā tika paplašināti un spinu mijiedarbības netika atrisinātas. Tas varētu norādīt uz vāju mijiedarbību starp savienojumu **6** un DOPC liposomām vai alternatīvi – rezonanses izmaiņas varētu būt saistītas ar izmainītu molekulāro vidi (liposomu dispersiju). Pārsteidzoši, CL saturošu liposomu klātbūtnē šie signāli tika paplašināti vēl vairāk.



1.5. attēls. Mijiedarbība starp savienojumu **6 un CL. A) savienojuma **6** (augšā), **6** un DOPC (vidū), **6** un DOPC ar CL (apakšā) 600 MHz ¹H KMR spektrs 90 % H₂O/10 % D₂O, D18 HEPES, pH = 7,4 (parādīts palielināts aromātiskais reģions); savienojuma **6** un DOPC (B) un CL/DOPC (C) saistīšanas izoterms un kalorimetriskās titrēšanas līknes**

Šos rezultātus apstiprināja arī dati, kas iegūti ar izotermiskās titrēšanas kalorimetriju (ITC) palīdzību (1.5. B un C attēls). DOPC liposomu titrēšana ar savienojumu **6** neizraisīja nekādu siltuma izdalīšanos, un saistīšanās pazīmes nenovēroja. Turpretī negatīvā siltuma plūsma, kas novērota pēc katras

savienojuma **6** injekcijas, norādīja, ka izoselenazolija katjona-CL mijiedarbību pavadīja entalpijas samazināšanās. Šie rezultāti liecināja, ka savienojums **6** saistās ar kardiolipīnu vienkāršotā mitohondriju membrānas modelī. Tomēr liela enerģijas izdalīšanās, kā arī plašie un asimetriskie pīķi neļāva precīzi noteikt savienojuma **6** saistīšanās afinitāti.

Šajā pētījuma posmā PARP1 un CL identificēti kā potenciālie izoselenazolija sāļu molekulārie mērķi. Lai pārbaudītu PARP1 inhibējošo aktivitāti lielumam savienojumu skaitam, var izmantot komerciāli pieejamu testa komplektu, tomēr precīzas metodes, lai noteiktu savienojumu afinitāti pret CL, nebija. Tāpēc, lai veicinātu progresu darbības mehānisma izpētē, pētījums tika turpināts ar jaunas metodes izstrādi, lai būtu iespējams noteikt savienojumu afinitāti pret CL.

1.2. Jaunā, pret kardiolipīnu specifiskā fluorescējošā marķiera izstrāde

Pētīt saistīšanos ar CL ir svarīgi, meklējot jaunus, uz CL mērķētus mitohondriālo funkciju modulatorus un antibakteriālos līdzekļus, kā arī lai novērtētu zāļu vielu potenciālo mitohondriālo toksicitāti, kuru var izraisīt mijiedarbība ar CL.

Pagājušā gadsimta 80. gadu sākumā tika atklāta fluorescējoša krāsviela 10-*N*-nonilakridīns oranžais (NAO), kuru izmantoja selektīvai CL detektēšanai un mitohondriju vizualizācijai (Mileykovskaya et al., 2001). Tomēr NAO ir būtiski trūkumi, līdz ar to ierobežota izmantošana gan kvantitatīvajā analizē, gan konkurējošās saistīšanas testos. Precīzāk, NAO fluorescences intensitāte ir salīdzinoši zema un nestabila zemas šķīdības dēļ, tam ir zems fotoluminiscences kvantu iznākums (Φ) un neliela fluorescences intensitātes atšķirība starp brīvo NAO un CL-NAO kompleksu.

Cits komerciāli pieejams fluorescējošais marķieris, kas ir specifisks pret CL, ir TTAPE-Me. Tas veido fluorescējošu kompleksu ar CL, taču šī kompleksa fluorescences intensitāte ir ļoti zema (Chen et al., 2015), līdz ar to kvalitatīvu rezultātu iegūšanai ir nepieciešami lieli parauga un marķiera daudzumi. Vēl viens būtisks trūkums ir tas, ka TTAPE-Me saistās ar CL tikai elektrostatiski. Nātrija joni konkurē ar marķieri, tātad TTAPE-Me nav iespējams lietot konkurējošās saistīšanas pētījumos.

Tādēļ ir vajadzīgs stabilāks un jutīgāks marķieris, kuru būtu iespējams lietot CL koncentrācijas mērījumiem, kā arī vienkāršā metode, lai varētu realizēt bioloģiski aktīvo savienojumu skrīningu un kvantitatīvi raksturot saistīšanās afinitāti. Šī iemesla dēļ ir jāuzlabo fluorescējošā marķiera šķīdība, stabilitāte, fotoluminiscences kvantu iznākums un fluorescences intensitāte.

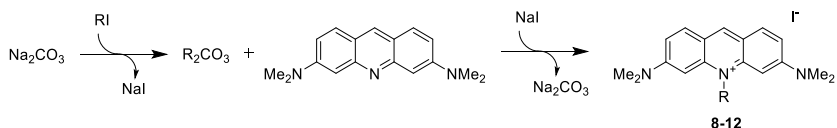
1.2.1. Jaunā, pret kardiolipīnu specifiskā fluorescējošā marķiera sintēze

Lai atrisinātu iepriekš minētās problēmas, pētījums tika vērsts uz NAO fizikoķīmisko īpašību uzlabošanu. Sākumā uzmanība tika pievērsta šķīdības un stabilitātes jautājumiem. Bija zināms, ka N^+ katjonam ir izšķīroša nozīme vielas mijiedarbībā ar CL fosfātu grupām, tajā pašā laikā ir jā saglabā alkilķēdes lipofilitāte, lai savienojums varētu veidot hidrofobas saites ar CL taukskābju ķēdēm (Rodriguez et al., 2008). Acīmredzot NAO hidrofobā alkilķēde negatīvi ietekmē tā šķīdību un šī iemesla dēļ tika modificēta.

Akridīna oranžā (AO) alkilēšana notiek lēni (24–72 stundas), ar zemu konversiju un ar vairāku blakusproduktu veidošanos, ko var izskaidrot ar 3,6- dimetilaminoakridīnija sāļu demetilēšanu ilgstošas karsēšanas laikā. Lai samazinātu reakcijas laiku, tika izmantoti aktīvākie alkilējošie aģenti – *in situ* iegūtie dialkilkarbonāti, sulfāti un trialkilfosfāti, kuri bija pārbaudīti toluolā, ksilolā un dihlorbenzolā attiecīgā šķīdinātāja viršanas temperatūrā. Pārsteidzoši,

tika konstatēts, ka AO kvaternizācija ar 1-bromnonānu vai 1-jodnonānu dihlorbenzolā 170 °C un 2 ekviv. Na₂CO₃ klātbūtnē ļāva palielināt konversiju līdz 91 un 98 % bez ievērojamas demetilētu blakusproduktu veidošanās (1.6. attēls). Šī metode ļāva iegūt dažādus kvaternizētus akrīdīnija sāļus ar labiem iznākumiem un augstu tīrības pakāpi (≥ 96,5 %, AEŠH).

Lai palielinātu fluorescējošā marķiera šķīdību ūdens vidē, nezaudējot lipofilitāti, tika izmantots (3-jodpropil)trimetilsilāns. Iegūtajam akrīdīnija atvasinājumam **12** ar 3-(trimetilsilil)propilgrupu bija piecas reizes lielāka šķīdība 20 mM HEPES (pH = 7,4) buferī, salīdzinot ar NAO, un labāka stabilitāte 24 stundu laikā. Turklāt 3-(trimetilsilil)propilgrupas ieviešana nedaudz palielināja Φ, salīdzinot ar NAO (attiecīgi 18,7 % un 15,5 %), bet, neskatoties uz to, ka Φ pieaugums bija neliels, fluorescences intensitāte (FI) palielinājās par ~ 30 %.



1.6. attēls. Savienojumu 8–12 sintēze*

* Reakcijas apstākļi: alkiljodīds, dihlorbenzols, 170 °C, Na₂CO₃ (2 ekviv.).

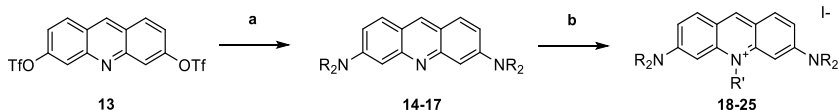
8, R = metil, 98 %; **9**, NAO, R = nonil, 77 %; **10**, R = dodecil, 76 %;

11, R = 3-(trimetilsilil)propil, 97 %; **12**, R = 3- silatranilpropil, 14 %.

Ir pierādīts, ka azetidīnīlgrupas ieviešana līdzīgās heterocikliskās sistēmās ievērojami palielina Φ, iespējams, kavējot C_{aril}–N saites pagriešanu un traucējot izgriezta iekšmolekulāra lādiņa pārnese stāvokļa veidošanai (Grimm et al., 2015). Lai to apstiprinātu, dimetilaminogrupas 3. un 6. pozīcijās akrīdīnija sāls struktūrā tika aizstātas ar cikliskām aminogrupām.

Savienojumi **14–17** tika sintezēti no savienojuma **13**, izmantojot pallādija katalizēto šķērsametināšanas reakciju ar cikliskajiem amīniem. Tālāk tie tika kvaternizēti, izmantojot iepriekš izstrādāto metodi ar atbilstošu alkiljodīdu nātrija karbonāta klātbūtnē, lai iegūtu akridīnija jodīdus **18–25** (1.7. attēls).

Kā jau bija gaidāms, AO analogi **18–20** ar azetidīnīlgrupām uzrādīja četras reizes augstāku Φ ($> 60\%$) nekā NAO (1.2. tabula). Ar pirolidīnu aizvietotais akridīnija sāls **23** uzrādīja vidēju Φ (40%), bet akridīnija sāļiem ar piperidil- un morfolilgrupām **24** un **25** bija ļoti zems Φ , attiecīgi $2,7\%$ un $6,8\%$.











1.7. attēls Akridīnija sāļu **18–25** sintēze*

* Reakciju apstākļi: a) cikliskais amīns (3 ekv.), Pd(OAc)₂ (25 mol-%), BINAP (30 mol-%), Cs₂CO₃ (4 ekv.), ksilols, viršanas temperatūrā, 16h; b) R'-I, Na₂CO₃, dihlorbenzols vai toluols, viršanas temperatūrā, 10–40 min.

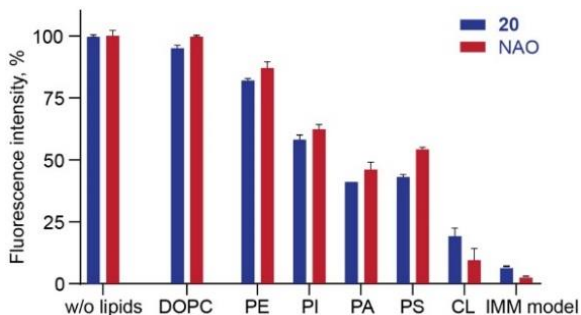
14, NR₂ = azetidīnīl, 69 %; **15**, NR₂ = pirolidīl, 54 %; **16**, NR₂ = piperidīl, 65 %; **17**, NR₂ = morfolil, 67 %; **18**, NR₂ = azetidīnīl, R' = CH₃, 75 %; **19**, NR₂ = azetidīnīl, R' = CD₃, 89 %; **20**, NR₂ = azetidīnīl, R' = Me₃Si(CH₂)₃, 61 %; **21**, NR₂ = azetidīnīl, R' = C₉H₁₉, 76 %; **22**, NR₂ = azetidīnīl, R' = C₁₂H₂₅, 54 %; **23**, NR₂ = pirolidīl, R' = Me₃Si(CH₂)₃, 98 %; **24**, NR₂ = piperidīl, R' = Me₃Si(CH₂)₃, 59 %; **25**, NR₂ = morfolil, R' = Me₃Si(CH₂)₃, 63 %.

Atvasinājumiem ar azetidīnīlgrupām un metil- vai 3-(trimetilsilil)propilgrupu 10. pozīcijā bija visaugstākais Φ , bet alkilķēdes pagarinājums to samazināja. Tāpēc turpmākiem pētījumiem tika izvēlēti akridīnija jodīdi **18** un **20**.

NAO analoģu fotoluminiscentās īpašības

Savienojums	R	R'	Φ , %	$\lambda_{\text{abs}}/\lambda_{\text{em}}$, nm
9 (NAO)	Me ₂ N	C ₉ H ₁₉	15,5	497/529
12	Me ₂ N	Me ₃ Si(CH ₂) ₃	18,7	491/529
18		CH ₃	59,9	498/529
19		CD ₃	61,5	498/529
20		Me ₃ Si(CH ₂) ₃	60,7	497/529
21		C ₉ H ₁₉	47,9	498/529
22		C ₁₂ H ₂₅	16,1	496/529
23		Me ₃ Si(CH ₂) ₃	40,0	511/529
24		Me ₃ Si(CH ₂) ₃	2,7	484/547
25		Me ₃ Si(CH ₂) ₃	6,8	488/547

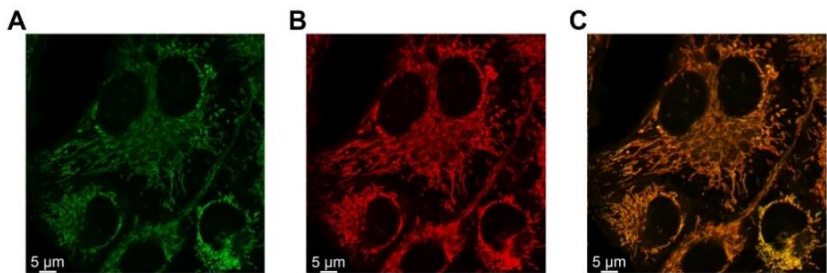
Kā bija paredzēts, *N*-metil aizvietots diazetidinilakridīnija jodīds **18** bez hidrofobās alkilķēdes nespēj izveidot stabilu kompleksu ar CL, ko apstiprināja FI palielinājums par 13 % 10 min. laikā pēc savienojuma pievienošanas pie CL. Savukārt savienojuma **20** un tā kompleksa ar CL fluorescences intensitāte buferšķīdumā bija stabila vismaz 30 min. atšķirībā no NAO. Šo faktu varētu izskaidrot ar aptuveni piecas reizes labāku šķīdību (0,188 mg/ml pret 0,041 mg/ml NAO gadījumā). Ir svarīgi atzīmēt, ka savienojums **20**, tāpat kā NAO, saistījās ar CL specifiski (1.8. attēls).



1.8. attēls. Savienojuma 20 un NAO mijiedarbība ar fosfolipīdiem

Turklāt savienojums **20** tika veiksmīgi izmantots mitohondriju vizualizācijai dzīvās šūnās (1.9. attēls). Salīdzinājumam, mitohondriji tika iekrāsoti ar komerciāli pieejamu krāsvielu *MitoTracker Deep Red*, lai apstiprinātu savienojuma **20** mitohondriālo lokalizāciju. Savienojuma **20** fluorescentais signāls precīzi pārklājās ar *MitoTracker Deep Red* signālu un būtiski nepārklājās ar citiem organoīdiem.

Līdz ar to savienojums **20** tika izvēlēts kā fluorescējošais marķieris CL kvantitatīvajai analīzei un konkurējošas saistīšanās testa izstrādei, lai noteiktu bioloģiski aktīvo vielu saistīšanās afinitāti pret CL.

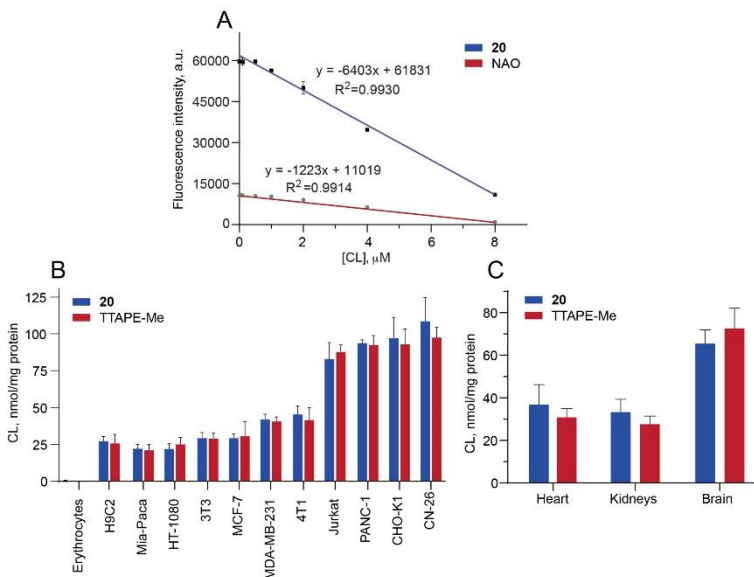


1.9. attēls. A) savienojuma **20** (100 nM) lokalizācija cilvēka melanomas šūnās (A2058); B) mitohondriji A2058 šūnās, iekrāsoti ar *MitoTracker Deep Red* (200 nM); C) reprezentatīvs savienojuma **20** un *MitoTracker Deep Red* kolokalizācijas attēls

1.2.2. Kardioliipīna kvantitatīvā analīze

Vispirms tika veikta CL kvantitatīvā analīze CL/DOPC liposomālajā modelī: savienojumu **20** titrēja ar CL 0,05–8 μM koncentrācijās, iegūstot lineāru ($R^2 = 0,9930$) regresijas līkni (1.10. A attēls). Tā kā CL atrodas galvenokārt mitohondrijos, izmantojot kalibrēšanas līknes, iegūtas ar liposomāliem CL šķīdumiem, CL daudzums tika noteikts mitohondriālās frakcijās, izolētās no dažādām šūnu līnijām. Kā negatīvu kontroli izmantoja cilvēka eritrocītu lizātu, jo cilvēka eritrocītos nav mitohondriju un tie nesatur CL. Paralēli CL koncentrācija tika noteikta ar TTAPE-Me un iegūtie rezultāti salīdzināti ar rezultātiem, iegūtiem ar savienojumu **20**, izmantojot Stjūdenta t-testu (1.10. B attēls). Visās pārbaudītajās šūnu līnijās netika konstatētas statistiski nozīmīgas atšķirības starp rezultātiem, iegūtiem ar savienojumu **20** vai TTAPE-Me ($p > 0,37$, Stjūdenta t-tests). Turklāt CL netika konstatēts eritrocītos, tādējādi apstiprinot savienojuma **20** selektivitāti pret CL.

Kardiomioblasti (H9C2) ir bagāti ar mitohondrijiem un satur relatīvi lielu CL daudzumu ($26,6 \pm 3,7$ nmol/mg prot.). Pārsteidzoši, vēža šūnu līnijās un šūnu līnijās ar augstu proliferācijas ātrumu tika atrasts salīdzināms vai pat lielāks CL daudzums.



1.10. attēls. **A)** 20 un NAO (16 μM) titrēšana ar CL/DOPC liposomām 20 mM HEPES buferī, pH = 7,4; **B)** CL koncentrācijas mitohondriālās frakcijās, izolētas no šūnu lizātiem; **C)** CL koncentrācijas mitohondriālās frakcijās, izolētas no C57Bl/6J peļu audu homogenātiem*

* n = 3–5. Visos gadījumos $p > 0,05$ (Stjudenta t-tests).

Visaugstākā CL koncentrācija ($108,5 \pm 16,0$ nmol/mg prot.) starp pētītajām šūnu līnijām tika konstatēta peles resnās zarnas karcinomas šūnu mitohondrijos (CT-26), kas atbilst ziņojumam par paaugstinātu CL līmeni resnās zarnas vēža gadījumā (Zichri et al., 2021).

Nākamais solis bija pierādīt, vai ir iespējams izmērīt CL koncentrāciju mitohondriālās frakcijās, kas izolētas no dzīvnieku audiem. Mitohondriālās frakcijas tika izolētas no veselu C57Bl/6J peļu sirds, nieru un smadzeņu audu homogenātiem, un CL koncentrācijas tika noteiktas ar iepriekš aprakstīto metodi (1.10. C attēls). Šajā gadījumā arī netika konstatētas statistiski nozīmīgas atšķirības starp CL koncentrācijām, kas iegūtas ar savienojuma 20 vai TTAPE-Me palīdzību ($p > 0,44$, Stjudenta t-tests). Peļu sirds un nieru mitohondriji

saturēja līdzīgu CL daudzumu ($37,49 \pm 8,69$ un $33,95 \pm 5,32$ nmol/mg prot.). Iepriekš publicētajos datos (Grevengoed et al., 2015; Pennington et al., 2019) secināts, ka CL koncentrācijas peles sirds mitohondrijos ir zemākas ($15\text{--}20$ nmol/mg prot.), un to var izskaidrot ar iespējamiem CL zudumiem ekstrakcijas un atdalīšanas laikā. Interesanti, ka CL koncentrācija peļu smadzeņu mitohondrijos ($66,11 \pm 5,78$ nmol/mg prot.) bija gandrīz divreiz augstāka nekā sirdī un nierēs. Iegūtā vērtība bija nedaudz augstāka par iepriekš ziņoto ($52,7 \pm 4,5$ nmol/mg prot.) (Kiebish et al., 2009), ko arī var izskaidrot ar lipīdu ekstrakcijas soli pirms CL noteikšanas vai CL līmeņa svārstībām starp dažādām peļu sugām.

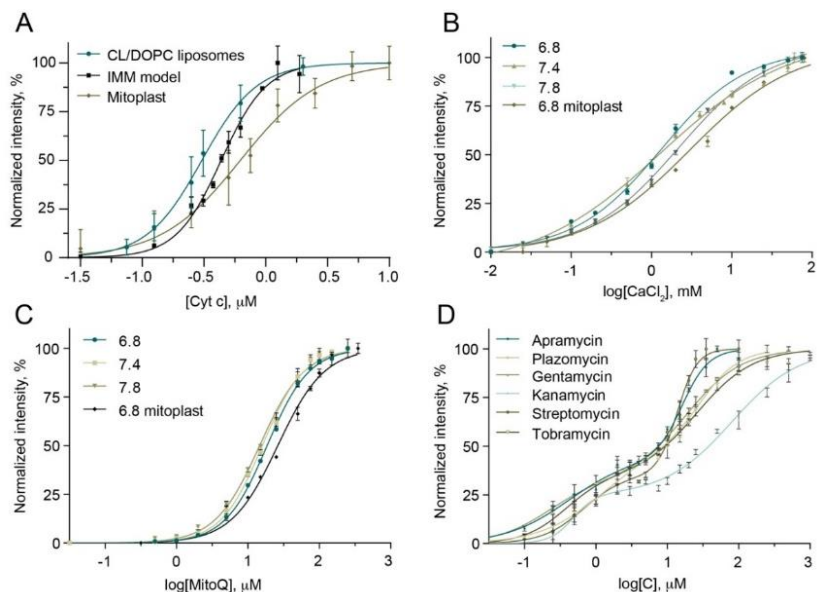
Apkopojot iegūtos datus, secināts, ka sintezētā fluorescējošā krāsvielā **20** ir piemērota ātrai un vienkāršai CL koncentrācijas noteikšanai mitohondriālās frakcijās, kas izolētas no šūnu kultūrām un dzīvnieku audiem. Vislielākā priekšrocība ir vienkārša eksperimentālā procedūra, jo lipīdu ekstrakcija un atdalīšana nav nepieciešama un ir vajadzīga tikai 15 minūšu inkubācija un viens emisijas mērījums, kas nodrošina skaidru un stabilu signālu. Lai gan izstrādātā metode ļauj kvantitatīvi noteikt kopējo CL daudzumu, tās ierobežojums ir nespēja atšķirt CL molekulas ar dažādām alkilķēdēm.

1.2.3. Uz fluorescenci balstīta konkurējošās saistīšanās metode

Eksperimentālās procedūras izstrādei un optimizēšanai tika izvēlēti dabīgs CL ligands, citohroms c (cyt c) un CL/DOPC liposomas (25:75 mol %). Vislabākais signāls tika iegūts, ja savienojums **20** un CL tika izmantoti attiecībā 2:1, attiecīgi 5 un 2,5 μM koncentrācijās. Cyt c uzrādīja augstu afinitāti pret CL, un pie $\text{pH} = 7,4$ EC_{50} vērtība bija vienāda ar $0,32 \pm 0,06$ μM (1.11. A attēls).

Līdzīga EC_{50} vērtība ($0,44 \pm 0,02$ μM) tika iegūta eksperimentos sarežģītākā IMM modelī (PI, CL, PE un DOPC, 10:25:30:35 mol %). Tāpēc

savienojumu skrīninga nolūkos kā vienkāršāks un lētāks mākslīgās membrānas modelis tika izvēlētas CL/DOPC liposomas.



1.11. attēls. **A) cyt c saistīšanās ar CL CL/DOPC liposomās, IMM modeli un mitoplastos; B) reprezentatīvas līknes, kur parādīta CaCl_2 (B) un MitoQ (C) saistīšanās ar CL CL/DOPC liposomās un mitoplastos; D) aminoglikozīdu saistīšanās ar CL CL/DOPC liposomās**

Veiksmīgi tika lietoti dabīgo lipīdu membrānu reprezentējošie mitoplasti, kas bija izolēti no žurkas sirds. Šajā gadījumā cyt c bija aptuveni divas reizes augstāka EC_{50} vērtība ($0,78 \pm 0,15 \mu\text{M}$), ko var izskaidrot ar iespējamu mijiedarbību ar citiem IMM komponentiem, piemēram, membrānu proteīniem vai citiem lipīdiem. Pēc tam cyt c afinitāte pret CL tika noteikta ar dažādām pH vērtībām, kas atbilst mitohondriju starpmembrānu telpas (6,8), citosola (7,4) un mitohondriju matricas (7,8) pH (Santo-Domingo un Demarex, 2012). Iegūtie dati parādīja, ka cyt c afinitāte pret CL nav atkarīga no vides pH.

Ņemot vērā to, ka cyt c ir augsta un no pH neatkarīga afinitāte pret CL, kā arī tā komerciālo pieejamību, cyt c tika izvēlēts kā references savienojums. Lai validētu izstrādāto metodi, tika izpētīti vairāki ligandi (1.11. B–D attēls un 1.3. tabula).

1.3. tabula

Savienojumu relatīva afinitāte pret CL

Modelis	EC ₅₀ , μM			Mitoplasti 6,8
	CL/DOPC 6,8	CL/DOPC 7,4	CL/DOPC 7,8	
pH				
Neorganiskie sāļi				
MgCl ₂	1141 ± 122	1102 ± 66	1300 ± 94	1576 ± 190
Zn glikonāts	683 ± 111	736 ± 37	344 ± 32	792 ± 125
CaCl ₂	1285 ± 129	1334 ± 101	1701 ± 154	2703 ± 246
NH ₄ Cl	14849 ± 2002; 88827 ± 3392	14270 ± 165; 45130 ± 153	9170 ± 149; 82020 ± 130	4930 ± 107; 68290 ± 810
NaCl	> 100000	> 100000	> 100000	> 100000
HgCl ₂	q	q	q	q
Savienojumi, kas ietekmē mitohondriālās funkcijas				
Cyt c	0,26 ± 0,02	0,32 ± 0,06	0,33 ± 0,06	0,78 ± 0,15
NonilTPP	36,65 ± 2,93	19,76 ± 0,75	28,82 ± 1,02	43,31 ± 3,87
MitoQ	19,55 ± 1,67	15,92 ± 0,87	17,06 ± 0,17	30,67 ± 5,14
Metformīns	> 500	> 500	> 500	n.p.
Timerosāls	> 500	> 500	> 500	n.p.
Aciklovīrs	> 500	> 500	> 500	n.p.
Abakavīrs	> 500	> 500	> 500	n.p.
Antimicīns A	q	q	q	n.p.
CCCP	q	q	q	n.p.
Antibiotikas				
Vankomicīns	796 ± 47	434 ± 62	346 ± 21	1732 ± 29
Rifampicīns	q	q	q	n.p.
Ampicilīns Na	> 500	> 500	> 500	n.p.
Dodeciltrimetil- amonija hlorīds	74,41 ± 8,47	30,71 ± 2,75	23,16 ± 2,74	69,20 ± 3,67
Apramicīns	0,85 ± 0,04; 102,5 ± 1,5	0,63 ± 0,21; 14,54 ± 0,59	0,58 ± 0,04; 27,87 ± 2,70	2,79 ± 0,31; 593 ± 76
Gentamicīns	1,04 ± 0,09; 384 ± 18	0,22 ± 0,03; 19,19 ± 1,44	0,38 ± 0,05; 24,15 ± 3,90	1,83 ± 0,69; 298 ± 55

1.3. tabulas turpinājums

EC ₅₀ , μM				
Modelis	CL/DOPC	CL/DOPC	CL/DOPC	Mitoplasti
pH	6,8	7,4	7,8	6,8
Antibiotikas				
Streptomicīns	1,22 ± 0,20; 87,5 ± 6,2	0,60 ± 0,15; 14,15 ± 2,17	0,89 ± 0,12; 16,28 ± 2,83	2,33 ± 0,05; 155 ± 69
Tobramicīns	n.p.	0,40 ± 0,16; 26,16 ± 2,79	n.p.	n.p.
Kanamicīns	n.p.	0,44 ± 0,10; 80,1 ± 13,5	n.p.	n.p.
Plazomicīns	n.p.	1,13 ± 0,46; 29,4 ± 4,2	n.p.	n.p.

* n.p. – nav pārbaudīts, q – pētāmais savienojums samazina savienojuma **20** fluorescences intensitāti.

Kopumā metode tika validēta, pārbaudot 25 dažādas dabas vielas – neorganiskos sāļus, peptīdu, glikopeptīdu, polikatjonu cukurus, lipofilus, fosfonija un amonija sāļus, guanīna un guanidīna grupu saturošas zāles un citas vielas. Izstrādātajai metodei nav nepieciešamas speciālās iekārtas, izņemot fluorimetru, un tā ir ātra, ļaujot šo testu izmantot liela savienojumu skaita skrīningam. Apkopojot iegūtos datus, tika novērots, ka pozitīvi lādētām vielām ir tendence saistīties ar CL, taču to afinitāte var ievērojami atšķirties; EC₅₀ vērtības var svārstīties no submikromolārām līdz milimolārām koncentrācijām. Fluorescējošā marķiera mijiedarbība ar pētāmajiem savienojumiem, piemēram, smago metālu joniem, ir analīzes ierobežojums; tāpēc, lai izvairītos no rezultātu nepareizas interpretācijas, vienmēr jāveic kontroles titrēšana bez CL.

1.2.4. Izoselenazoliņa sāļu afinitāte pret kardioliipīnu

Beidzot pēc jaunās metodes izstrādes bija iespējams noteikt izoselenazoliņa sāļu afinitāti pret CL. Neraugoties uz iepriekšējiem ITC datiem, kas liecināja par skaidru eksotermisku mijiedarbību starp savienojumu **6** un CL saturošām liposomām, ar jauno metodi iegūtas savienojumu **3** un **6** EC₅₀ vērtības

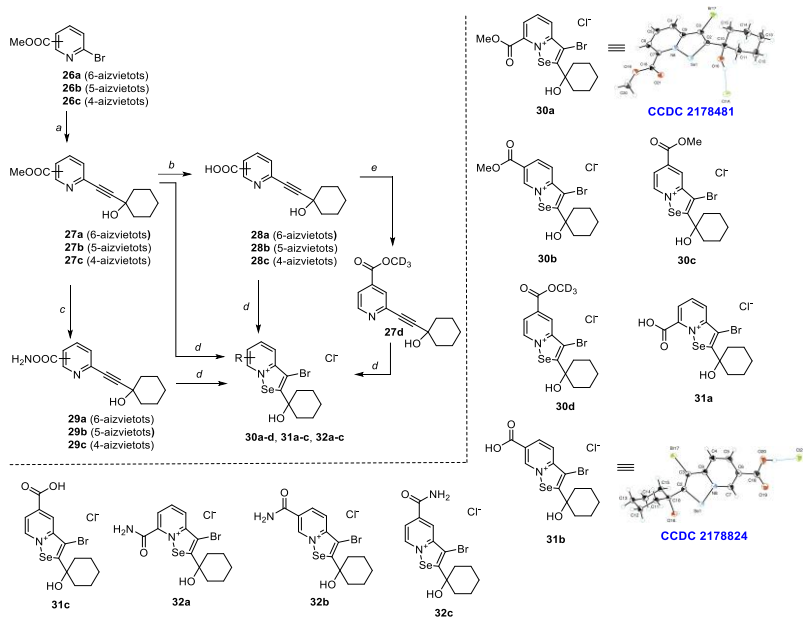
CL/DOPC modelī bija augstākas par 500 μM . Tas nozīmē, ka šo savienojumu afinitāte pret CL ir zema un to ietekmi uz mitohondriālo elpošanu un kopējo citotoksisko aktivitāti nevar izskaidrot ar mijiedarbību ar CL. Tādēļ tika nolemts modificēt izoselenazolija sāļu struktūru un fokusēt pētījumu uz mitohondriālo elpošanu, atkarīgu no piruvāta, NAD^+ metabolismu un PARP1 inhibējošo aktivitāti.

1.3. Izoselenazolija sāļu otrā paaudze un tās darbības mehānisms

1.3.1. Jauno izoselenazolija atvasinājumu sintēze

Sākotnējais plāns bija izveidot savienojumus, kuri atgādinātu PARP1 substrātu NAD^+ , ievadot nikotīnamīda daļu izoselenazolopiridīnija struktūrā, kā arī izpētīt amīda, karboksilgrupas un metilestera grupas ietekmi uz citotoksicitāti (1.12. attēls).

Sintēze tika sākota no α -brompiridīniem **26a–c**, kuri tika apstrādāti ar 1- etinilcikloheksan-1-olu pallādija katalizatora klātbūtnē, kas ļāva iegūt etinilaizvietotus atvasinājumus **27a–c** ar augstiem iznākumiem.



1.12. attēls. Izoselenazolopiridīnija hlorīdu **30a–e**, **31a–c** un **32a–c** sintēze*

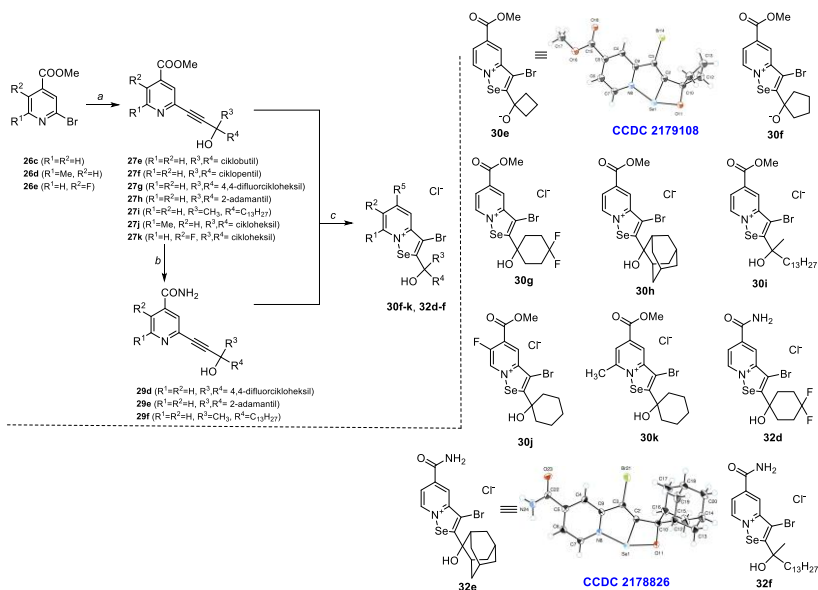
- * Reakciju apstākļi: a) terminālais acetilēns (1,4 ekv.), CuI (0,01–0,05 ekv.), (Ph₃P)₂PdCl₂ (0,01–0,05 ekv.), DMF/iPr₂NH vai Et₃N, 50 vai 80 °C, 2–5 st;
 b) 1. NaOH (5 ekv.), 2. HCl, MeOH/H₂O, ist. t., 16 h; c) NH₃, MeOH, ist. t., 16 h;
 d) SeBr₄, dioksāns/ūdens, it; e) CD₃OD, EDC·HCl, HOBT·H₂O, DMF, ist. t., 2 h.

Attiecīgas karbonskābes tika iegūtas, hidrolizējot esterus **28a–c** sārmainā vidē, bet amīdi **29a–c** tika sintezēti, apstrādājot savienojumus **27a–c** ar piesātinātu NH₃ metanola šķīdumu. Metil-d₃ 2-((1-hidroksicikloheksil)ethinil)izonikotināts (**27d**) tika iegūts, esterificējot attiecīgu karbonskābi **28c** ar CD₃OD dimetilformamīdā HOBT hidrāta un EDC·HCl klātbūtnē.

Pēc visu etinilpiridīnu atvasinājumu iegūšanas attiecīgie izoselenazolijs sāļi tika sintezēti, balstoties uz iepriekš izstrādāto metodi (Arsenyan et al., 2015). Etinilpiridīnus **27a–d**, **28a–c** un **29a–c** apstrādāja ar *in situ* pagatavotu SeBr₄, kas tika iegūts, izšķīdinot selēna(IV) oksīdu koncentrētā bromūdeņražskābē

dioksāna/ūdens maisījumā. Pēc reakcijas beigām jēlmateriāls tika izšķīdināts etanola/ūdens maisījumā un veikta jonu apmaiņa, izmantojot jonapmaiņas sveķus, kas iepriekš apstrādāti ar sālsskābi, lai iegūtu izoselenazolopiridīnija hlorīdus **30a–d**, **31a–c** un **32a–c**. Tomēr 2-(1-hidroksicikloheksil)etil)nikotīnskābes, kā arī tās amīda un metilestera atvasinājumu reakcijas ar SeBr₄ bija neveiksmīgas, produkti veidojās niecīgā daudzumā, un tos nebija iespējams izdalīt no reakcijas maisījuma.

Balstoties uz sākotnējiem struktūras-aktivitātes likumsakarības (SAR) datiem, cikloheksilgrupa 2. pozīcijā tika aizstāta ar ciklobutil-, ciklopentil-, 1-adamantil-, tridecil- un 4',4'-difluorcikloheksilgrupām. Izoselenazolopiridīnija hlorīdi **30f–k**, **32d–f** tika sintezēti līdzīgi iepriekšējai savienojumu grupai (1.13. attēls). Savienojumus **30j** un **30k** sintezēja, par izejmateriālu izmantojot metil- un fluor- aizvietotus α -brompiridīnus. Savienojumu **30a** (CCDC 2178481), **30e** (CCDC 2179108), **31b** (CCDC 2178824) un **32e** (CCDC 2178826) molekulārās struktūras tika viennozīmīgi apstiprinātas ar rentgenstrukturālas analīzes datiem.



1.13. attēls. Izoselenazolopiridīnija hlorīdu **30f–k** un **32d–f** sintēze*

* Reakciju apstākļi: a) terminālais acetilēns (1,4 ekv.), CuI (0,01–0,05 ekv.), $(Ph_3P)_2PdCl_2$ (0,01–0,05 ekv.), DMF/ iPr_2NH vai Et_3N , 50 vai 80 °C, 2–5 h; b) NH_3 , MeOH, ist. t., 16 h; c) $SeBr_4$, dioksāns/ūdens, ist. t.

1.3.2. Jauno izoselenazolija sāļu citotoksicitāte

Jaunu izoselenazolija sāļu citotoksicitāte tika pārbaudīta uz cilvēka un peles krūts vēža šūnām (MCF-7, MDA-MB-231, 4T1), T šūnu leukēmijas (Jurkat), cilvēka hepatocelulārās karcinomas (HCC1937) un cilvēka plaušu adenokarcinomas (A549) šūnām, un dati ir apkopoti 1.4. tabulā. Tā kā jaunās vielas varēja ietekmēt mitochondriālās funkcijas, žurku kardiomioblasti (H9C2) tika izvēlēti kā normālā šūnu līnija, jo tie satur lielu mitochondriju skaitu (Kuznetsov et al., 2015) un tos plaši izmanto mitochondriālās toksicitātes noteikšanai *in vitro* (Kim un Choi, 2021).

Savienojumu 30b–32f citotoksicitāte pret vēža šūnu līnijām un kardiomioblastiem

Citotoksicitāte, IC ₅₀ , μM							
Savienojums	H9C2	Jurkat	MCF7	HCC1937	A549	MDA-MB-231	4T1
Doksrubicīns	3,90 ± 0,60	0,32 ± 0,08	0,47 ± 0,14	1,08 ± 0,10	0,23 ± 0,07	0,41 ± 0,08	0,065 ± 0,008
30b	0,89 ± 0,27	0,25 ± 0,06	0,87 ± 0,29	0,31 ± 0,11	1,31 ± 0,20	0,43 ± 0,14	0,70 ± 0,18
30c	2,46 ± 0,60	0,44 ± 0,25	1,16 ± 0,09	0,33 ± 0,03	1,30 ± 0,23	0,51 ± 0,15	0,32 ± 0,03
30d	0,64 ± 0,28	0,49 ± 0,06	0,38 ± 0,09	0,54 ± 0,02	1,20 ± 0,46	0,40 ± 0,11	1,11 ± 0,04
30e	2,97 ± 0,22	3,24 ± 0,49	2,80 ± 0,75	3,03 ± 0,40	9,12 ± 1,42	6,51 ± 0,67	> 10
30f	0,77 ± 0,14	0,48 ± 0,22	0,36 ± 0,13	0,41 ± 0,13	8,70 ± 1,43	1,66 ± 0,35	2,04 ± 0,60
30g	1,06 ± 0,03	0,48 ± 0,27	0,28 ± 0,13	0,24 ± 0,10	1,16 ± 0,25	0,48 ± 0,13	1,48 ± 0,44
30h	4,76 ± 0,18	6,18 ± 0,16	6,87 ± 0,75	2,89 ± 0,37	n.p.	n.p.	n.p.
30i	3,63 ± 0,38	3,38 ± 0,30	3,79 ± 0,57	2,45 ± 0,43	n.p.	n.p.	n.p.
30j	1,68 ± 0,36	1,16 ± 0,19	1,08 ± 0,02	1,19 ± 0,27	2,93 ± 0,47	1,38 ± 0,40	2,34 ± 0,51
30k	0,90 ± 0,24	0,45 ± 0,11	0,30 ± 0,18	0,34 ± 0,05	1,12 ± 0,26	0,37 ± 0,14	0,96 ± 0,14
31b	3,55 ± 0,18	3,26 ± 0,54	> 10	3,85 ± 0,61	n.p.	n.p.	n.p.
31c	7,82 ± 0,19	6,61 ± 2,15	> 10	5,82 ± 0,72	7,03 ± 0,10	6,12 ± 0,47	6,81 ± 0,33
32a	2,63 ± 0,44	1,88 ± 0,42	3,85 ± 0,41	1,33 ± 0,30	n.p.	n.p.	n.p.
32b	1,27 ± 0,13	0,60 ± 0,25	2,30 ± 0,87	1,50 ± 0,34	n.p.	n.p.	n.p.
32c	1,41 ± 0,17	1,00 ± 0,15	2,22 ± 0,57	0,60 ± 0,25	2,81 ± 0,58	1,15 ± 0,20	1,41 ± 0,28
32d	1,41 ± 0,26	1,43 ± 0,36	1,00 ± 0,08	0,60 ± 0,25	3,17 ± 0,23	1,36 ± 0,18	1,25 ± 0,08
32e	0,91 ± 0,25	0,91 ± 0,29	0,61 ± 0,04	0,74 ± 0,26	2,21 ± 0,36	0,65 ± 0,21	0,56 ± 0,02
32f	1,91 ± 0,55	2,00 ± 0,25	1,01 ± 0,08	0,91 ± 0,10	3,72 ± 0,40	2,42 ± 0,18	4,32 ± 0,73

* Rezultāti ir parādīti kā vidējais ± SD no 3 līdz 5 neatkarīgiem eksperimentiem.

n.p. – nav pārbaudīts.

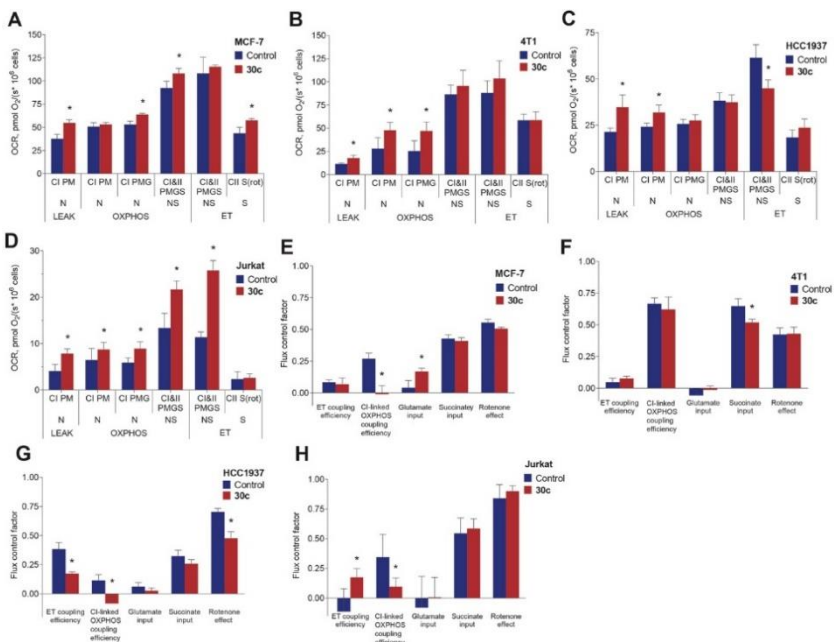
Karboksilgrupa izoselenazolopiridīnija gredzenā (savienojumi **31c** un **31b**) samazināja citotoksicitāti un selektivitāti pret vēža šūnām, iespējams, sliktās biopieejamības dēļ. Savienojumi **30a** un **31a** tika izslēgti no tālākiem pētījumiem sliktās savienojumu šķīdības ūdenī dēļ. Atvasinājumi ar metoksikarbonil- vai amīda grupu 5. vai 6. pozīcijā uzrādīja augstu citotoksicitāti pret vairākām vēžu šūnu līnijām. Īpaši jāmin savienojums **30c** ar metoksikarbonilgrupu 5. pozīcijā, kuram bija vislabākā citotoksicitāte. Savukārt fluora atoma ievadīšana 6. pozīcijā vai metilgrupas ievadīšana 7. pozīcijā samazināja selektivitāti pret vēža šūnām.

Tālāk tika modificēti aizvietotāji 2. pozīcijā un secināts, ka liela izmēra (adamantil) un lipofilie (2-hidroksimpentadekān-2-il) aizvietotāji samazina citotoksicitāti un/vai selektivitāti pret vēža šūnām. Tika konstatēts, ka optimālais aizvietotājs bija 1-hidroksicikloheksilgrupa un hidroksicikloalkāniem ar mazāku oglekļa atoma skaitu bija zemāka citotoksicitāte.

Savienojumi **30g** un **30f** uzrādīja labus rezultātus citotoksicitātes testos, toties savienojums **30c** bija visselektīvākais un uzrādīja visaugstāko citotoksisko aktivitāti pret plašu vēža šūnu līniju spektru. Tādējādi savienojums **30c** tika izvēlēts padziļinātai darbības mehānisma izpētei.

1.3.3. Ietekme uz mitohondriālo elpošanu, ROS veidošanos un elektronu transporta ķēdes sajūgšanas stāvokli

Savienojuma **30c** ietekme uz mitohondriālo elpošanu tika pētīta HCC1937, MCF-7, 4T1 un Jurkat šūnās ar augstas izšķirtspējas fluororespirometriju. Iegūtie rezultāti apkopoti 1.14. attēlā.



1.14. attēls. Savienojuma 30c (1 μM) ietekme uz mitohondriālo elpošanu. Elpošanas parametri permeabilizētās (A) MCF-7, (B) 4T1, (C) HCC1937, (D) Jurkat šūnās. Plūsmas kontroles faktori permeabilizētās (E) MCF-7, (F) 4T1, (G) HCC1937, (H) Jurkat šūnās*

* OCR – skābekļa patēriņa ātrums, CI – kompleks I; CII – kompleks II; LEAK – no fosforilēšanas neatkarīgs miera stāvoklis; OXPHOS – oksidatīvas fosforilēšanas stāvoklis; ET – elektronu transports atjūgtā stāvoklī; P – piruvāts; M – malāts; G – glutamāts; S – sukcināts; N – NADH ražojošie substrāti; NS – NADH un sukcinātu ražojošie substrāti; rot – rotenons. Statistiski nozīmīga atšķirība (*) tika uzskaitīta, kad $p < 0,05$ (Stjudenta t-tests), salīdzinot ar kontroles grupu (DMSO).

Mitohondriālā metabolisma aktivitāte šajās šūnu līnijās būtiski atšķirās, un maksimālais skābekļa patēriņa ātrums (OCR) bija dilstošā secībā: MCF-7 > 4T1 > HCC1937 > Jurkat (1.14. A–D attēls).

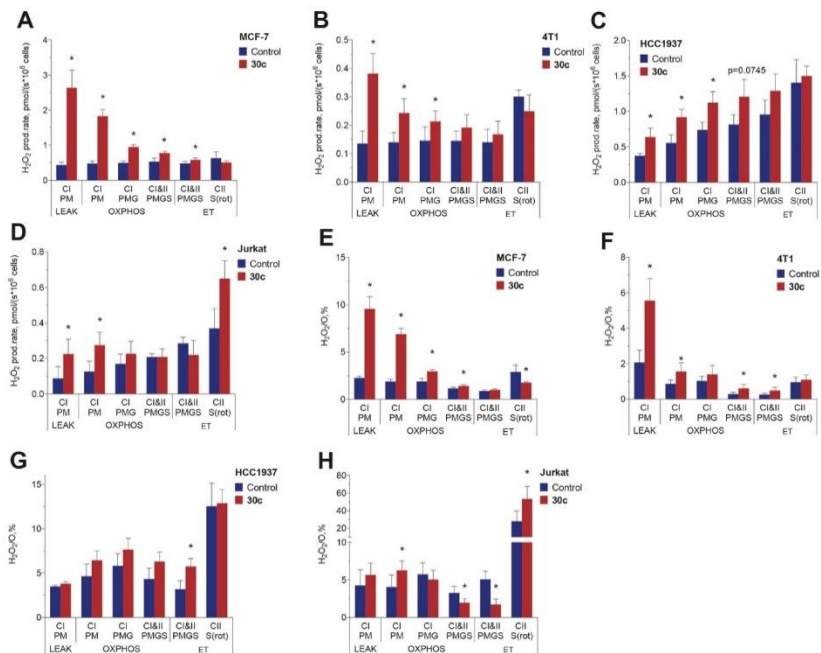
Pārsteidzoši, savienojums 30c ievērojami palielināja OCR visās šūnu līnijās piruvāta un malāta klātbūtnē LEAK, OXPHOS vai abos stāvokļos. Tajā pašā laikā savienojums 30c kavēja OXPHOS sajūgšanu CI substrātu (piruvāta

un malāta) klātbūtnē MCF-7 (1.14. E attēls), HCC1937 (1.14. G attēls) un Jurkat (1.14. H attēls), bet ne 4T1 šūnās (1.14. F attēls). Savienojums **30c** tiešā veidā neinhibēja CI, jo rotenona (CI inhibitora) efekts pētāmās un kontroles grupās bija gandrīz identisks, izņemot HCC1937, kur rotenona efekts tika samazināts. Turklāt OXPHOS stāvoklī CII substrātu klātbūtnē nebija būtisku izmaiņu mitohondriālā elpošanā.

Paaugstinātu OCR var izskaidrot ar ROS ražošanas pieaugumu. Tūlīt pēc savienojuma **30c** pievienošanas visās šūnu līnijās ievērojami palielinājās H_2O_2 ražošanas ātrums (1.15. A–D attēls).

Visizteiktākais H_2O_2 ražošanas pieaugums bija novērots CI substrātu klātbūtnē. Augstākas H_2O_2/O attiecības (1.15. E–H attēls) norāda uz to, ka lielāks skābekļa daudzums tika novirzīts uz ROS ražošanu, nevis piedalījās ETS.

Mitohondriju ROS ražošanas palielināšanās var veidoties no CI vai kompleksa III (CIII) radītā superoksīda radikalanjona. Tomēr CIII veido $O_2^{\cdot-}$ mazos daudzumos, un ir mazticams, ka tas bija saistīts ar tādu ROS pieaugumu (Forman and Azzi, 1997). Savukārt CI var ražot lielu $O_2^{\cdot-}$ un H_2O_2 daudzumu gan tiešā (NADH-oksīdējošā), gan pretējā (NAD⁺-reducējošā) elektronu transporta rezultātā. Pēdējo variantu var izslēgt, jo rotenons nesamazināja H_2O_2 veidošanos, apstiprinot, ka elektroni nieieplūst CI caur koenzīma Q saistīšanas vietu(-ām) pretējā virzienā (Murphy, 2009).



1.15. attēls. Savienojuma 30c (1 μM) ietekme uz H₂O₂ ražošanas ātrumu permeabilizētās (A) MCF-7, (B) 4T1, (C) HCC1937 un (D) Jurkat šūnās. H₂O₂/O attiecība permeabilizētās (E) MCF-7, (F) 4T1, (G) HCC1937 un (H) Jurkat šūnās*

* CI – komplekss I; CII – komplekss II; LEAK – no fosforilēšanas neatkarīgs miera stāvoklis; OXPHOS – oksidatīvas fosforilēšanas stāvoklis; ET – elektronu transports atjūgtā stāvoklī; P – piruvāts; M – malāts; G – glutamāts; S – sukcināts; rot – rotenons.

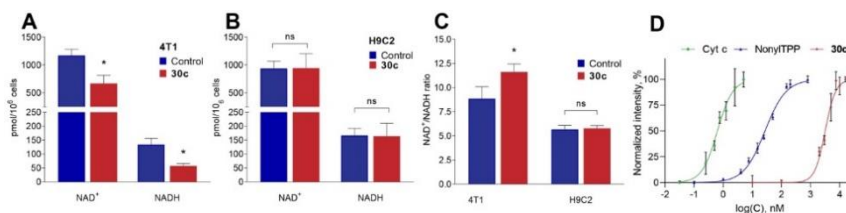
Statistiski nozīmīga atšķirība (*) tika uzskatīta, kad $p < 0,05$ (Stjūdenta t-tests), salīdzinot ar kontroles grupu (DMSO).

Vēl viens veids, kā var palielināt mitohondriālo ROS veidošanos, ir samazināt NAD⁺/NADH attiecību (Murphy, 2009). Savienojums 30c ievērojami samazināja intracelulārus NAD⁺ un NADH daudzumus 4T1 šūnās attiecīgi par 42,8 % un 57,4 % (1.16. A attēls). Turpretim paralēlajā eksperimentā ar H9C2 šūnām netika konstatēta ietekme uz NAD⁺ un NADH daudzumiem vai NAD⁺/NADH attiecību (1.16. B attēls). Pārsteidzoši ir tas, ka savienojums 30c

nesamazināja NAD^+/NADH attiecību 4T1 šūnās, bet tieši otrādi, palielināja to (1.16. C attēls). Tādējādi izmaiņas NAD^+/NADH attiecībā nav saistītas ar ROS pārprodukciju.

Lai noteiktu, vai savienojuma **30c** mijiedarbība ar CL potenciāli varētu izraisīt novēroto ROS veidošanos un OXPHOS atjūgšanu, savienojuma **30c** afinitāte pret kardioliipīnu tika noteikta ar konkurējošās saistīšanās testu, izmantojot mitoplastus, izolētus no žurkas aknām (1.16. D attēls).

Lai gan savienojums **30c** acīmredzami mijiedarbojās ar CL ($\text{EC}_{50} = 3490 \pm 298 \mu\text{M}$), tā afinitāte bija aptuveni 100 reižu zemāka nekā klasiskajam, uz mitohondrijiem mērķētam, nonilTPP bromīdam ($\text{EC}_{50} = 32,22 \pm 2,64 \mu\text{M}$) un aptuveni 5000 reižu zemāka, salīdzinot ar cyt c ($\text{EC}_{50} = 0,70 \pm 0,14 \mu\text{M}$).



1.16. attēls. NAD^+ un NADH koncentrācijas (A) 4T1 un (B) H9C2 šūnās pēc savienojuma **30c ($1 \mu\text{M}$) pievienošanas. (C) NAD^+/NADH attiecība 4T1 un H9C2 šūnās pēc savienojuma **30c** ($1 \mu\text{M}$) pievienošanas. (D) Savienojuma **30c**, citohroma c, nonilTPP bromīda saistīšanās ar kardioliipīnu mitoplastos, izolētos no žurkas aknām***

* Rezultāti ir parādīti kā vidējais \pm SD no 3 līdz 5 neatkarīgiem eksperimentiem. Statistiski nozīmīga atšķirība (*) tika uzskatīta, kad $p < 0,05$ (Stjūdenta t-tests), salīdzinot ar kontroles grupu.

Tādējādi ir mazticams, ka savienojuma **30c** mijiedarbība ar CL izraisa OXPHOS atjūgšanu. Līdz ar to tika meklēti citi molekulārie mērķi, kas varētu būt saistīti ar mitohondriālo metabolismu.

1.3.4. Izoselenazolija sāļu enzimatiskais skrīnings

Sākumā savienojuma **30c** PARP inhibējošā aktivitāte pārbaudīta 0,25 μM koncentrācijā uz 13 PARP saimes proteīniem un tika konstatēts, ka selektīvi inhibē PARP1 izoformu. Meklējot citus iespējamus molekulāros mērķus, savienojums **30c** (1 μM koncentrācijā) tika pārbaudīts uz vairākiem metabolīem enzīmiem, kā arī uz vairākiem Bcl-2 saimes proteīniem. Pārsteidzoši, tika atrasts, ka savienojums **30c** selektīvi kavē piruvāta kināzi M2 (PKM2), vienu no četrām piruvāta kināzes izoformām, kas pārsvarā tiek ekspresēta audzējos (Israelsen et al., 2013; Liu et al., 2015).

Pēc šiem intriģējošajiem atklājumiem tika noteiktas pārējo izoselenazolija sāļu PARP1 un PKM2 inhibējošās aktivitātes (1.5. tabula). Izrādījās, ka savienojumam **30c** bija visaugstākā PARP1 inhibējošā aktivitāte starp pētītajiem savienojumiem, IC_{50} vērtība $0,250 \pm 0,08 \mu\text{M}$, kas ir aptuveni četras reizes zemāka nekā savienojumam **3**.

1.5. tabula

Izoselenazolija sāļu PKM2 un PARP1 IC_{50} vērtības un PKM1, PKR un LDH kavējošā aktivitāte 1 μM koncentrācijā

Sav.	$\text{IC}_{50}, \mu\text{M}$			Inhibīcija 1 μM , %		
	PARP1	PKM2	PKM2 ar FBP (250 μM)	PKM1	PKR	LDH
Apigenīns	n.p.	> 20	> 20	n.p.	n.p.	n.p.
Sav. 3k (Ning et al., 2017)	n.p.	> 20	> 20	n.p.	n.p.	n.p.
Olaparibs	$0,0035 \pm 0,0005$	> 10	> 10	n.p.	n.p.	n.p.
3	$0,970 \pm 0,030$	$2,924 \pm 0,356$	$2,731 \pm 0,277$	n.p.	n.p.	n.p.
30b	$0,359 \pm 0,070$	$0,545 \pm 0,059$	$0,303 \pm 0,081$	16 ± 4	39 ± 6	10 ± 3
30c	$0,250 \pm 0,080$	$0,350 \pm 0,068$	$0,477 \pm 0,104$	13 ± 1	21 ± 11	10 ± 7
30d	$0,769 \pm 0,021$	$0,478 \pm 0,143$	$0,610 \pm 0,022$	10 ± 2	16 ± 14	13 ± 4
30e	$0,307 \pm 0,010$	$0,854 \pm 0,263$	$0,603 \pm 0,023$	26 ± 4	20 ± 2	7 ± 2
30f	$0,322 \pm 0,012$	$0,380 \pm 0,138$	$0,517 \pm 0,036$	20 ± 10	42 ± 3	6 ± 2

1.5. tabulas turpinājums

Sav.	IC ₅₀ , μM			Inhibīcija 1 μM, %		
	PARP1	PKM2	PKM2 ar FBP (250 μM)	PKM1	PKR	LDH
30g	0,438 ± 0,090	0,637 ± 0,137	0,572 ± 0,021	11 ± 4	29 ± 13	2 ± 1
30h	> 1	> 1	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
30i	> 1	> 1	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
30j	0,378 ± 0,020	0,897 ± 0,385	n.p.	29 ± 1	15 ± 6	7 ± 3
30k	> 1	1,355 ± 0,295	n.p.	10 ± 6	28 ± 14	7 ± 2
31b	1,370 ± 0,070	> 1	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
31c	1,620 ± 0,130	1,064 ± 0,266	n.p.	4 ± 3	5 ± 3	9 ± 4
32a	0,275 ± 0,014	> 1	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
32b	0,315 ± 0,080	> 1	n.p.	n.p.	n.p.	n.p.
32c	0,355 ± 0,090	0,420 ± 0,097	0,572±0,103	15 ± 8	37 ± 1	6 ± 2
32d	0,303 ± 0,080	0,362 ± 0,038	0,542±0,030	26 ± 4	40 ± 17	13 ± 5
32e	> 1	1,010 ± 0,264	n.p.	21 ± 3	11 ± 4	6 ± 1
32f	> 1	0,901 ± 0,173	n.p.	23 ± 3	29 ± 10	9 ± 2

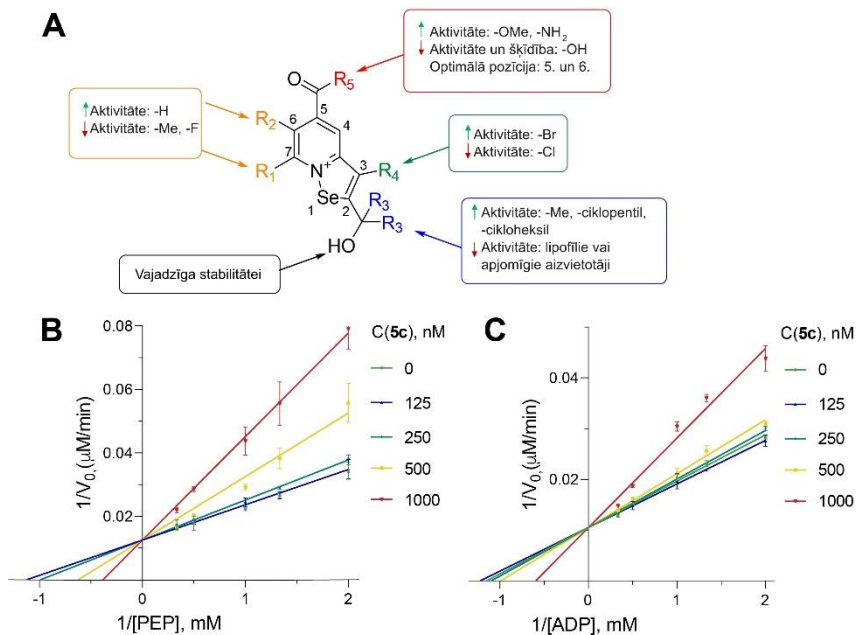
* Rezultāti ir parādīti kā vidējais ± SD vismaz no 3 neatkarīgiem eksperimentiem. PKM2, piruvāta kināzes M2 izoforma; PKM1, piruvāta kināzes M1 izoforma; PKR piruvāta kināzes R izoforma; LDH, L-laktāta dehidrogenāze; FBP, fruktozes-1,6-bifosfāts; n.p. – nav pārbaudīts.

Savienojumu PKM2 IC₅₀ vērtības tika noteiktas ar LDH sajūgtu testu. Izoselenazolija sāļi neinhībēja LDH, līdz ar to izvēlētais tests bija piemērots šāda tipa savienojumiem. Tika konstatēts, ka savienojumi **30b–32f** selektīvi kavē PKM2 un savienojuma **30c** un tā amīda analogā **32c** IC₅₀ vērtības ir 0,350 ± 0,068 un 0,420 ± 0,097 μM. Jāpiemin, ka izmantotajā testā iepriekš aprakstītie PKM2 inhibitori apigenīns un savienojums 3k nekavēja PKM2 pat 20 μM koncentrācijā. Pētāmie izoselenazolija sāļi bija selektīvāki pret PKM2, jo neviens savienojums 1 μM koncentrācijā nekavēja PKM1 vai PKR vairāk par 50 %. Īpaši interesanti ir tas, ka fruktozes-1,6-bifosfāta (FBP), PKM2 dabiskā alostēriskā aktivatora, pievienošana neietekmēja pētīto savienojumu kavējošo aktivitāti.

Ir jāatzīmē, ka estera vai amīda grupa izoselenazolopiridīnija gredzenā būtiski uzlaboja PKM2 kavējošo aktivitāti, jo iepriekš aprakstītais neaizvietotais izoselenazolopiridīnija hlorīds **3** bija aptuveni astoņas reizes mazāk aktīvs nekā savienojumi **30c** un **32c**.

1.3.5. Piruvāta kināzes M2 inhibīcijas mehānismi

Jaunatklāto PKM2 inhibitoru struktūras-aktivitātes likumsakarības (SAR) (1.17. A attēls) labi korelēja ar citotoksicitātes datiem. Lai noskaidrotu izoselenazolija sāļu saistīšanās un inhibīcijas mehānismus, turpmākajiem bioķīmiskiem un biofizikālajiem pētījumiem tika izvēlēti spēcīgākie inhibitori **30c** un **32c**. Lai raksturotu inhibīcijas mehānismu, tika noteikti PKM2 kinētiskie parametri savienojuma **30c** klātbūtnē, titrējot gan ar PEP, gan ar ADP. Tika konstatēts, ka, palielinot savienojuma **30c** koncentrāciju abu substrātu titrēšanas gadījumos, $V_{App,max}$ vērtība nemainījās, bet $K_{App,M}$ palielinājās. Turklāt, spriežot pēc Lainvivera-Berka (angl. *Lineweaver-Burk*) diagrammām, (1.17. B un C attēls) izoselenazolija sāļiem piemīt klasiskais atgriezenisko konkurējošo inhibitoru raksturs abu substrātu gadījumā.



1.17. attēls. **A) Struktūras-aktivitātes likumsakarības attiecība uz PKM2 kavējošo aktivitāti; B) PKM2 sākotnējais reakcijas ātrums (V_0) attiecībā pret PEP koncentrāciju dažādās savienojuma 30c koncentrācijās; C) PKM2 sākotnējais reakcijas ātrums (V_0) attiecībā pret ADP koncentrāciju dažādās savienojuma 30c koncentrācijās**

Selēna atomam izoselenazolija struktūrā piemīt elektrofilās īpašības, un tas var veidot kovalentas saites ar nukleofilām cisteīna sānu ķēdēm uz PKM2 virsmas. Izmantojot magnetizācijas pārnese eksperimentu no ūdens molekulām uz ligandu caur kodolu Overhauzera efektu (*Water-LOGSY*), tika pārbaudīts, vai savienojums **32c** saistās ar PKM2 atgriezeniski, vai veido kovalentas saites. Brīvā stāvoklī savienojuma **32c** protoniem bija negatīvas signāla intensitātes (1.18. A attēls, apakšā), savukārt PKM2 pievienošana pie savienojuma **32c** izraisīja signāla intensitātes apgriešanu – negatīvu kodolu Overhauzera efektu, kas liecina, ka notikusi atgriezeniska, nekovalenta liganda saistīšanās ar PKM2 (1.18. A attēls, augšā).

PKM2 aktivitāti regulē dažādi metabolīti, kas ietekmē tā ceturtējo struktūru, veicinot vai kavējot aktīvākā tetramēra veidošanos, vai izraisot starpprotomēru kustības, kas arī izraisa izmaiņas aktivitātē (Wang et al., 2015; Macpherson et al., 2019; Srivastava, Nandi un Dey, 2019; Nandi un Dey, 2020). Lai novērtētu izoselenazolija sāļu ietekmi uz PKM2 oligomēro stāvokli, tika lietota izmēru izslēgšanas hromatogrāfija (SEC). Izmantotos eksperimentālajos apstākļos PKM2 pastāv galvenokārt tetramērā formā, kurai atbilst pirmais signāls hromatogrammā, kam sekoja mazāks dimēra/monomēra signāls (1.18. B attēls). Kā bija sagaidāms, tetramēra attiecība pret dimēru/monomēru palielinājās, pieaugot PKM2 koncentrācijai. PKM2 (5 μM) inkubācija ar savienojumiem **30c** vai **32c** izraisīja no devas atkarīgu tetramēra attiecības pieaugumu, samazinot dimēra/monomēra signālu (1.18. C attēls).

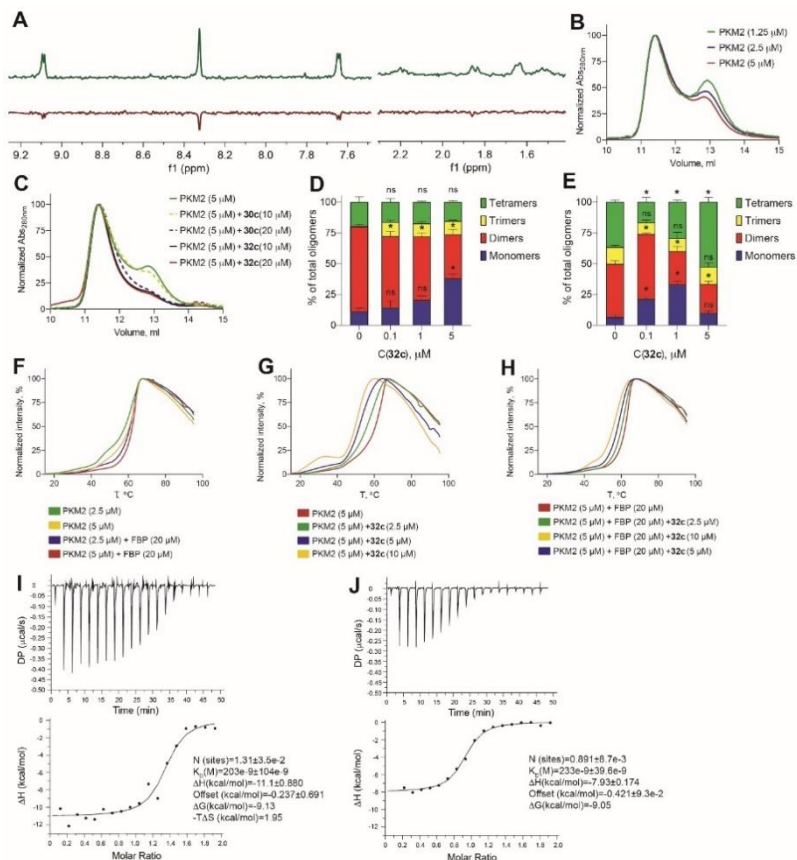
SEC metode ļauj strādāt tikai ar mikromolārām proteīna koncentrācijām, un novērotā PKM2 dimēra/tetramēra attiecība varēja būt fizioloģiski maznozīmīga, ņemot vērā to, cik lielā mērā šī attiecība ir atkarīga no koncentrācijas. Lai izpētītu PKM2 oligomēro stāvokli zemākā koncentrācijā, tika izmantota masas fotometrija. 50 nM koncentrācijā (1.18. D attēls) PKM2 pārsvarā bija dimēra formā ($69,1 \pm 1,9$ % no kopējiem oligomēriem), bet monomēri un tetramēri – attiecīgi $11,1 \pm 3,0$ % un $19,8 \pm 4,3$ %.

Tāpat kā SEC eksperimentā, savienojuma **32c** pievienošana izraisīja dimēra daudzuma samazināšanos, un pie 5 μM dimēra daudzums tika samazināts divas reizes ($69,1 \pm 1,9$ % pret $35,8 \pm 4,0$ %, $p < 0,0001$). Tajā pašā laikā monomēru īpatsvars tika palielināts tikai pie 5 μM (līdz $38,0 \pm 3,8$ %, $p = 0,0002$). Interesanti, ka fotometrijas histogrammās tika novērota arī trimēra forma, tā molekulārā masa ir aptuveni 180 kDa, un to nevarēja detektēt ar SEC palīdzību. Kā bija sagaidāms, FBP (100 μM) pievienošana palielināja tetramēra un trimēra daudzumu un samazināja dimēra īpatsvaru (1.18. E attēls). Pievienojot gan FBP, gan savienojumu **32c**, izmaiņas oligomēru populācijās

kļuva sarežģītākas, bet līdzīgi iepriekšējiem eksperimentiem 5 μM koncentrācijā dimēra daudzums tika samazināts divas reizes ($43,2 \pm 2,5 \%$ pret $23,7 \pm 1,8 \%$, $p < 0,0001$). Taču šajā gadījumā bija ievērojams tetramēru īpatsvara pieaugums ($36,6 \pm 1,5 \%$ pret $52,6 \pm 3,7 \%$, $p = 0,0004$). Gan SEC, gan masas fotometrijas rezultāti ir krasā pretstatā iepriekš publicētajiem novērojumiem, ka dabiskie PKM2 aktivatori, piemēram, FBP un serīns, veicina tetramēru veidošanos, bet PKM2 inhibitori palielina dimēru/monomēru īpatsvaru (Nandi and Deja, 2020).

PKM2 kušanas temperatūra tika pārbaudīta, izmantojot *SYPRO Orange* diferenciālās skenējošās fluorimetrijas (DSF) metodi. PKM2 kušanas līknes parādīja multimodālu raksturu (1.18. F attēls). PKM2 koncentrācijas samazināšanās no 5 līdz 2,5 μM palielināja zemas stabilitātes formu veidošanos. Tika novērotas trīs pārejas 2,5 μM koncentrācijā: pirmā 20–40 °C diapazonā, otrā 40–50 °C diapazonā un trešā 60 °C temperatūrā. Šie dati liecina, ka pastāv dažādas PKM2 formas ar atšķirīgu stabilitāti, kas, iespējams, atspoguļo dažādus oligomērus. Alternatīvi, novērotās pārejas var būt atbilstošas dažādām konformācijām, piemēram, iepriekš ziņotiem T vai R stāvokļiem (Wang et al., 2015).

Ir pierādīts, ka FBP pasargā PKM2 no termiskās denaturācijas, un iegūtie dati bija saskaņā ar masas fotometrijas rezultātiem un iepriekš publicētu ziņojumu (Wang et al., 2015). FBP samazināja zemas stabilitātes formu daudzumu, bet neizmainīja temperatūru, kurā tiek iegūta maksimālā fluorescēnce. Šie dati liecināja par to, ka FBP veicināja augstas stabilitātes formu veidošanos, bet būtiski neietekmēja trešējās struktūras stabilitāti.



1.18. attēls A) Brīvā savienojuma 32c (250 μM) Water-LOGSY spektrs (apakšā, sarkans) un savienojuma 32c Water-LOGSY spektrs PKM2 (12,5 μM) klātbūtnē (augšā, zaļš); B) PKM2 izmēru izslēgšanas hromatogrammas; C) PKM2 izmēru izslēgšanas hromatogrammas pēc inkubācijas ar savienojumiem 30c vai 32c; D) PKM2 oligomērais stāvoklis sav. 32c klātbūtnē, noteikts ar masas fotometriju; E) PKM2 oligomērais stāvoklis FBP un sav. 32c klātbūtnē, noteikts ar masas fotometriju; F) PKM2 DSF līknes ar vai bez FBP; G) PKM2 DSF līknes sav. 32c klātbūtnē; H) PKM2 DSF līknes FBP un sav. 32c klātbūtnē; I) PKM2 titrēšana ar FBP, veikta ar ITC; J) PKM2 titrēšana ar FBP pēc inkubācijas ar sav. 32c, veikta ar ITC*

* Rezultāti ir parādīti kā vidējais \pm SD vismaz no 3 neatkarīgiem eksperimentiem. Statistiski nozīmīga atšķirība (*) tika uzskatīta, kad $p < 0,05$ (ANOVA dispersijas analīze), salīdzinot ar kontroli.

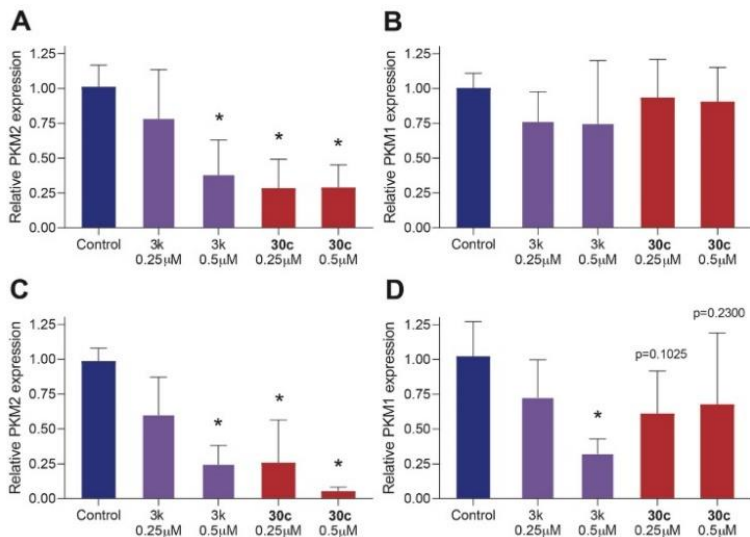
Savienojums **32c** destabilizēja PKM2, un efekts bija atkarīgs no devas (1.18. G attēls). Šāda veida destabilizācija liecina par izmaiņām oligomēra stāvoklī vai izmaiņām proteīna trešējā struktūrā. Augstā koncentrācijā (10 μM) savienojums **32c** veicināja destabilizētas populācijas veidošanos ar kušanas temperatūru 20–40 °C diapazonā, kas bija tikai minimāli pārstāvēta brīvai PKM2. Savukārt FBP samazināja savienojuma **32c** izraisītās destabilizācijas sekas (1.18. H attēls). Tā kā FBP nestabilizē trešējo, bet gan ceturtējo struktūru, ir iespējams, ka savienojums **32c** un FBP izraisa konkurējošas konformācijas izmaiņas PKM2 oligomēros. Šo pieņēmumu apstiprināja ITC dati, kas liecināja, ka FBP bija augsta afinitāte pret brīvo PKM2 (1.18. I attēls) un PKM2 pēc inkubācijas ar savienojumu **32c** (1.18. J attēls). Toties otrajā gadījumā bija ievērojami zemāka saistīšanās entalpija, kas liecina, ka FBP lokālā mijiedarbība ar enzīmu ir saglabāta, bet tās ietekme uz ceturtējo struktūru ir traucēta.

1.3.6. Ietekme uz piruvāta kināžu M2 un M1 mRNS ekspresiju

Vēl viens veids, kā var modulēt enzīma aktivitāti, ir samazināt tā ekspresiju. PKM1 un PKM2 mRNS ekspresija tika noteikta ar qPCR palīdzību, un savienojums 3k tika izmantots kā pozitīva kontrole. Savienojums **30c** 0,25 un 0,5 μM koncentrācijās pēc 24 stundām samazināja PKM2 mRNS ekspresiju 4T1 šūnās aptuveni trīs reizes ($p < 0,001$), savukārt PKM1 ekspresija netika būtiski ietekmēta (1.19. A un B attēls). Lai gan savienojums 3k nebija aktīvs enzīmātiskajā testā, tas spēja samazināt PKM2 mRNS ekspresiju 4T1 šūnās 0,5 μM koncentrācijā.

HCC1937 šūnās savienojums **30c** 0,25 un 0,5 μM koncentrācijās samazināja PKM2 ekspresiju attiecīgi 4 un 20 reizēs (1.19. C attēls), savukārt 3k bija efektīvs tikai 0,5 μM koncentrācijā. Savienojums **30c** neietekmēja PKM1 ekspresiju HCC1937 šūnās (1.19. D attēls), savukārt savienojums 3k nebija selektīvs un samazināja PKM1 mRNS daudzumu trijās reizēs ($p = 0,0021$).

Tādējādi var secināt, ka savienojums **30c** samazināja PKM2 mRNS ekspresiju efektīvāk un selektīvāk nekā savienojums 3k abās izpētītajās šūnu līnijās.



1.19. attēls. Relatīva PKM2 mRNS ekspresija (A) 4T1 un (C) HCC1937 šūnās un relatīva PKM1 mRNS ekspresija (B) 4T1 un (D) HCC1937 šūnās pēc 24 h inkubācijas ar savienojumiem 30c vai 3k 0,25 vai 0,5 μM koncentrācijās*

* Rezultāti ir parādīti kā vidējais ± SD no 5 līdz 7 neatkarīgiem eksperimentiem. Statistiski nozīmīga atšķirība (*) tika uzskatīta, kad $p < 0,05$ (ANOVA dispersijas analīze), salīdzinot ar kontroles grupu.

1.3.7. Piruvāta kināzes M2 kodola translokācijas novēršana

Papildus savām metabolajām funkcijām glikolīzē PKM2 dimēra forma var pārvietoties uz kodolu, kur tā darbojas kā proteīnkināze un vairāku onkogēnu transkripcijas koaktivators (Zahra et al., 2020). Turklāt ir ziņots, ka starp daudzām pēctranslācijas modifikācijām PKM2 var tikt pakļauta PARilēšanai (modifikācija ar poli(ADP-ribozi), PAR), ko katalizē PARP1. PARilēšana uzlabo PKM2 aizturi kodolā un ir nepieciešama proto-onkogēna c-Myc un ar glikolīzi

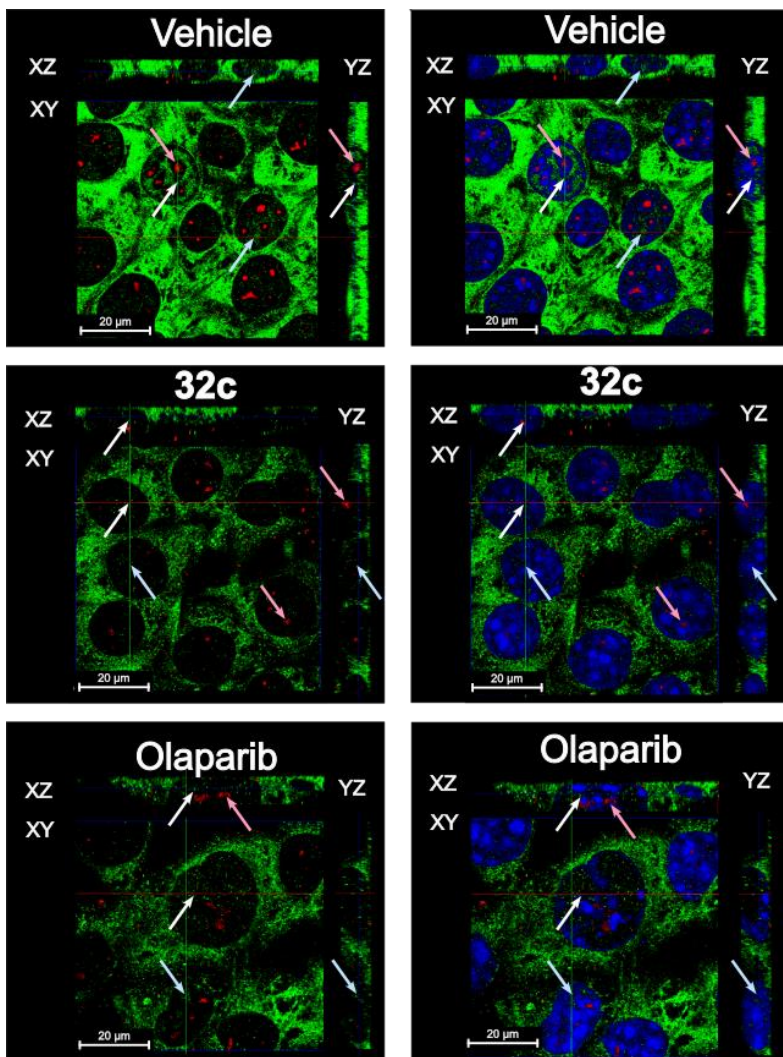
saistīto GLUT un LDH gēnu ekspresijas veicināšanai (Li et al., 2016). Ņemot vērā izoselenazolija sāļu PARP1 inhibējošo aktivitāti un spēju samazināt PKM2 dimēra daudzumu, bija īpaši svarīgi izpētīt, vai tie var kavēt PKM2 translokāciju.

Lai noteiktu PKM2 un PAR intracelulāro lokalizāciju 4T1 šūnās, tika izmantots imūnfluorescences krāsošanas paņēmiens un konfokālā mikroskopija (1.20. attēls).

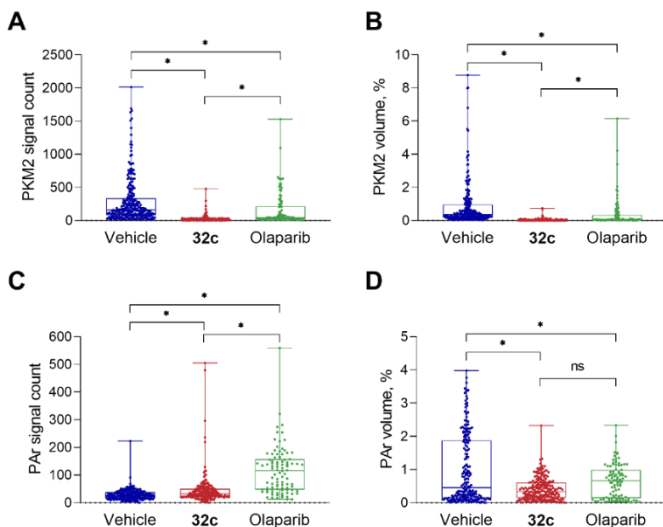
Kontroles grupā PKM2 signāls bija augsts un izplatīts visā citoplazmā, tomēr PKM2 atrašanās kodolā tika nenoliedzami apstiprināta XZ un YZ ortogonālās projekcijās pēc kodolu iekrāsošanas ar DAPI. Pēc šūnu inkubācijas ar savienojumu **32c**, kā arī bija sagaidāms no qPCR datiem, PKM2 signāls gan citoplazmā, gan kodolos bija zemāks, un pārsteidzošā kārtā inkubācija ar olaparibu deva līdzīgus rezultātus.

Lai kvantitatīvi aprakstītu PKM2 un PAR daudzumu kodolos, tika analizēts signālu skaits kodolos un signālu relatīvais aizņemtais tilpums. Analīze parādīja, ka gan savienojums **32c**, gan olaparibs statistiski nozīmīgi samazināja PKM2 signālu skaitu (1.21. A attēls) un relatīvo tilpumu (1.21. B attēls). Lietojot Dunna salīdzināšanas testu, tika pierādīts, ka savienojums **32c** ir efektīvāks par olaparibu ($p < 0,001$) abos aspektos.

Atšķirībā no PKM2, kas galvenokārt veido punktu signālu, PAR veido garas polimēru ķēdes, kas konfokālajā attēlā redzamas kā lieli agregāti. PAR skaits kodolos pēc inkubācijas ar savienojumu **32c** vai olaparibu (1.21. C attēls) bija lielāks nekā kontroles grupā ($p < 0,001$), bet šo agregātu (1.21. D attēls) aizņemtais tilpums bija mazāks ($p < 0,001$). Tādējādi tika izveidotas īsākas PAR ķēdes, kas apstiprināja PARP aktivitātes kavēšanu.



1.20. attēls. Reprezentatīvie konfokālās mikroskopijas attēli, kur parādīta PKM2 (zaļš) un PAr (sarkans) lokalizācija 4T1 šūnās pēc inkubācijas ar kontrols šķīdumu (augšējā sekcija), savienojumu 32c (2 μM, vidējā sekcija) vai olaparibu (2 μM, apakšējā sekcija) un sekojošās stimulācijas ar CoCl₂ (100 μM). Kodoli ir nokrāsoti ar DAPI (zils)



1.21. attēls. **A) PKM2 signālu skaits kodolos; B) PKM2 aizņemtais tilpums kodolos; C) PAr signālu skaits kodolos; D) PKM2 aizņemtais tilpums kodolos pēc 4T1 šūnu 24 h inkubācijas ar kontrolšķīdumu, savienojumu 32c vai olaparibu (2 μ M) un tai sekojošai stimulācijai ar CoCl₂ (100 μ M)***

* Katrs atsevišķais punkts reprezentē vienu šūnu. Dati bija analizēti ar Kraskala–Valisa testu ar sekojošo Dunna daudzfaktoru salīdzinājuma testu. Statistiski nozīmīga atšķirība (*) tika uzskatīta, kad $p < 0,05$.

Lai gan PAr signālu skaits pēc inkubācijas ar savienojumu **32c** bija nedaudz mazāks nekā ar olaparibu, savienojuma **32c** un olapariba iedarbība bija līdzīga un netika novērota statistiski nozīmīga atšķirība starp abu savienojumu ietekmi uz PAr tilpumu. Pēc šiem eksperimentiem tika secināts, ka izoselenazolija sāļi samazina PKM2 daudzumu kodolos, iespējams, samazinot PKM2 dimēra daudzumu un novēršot tā aizturi kodolā, kavējot PARP1.

2. Diskusija

Darbības mehānisma atklāšana ir pamats jaunu pretvēža zāļu izstrādei. Pirmās paaudzes izoselenazolijs sāļiem bija augsta un selektīva citotoksicitāte pret krūts vēzi *in vitro*. Šie selēnu saturošie savienojumi ietekmēja vēža šūnu metabolismu: samazināja NAD⁺ un NADH līmeni, kavēja PARP1, no piruvāta atkarīgo mitohondriālo metabolismu un veicināja ROS veidošanos. Bija pierādīts, ka izoselenazolijs sāļi ietekmē CI aktivitāti, bet tiešā veidā nekavē CI, un precīzs darbības mehānisms sākumā netika identificēts. Tā kā CI stabilizē CL, tā aktivitāti var ietekmēt ROS izraisīta CL peroksidācija vai lipīdu membrānas destabilizācija savienojuma tiešas mijiedarbības rezultātā (Paradies et al., 2002; Petrosillo et al., 2007). KMR un ITC dati liecināja, ka izoselenazolijs sāļi mijiedarbojas ar CL, un sākotnēji tas tika uzskatīts par potenciālo molekulāro mērķi.

Tradicionālajiem zāļu mērķiem, piem., enzīmiem, receptoriem un jonu kanāliem, parasti ir izstrādāti ātri un ērti skrīninga testi, kas ir piemēroti liela savienojumu skaita pārbaudei. Vēsturiski konkrēti fosfolipīdi, piemēram, CL, tika atzīti par potenciālo zāļu mērķi daudz vēlāk, un līdz šim tam nebija pieejamas zāļu skrīninga metodes. Tāpēc tika iegūts jaunais pret CL specifiskais fluorescējošais marķieris, kuru lietojot tika izstrādāts uz konkurējošās saistīšanās balsfītais tests. Jaunais skrīninga tests ļauj izvērtēt CL kā potenciālu molekulāro mērķi, gan pētot uz mitohondrijiem mērķētus savienojumus, gan pētot mērķtiecīgas zāļu transporta sistēmas vai izstrādājot jaunus antimikrobiālus savienojumus. Tests var palīdzēt prognozēt zāļu mijiedarbību ar mitohondriālo membrānu un, iespējams, brīdināt par iespējamām blakusparādībām, kas saistītas ar mitohondriju disfunkciju jau pētījuma sākumposmā.

Izoselenazolija sāļi testā uzrādīja zemu afinitāti pret CL, tāpēc pēfīto savienojumu citotoksisko efektu nevar saistīt ar tiešu mijiedarbību ar CL. Iegūtie rezultāti uzsver, cik svarīgi ir izmantot dažādas metodes, kuru pamatā ir dažādi principi, lai apstiprinātu molekulāro mērķi.

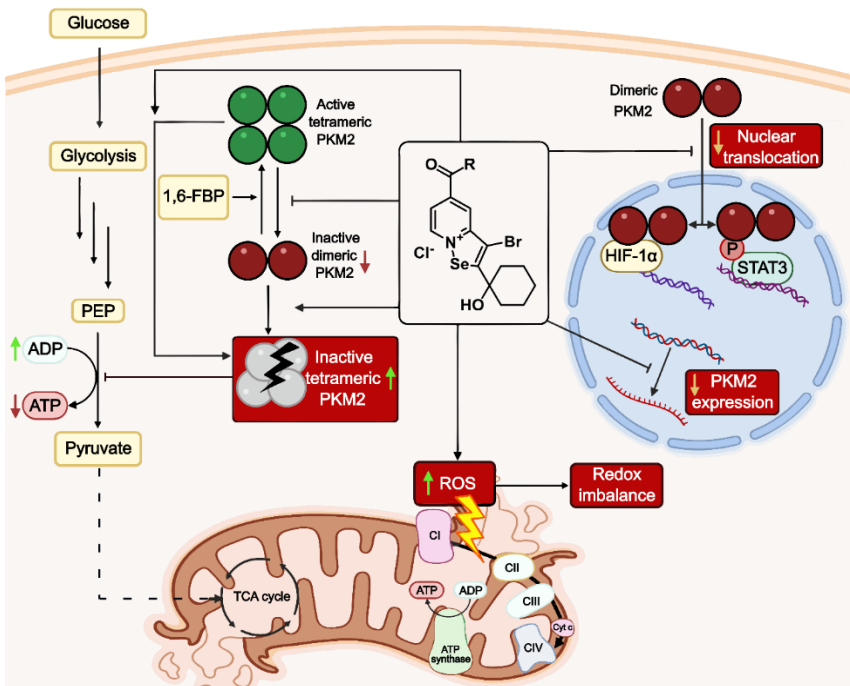
Otrās paaudzes izoselenazolija atvasinājumi uzrādīja augstu citotoksicitāti ne tikai krūts vēža, bet arī hepatocelulārās karcinomas, plaušu vēža un T šūnu leukēmijas *in vitro* modeļos. Šie savienojumi bija spēcīgāki PARP1 inhibitori nekā pirmās paaudzes savienojumi, bet tiem bija līdzīga ietekme uz mitohondriālo elpošanu. Pētījuma gaitā tika atklāts, ka savienojums **30c** ir spēcīgs un selektīvs PKM2 inhibitoris.

Precīzi izprast liganda un mērķa proteīna mijiedarbības mehānismu ir ļoti svarīgi, lai veiktu veiksmīgu *hit-to-lead* optimizāciju. Atomu līmeņa strukturālās metodes, piemēram, proteīnu rentgenstaru kristalogrāfija, sniedz visdetalizētāko informāciju, tomēr mēģinājumi iegūt PKM2 un izoselenazolija sāļu kokristālus bija neveiksmīgi. Acīmredzot kokristalizāciju kavēja savienojumu izraisīta PKM2 ceturrtējās struktūras destabilizācija. Līdz ar to saistīšanās mehānisma izpētei bija jāizmanto citas bioķīmiskās un biofizikālās metodes.

Lai gan izoselenazolija sāļiem ir atgriezeniskā konkurējošā inhibitora raksturs, tas ne vienmēr nozīmē, ka tie obligāti saistās ar enzīma aktīvo centru. Inhibitors un substrāts var saistīties dažādās vietās, kas alostēriski negatīvi ietekmē viena otru pēc inhibitoru izraisītām konformācijas izmaiņām (Robert A. Copeland, 2013). Šis ir rets gadījums, taču šāds konkurējošās alosteriskās kavēšanas mehānisms dažas reizes aprakstīts literatūrā (Luo et al., 2007; Alphey et al., 2013; Feldman et al., 2016). DSF, SEC un masas fotometrijas dati liecina, ka izoselenazolija sāļi kavē PKM2 nekanoniskā veidā un veicina nestabilu, funkcionāli neaktīvu tetramēru veidošanos. Turklāt dabiskais PKM2 alostēriskais aktivators FBP nekonkurē ar izoselenazolija sāļu saistīšanās vietu

un nespēj atjaunot PKM2 enzimatisko funkciju un ceturto struktūru (Macpherson et al., 2019).

Piedāvātais izoselenazoliņa darbības mehānisms shematiski attēlots 2.1. attēlā. Tā kā PKM2 ir vienīgais enzīms, kas ražo ATP glikolīzes “atmaksas fāzē”, PKM2 enzimatiskās funkcijas kavēšana nomāc galveno ATP ražošanas ceļu vēža šūnās. Tajā pašā laikā CI un OXPHOS sajūgšana tiek traucēta, iespējams, krasi palielinoties ROS ražošanai, kas vēl vairāk saasina šūnas enerģijas krīzi.



2.1. attēls. Piedāvātais izoselenazoliņa sāļu darbības mehānisms

Ir pierādīts, ka PKM2 neaktīvā dimēra forma veicina ROS detoksifikāciju, novirzot glikozes-6-fosfātu fosfopentožu ceļā, kas nodrošina glutationa reduktāzi ar NADPH (Anastasiou et al., 2011). Papildus PKM2 kavē ROS izraisītu apoptozi, fosforilējot un stabilizējot Bcl-2 (Liang et al., 2017), toties tā acīmredzot netiek galā ar izoselenazolija sāļu izraisītu oksidatīvo sprādzieni. Vienlaikus arī kopējā PKM2 ekspresija ir ievērojami samazināta. Papildus savienojums **30c** ievērojami samazina NAD⁺ un NADH līmeņus krūts vēža šūnās, bet neietekmē tos kardiomioblastos. Pagaidām nav skaidrs, vai tās ir PKM2 kavēšanas sekas vai ārpusmērķa efekts, un ir vajadzīgi papildu pētījumi, lai atbildētu uz šo jautājumu.

Balstoties uz literatūras datiem, tieši PKM2 dimēra forma pārvietojas uz kodolu, kur tā darbojas kā proteīnkināze un transkripcijas koaktivators, savukārt tetramēri to nedara (Dong et al., 2016). Tāpēc dimēru īpatsvara samazināšanās ir ļoti svarīga PKM2 nemetabolo funkciju nomākšanai un audzēja augšanas kavēšanai. Piemēram, Gao un kolēģi ir parādījuši, ka PKM2 ar mutāciju R399E, kas neveido tetramēru, veicina STAT3 fosforilēšanos un palielina audzēja augšanas ātrumu *in vivo* resnās zarnas adenokarcinomas modelī, salīdzinot ar savvaļas tipa PKM2 ekspresējošo audzēju (Gao et al., 2012).

Šajā darbā tika pierādīts, ka savienojums **32c** samazina PKM2 daudzumu translokāciju uz kodolu un šim procesam ir divi mehānismi. Pirmkārt, tiek samazināts PKM2 dimēru daudzums, kas var nonākt kodolos, un, otrkārt, tiek kavēta PKM2 parilēšana ar PARP1, līdz ar to tiek traucēta PKM2 stabilitāte un aizture kodolā.

Tādējādi izoselenazolija sāļi kavē PKM2 funkcijas trijos līmeņos: samazina proteīna ekspresiju, samazina enzīmu metabolo funkciju un novērš nemetabolās funkcijas, ierobežojot tā translokāciju. Vēl nav zināms, kurš no šiem efektiem visvairāk veicina antiproliferatīvo aktivitāti, taču daži dati liek domāt, ka dimēra/tetramēra attiecības samazināšanai ir noteicoša loma. Šādu

pieņēmumu apstiprina mazmolekulāro PKM2 aktivatoru līdzīga antiproliferatīvā aktivitāte. PKM2 aktivatori veicina aktīvo tetramēru veidošanos, samazina dimēra daudzumu un kavē PKM2 translokāciju uz kodolu (Warner, Carpenter un Bearss, 2014; Giannoni et al., 2015; Li et al., 2018).

Paliek atklāts jautājums, kā izoselenazolija sāļi izraisa mitohondriālo ROS ražošanas pieaugumu. Rezultāti parādīja, ka ROS pārprodukciju neizraisa ne NAD^+/NADH attiecības samazināšanās, ne pretējais elektronu transports. Interesanti, ka PKM2 arī ir iesaistīts mitohondriālo ROS regulācijā, lai gan precīzs mehānisms pagaidām nav zināms (Gao et al., 2022). Ir pierādīts, ka PKM2 aktivatori TEPP-46 un DASA-58 samazina ROS veidošanos, un, spriežot pēc pretējas loģikas, ir iespējama saistība starp PKM2 kavēšanu un ROS pārprodukciju. Alternatīvi, ir arī iespējams, ka izoselenazolija sāļi ietekmē ROS detoksifikācijas ceļus, piemēram, glutaciona metabolismu, taču ir nepieciešami turpmāki pētījumi, lai to pārbaudītu.

Kopumā šie atklājumi veido pamatu jaunai zāļu kandidātu klasei ar unikālu molekulāro mehānismu un atklāj specifiskas PKM2 struktūras iezīmes. Turklāt spēcīgs un stabils inhibitors ir nepieciešams, lai padziļinātu fundamentālās zināšanas par PKM2 lomu vēža metabolismā un onkoģenēzē.

Secinājumi

1. Hipotēze tika apstiprināta: izoselenazolija atvasinājumi, ietekmējot vēža enerģijas metabolismu, uzrāda augstu antiproliferatīvo aktivitāti vairākos vēža modeļos *in vitro*.
2. Jauna, uz fluorescējošā marķiera **20** balstīta konkurējošās saistīšanās metode ļauj ātri un precīzi noteikt vielu afinitāti pret kardiolipīnu, toties izoselenazolija sāļu afinitāte ir zema un nav saistīta ar to farmakoloģisko aktivitāti.
3. Estera vai amīda grupa izoselenazolopiridīnija 5. vai 6. pozīcijā būtiski uzlabo gan PARP1, gan PKM2 kavējošo aktivitāti.
4. Izoselenazolija sāļu galvenais molekulārais mērķis ir PKM2. Izoselenazolija sāļi izraisa nestabila tetramēra veidošanos, tādējādi samazinot PKM2 metabolisko un nemetabolisko aktivitāti.

Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu

Publikācijas:

1. **Dimitrijevs, P.**, Domracheva, I., Arsenyan, P. 2020. Improved method for the preparation of nonyl acridine orange analogues and utilization in detection of cardiolipin. *New Journal of Chemistry*. 44(23), 9626–9633. doi:10.1039/D0NJ02116D
2. Makrecka-Kuka, M., **Dimitrijevs, P.**, Domracheva, I., Jaudzems, K., Dambrova, M., Arsenyan, P. 2020. Fused isoselenazolium salts suppress breast cancer cell growth by dramatic increase in pyruvate-dependent mitochondrial ROS production. *Scientific Reports*. 10(1), 21595. doi:10.1038/s41598-020-78620-8
3. **Dimitrijevs, P.**, Arsenyan, P. 2021. Cardiolipin in the spotlight: Quantitative analysis and fluorescence-based competitive binding assay. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 346, 130537. doi:10.1016/j.snb.2021.130537
4. **Dimitrijevs, P.**, Makrecka-Kuka, M., Bogucka, A., Hyvönen, M., Pantelejevs, T., Arsenyan, P. 2023. Development of isoselenazolium chlorides as selective pyruvate kinase isoform M2 inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 257, 115504. doi:10.1016/j.ejmech.2023.115504

Referāti un tēzes starptautiskos kongresos un konferencēs:

1. **Dimitrijevs, P.** Novel method for evaluating cardiolipin as a potential molecular drug target and its quantitative analysis, 12th World Congress on Targeting Mitochondria, October 27–29, 2021, online.

Patenta pieteikumi:

1. Arsenjans, P., **Dimitrijevs, P.** Fluorescent acridinium salts, synthesis thereof and use for detection of cardiolipin. WO2021105780A1, 2021.
2. Arsenjans, P., **Dimitrijevs, P.** An assay for measuring binding affinity for cardiolipin of biologically active compounds. WO2022038424A1, 2022.
3. Arsenjans, P., **Dimitrijevs, P.**, Makrecka-Kuka, M. Novel pyruvate kinase isoform M2 inhibitors. Filed: 20.04.2022, (LVP2022000034).

Literatūras saraksts

1. Alphey, M. S., Pirrie, L., Torrie, L. S., Boulkeroua, W. A., Gardiner, M., Sarkar, A., Maringer, M., Oehlmann, W., Brenk, R., Scherman, M. S., Mcneil, M., Rejzek, M., Field, R. A., Singh, M., Gray, D., Westwood, N. J., Naismith, J. H. 2013. Allosteric Competitive Inhibitors of the Glucose-1-phosphate Thymidyltransferase (RmlA) from *Pseudomonas aeruginosa*. *ACS Chemical Biology*. 8, 387–397.
2. Anastasiou, D., Pouligiannis, G., Asara, J. M., Boxer, M. B., Jiang, J. kang, Shen, M., Bellinger, G., Sasaki, A. T., Locasale, J. W., Auld, D. S., Thomas, C. J., Heiden, M. G. Vander, Lewis, C. 2011. Inhibition of pyruvate kinase M2 by reactive oxygen species contributes to cellular antioxidant responses. *Science*. 334(6060), 1278–1283. doi:10.1126/science.1211485.Inhibition
3. Arsenyan, P., Vasiljeva, J., Belyakov, S., Liepinsh, E., Petrova, M. 2015. Fused Selenazolium Salt Derivatives with a Se-N⁺ Bond: Preparation and Properties. *European Journal of Organic Chemistry*. 2015(26), 5842–5855. doi:10.1002/ejoc.201500582
4. Chen, Z., Tan, L., Hu, L., Luan, Y. 2015. Superior fluorescent probe for detection of potassium ion. *Talanta*. 144, 247–251. doi:10.1016/j.talanta.2015.06.015
5. Chuai, H., Zhang, S. Q., Bai, H., Li, J., Wang, Y., Sun, J., Wen, E., Zhang, J., Xin, M. 2021. Small molecule selenium-containing compounds: Recent development and therapeutic applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 223, 113621. doi:10.1016/j.ejmech.2021.113621
6. Dong, G., Mao, Q., Xia, W., Xu, Y., Wang, J., Xu, L., Jiang, F. 2016. PKM2 and cancer: The function of PKM2 beyond glycolysis. *Oncology Letters*. 11(3), 1980–1986. doi:10.3892/ol.2016.4168
7. Fan, J., Kamphorst, J. J., Mathew, R., Chung, M. K., White, E., Shlomi, T., Rabinowitz, J. D. 2013. Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia. *Molecular Systems Biology*. 9(712), 1–11. doi:10.1038/msb.2013.65
8. Feldman, H. C., Tong, M., Wang, L., Meza-acevedo, R., Gobillot, T., Lebedev, I., Hari, S. B., Gliedt, M. J., Arinjay, K., Backes, B. J., Papa, F. R., Seeliger, M. A., Maly, D. J. 2016. Structural and Functional Analysis of the Allosteric Inhibition of IRE1 α with ATP-Competitive Kinase Ligands Structural and Functional Analysis of the Allosteric Inhibition of IRE1 α with ATP-Competitive Ligands. *ACS Chemical Biology*. 11(8), 2195–2205. doi:10.1021/acscchembio.5b00940
9. Forman, H. J., Azzi, A. 1997. On the virtual existence of superoxide anions in mitochondria: thoughts regarding its role in pathophysiology. *The FASEB Journal*. 11(5), 374–375. doi:10.1096/fasebj.11.5.9141504

10. Gandin, V., Khalkar, P., Braude, J., Fernandes, A. P. 2018. Organic selenium compounds as potential chemotherapeutic agents for improved cancer treatment. *Free Radical Biology and Medicine*. 127, 80–97. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.05.001
11. Gao, J., Zhao, Y., Li, T., Gan, X., Yu, H. 2022. The Role of PKM2 in the Regulation of Mitochondrial Function: Focus on Mitochondrial Metabolism, Oxidative Stress, Dynamic, and Apoptosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2022.
12. Gao, X., Wang, H., Yang, J. J., Liu, X., Liu, Z. R. 2012. Pyruvate Kinase M2 Regulates Gene Transcription by Acting as a Protein Kinase. *Molecular Cell*. 45(5), 598–609. doi:10.1016/j.molcel.2012.01.001
13. Garbo, S., Di Giacomo, S., Łażewska, D., Honkisz-Orzechowska, E., Di Sotto, A., Fioravanti, R., Zwergel, C., Battistelli, C. 2022. Selenium-Containing Agents Acting on Cancer – A New Hope? *Pharmaceutics*. 15(1), 104. doi:10.3390/pharmaceutics15010104
14. Giannoni, E., Taddei, M. L., Morandi, A., Comito, G., Calvani, M., Bianchini, F., Richichi, B., Raugei, G., Wong, N., Tang, D., Chiarugi, P. 2015. Targeting stromal-induced pyruvate kinase M2 nuclear translocation impairs OXPHOS and prostate cancer metastatic spread. *Oncotarget*. 6(27), 24061–24074. doi:10.18632/oncotarget.4448
15. Gorrini, C., Harris, I. S., Mak, T. W. 2013. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature Reviews Drug Discovery*. 12(12), 931–947. doi:10.1038/nrd4002
16. Grevengoed, T. J., Martin, S. A., Katunga, L., Cooper, D. E., Anderson, E. J., Murphy, R. C., Coleman, R. A. 2015. Acyl-CoA synthetase 1 deficiency alters cardiolipin species and impairs mitochondrial function. *Journal of Lipid Research*. 56(8), 1572–1582. doi:10.1194/jlr.M059717
17. Grimm, J. B., English, B. P., Chen, J., Slaughter, J. P., Zhang, Z., Revyakin, A., Patel, R., Macklin, J. J., Normanno, D., Singer, R. H., Lionnet, T., Lavis, L. D. 2015. A general method to improve fluorophores for live-cell and single-molecule microscopy. *Nature Methods*. 12(3), 244–250. doi:10.1038/nmeth.3256
18. Houtkooper, R. H., Cantó, C., Wanders, R. J., Auwerx, J. 2010. The secret life of NAD⁺: An old metabolite controlling new metabolic signaling pathways. *Endocrine Reviews*. 31(2), 194–223. doi:10.1210/er.2009-0026
19. Israelsen, W. J., Dayton, T. L., Davidson, S. M., Fiske, B. P., Hosios, A. M., Bellinger, G., Li, J., Yu, Y., Sasaki, M., Horner, J. W., Burga, L. N., Xie, J., Jurczak, M. J., Depinho, R. A., Clish, C. B., Jacks, T., Kibbey, R. G., Wulf, G. M., Di Vizio, D., Mills, G. B., Cantley, L. C., Vander Heiden, M. G. 2013. PKM2 isoform-specific deletion reveals a differential requirement for pyruvate kinase in tumor cells. *Cell*. 155(2), 397. doi:10.1016/j.cell.2013.09.025

20. Johnson, W. D., Morrissey, R. L., Kapetanovic, I., Crowell, J. A., McCormick, D. L. 2008. Subchronic oral toxicity studies of Se-methylselenocysteine, an organoselenium compound for breast cancer prevention. *Food and Chemical Toxicology*. 46(3), 1068–1078. doi:10.1016/j.fct.2007.11.001
21. Katsyuba, E., Romani, M., Hofer, D., Auwerx, J. 2020. NAD⁺ homeostasis in health and disease. *Nature Metabolism*. 2(1), 9–31. doi:10.1038/s42255-019-0161-5
22. Kiebish, M. A., Han, X., Cheng, H., Seyfried, T. N. 2009. *In Vitro* Growth Environment Produces Lipidomic and Electron Transport Chain Abnormalities in Mitochondria from Non-Tumorigenic Astrocytes and Brain Tumours. *ASN Neuro*. 1(3), AN20090011. doi:10.1042/AN20090011
23. Kim, C. W., Choi, K. C. 2021. Effects of anticancer drugs on the cardiac mitochondrial toxicity and their underlying mechanisms for novel cardiac protective strategies. *Life Sciences*. 277(February), 119607. doi:10.1016/j.lfs.2021.119607
24. Kuznetsov, A. V., Javadov, S., Sickinger, S., Frotschnig, S., Grimm, M. 2015. H9c2 and HL-1 cells demonstrate distinct features of energy metabolism, mitochondrial function and sensitivity to hypoxia-reoxygenation. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1853(2), 276–284. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.11.015
25. Lenardão, E. J., Sancineto, L., Santi, C. 2018. *New Frontiers in Organoselenium Compounds* 1st ed. 2018. Cham: Springer International Publishing: Imprint: Springer. doi:10.1007/978-3-319-92405-2
26. Li, J., Li, S., Guo, J., Li, Q., Long, J., Ma, C., Ding, Y., Yan, C., Li, L., Wu, Z., Zhu, H., Li, K. K., Wen, L., Zhang, Q., Xue, Q., Zhao, C., Liu, N., Ivanov, I., Luo, M., Xi, R., Long, H., Wang, P. G., Chen, Y. 2018. Natural Product Micheliolide (MCL) Irreversibly Activates Pyruvate Kinase M2 and Suppresses Leukemia. *Journal of Medicinal Chemistry*. 61(9), 4155–4164. doi:10.1021/acs.jmedchem.8b00241
27. Li, N., Feng, L., Liu, H., Wang, J., Kasembeli, M., Tran, M. K., Twardy, D. J., Lin, S. H., Chen, J. 2016. PARP Inhibition Suppresses Growth of EGFR-Mutant Cancers by Targeting Nuclear PKM2. *Cell Reports*. 15(4), 843–856. doi:10.1016/j.celrep.2016.03.070
28. Liang, J., Cao, R., Wang, X., Zhang, Y., Wang, P., Gao, H., Li, C. 2017. Mitochondrial PKM2 regulates oxidative stress-induced apoptosis by stabilizing Bcl2. *Cell Research*. 27, 329–351. doi:10.1038/cr.2016.159
29. Liu, W. R., Tian, M. X., Yang, L. X., Lin, Y. L., Jin, L., Ding, Z. Bin, Shen, Y. H., Peng, Y. F., Gao, D. M., Zhou, J., Qiu, S. J., Dai, Z., He, R., Fan, J., Shi, Y. H. 2015. PKM2 promotes metastasis by recruiting myeloid-derived suppressor cells and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 6(2), 846–861. doi:10.18632/oncotarget.2749

30. Luo, L., Parrish, C. A., Nevins, N., McNulty, D. E., Chaudhari, A. M., Carson, J. D., Sudakin, V., Shaw, A. N., Lehr, R., Zhao, H., Sweitzer, S., Lad, L., Wood, K. W., Sakowicz, R., Annan, R. S., Huang, P. S., Jackson, J. R., Dhanak, D., Copeland, R. A., Auger, K. R. 2007. ATP-competitive inhibitors of the mitotic kinesin KSP that function via an allosteric mechanism. *Nature Chemical Biology*. 3(11), 722–726. doi:10.1038/nchembio.2007.34
31. Macpherson, J. A., Theisen, A., Masino, L., Fets, L., Driscoll, P. C., Encheva, V., Snijders, A. P., Martin, S. R., Kleinjung, J., Barran, P. E., Fraternali, F., Anastasiou, D. 2019. Functional cross-talk between allosteric effects of activating and inhibiting ligands underlies PKM2 regulation. *eLife*. 8, 1–36. doi:10.7554/eLife.45068
32. Mileykovskaya, E., Dowhan, W., Birke, R. L., Zheng, D., Lutterodt, L., Haines, T. H. 2001. Cardiolipin binds nonyl acridine orange by aggregating the dye at exposed hydrophobic domains on bilayer surfaces. *FEBS Letters*. 507(2), 187–190. doi:10.1016/S0014-5793(01)02948-9
33. Murphy, M. P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*. 417(1), 1–13. doi:10.1042/BJ20081386
34. Nandi, S., Dey, M. 2020. Biochemical and structural insights into how amino acids regulate pyruvate kinase muscle isoform 2. *Journal of Biological Chemistry*. 295(16), 5390–5403. doi:10.1074/jbc.RA120.013030
35. Ning, X., Qi, H., Li, R., Li, Y., Jin, Y. 2017. Discovery of novel naphthoquinone derivatives as inhibitors of the tumor cell specific M2 isoform of pyruvate kinase. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 138, 343–352. doi:10.1016/j.ejmech.2017.06.064
36. Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M., Petrosillo, G. 2019. Role of Cardiolipin in Mitochondrial Function and Dynamics in Health and Disease: Molecular and Pharmacological Aspects. *Cells*. 8(7), 728. doi:10.3390/cells8070728
37. Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M., Ruggiero, F. M. 2002. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene*. 286(1), 135–141. doi:10.1016/S0378-1119(01)00814-9
38. Pennington, E. R., Funai, K., Brown, D. A., Shaikh, S. R. 2019. The role of cardiolipin concentration and acyl chain composition on mitochondrial inner membrane molecular organization and function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1864(7), 1039–1052. doi:10.1016/j.bbalip.2019.03.012
39. Petrosillo, G., Portincasa, P., Grattagliano, I., Casanova, G., Matera, M., Ruggiero, F. M., Ferri, D., Paradies, G. 2007. Mitochondrial dysfunction in rat with nonalcoholic fatty liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*. 1767(10), 1260–1267. doi:10.1016/j.bbabi.2007.07.011
40. Poljsak, B. 2016. NAD⁺ in Cancer Prevention and Treatment: Pros and Cons. *Journal of Clinical & Experimental Oncology*. 5(4), 1–15. doi:10.4172/2324-9110.1000165

41. Rendekova, J., Vlasakova, D., Arsenyan, P., Vasiljeva, J., Nasim, M. J., Witek, K., Dominguez-Alvarez, E., Zeslowska, E., Manikova, D., Tejchman, W., Zaib Saleem, R. S., Rory, K., Handzlik, J., Chovanec, M. 2018. The Selenium-Nitrogen Bond as Basis for Reactive Selenium Species with Pronounced Antimicrobial Activity. *Current Organic Synthesis*. 14(8). doi:10.2174/1570179414666170525104735
42. Robert A. Copeland 2013. *Evaluation of Enzyme Inhibitors in Drug Discovery: A Guide for Medicinal Chemists and Pharmacologists* 2nd edn. John Wiley & Sons, Inc. doi:10.1002/9781118540398
43. Rodriguez, M. E., Azizuddin, K., Zhang, P., Chiu, S. mao, Lam, M., Kenney, M. E., Burda, C., Oleinick, N. L. 2008. Targeting of mitochondria by 10-N-alkyl acridine orange analogues: Role of alkyl chain length in determining cellular uptake and localization. *Mitochondrion*. 8(3), 237–246. doi:10.1016/j.mito.2008.04.003
44. Santo-Domingo, J., Demaurex, N. 2012. The renaissance of mitochondrial pH. *Journal of General Physiology*. 139(6), 415–423. doi:10.1085/jgp.201110767
45. Srivastava, D., Nandi, S., Dey, M. 2019. Mechanistic and Structural Insights into Cysteine-Mediated Inhibition of Pyruvate Kinase Muscle Isoform 2. *Biochemistry*. 58(35), 3669–3682. doi:10.1021/acs.biochem.9b00349
46. Upadhyay, M., Samal, J., Kandpal, M., Singh, O. V., Vivekanandan, P. 2013. The Warburg effect: Insights from the past decade. *Pharmacology and Therapeutics*. 137(3), 318–330. doi:10.1016/j.pharmthera.2012.11.003
47. Wang, P., Sun, C., Zhu, T., Xu, Y. 2015. Structural insight into mechanisms for dynamic regulation of PKM2. *Protein and Cell*. 6(4), 275–287. doi:10.1007/s13238-015-0132-x
48. Warner, S. L., Carpenter, K. J., Bearss, D. J. 2014. Activators of PKM2 in cancer metabolism. *Future Medicinal Chemistry*. 6(10), 1167–1178. doi:10.4155/fmc.14.70
49. Weinberg, F., Hamanaka, R., Wheaton, W. W., Weinberg, S., Joseph, J., Lopez, M., Kalyanaraman, B., Mutlu, G. M., Budinger, G. R. S., Chandel, N. S. 2010. Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(19), 8788–8793. doi:10.1073/pnas.1003428107
50. Weinberg, S. E., Chandel, N. S. 2015. Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nature Chemical Biology*. 11(1), 9–15. doi:10.1038/nchembio.1712
51. Witek, K., Nasim, M., Bischoff, M., Gaupp, R., Arsenyan, P., Vasiljeva, J., Marć, M., Olejarz, A., Latacz, G., Kieć-Kononowicz, K., Handzlik, J., Jacob, C. 2017. Selenazolium Salts as “Small Molecule Catalysts” with High Potency against ESKAPE Bacterial Pathogens. *Molecules*. 22(12), 2174. doi:10.3390/molecules22122174

52. Zahra, K., Dey, T., Ashish, Mishra, S. P., Pandey, U. 2020. Pyruvate Kinase M2 and Cancer: The Role of PKM2 in Promoting Tumorigenesis. *Frontiers in Oncology*. 10, 159. doi:10.3389/fonc.2020.00159
53. Zhu, Y., Liu, J., Park, J., Rai, P., Zhai, R. G. 2019. Subcellular compartmentalization of NAD⁺ and its role in cancer: A sereNADe of metabolic melodies. *Pharmacology and Therapeutics*. 200, 27–41. doi:10.1016/j.pharmthera.2019.04.002
54. Zichri, S. B., Kolusheva, S., Shames, A. I., Schneiderman, E. A., Poggio, J. L., Stein, D. E., Doubijensky, E., Levy, D., Orynbayeva, Z., Jelinek, R. 2021. Mitochondria membrane transformations in colon and prostate cancer and their biological implications. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*. 1863(1), 183471. doi:10.1016/j.bbamem.2020.183471
55. Zu, X. L., Guppy, M. 2004. Cancer metabolism: Facts, fantasy, and fiction. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313(3), 459–465. doi:10.1016/j.bbrc.2003.11.136

Pateicības

Izsaku visdziļāko pateicību savam zinātniskajam vadītājam un pasniedzējam Dr. Pāvelam Arsenjanam par pacietību un ieguldīto laiku, vērtīgām zināšanām un lietderīgiem padomiem. Pateicoties viņam, man bija iespēja iegūt vislabāko mācību pieredzi, kādu vien varēju iedomāties. Es nekad neaizmirsīšu viņa fantastiskās meistarklases un “klasiskās” metodes.

Vēlos izteikt pateicību kolēģēm Allai Petrenko un Dr. Sindijai Lapčinskai par ieguldījumu darbā un noderīgiem ķīmiskiem trikiem. Milzīgs paldies prof. Maijai Dambrovai, Dr. Marinai Makreckai-Kūkai, Dr. Edijam Vāveram, Dr. Baibai Švalbei, Dr. Ilonai Domračevai, Ļudmilai Jackevičiai, Staņislavai Korž un topošajai *Ph. D.* Melitai Ozolai par vērtīgajām apmācībām un praktisko palīdzību vairākos eksperimentos.

Īpašs paldies Dr. Sergejam Beļakovam par rentgenstruktūras analīzes datiem un Dr. Kasparam Leduskram par palīdzību luminiscences īpašību raksturošanā.

Esmu pateicīgs arī Dr. Teodoram Panteļevam par PKM2 ekspresiju un palīdzību biofizikālajos eksperimentos, Dr. Marko Hyvonenam un Dr. Agnieszcai Boguckai par masas fotometrijas datiem un laipnajām atsauksmēm.

Esmu ļoti pateicīgs savai brīnišķīgajai sievai Annai, kura neskaitāmas reizes noklausījās manas prezentācijas un palīdzēja pārveidot, lai tās būtu saprotamas normālam cilvēkam.

Mana promocijas darba izstrāde nebūtu iespējama bez ģimenes un draugu bezgalīgas mīlestības un atbalsta, un es to sirsnīgi novērtēju.

Vēlos izteikt pateicību par finansiālo atbalstu no Latvijas Organiskās sintēzes institūta (studentu iekšējais grants IG-2020-01), ERAF “Jaunu efektīvu PARP inhibitoru izstrāde” (Nr. 1.1.1.1/19/A/016) un *BioMedPharm* (Nr. VPP-EM-BIOMEDICĪNA-2022/1-0001) projektiem.