

©Коллектив авторов

## ВЛИЯНИЕ N-АЛКИНИЛАМИНОСТЕРОИДОВ НА ФУНКЦИОНИРОВАНИЕ МИТОХОНДРИЙ И ПРОЦЕССЫ АУТОФАГИИ В КЛЕТКАХ ГЛИОМЫ

Я.В. Панада<sup>1</sup>, В.А. Клопова<sup>1</sup>, Т.А. Кулагова<sup>2</sup>, Я.В. Фалетров<sup>1,2</sup>,  
Н.С. Фролова<sup>1</sup>, С.В. Корень<sup>4</sup>, Е.Г. Фомина<sup>1</sup>, В.М. Шкуматов<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Беларусь, 220030, Минск, ул. Ленинградская, 14

<sup>2</sup>Белорусский государственный университет,

Беларусь, 220030, Минск, пр. Независимости, 4; \*эл. почта: biopharm@bsu.by

<sup>3</sup>Научно-исследовательский институт ядерных проблем Белорусского государственного университета, Беларусь, 220030, Минск, ул. Бобруйская, 11

<sup>4</sup>Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии, Беларусь, 220114, Минск, ул. Филимонова, 23

Исследовано влияние синтезированных на основе дегидроэпиандростерона и прегненолона N-алкинил-17-аминостероидов и N-алкинил-20-аминостероидов на функции клеток глиомы крысы линии С6. Установлено, что в концентрации 10 мкМ исследованные N-алкиниламиностероиды не влияют на митохондриальный мембранный потенциал. В аналогичных условиях N-алкиниламиностероиды усиливают процессы аутофагии в клетках глиомы на 70-90%, что было сопоставимо с активностью известного индуктора аутофагии дексаметазона. Компьютерный докинг структур полученных соединений показал возможность аффинного связывания N-алкиниламиностероидов с белком Keap1 и белком Smoothed сигнального пути Hedgehog, участвующими в регуляции аутофагии. Обсуждаются возможные механизмы наблюдаемых процессов.

**Ключевые слова:** глиома; противоопухолевые агенты; алкиниламиностероиды; митохондрии; аутофагия

**DOI:** 10.18097/PBMC20226802126

## ВВЕДЕНИЕ

Аутофагия представляет собой один из механизмов катаболизма клеточных компонентов. В норме процессы аутофагии отвечают за деградацию и переработку несвёрнутых белков, повреждённых органелл и прочих избыточных или ненужных компонентов цитоплазмы. Аутофагия также сопряжена с внутриклеточным сигнальным путём, который активируется в ответ на появление дефектных/несвёрнутых белков (unfolded protein response, UPR), и регулирует синтез шаперонов и работу митохондрий в условиях клеточного стресса [1, 2]. Постоянная повышенная активность сигнального пути UPR характерна для ряда опухолей и является одним из механизмов адаптации и выживания трансформированных клеток, поэтому его позиционируют как мишень для противоопухолевой терапии [3, 4]. В частности, установлено, что белок GPR78, являющийся одним из ключевых посредников в сигнальном пути UPR, гиперэкспрессирован в клетках глиобластомы человека (GBM) по сравнению с нормальными астроцитами и является важным фактором радиорезистентности и хеморезистентности GBM [5].

Помимо непосредственного ингибирования сигнальных белков, участвующих в пути UPR, в литературе также описана направленная активация UPR с целью доведения интенсивности аутофагии до летальных уровней и/или апоптоза [1, 3, 5]. Одним из классов соединений, активно изучающихся в связи с этим, являются

производные стероидов и стероидных гормонов, играющие существенную роль в регуляции клеточного ответа на несвёрнутые белки и аутофагии [6, 7]. В частности, дегидроэпиандростерон и агонисты эстрогеновых рецепторов регулируют активность ключевого убиквитин-связывающего белка p62, который контролирует образование и сборку аутофагосом, а также белка межклеточной матрицы CLDN6, регулирующего экспрессию беклина-1 и некоторых других посредников аутофагии [6, 8, 9]. В GBM выявлено участие стероидогенного цитохрома CYP17A1 в регуляции активности GTPазы SAR-1, участвующей в процессах фолдинга и транспорта новосинтезированных белков. Показано, что ингибирование CYP17A1 (изоформа цитохрома P450) абиратероном приводит к запуску ответа на несвёрнутые белки и апоптозу, а также снижению синтеза дегидроэпиандростерона, оказывающего цитопротекторное действие на GBM [10]. Переход от цитопротекторной к проапоптотической и проаутофагической активности описан в литературе для различных классов стероидов, в том числе для дегидроэпиандростерона [8], эстрогеновых гормонов [6, 9], окистеролов (7-кетохолестерин, 7β-гидроксихолестерин, 20(S)-гидроксихолестерин, 24-гидроксихолестерин) [11-12] и нейростероидов (3β,17α-андростендиол, аллопрегнанолон и др.) [13-15].

Ранее было установлено, что 17- и 20-аминопроизводные 3β-гидрокси-5-ен-стероидов, содержащие N-индолилалкильную группу, в концентрации 10 мкМ существенно снижают пролиферацию культуры

клеток глиомы крысы С6 и сопоставимы по активности с абиратерона ацетатом (Abi) [16]. Для наиболее активных соединений также отмечено значительное повышение концентрации GSH [16], это указывает на активацию каскада Kelch-подобный ECH-ассоциированный белок 1 – ядерный фактор, ассоциированный с эритроидным фактором 2 (Kear1-Nrf2), участвующего в регуляции процессов аутофагии в GBM и некоторых других опухолях [17-20], и позволяет предположить аутофагическую природу гибели клеток. С целью уточнения механизма антипролиферативного действия и исследования закономерностей между строением и биологической активностью был проведён сравнительный анализ свойств N-алкилпроизводных 17- и 20-аминостероидов, не содержащих индольный фрагмент в боковой цепи. В данной работе изучена потенциальная противоопухолевая активность N-алкинил-17-аминостероидов и N-алкинил-20-аминостероидов: исследована их способность индуцировать аутофагию и оказывать влияние на работу митохондрий в клеточной линии С6.

## МЕТОДИКА

### Материалы и реагенты

За исключением особо оговоренных случаев, использованные реагенты были приобретены у компании “Sigma-Aldrich” (США). В работе были использованы следующие реагенты: проп-2-ин-1-амин (98%), бут-3-ин-1-амин (95%), прегненолон (98%), дегидроэпиандростерон (99%), триацетоксиборогидрид натрия (98%), серная кислота (98%, “Реахим”, Россия), 1,2-дихлорэтан (97%, “Экос-1”, Россия), силикагель (размер пор 60 Å), диметилсульфоксид (ДМСО; 99,8%, “Фармтехнология”, Беларусь), ротенон (99%), антимицин А (99%), тетраэтилбензимидазолилкарбодианина йодид (JC-1; 99%, “ThermoFisher”, США), монодансилкадаверин (MDC; 99%), дексаметазон (Dex; 97%). Все растворители были перегнаны непосредственно

перед использованием. Анализ методом тонкослойной хроматографии проводили с использованием пластинок на алюминиевой подложке (“Merck”, Германия) в системе хлороформ-этанол (19:1). Для проявления пластинки погружали в 1% раствор  $\text{H}_2\text{SO}_4$  в этаноле (по массе) с последующими медленным прогреванием при 120°C и контролем под УФ-светом (длина волны 365 нм). Спектры ESI-MS записывали на приборе Shimadzu LCMS-2020 (“Shimadzu”, Япония). ИК-спектры снимали в виде плёнки на ИК-Фурье спектрометре Bruker Alpha с ячейкой ATR-DI (“Bruker”, США) в диапазоне 4000-400  $\text{см}^{-1}$ . Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР были получены с помощью прибора Bruker Avance (400 МГц; “Bruker”) с использованием  $\text{CDCl}_3$  (99,8%) в качестве растворителя и внутреннего стандарта. Реагенты для буферных растворов были произведены компанией “Анализ Х” (Беларусь). Растворы были приготовлены непосредственно перед использованием. Состав буфера HEPES в расчёте на 1 л дистиллированной воды: 7,66 г NaCl, 0,37 г KCl, 0,144 г  $\text{CaCl}_2$ , 0,32 г  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1,08 г глюкозы, 4,606 г HEPES, 10 М NaOH до pH 7,3. Состав фосфатного буферного раствора в расчёте на 1 л дистиллированной воды: 8 г NaCl, 0,2 г KCl, 1,44 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,24 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 М NaOH до pH 7,3. Центрифугирование проводили с помощью высокоскоростной центрифуги Sigma 3-30KS (“Sigma-Aldrich”, США).

### Синтез N-алкиниламиностероидов

3β-гидроксиандрост-5-ен-17β-(2-пропинил)амин (AS-1), 3β-гидроксиандрост-5-ен-17β-(3-бутинил)амин (AS-2), [20(R,S)]-3β-гидроксипрегн-5-ен-20-(2-пропинил)амин (AS-3), [20(R,S)]-3β-гидроксипрегн-5-ен-20-(3-бутинил)амин (AS-4) были получены путём восстановительного аминирования соответствующих кетостероидов и охарактеризованы согласно методике, описанной в работе [21]. Соединения AS-3 и AS-4 были исследованы в виде рацемической смеси соответствующих 20-изомеров. Структуры соединений изображены на рисунке 1.

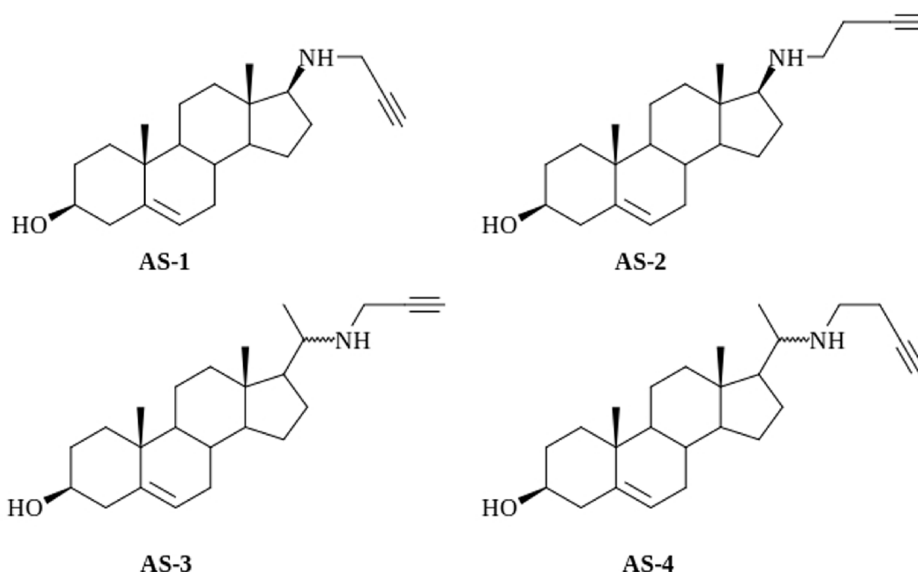


Рисунок 1. Строение исследованных N-алкиниламиностероидов.

*Культивирование клеток глиомы*

Клеточную линию C6, полученную из коллекции культур клеток человека и животных РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Беларусь), культивировали в среде DMEM ("Sigma Chemical Co.", США) с добавлением 10% бычьей эмбриональной сыворотки "HyClone" (США) и 4% гентамицина (масса/объем; "Белмедпрепараты", Беларусь). Культивирование клеток проводили в атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub>, при температуре 37°C. Снятие клеток с подложки осуществляли путём 5-минутной инкубации с 0,025% раствором трипсина ("Sigma-Aldrich", Германия). Снятые клетки центрифугировали при 185 g в течение 5 мин, затем для отмывки повторно центрифугировали в HEPES-буфере при тех же условиях. После удаления надосадка клетки ресуспендировали в буферном растворе, доводя концентрацию до 1×10<sup>6</sup> клеток/мл.

*Исследование митохондриального мембранного потенциала (ММП)*

Для данного анализа был использован карбоцианиновый краситель JC-1, используемый для оценки состояния митохондрий при исследовании процессов апоптоза. В зависимости от потенциала митохондриальной мембраны JC-1 способен накапливаться в митохондриях и обратимо переходить в агрегированное состояние, для которого характерен батохромный сдвиг эмиссии ( $\lambda_{em1} = 530$  нм,  $\lambda_{em2} = 590$  нм). В норме JC-1 преимущественно находится в агрегированной форме, тогда как при открытии митохондриальных пор наблюдается диссоциация JC-1. Таким образом, соотношение интенсивностей эмиссии при двух длинах волн позволяет оценить нарушение функционирования митохондрий.

Суспензию клеток инкубировали с 2 мкМ JC-1 в темноте при 37°C на протяжении 15 мин [22]. После инкубации клетки были осаждены с помощью центрифугирования в условиях, аналогичных описанным выше, промыты HEPES-буфером и ресуспендированы. Добавление веществ проводили непосредственно перед началом измерения. Состояние ММП определяли по соотношению интенсивности флуоресценции JC-1 при двух длинах волн ( $\lambda_{ex} = 490$  нм,  $\lambda_{em1} = 530$  нм,  $\lambda_{em2} = 590$  нм). Относительное значение ММП выражали в процентах от контрольного образца, содержащего только ДМСО. Конечная концентрация ДМСО в культуре не превышала 0,1%. В качестве положительных контролей использовали ротенон и антимицин А в концентрации 10 мкМ.

*Исследование процессов аутофагии*

Для анализа аутофагии был использован флуоресцентный маркер монодансилкадаверин (MDC), обладающий тропностью к мембранным липидам и органеллам с повышенной кислотностью среды и способный преимущественно накапливаться в аутофагосомах и аутолизосомах [23]. Монослой

культуры клеток C6 инкубировали с исследуемыми веществами или ДМСО на протяжении 3 ч и снимали с подложки по методике, описанной выше. Конечная концентрация ДМСО в культуре не превышала 0,1%. К суспензии клеток C6 в HEPES-буфере был добавлен раствор MDC в концентрации 50 мкМ. После 15 мин инкубации в темноте при 37°C клетки отмывали центрифугированием, промывали используемым буфером и ресуспендировали из расчёта 10<sup>6</sup> клеток/мл. Количество накопленного красителя оценивали с помощью флуориметрии ( $\lambda_{ex} = 340$  нм,  $\lambda_{em} = 430$  нм) относительно образца, содержащего только ДМСО. В качестве положительного контроля использовали дексаметазон в концентрации 10 мкМ [24, 25].

*Молекулярный докинг*

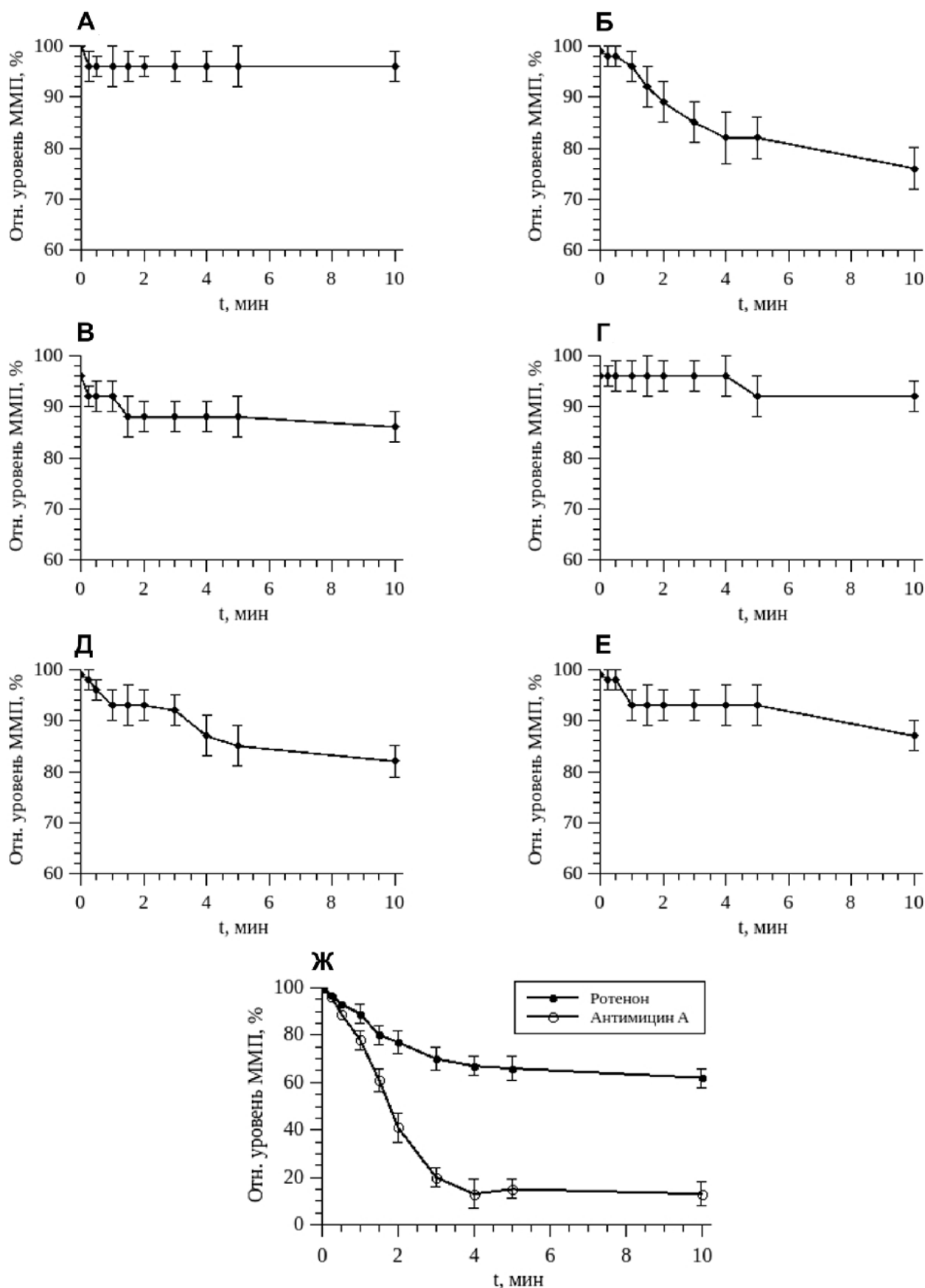
Координаты белков были взяты из базы белковых структур RCSB PDB. Выборка, состоящая из 262 структур, была собрана путём поиска по ключевому слову "аутофагия". В скрининге были использованы 22 белка, ассоциированные с аутофагией: 5 структур аминокептидазы Ape1, 91 структура аутофагических белков Atg, 12 структур Bcl-2 и Bcl-xL, 10 структур беклина-1, 1 структура CDC-подобной киназы CLK1, 4 структуры DAPK1 (ассоциированная с гибелью протеинкиназа 1), 3 структуры Kear1, 40 структур LC3, 5 структур адапторного белка NBR1, 7 структур NDP52, 2 структуры оптинейрина, 20 структур адапторного белка p62, 13 структур PI3K класса 3, 2 структуры стерол-3 $\beta$ -глюкотрансферазы, 1 структура сфингозин-1-фосфатлиазы, 9 структур ULK1/2, 2 структуры 14-3-3 и 35 структур адапторов аутофагии TNIP1, LGG и MITF. Докинг проводили с помощью открытой программы AutoDock Vina 1.1.2 ("Scripps Research Institute", США) в приближении неподвижных белковых цепей. При моделировании использовали стандартные параметры оценочной функции. Поисковое пространство имело форму куба со стороной 40 Å. Значение параметра избыточности (exhaustiveness) было задано равным 128.

*Статистический анализ*

Все эксперименты были повторены трижды. Данные представлены в виде среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Статистическую обработку данных производили с помощью однофакторного дисперсионного анализа. Отклонение считали статистически значимым при значении  $p < 0,05$ . Графики были построены в открытом программном пакете QtiPlot 0.9.8.9.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ***Исследование влияния синтезированных соединений на митохондриальный мембранный потенциал*

Обнаружено, что в концентрации 10 мкМ синтезированные соединения не вызывают существенного снижения ММП по сравнению с контрольным образцом, содержащим только ДМСО (рис. 2). В общем случае уровень ММП после

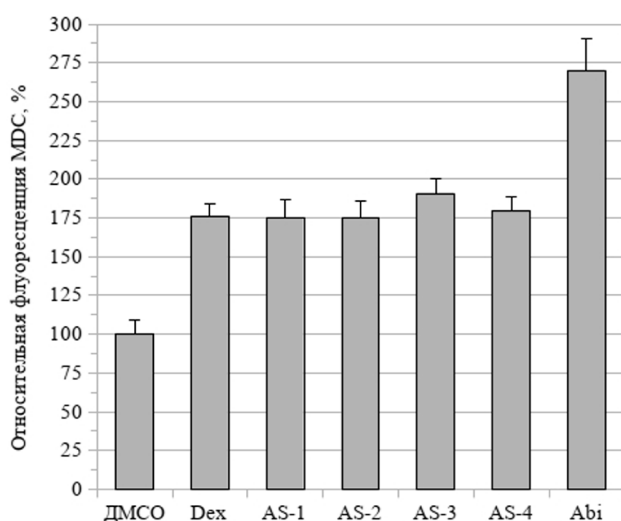


**Рисунок 2.** Влияние производных стероидов ( $C = 10$  мкМ) на митохондриальный мембранный потенциал глиомы крыс С6. Буквами обозначены: **А** — ДМСО; **Б** — Аb1; **В** — АS-1; **Г** — АS-2; **Д** — АS-3; **Е** — АS-4; **Ж** — положительные контроли ротенон и антимицин А.

воздействия N-алкиниламиностероидов (10 мкМ) составил 84-90% против 95±4% для образца, содержащего только ДМСО. Хотя снижение ММП под действием N-алкиниламиностероидов было статистически значимым, сопоставление эффекта для N-алкиниламиностероидов (рис. 2В-2Е) и ингибиторов комплексов I и III дыхательной цепи — ротенона и антимицина (рис. 2Ж) — позволяет предположить, что N-алкиниламиностероиды не вызывают значительного нарушения функционирования митохондрий глиомы C6 по сравнению с известными индукторами апоптоза.

#### Влияние производных стероидов на накопление MDC клеточной линией C6

Установлено, что N-алкиниламиностероиды в концентрации 10 мкМ вызывают значительное накопление MDC клетками глиомы (175-191%) относительно контроля, содержащего только ДМСО. Это сопоставимо с эффектом дексаметазона (178±8%), тогда как Abi приводит к увеличению накопления MDC до 270±21% (рис. 3). Показано, что N-алкиниламиностероиды в ряду AS-1–AS-2–AS-4 не проявляют различий в способности индуцировать аутофагию; для AS-3 наблюдается небольшое статистически значимое увеличение активности до 191±10%.



**Рисунок 3.** Влияние исследованных стероидов (C = 10 мкМ) на интенсивность процессов аутофагии в глиоме крыс C6.

Следует отметить, что способность исследованных N-алкиниламиностероидов индуцировать аутофагию сопоставима с описанной в литературе для других аминостероидов. В частности, природные 3β-аминостероиды клионамин А и клионамин В, индуцировавшие аутофагию в линии клеток молочной железы MCF-7, повышали количество аутофагосом в 1,5-2 раза при концентрации 10 мкг/мл (23 мкМ) [26]. Для четвертичного аминопроизводного 17β-эстрадиола было обнаружено снижение пролиферации опухолевых клеток MCF-7 и MDA-MB-231 (IC<sub>50</sub>=3 мкМ) с одновременной индукцией маркеров аутофагии и апоптоза; при этом инактивация фактора аутофагии Atg5 приводила к снижению антипролиферативного эффекта [27].

#### Молекулярный докинг

В литературе описано, что дексаметазон и некоторые другие глюкокортикоиды способны индуцировать аутофагию и вызывать гибель ряда опухолей за счёт активации глюкокортикоидных рецепторов, являющихся одними из посредников в регуляции процессов аутофагии [28-30]. Тем не менее, поскольку для агонистов глюкокортикоидных рецепторов характерна 3-кето-Δ<sup>4</sup>-стероидная структура, данный механизм действия представляется маловероятным для исследуемых N-алкиниламиностероидов, содержащих 3β-гидрокси-Δ<sup>5</sup>-фрагмент. Для определения возможных молекулярных мишеней был проведён обратный докинг к 262 белковым структурам из базы данных RCSB PDB, участвующим в регуляции процессов аутофагии. В результате скрининга были идентифицированы 5 белков с предсказанной энергией связывания от -9,0 ккал/моль, в том числе Keap1, белок Smoothed сигнального пути Hedgehog (Smo) и нетипичные для стероидов мишени протеинкиназы CLK1 и ULK1/2, являющиеся одним из вторичных звеньев стероидной сигнализации (таблица). Следует отметить, что в литературе описано специфичное связывание 20-аминостероидных аналогов холестерина с белком Smo [31-32], а также ингибирование активности Smo под действием аминостероидов джержина и циклопина, приводящее к активации либо синергетическому усилению летальной аутофагии опухолей [33-34]. Таким образом, результаты скрининга позволяют предположить возможную роль Smoothed и остальных вышеперечисленных белков в механизме аутофагии, вызванной исследованными N-алкиниламиностероидами.

**Таблица.** Расчётные энергии взаимодействия исследованных стероидов с некоторыми белками-регуляторами аутофагии

Белок	PDB	Дексаметазон	AS-1	AS-2	AS-3 (20R)	AS-3 (20S)	AS-4 (20R)	AS-4 (20S)
Keap1	3ade	-10,2	-10,1	-9,7	-10,0	-9,6	-9,4	-9,2
Smo	5l7i	-10,4	-10,2	-10,3	-10,8	-10,7	-10,1	-10,5
ULK1	4wnp	-10,0	-9,4	-9,6	-9,2	-9,7	-9,1	-9,5
ULK2	6qav	-7,9	-9,5	-9,3	-9,5	-9,4	-9,8	-9,8
CLK1	5x8i	-8,0	-9,4	-9,5	-9,3	-8,8	-9,4	-9,3

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе была изучена потенциальная противоопухолевая активность синтезированных N-алкиниламиностероидов и исследована их способность влиять на функционирование митохондрий и индуцировать аутофагию в клеточной линии С6. Обнаружено, что в концентрации 10 мкМ соединения незначительно снижали митохондриальный мембранный потенциал по сравнению с контролем и не приводили к быстрому падению потенциала, наблюдаемому для ингибиторов митохондриальных комплексов I (ротенон) и III (антимицин А). Также обнаружено, что в клетках глиомы, проинкубированных 3 ч с N-алкиниламиностероидами, происходило усиление процессов аутофагии в пределах, сопоставимых с противовоспалительным и противоопухолевым препаратом дексаметазоном. С помощью обратного молекулярного докинга идентифицированы потенциальные белки-регуляторы аутофагии, которые могут являться молекулярными мишенями N-алкиниламиностероидов, в том числе Keap1, Smoothed (Smo), протеинкиназы CLK1 и ULK1/2. Результаты, полученные в данной работе, позволяют лучше понять закономерности между строением и противоопухолевой активностью производных стероидов и могут быть использованы для дальнейшего рационального дизайна и оптимизации противоопухолевых свойств аминостероидов.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность сотрудникам кафедры радиационной химии и химико-фармацевтических технологий химического факультета Белорусского государственного университета (БГУ) и лаборатории катализа полимеризационных процессов НИИ физико-химических проблем БГУ за помощь в проведении ESI-MS, ИК и <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопии.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа была выполнена при поддержке гранта Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований X20M-113.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Исследования, выполненные в данной работе, проведены без использования животных, добровольцев или биологических материалов, полученных от животных или пациентов, в качестве объектов испытания.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Zheng X., Andruska N., Yu L., Mao C., Kim J.U., Livezey M., Helferich W.G., Shapiro D.J. (2016) Interplay between steroid hormone activation of the unfolded protein response and nuclear receptor action. *Steroids*, **114**, 2-6. DOI: 10.1016/j.steroids.2016.03.014
2. Tian Y., Merkwirth C., Dillin A. (2016) Mitochondrial UPR: a double-edged sword. *Trends Cell Biol.*, **26**(8), 563-565. DOI: 10.1016/j.tcb.2016.06.006
3. Jin Y., Saatcioglu F. (2020) Targeting the unfolded protein response in hormone-regulated cancers. *Trends Cancer*, **6**(2), 160-171. DOI: 10.1016/j.trecan.2019.12.001
4. Shi P., Zhang Zh., Xu J., Zhang L., Cui H. (2021) Endoplasmic reticulum stress-induced cell death as a potential mechanism for targeted therapy in glioblastoma (Review). *Int. J. Oncol.*, **59**(2), 60. DOI: 10.3892/ijo.2021.5240
5. Liu K., Tsung K., Attenello F.J. (2020) Characterizing cell stress and grp78 in glioma to enhance tumor treatment. *Front. Oncol.*, **10**, 608911. DOI: 10.3389/fonc.2020.608911
6. Wnuk A., Kajta M. (2017) Steroid and xenobiotic receptor signalling in apoptosis and autophagy of the nervous system. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**(11), 2394. DOI: 10.3390/ijms18112394
7. Denton D., Aung-Htut M.T., Lorensuhewa N., Nicolson S., Zhu W., Mills K., Cakouros D., Bergmann A., Kumar S. (2013) UTX coordinates steroid hormone-mediated autophagy and cell death. *Nat. Commun.*, **4**, 2916. DOI: 10.1038/ncomms3916
8. Vegliante R., Desideri E., di Leo L., Ciriolo M.R. (2016) Dehydroepiandrosterone triggers autophagic cell death in human hepatoma cell line HepG2 via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression. *Carcinogenesis*, **37**(3), 233-244. DOI: 10.1093/carcin/bgw003
9. Song P., Li Y., Dong Y., Liang Y., Qu H., Qi D., Lu Y., Jin X., Guo Y., Jia Y., Wang X., Xu W., Quan C. (2019) Estrogen receptor  $\beta$  inhibits breast cancer cells migration and invasion through CLDN6-mediated autophagy. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **38**, 354. DOI: 10.1186/s13046-019-1359-9
10. Lin H.-Y., Ko C.-Y., Kao T.-J., Yang W.-B., Tsai Y.-T., Chuang J.-Y., Hu S.-L., Yang P.-Y., Lo W.-L., Hsu T.-I. (2019) CYP17A1 Maintains the survival of glioblastomas by regulating sar1-mediated endoplasmic reticulum health and redox homeostasis. *Cancers*, **11**(9), 1378. DOI: 10.3390/cancers11091378
11. de Freitas F.A., Levy D., Zarrouk A., Lizard G., Bydlowski S.P. (2021) Impact of oxysterols on cell death, proliferation, and differentiation induction: current status. *Cells*, **10**(9), 2301. DOI: 10.3390/cells10092301
12. Poirot M., Silvente-Poirot S. (2018) The tumor-suppressor cholesterol metabolite, denderogenin A, is a new class of LXR modulator activating lethal autophagy in cancers. *Biochem. Pharmacol.*, **153**, 75-81. DOI: 10.1016/j.bcp.2018.01.046
13. Graf R.M., Jia W., Johnson R.S., Dent P., Mitchell C., Loria R.M. (2009) Autophagy and the functional roles of Atg5 and beclin-1 in the anti-tumor effects of 3 $\beta$  androstene 17 $\alpha$  diol neuro-steroid on malignant glioma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **115**(3), 137-145. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2009.03.013
14. Jia W., Loria R.M., Park M.A., Yacoub A., Dent P., Graf R.M. (2010) The neuro-steroid, 5-androstene 3 $\beta$ ,17 $\alpha$  diol; induces endoplasmic reticulum stress and autophagy through PERK/eIF2 $\alpha$  signaling in malignant glioma cells and transformed fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **42**(12), 2019-2029. DOI: 10.1016/j.biocel.2010.09.003

15. Kim H.N., Lee S.J., Koh J.Y. (2012) The neurosteroids, allopregnanolone and progesterone, induce autophagy in cultured astrocytes. *Neurochem. Int.*, **60**(2), 125-133. DOI: 10.1016/j.neuint.2011.11.015
16. Panada J., Klopava V., Kulahava T., Frolova N., Faletrov Y., Shkumatov V. (2020) New 3 $\beta$ -hydroxysteroid-indolamine conjugates: Design, synthesis and inhibition of C6 glioma cell proliferation. *Steroids*, **164**, 107828. DOI: 10.1016/j.steroids.2020.108728
17. Ichimura Y., Waguri S., Sou Y.-S., Kageyama S., Hasegawa J., Ishimura R., Saito T., Yang Y., Kouno T., Fukutomi T., Hoshii T., Hirao A., Takagi K., Mizushima T., Motohashi H., Lee M.-S., Yoshimori T., Tanaka K., Yamamoto M., Komatsu M. (2013) Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Molecular Cell*, **51**(5), 618-631. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.08.003
18. Zhou Y., Wang H.-D., Zhu L., Cong Z.-X., Li N., Ji X.-J., Pan H., Wang J.-W., Li W.-C. (2013) Knockdown of Nrf2 enhances autophagy induced by temozolomide in U251 human glioma cell line. *Oncology Rep.*, **29**(1), 394-400. DOI: 10.3892/or.2012.2115
19. Ryoo I., Choi B., Ku S.-K., Kwak M.-K. (2018) High CD44 expression mediates p62-associated NFE2L2/NRF2 activation in breast cancer stem cell-like cells: Implications for cancer stem cell resistance. *Redox Biol.*, **17**, 246-258. DOI: 10.1016/j.redox.2018.04.015
20. Калия М., Бейсбарг Т., Кель А.Э. (2021) Мастер-регуляторы, связанные с плохим прогнозом при глиобластоме. *Биомедицинская химия*, **67**(3), 201-212. [Kalya M.P., Beisbarth T., Kel A. (2021) Master regulators associated with poor prognosis in glioblastoma multiforme. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(3), 201-212.] DOI: 10.18097/PBMC20216703201
21. Панада Я.В., Фалетров Я.В., Фролова Н.С., Шкуматов В.М. (2019) N-алкиниламиностероиды в качестве потенциальных ингибиторов цитохрома P450 17A1. *Биомедицинская химия*, **65**(4), 324-330. [Panada J.U., Faletrov Y.V., Frolova N.S., Shkumatov V.M. (2019) Synthesis and evaluation of N-alkynylaminosteroids as potential inhibitors of CYP450 17A1. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **65**(4), 324-330.] DOI: 10.18097/PBMC20196504324
22. Sivandzade F., Bhalerao A., Cucullo L. (2019) Analysis of the mitochondrial membrane potential using the cationic jc-1 dye as a sensitive fluorescent probe. *Bio-Protocol*, **9**(1), e3128. DOI: 10.21769/BioProtoc.3128
23. Vázquez C.L., Colombo M.I. (2009) Assays to assess autophagy induction and fusion of autophagic vacuoles with a degradative compartment, using monodansylcadaverine (MDC) and DQ-BSA. In: *Methods in Enzymology, Autophagy in Mammalian Systems, Part B* (Klionsky D., Abelson J.N., Simon M.I., eds.), Elsevier Academic Press, San Diego, 452, pp. 85-95.
24. Guan Y., Chen J., Zhan Y., Lu H. (2018) Effects of dexamethasone on C6 cell proliferation, migration and invasion through the upregulation of AQP1. *Oncology Lett.*, **15**(5), 7595-7602. DOI: 0.3892/ol.2018.8269
25. Higgins S.C., Pilkington G.J. (2010) The *in vitro* effects of tricyclic drugs and dexamethasone on cellular respiration of malignant glioma. *Anticancer Res.*, **30**(2), 391-397.
26. Forestieri R., Donohue E., Balgi A., Roberge M., Andersen R.J. (2013) Synthesis of clonamine B, an autophagy stimulating aminosteroid isolated from the sponge *cliona celata*. *Organic Lett.*, **15**(15), 3918-3921. DOI: 10.1021/ol4016783
27. Sinha S., Roy S., Reddy B.S., Pal K., Sudhakar G., Iyer S., Dutta S., Wang E., Vohra P.K., Roy K.R., Reddanna P., Mukhopadhyay D., Banerjee R. (2011) A lipid-modified estrogen derivative that treats breast cancer independent of estrogen receptor expression through simultaneous induction of autophagy and apoptosis. *Mol. Cancer Res.*, **9**(3), 364-374. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-10-0526
28. Laane E., Tamm K., Buentke E., Ito K., Khahariza P., Oscarsson J., Corcoran M., Björklund A.C., Hulténby K., Lundin J., Heyman M., Söderhäll S., Mazur J., Porwit A., Pandolfi P.P., Zhivotovsky B., Panaretakis T., Grandér D. (2009) Cell death induced by dexamethasone in lymphoid leukemia is mediated through initiation of autophagy. *Cell Death Differentiation*, **16**, 1018-1029. DOI: 10.1038/cdd.2009.46
29. Altinoz M.A., Nalbantoglu J., Ozpinar A., Ozcan M.E., del Maestro R.F., Elmaci I. (2018) From epidemiology and neurodevelopment to antineoplasticity. Medroxyprogesterone reduces human glial tumor growth *in vitro* and C6 glioma in rat brain *in vivo*. *Clin. Neurol. Neurosurg.*, **173**, 20-30. DOI: 10.1016/j.clineuro.2018.07.012
30. Xu Z., Yang K., Li X. (2020) Inhibitory effect of glucocorticoid receptor on colorectal cancer growth by inhibiting glycolysis through autophagy. *Materials Express*, **10**(3), 363-373. DOI: 10.1166/mex.2020.1648
31. Nedelcu D., Liu J., Xu Y., Jao C., Salic A. (2013) Oxysterol binding to the extracellular domain of Smoothened in Hedgehog signaling. *Nat. Chem. Biol.*, **9**, 557-564. DOI: 10.1038/nchembio.1290
32. Faletrov Y.V., Efimova V.S., Horetski M.S., Tugaeva K.V., Frolova N.S., Lin Q., Isaeva L.V., Rubtsov M.A., Sluchanko N.N., Novikova L.A., Shkumatov V.M. (2020) New 20-hydroxycholesterol-like compounds with fluorescent NBD or alkyne labels: synthesis, *in silico* interactions with proteins and uptake by yeast cells. *Chemistry Physics Lipids*, **227**, 104850. DOI: 10.1016/j.chemphyslip.2019.104850
33. Xu J.H., Yang H.P., Zhou X.D., Wang H.J., Gong L., Tang C.L. (2015) Autophagy accompanied with bisdemethoxycurcumin-induced apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *Biomed. Environ. Sci.*, **28**(2), 105-115. DOI: 10.3967/bes2015.013
34. Lei W., Huo Z. (2020) Jervine inhibits non-small cell lung cancer (NSCLC) progression by suppressing Hedgehog and AKT signaling via triggering autophagy-regulated apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **533**(3), 397-403. DOI: 10.1016/j.bbrc.2020.08.023

Поступила в редакцию: 08. 02. 2022.  
После доработки: 09. 03. 2022.  
Принята к печати: 10. 03. 2022.

**INFLUENCE OF N-ALKYNYLAMINOSTEROIDS  
ON MITOCHONDRIA FUNCTION AND AUTOPHAGY IN GLIOMA CELLS**

*J.U. Panada<sup>1</sup>, V.A. Klopava<sup>1</sup>, T.A. Kulahava<sup>3</sup>, Y.V. Faletrov<sup>1,2</sup>,  
N.S. Frolova<sup>1</sup>, S.V. Koran<sup>4</sup>, E.G. Fomina<sup>4</sup>, V.M. Shkumatov<sup>1,2,\*</sup>*

<sup>1</sup>Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University,  
14 Lieninhradskaja str., Minsk, 220030 Belarus

<sup>2</sup>Belarusian State University,  
4 Independence ave., Minsk, 220030 Belarus; \*e-mail: biopharm@bsu.by

<sup>3</sup>Institute for Nuclear Problems of the Belarusian State University,  
11 Babrujskaja str., Minsk, 220006 Belarus

<sup>4</sup>Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology,  
23 Filimonava str., Minsk, 220114 Belarus

In this work we examined the synthesized N-alkynyl-17-aminosteroids and N-alkynyl-20-aminosteroids (based on dehydroepiandrosterone and pregnenolone, respectively) for their effect on C6 rat glioma cell functions. At 10  $\mu$ M, the compounds had an insignificant effect on C6 glioma mitochondrial membrane potential, but increased cell autophagy by 70-90%, comparable to the known autophagy inducer dexamethasone. Docking simulations predict a potential high-affinity interaction between N-alkynylaminosteroids and Keap1 and the Hedgehog pathway protein, Smoothened, which are involved in autophagy regulation. The possible mechanisms of observed processes are discussed.

**Key words:** glioma; anticancer compounds; alkynylaminosteroids; mitochondria; autophagy

**Funding.** This work was supported by Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research grant X20M-113.

Received 08.02.2022; revised 09.03.2022; accepted 10.03.2022.