

Том 49, Номер 10

ISSN 0132-344X

Октябрь 2023



КООРДИНАЦИОННАЯ ХИМИЯ

www.sciencejournals.ru

Журнал представляет оригинальные статьи и обзоры
по всем аспектам теоретической и экспериментальной
координационной химии



СОДЕРЖАНИЕ

Том 49, номер 10, 2023

Номер посвящен биологически активным координационным соединениям

Биологически активные комплексы палладия(II), цинка(II) и меди(II) с терпеновыми лигандами — потенциальные лекарственные препараты <i>Я. А. Гурьева, О. А. Залевская, А. В. Кучин</i>	603
Транс-комплексы платины с диклофенаком, аспирином и 2,6-ди- <i>трет</i> -бутилфенольным фрагментом. Синтез и биологическая активность <i>Т. А. Антоненко, Д. Б. Шпаковский, Ю. А. Грачева, К. А. Лысенко, Е. Р. Милаева</i>	624
Фуранкарбоксилатные комплексы меди(II) с 5-нитро-1,10-фенантролином — перспективные биологические агенты <i>К. А. Кошенкова, Д. Е. Баравиков, Ю. В. Нелюбина, П. В. Примаков, В. О. Шендер, И. К. Мальяни, О. Б. Беккер, Т. М. Алиев, Е. А. Бородин, Д. Д. Котельников, Н. Ю. Леусова, С. Н. Мантров, М. А. Кискин, И. Л. Еременко, И. А. Луценко</i>	632
Поиск отечественных фармацевтических субстанций в ряду металлокомплексов на основе (гет)ариламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот <i>Н. А. Пулина, Ф. В. Собин, А. И. Краснова</i>	644
Комплексы Cu(II) и Zn(II) с анионами гетероциклических кислот и 3,5-диметилпиразолом: синтез, структура и биологические свойства <i>М. А. Уварова, М. В. Новикова, В. А. Елисеенкова, Д. Е. Баравиков, Ф. М. Долгушин, О. Б. Беккер, Е. В. Фатюшина, М. А. Кискин, И. Л. Еременко, И. А. Луценко</i>	651
Взаимодействие тетрасульфоталоцианина кобальта с дополнительным белком ORF8 SARS-CoV-2 <i>О. И. Койфман, В. Е. Майзлиш, Н. Ш. Лебедева, Е. С. Юрина, С. С. Гусейнов, Е. Л. Гурьев, Ю. А. Губарев</i>	659

УДК 547.598.5+547.599.6+547.304.2+546.98+546.47+546.562+615.01

БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ КОМПЛЕКСЫ ПАЛЛАДИЯ(II), ЦИНКА(II) И МЕДИ(II) С ТЕРПЕНОВЫМИ ЛИГАНДАМИ – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ

© 2023 г. Я. А. Гурьева¹, *, О. А. Залевская¹, А. В. Кучин¹

¹Институт химии Федерального исследовательского центра “Коми НЦ УрО РАН”, Сыктывкар, Россия

*e-mail: jana.aleksandrovna@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.01.2023 г.

После доработки 25.02.2023 г.

Принята к публикации 13.03.2023 г.

Представлен итоговый обзор результатов исследования разноплановой биологической активности (*in vitro*) хиральных металлокомплексов с терпеновыми производными бензиламина и этилендиамина. Определен цитотоксический профиль палладациклов, содержащих связь Pd–C, и хелатных комплексов палладия и цинка. Для ряда соединений проведен анализ возможных механизмов потенциального противоопухолевого действия, таких как модулирование процессов, связанных с функционированием митохондрий, а также влияние на параметры гликолитической функции опухолевых клеток. Исследована антибактериальная и противогрибковая активность комплексов палладия различного типа и хелатных комплексов меди. Для комплексов меди установлена корреляция между высокой противомикробной активностью и антиоксидантными свойствами ряда соединений. Материал дополнен расширенным анализом литературы по соответствующим разделам.

Ключевые слова: комплексы палладия(II), цинка(II), меди(II), терпеновые лиганды, противоопухолевая активность, антимикробная активность, антиоксиданты

DOI: 10.31857/S0132344X23700305, EDN: MVMZUU

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время число металлосодержащих фармакологических препаратов, используемых в клинической практике, исчисляется сотнями [1–3]. Это и диагностические вещества, и терапевтические лекарства. Интерес к таким соединениям постоянно растет. Особую группу составляют металлокомплексные соединения, в которых органический лиганд координирован с ионом металла. Ионы металлов играют важную роль в различных биологических процессах [4]. Координация органического лиганда к металлу позволяет модифицировать его свойства. Это подтверждается тем фактом, что практически в 90% исследованных пар лиганд–металлокомплекс биологическая активность исходного лиганда значительно ниже [5–9]. В терапии открывается множество возможностей, которые традиционные органические молекулы не могут выполнять из-за растущей лекарственной устойчивости. Обзоры, посвященные последним достижениям и перспективам использования металлокомплексных соединений в качестве лекарственных препаратов, активно публикуются [5–11].

Достоверно установлено, что важнейшим фактором эффективности фармпрепаратов является их хиральность, так как практически все мишени-

биомолекулы являются также хиральными и существуют, как правило, в индивидуальной стереоизомерной форме. Однако доступность энантиомерно чистых лигандов ограничена, поэтому их поиск продолжает оставаться актуальной проблемой. Природные монотерпеноиды – камфора [12], α -пинен [13] – недорогие коммерчески доступные соединения, что позволяет успешно использовать их производные в качестве прекурсоров для синтеза лигандов и получения хиральных металлокомплексов различного типа. Разноплановая биологическая активность синтетических производных природных терпеноидов достоверно установлена [14–18], в том числе их металлокомплексных соединений, отмеченных в обзоре [19].

В качестве N-донорных лигандов для синтеза металлокомплексов различного типа нами были получены пинановые и борнановые производные бензиламина HL¹–HL⁵ (схема 1) и этилендиамина HL⁶–HL¹⁶ (схема 2). Стартовыми хиральными соединениями для этих целей выбраны камфора и α -пинен, при этом мы использовали их в виде различных стереоизомеров с высокой энантиомерной чистотой. Таким образом, в нашем распоряжении были две группы лигандов: терпеновые производные бензиламина представляют интерес с точки зрения возможного получения палладациклов, а этилендиаминовые лиганды образуют

хелатные металлокомплексы. В представленном итоговом обзоре обсуждаются результаты исследования разноплановых биологических свойств комплексов палладия, цинка и меди с терпеновыми лигандами. Описание методов синтеза, строе-

ния и характеристики этих металлокомплексов и исходных лигандов можно найти в соответствующих наших публикациях. Лиганды — терпеновые производные бензиламина и этилендиамина представлены на схемах 1 и 2 соответственно:

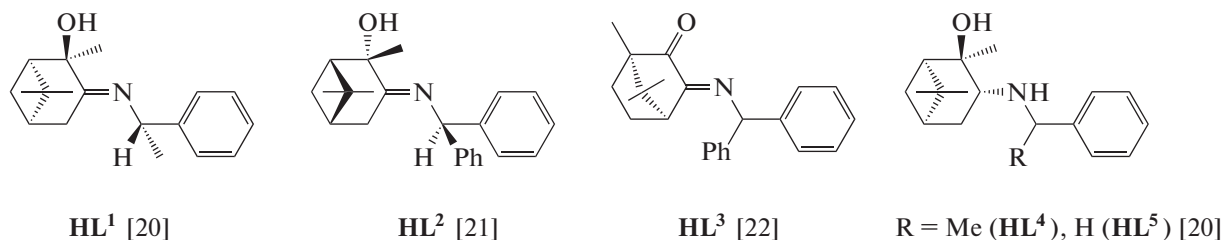


Схема 1.

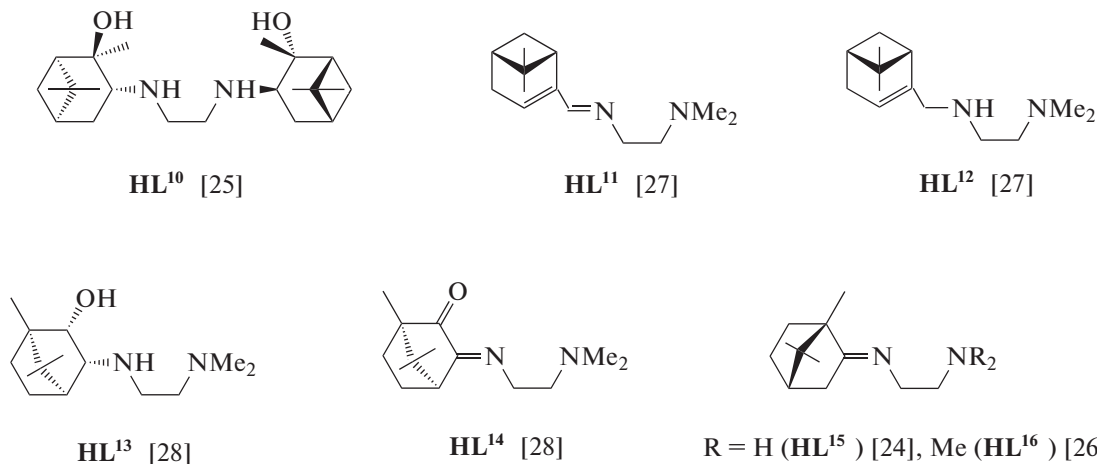
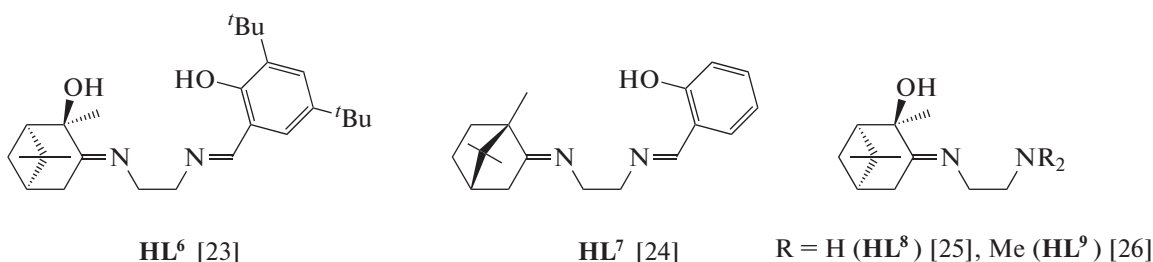


Схема 2. ^tBu

АНТИБАКТЕРИАЛЬНАЯ И ПРОТИВОГРИБКОВАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ПАЛЛАДИЯ(II) РАЗЛИЧНОГО ТИПА

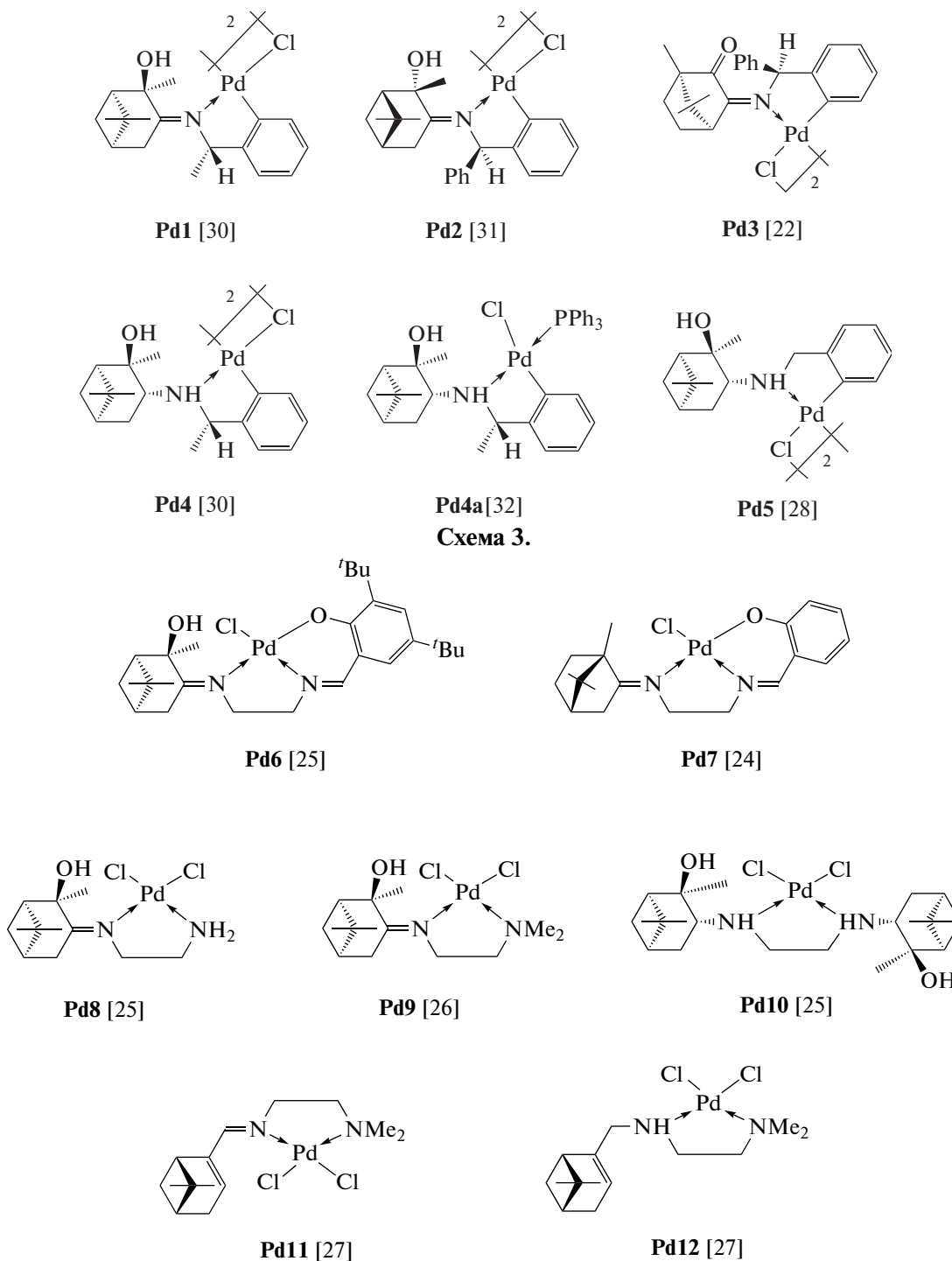
Растущее число микробов с множественной лекарственной устойчивостью представляет собой серьезную угрозу для современной противомикробной терапии, а отсутствие технических инноваций препятствует разработке новых лекарств для борьбы с растущими показателями резистентности. Это привело к возрождению нетрадиционных подходов

разработки противомикробных препаратов, которые не вписываются в традиционную парадигму низкомолекулярных препаратов прямого действия. В обзорах [9, 29] приведен анализ данных по оценке 906 металлосодержащих соединений, проверенных на антимикробную активность в рамках международного проекта Community for Open Antimicrobial Drug Discovery (CO-ADD). Результат показал, что 9.90% исследованных металлосодержащих соединений обладают активностью, а для органических молекул эта цифра составляет 0.87%. Полученные данные позволяют предположить, что на восприим-

чивость бактерий к химиотерапевтическим металлокомплексам существенное влияние оказывает как природа иона металла, так и связанная с ним координационная сфера.

Для установления корреляций “структура–биологическая активность” нами исследованы хиральные комплексы палладия(II) двух типов.

Комплексы Pd1–Pd5 (схема 3) – это палладациклы, содержащие связь углерод–палладий, полученные прямым циклопалладированием терпеновых производных бензиламинов. Вторая группа – соединения Pd6–Pd12 (схема 4) – это хелатные комплексы палладия, полученные на основе терпеновых производных этилендиамина.



Биологические испытания проводились *in vitro* в рамках международного проекта CO-ADD (Австралия) [32]. Активность определяли по ингибированию роста клеток пяти видов бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*) и двух видов грибов (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*). Данные виды широко распространенных бактерий и грибов обладают множественными механизмами резистентности по отношению к ряду клинических препаратов, что делает поиск новых бактерицидных и фунгицидных препаратов актуальным.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой избирательности ингибирующего действия комплексов палладия различного строения в отношении различных бактериальных штаммов. Все исследованные соединения оказались неактивными в отношении грамм-отрицательных бактерий *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*. В отношении грамм-положительных бактерий золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* высокую ингибирующую активность проявляют комплексы палладия Pd1–Pd4a, относящиеся к группе циклометаллированных соединений (табл. 1). Лидером является палладацикл Pd2, имеющий минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) 1 мкг/мл, что соответствует активности антибиотика ванкомицина. Сравнивая ингибирующую активность ближайших аналогов, можно отметить, что комплексы Pd1 и Pd2 на основе пинановых иминов более активны, чем соответствующие аминные производные (например, Pd4). Трансформация биядерного палладацикла Pd4 в моноядерный комплекс Pd4a, содержащий дополнительный трифенилфосфиновый лиганд, приводит к снижению МИК в 2 раза. Эти факты говорят о том, что антимикробная активность комплексов палладия существенно определяется структурными особенностями лигандов. При этом следует отметить, что соответствующие свободные лиганды неактивны в отношении *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213, музейный штамм). Качественные исследования антимикробной активности лигандов выполнено в Институте фундаментальной медицины и биологии Казанского федерального университета.

Согласно результатам испытаний все исследованные комплексы палладия (Pd1–Pd4a и Pd6–Pd12) показали высокую противогрибковую активность в отношении *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans* (табл. 1). МИК не выше 16 мкг/мл, а в ряде случаев менее 0.25 мкг/мл. Четко выраженной зависимости структура–свойство не наблюдается.

Проведена оценка клеточной токсичности комплексных соединений палладия Pd1–Pd4a и Pd6–Pd12 (табл. 1). Для оценки цитотоксичности

в качестве тест-систем были использованы эмбриональные клетки почек человека НЕК293 (Human embryonic kidney cells). Данные представлены в виде показателя CC_{50} , что соответствует концентрации препарата (мкг/мл), при которой достигается 50% ингибирования роста клеток. Оценена также гемолитическая активность исследуемых препаратов в отношении клеток эритроцитов человека RBC (Human red blood cells). Данные представлены в виде показателя HC_{10} , что соответствует концентрации препарата при 10%-ной гемолитической активности. Все образцы с CC_{50} и HC_{10} больше максимально испытанной концентрации (32 мкг/мл) классифицируются как нетоксичные. Таковыми являются палладокомплексы Pd7, Pd9 и Pd12. Этот результат позволяет считать, что токсичность координационных соединений палладия зависит от лигандного окружения иона металла и может быть, таким образом, целенаправленно снижена. Комплекс Pd12 с индексом селективности ($SI = CC_{50}/МИК$) больше 128 вошел в группу соединений, отобранных для исследования противогрибковой активности *in vivo* [9].

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ПАЛЛАДИЯ РАЗЛИЧНОГО ТИПА

Хотя история препаратов на основе металлов в химиотерапии рака насчитывает около 40 лет, все еще растет интерес к разработке новых противоопухолевых средств на основе металлов для решения проблем, связанных с резистентностью, наличием побочных эффектов, повышением эффективности и селективности действия лекарственного препарата. Линейка исследуемых металлокомплексов расширяется, о чем свидетельствуют обзоры, посвященные последним достижениям и перспективам использования металлокомплексных соединений в качестве противораковых препаратов [5, 7, 33–37]. Комплексы палладия с различными органическими лигандами активно исследуются в этом направлении [5, 7, 33–35]. При этом следует отметить огромное структурное разнообразие лигандов, лидерами среди которого являются N-донорные полидентатные молекулы. Весьма информативным является всесторонний обзор [7], посвященный комплексам палладия (847 соединений!), исследованным на противораковую активность *in vivo* или *in vitro* с эпохи открытия цисплатина до 2015 г. Многие разработанные палладиевые комплексы проявляют значительную противоопухолевую активность, причем некоторые из них превосходят цисплатин или другие клинически используемые препараты. Авторами выполнен анализ структура–свойства, а выявленные закономерности весьма полезны при разработке новых соединений палладия с большей цитотоксической активностью.

Таблица 1. МИК комплексов палладия(II) в отношении *S. aureus* (MRSA), *C. albicans* and *C. neoformans* var. *grubii* H99 (мкг/мл), CC₅₀ (мкг/мл), HC₁₀ (мкг/мл)

Соединение	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. neoformans</i> ATCC 208821	CC ₅₀	HC ₁₀
Pd1	4	1	0.5	11.9	3.9
Pd2	1	0.5	≤0.25	12.4	1.8
Pd3	16	2	0.5	6.0	>32
Pd4	32	1	≤0.25	16.6	5.6
Pd4a	16	2	1	2.9	5.6
Pd6	8	8	4	4.5	7.8
Pd7	>32	16	4	>32	>32
Pd8	>32	8	4	>32	6.9
Pd9	>32	16	2	>32	>32
Pd10	>32	4	4	>32	4.6
Pd11	>32	≤0.25	≤0.25	10.8	>32
Pd12	>32	2	≤0.25	>32	>32
Vancomycin	1				
Fluconazole		0.125	8		
Tamoxifen				9	
Melittin					2.7

Во многих работах [5, 7, 33–35] отмечается, что комплексы Pd(II) проявляют удовлетворительную цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток, причем значительно превосходящую активность исходных лигандов. Однако вызывает беспокойство их низкая стабильность. Комплексы Pd(II) проявляют большую склонность к обмену своими лигандами, примерно в 10⁵ раз выше, чем комплексы Pt(II) [38]. Это может вызвать быстрый гидролиз препаратов на основе палладия. Диссоциация лиганда порождает очень активные виды частиц (ионов, молекул), которые могут легко взаимодействовать с донорами, встречающимися в кровотоке и клеточной среде, тем самым препятствуя достижению лекарством своей мишени. Этого процесса можно избежать, используя объемные хелатирующие лиганды, тем самым достигая более высокой стабилизации и оптимальной скорости обмена лигандов с целью сохранения структурной целостности соединения *in vivo* в течение достаточно длительного периода для достижения его терапевтического действия [38]. В работах [7, 39–42] акцентируется внимание на циклопалладированные соединения, в которых хелатное кольцо содержит прочную связь углерод–металл. Такие соединения демонстрируют повышенную стабильность и удовлетворительную цитотоксичность. В аналитической работе [7] C,N-палладациклы отмечены в группе соединений с повышенной активностью. С точки зрения

наших интересов, можно выделить работы испанских [39–42] и иранских [43–45] ученых, объектами исследования которых являются циклопалладированные производные бензиламинов. Результаты свидетельствуют, что такие палладациклы имеют высокий потенциал для клинического применения, особенно против рака, устойчивого к химиотерапии.

Еще одним объектом наших интересов, как отмечено выше, являются хелатные комплексы палладия(II) с производными этилендиамина. Цитотоксическая активность палладокомплексов такого типа исследована сербскими учеными [46–50]. В этой группе металлокомплексов нет выдающихся результатов, но четко проявляется тонкая зависимость активности от малейших изменений в строении лиганда.

Биологическая активность синтезированных нами комплексов палладия различного типа исследована в Институте физиологически активных веществ ФИЦ ПХФ и МХ РАН [28]. С точки зрения строения, среди тестируемых соединений можно выделить две группы: комплексы палладия Pd1,1a,4,5,5a с терпеновыми лигандами, производными бензиламина, и хелатные комплексы Pd6,8,9,13,14,15 с производными этилендиамина. Комплексы палладия(II) различного типа, исследованные на цитотоксичность, представлена на схеме 5.

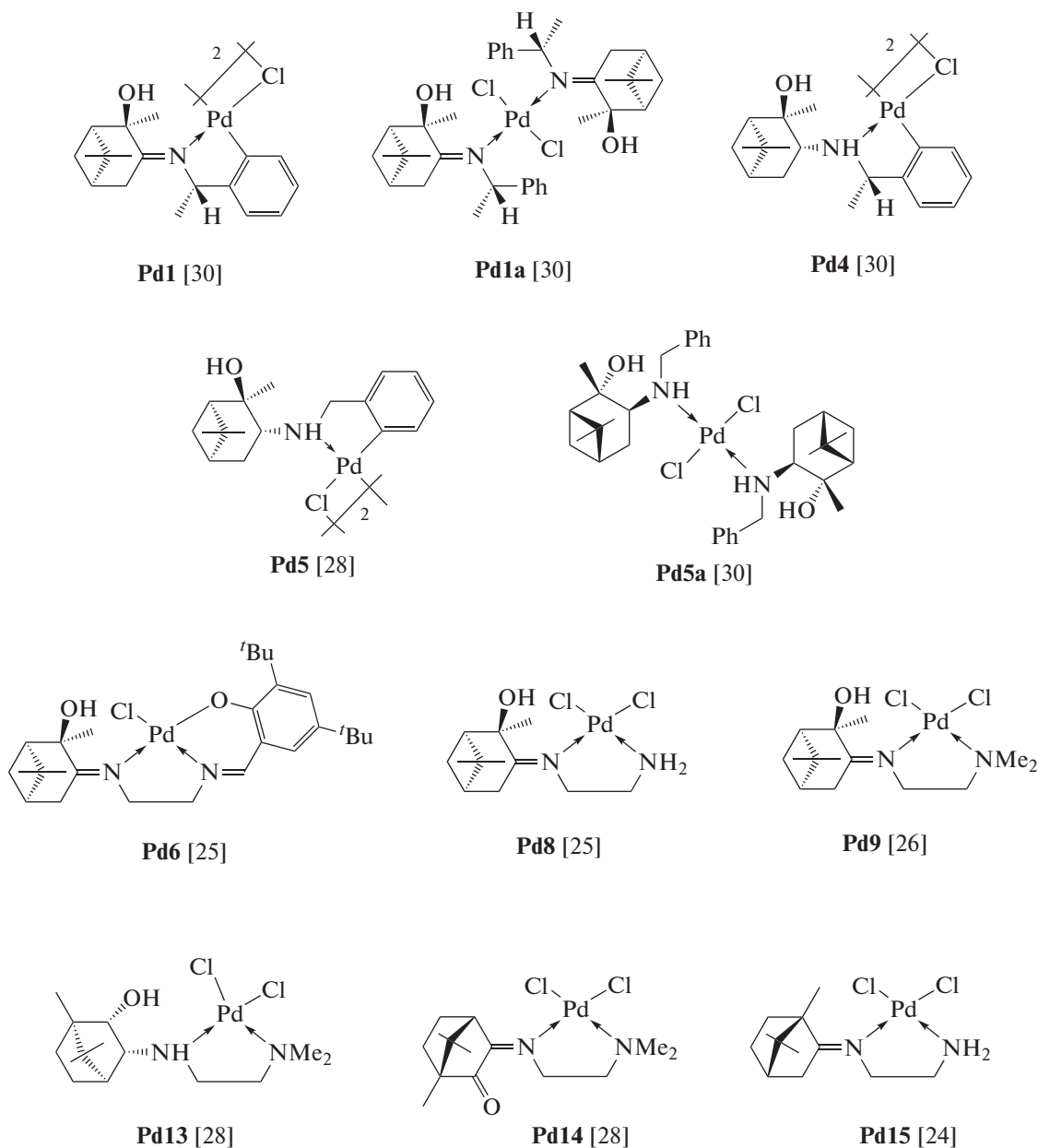


Схема 5.

Определен цитотоксический профиль в отношении панели клеточных линий опухолевого происхождения — легочной аденокарциномы (A549), нейробластомы (SH-SY5Y), эпидермоидной карциномы гортани (Hep-2), карциномы шейки матки (HeLa). Для определения IC_{50} (концентрация, при которой наблюдается 50% гибели клеток) комплексов палладия клеточные линии инкубировали в течение 24 ч с исследуемыми соединениями в концентрациях 0,1, 1, 10, 30, 100 мкМ (по три повтора для каждого). В качестве положительного контроля использовали клинический противоопухолевый препарат цисплатин (цис-диамминдихлорплатина(II)). Жизнеспособ-

ность клеток определяли с помощью теста МТТ. Полученные данные представлены в табл. 2.

Способность снижать выживаемость опухолевых клеток была обнаружена для группы палладо-комплексов (Pd1,1a,4,5,5a), содержащих в своем составе бензиламинный фрагмент. Хелатные комплексы палладия Pd8,9,13,14,15 с N,N-донорными лигандами (терпеновыми производными этилендиамина) в максимальной концентрации 100 мкМ не были эффективны ни на одной культуре клеток. Наиболее выраженное токсическое действие было показано для хелатного палладо-комплекса саленового типа Pd6. Для данного вещества на всех клеточных линиях были выявлены

Таблица 2. Цитотоксичность комплексов палладия(II) в отношении клеточных линий опухолевого происхождения SH-SY5Y, HeLa, Hep-2, A549

Соединение	IC ₅₀ , мкМ			
	SH-SY5Y	HeLa	Hep-2	A549
Pd1	5.86 ± 0.31	6.79 ± 0.44	53.47 ± 1.56	31.62 ± 2.32
Pd1a	28.25 ± 0.70	28.44 ± 0.18	68.32 ± 0.28	41.22 ± 0.58
Pd4	6.27 ± 0.14	22.45 ± 2.65	53.94 ± 1.99	34.08 ± 0.71
Pd5	5.62 ± 0.46	9.43 ± 0.31	61.40 ± 0.97	43.35 ± 2.93
Pd5a	5.94 ± 0.30	4.28 ± 0.09	66.70 ± 0.57	9.45 ± 0.86
Pd6	<0.1	4.66 ± 0.84	20.41 ± 0.82	8.07 ± 0.19
Pd8	≥100	≥100	≥100	≥100
Pd9	≥100	≥100	≥100	≥100
Pd13	≥100	≥00	≥100	≥100
Pd14	≥100	≥100	≥100	≥100
Pd15	≥100	≥100	≥100	≥100
Цисплатин	10.08 ± 1.12	9.03 ± 0.74	5.41 ± 0.36	19.15 ± 2.31

наиболее низкие значения IC₅₀ цитотоксического эффекта, особенно в отношении SH-SY5Y (IC₅₀ < 0.1 мкМ), что может свидетельствовать о более предпочтительной токсичности соединения Pd6 к клеткам нейрональноподобного фенотипа. Отметим, что для всех палладокомплексов наблюдалась сниженная токсичность в отношении клеточной линии Hep-2, о чем свидетельствуют более высокие значения величины IC₅₀ цитотоксического эффекта. Для определения возможных механизмов цитотоксического действия были выбраны соединения Pd1,1a,4,5,5a,6 способные снижать выживаемость опухолевых клеток в низких рабочих концентрациях вплоть до наномолярного диапазона.

Для соединений Pd1,1a,4,5a,6 был проведен анализ некоторых возможных механизмов потенциального противоопухолевого действия, таких как модулирование процессов, связанных с функционированием митохондрий, а также влияние на параметры гликолитической функции опухолевых клеток. Обобщенные количественные данные исследования биологической активности комплексов палладия представлены в табл. 3.

В патогенезе многих заболеваний человека, в частности рака, важным звеном являются аномальные функции митохондрий [51], приводящие к нарушениям клеточной биоэнергетики и метаболическому перепрограммированию раковых клеток за счет нарушений в выработке АТФ, Ca²⁺-гомеостаза и окислительно-восстановительного баланса. Показано, что за счет гиперполяризации митохондриальной мембраны, а также нарушения высвобождения проапоптотических факторов в цитозоль опухолевые клетки приобретают резистентность к апоптозу [36]. Таким образом, это

указывает на прямую связь между аномальными функциями митохондрий и опухолевым генезом. Поэтому было изучено влияние комплексов Pd1,1a,4,5,5a,6 на функциональные характеристики изолированных митохондрий печени крыс, используемых в качестве модельной системы, с целью исследования потенциальной проапоптотической активности соединений. Анализ проводили по двум параметрам: изменению “набухания” митохондрий по светопропусканию суспензии органелл и трансмембранного потенциала с использованием потенциал-зависимой метки Сафранин А.

Показано, что преинкубация изолированных митохондрий печени крыс с комплексами палладия(II) приводит к эффективному нарушению функционирования данных органелл. Наиболее выраженная индукция свеллинга наблюдалась для соединений Pd1a и Pd6, о чем свидетельствует значительно более высокая скорость формирования поры митохондриальной проницаемости по сравнению с действием стандартного триггера процесса открытия МРТР – ионов Ca²⁺, использованных в качестве эталона [52] (табл. 3). Кроме того, для данных соединений была выявлена способность снижать трансмембранный потенциал органелл, тем самым оказывая деполяризующее действие на митохондриальную мембрану (63.63% для Pd1a и 83.75% для Pd6). Очевидно, такой коллапс Ψ_m , возникающий под действием соединений, свидетельствует о митохондриальной дисфункции, дальнейшей пермеабиллизации внутренней мембраны органелл путем открытия пор перехода проницаемости митохондрий, выходе проапоптотических факторов в цитозоль и, в конечном итоге, гибели опухолевых клеток. Таким

Таблица 3. Биологическая активность комплексов палладия Pd1,1a,4,5,5a,6

Соединение	Митохондриальные характеристики		Гликолиз ^В
	Мито ^А , SW	Мито ^Б , ψ	
Pd1	127.08 $\pm$ 11.68	85.89 $\pm$ 5.76	110.79 $\pm$ 12.77
Pd1a	303.08 $\pm$ 14.30	63.63 $\pm$ 5.02	63.51 $\pm$ 10.15
Pd4	41.01 $\pm$ 5.49	33.38 $\pm$ 2.59	
Pd5	32.18 $\pm$ 9.24	32.09 $\pm$ 9.79	61.74 $\pm$ 13.34
Pd5a	132.39 $\pm$ 5.78	30.61 $\pm$ 2.04	
Pd6	307.23 $\pm$ 12.35	83.75 $\pm$ 10.39	98.44 $\pm$ 15.47

^А Мито, SW – $V_{\max}$ свеллинга митохондрий печени крыс после добавления 100 мкМ вещества, % от контроля.

^Б Мито, ψ – деполяризация митохондрий печени крыс после добавления 100 мкМ вещества, % от контроля.

^В Гликолиз – ингибирование максимального гликолиза в клетках HeLa после добавления 100 мкМ вещества, % от контроля.

образом, полученные результаты позволяют предположить проапоптотический механизм противоопухолевого действия исследованных соединений за счет модуляции функций митохондрий в клетке.

Определено влияние соединений Pd1,1a,4,5,5a,6 на процесс гликолиза опухолевой культуры рака шейки матки человека HeLa. Еще в середине прошлого века Отто Варбург впервые описал пролиферативный метаболический фенотип, при котором опухолевые клетки демонстрируют повышенную гликолитическую активность и сниженное дыхание митохондрий в отличие от нормальных клеток организма. Это явление стало известно как “эффект Варбурга” [53]. Так, опухоли генерируют до 90%-ного клеточного адезинтрифосфата (АТФ) путем гликолиза, и лишь оставшиеся 10% поступают в результате окислительного фосфорилирования, в то время как в аэробных непролиферативных клетках митохондрии участвуют в образовании АТФ на 95% [54]. В ряде работ показано, что соединения, способные ингибировать гликолиз, обладают выраженным противоопухолевым потенциалом, приводя к гибели опухолевых клеток [55, 56]. В связи с этим нацеливание на aberrantный метаболизм является многообещающей стратегией для ингибирования роста раковых клеток и метастаза.

Влияние металлокомплексов с терпеновыми лигандами на анаэробный гликолиз было исследовано с использованием анализатора клеточного метаболизма Agilent Seahorse XF96e Analyzer (Seahorse Bioscience, США) по уровню продукции протонов водорода в клетках опухолевого происхождения с помощью гликолиз стресс-теста [57]. Скорость внеклеточного закисления среды измерялась в режиме реального времени в условиях поочередного введения модуляторов, что позволило оценить интенсивность гликолиза в клетках посредством фиксирования основных парамет-

ров гликолитической функции: гликолиза, гликолитической емкости и гликолитического резерва.

Показано, что комплексы Pd1,1a,5,6 обладают выраженными гликолиз-ингибирующими свойствами. Эти вещества достоверно снижали гликолитическую способность опухолевой культуры рака шейки матки человека HeLa более чем на 50%: Pd5 (на 83.86 $\pm$ 4.96% гликолиз; 61.94 $\pm$ 3.90% гликолитическую емкость; 97.79 $\pm$ 3.78% гликолитический резерв), Pd1 (на 91.37 $\pm$ 3.61% гликолиз; 95.63 $\pm$ 3.90% гликолитическую емкость; 97.19 $\pm$ 3.78% гликолитический резерв) и Pd1a (на 53.52 $\pm$ 1.98% гликолиз; 64.10 $\pm$ 2.95% гликолитическую емкость; 79.59 $\pm$ 0.92% гликолитический резерв), а также палладокомплекс саленового типа Pd6 (на 93.40 $\pm$ 3.21% гликолитическую емкость; 97.79 $\pm$ 0.43% гликолитический резерв). Полученные данные коррелируют с результатами исследования цитотоксического профиля: для вышеуказанных комплексов было обнаружено наиболее высокое токсическое действие в отношении большинства клеточных культур. Очевидно, иницируя каскад ингибирования гликолиза, данные соединения обладают способностью нарушать энергетический метаболизм и тем самым приводить к гибели опухолевой клетки.

Полученные результаты позволяют подтвердить перспективность нашего синтетического подхода к созданию эффективных противоопухолевых соединений на основе комплексов палладия различного типа с терпеновыми лигандами. Выявлены соединения-лидеры, обладающие выраженными цитотоксическими свойствами на различных линиях опухолевых клеток. Это, прежде всего, комплекс палладия Pd6 с N,N,O-лигандом, а также соединения палладия Pd1,1a,4,5,5a, содержащие в качестве лиганда терпеновые производные бензиламина. В последней группе не выявлено зави-

симости цитотоксической активности палладат-комплекса от характера координации исходного лиганда. Механизм цитотоксического действия данных веществ может быть обусловлен как их способностью оказывать повреждающее действие на митохондрии, так и влиянием на энергетическую функцию опухолевых клеток — гликолиз.

ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПАЛЛАДАЦИКЛОВ, СОДЕРЖАЩИХ АМИНОКИСЛОТУ В КАЧЕСТВЕ СОЛИГАНДА

Биядерный комплекс Pd₄ мы выбрали в качестве стартового соединения для синтеза на его основе серии смешанолигандных мооядерных производных Pd₄b-e, содержащих, кроме C,N-палладацикла, аминокислоту в качестве второго N,O-донорного хелатного лиганда (схема 6). Биядерные палладациклы (ПЦ) легко вступают в реакцию с дополнительными лигандами (как монодентат-

ными, так и бидентатными) за счет раскрытия хлоридных (или ацетатных) мостиков с образованием соответствующих мооядерных комплексов [31, 58]. В качестве такого солиганда мы использовали протеиногенные L-аминокислоты — пролин (**Pro**), тирозин (**Tyr**), серин (**Ser**) — и изолейцин (**Ile**). Биологическая активность этих соединений, входящих в состав белков, вполне очевидна. В работах иранских ученых [58, 59] описан синтез фосфорсодержащих ПЦ с дополнительными аминокислотными лигандами. Установлена четкая зависимость активности ПЦ от природы аминокислотного фрагмента. К сожалению, авторы не приводят данные для исходных биядерных ПЦ, чтобы оценить вклад аминокислотного фрагмента. Следует отметить, что на фоне высокой противоопухолевой активности отмечается низкая токсичность ПЦ в отношении нормальных клеток человека [58, 59].

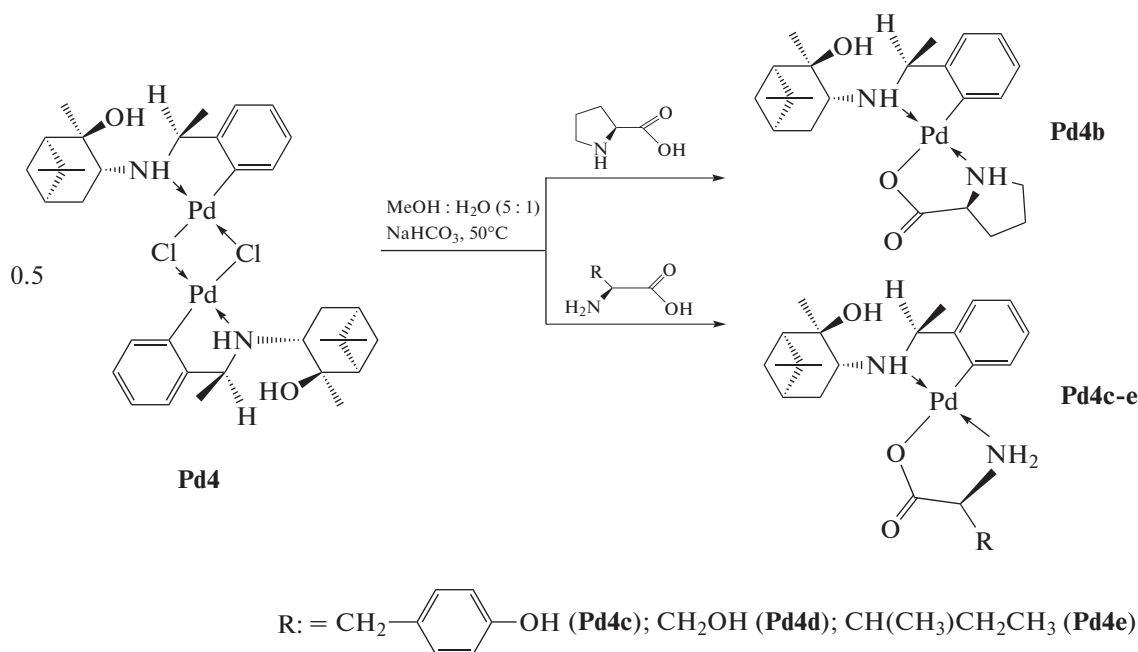


Схема 6.

Биологическая активность синтезированных нами смешанолигандных мооядерных комплексов палладия с аминокислотными лигандами исследована в Институте физиологически активных веществ ФИЦ ПХФ и МХ РАН [60]. При изучении противоопухолевого потенциала новых C,N-ПЦ, содержащих L-аминокислоты, был проведен анализ степени влияния исследуемых соединений на выживаемость клеток опухолевого происхождения нейробластомы (SH-SY5Y), легочной аденокарциномы (A549), эпидермоидной карци-

номы гортани (Нер-2) и карциномы шейки матки (HeLa). Определение жизнеспособности клеток проводили с помощью МТТ-теста, основанного на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток восстанавливать МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) до кристаллов нерастворимого формазана. Для валидирования метода в наших условиях в качестве референсного вещества использовали известный противоопухолевый препарат Цисплатин. В качестве препаратов сравнения исследо-

дованы соответствующие свободные лиганды — терпеновый амин (HL^4) и аминокислоты (Pro, Tyr, Ser и Ile).

Данные по цитотоксической активности представлены в табл. 4. Установлено, что все смешанолигандные металлокомплексы Pd4b-е оказывали умеренное влияние на выживаемость клеток использованных линий. Наиболее выраженным цитотоксическим эффектом обладали соединения Pd4c и Pd4e в отношении клеточной линии SH-SY5Y, IC_{50} для которых составили 28.65 ± 0.36 и 23.66 ± 0.41 мкмоль $л^{-1}$ соответственно. Однако эти значения оказались выше, чем IC_{50} исходного биядерного комплекса Pd4 (6.27 ± 0.14 мкмоль $л^{-1}$). Только для соединения Pd4d в отношении Нер-2 токсический эффект более чем в 3 раза превышал таковое у исходного соединения Pd4. Для исходных лигандов (HL^4 и Pro, Tyr, Ser и Ile) значения IC_{50} в отношении всех опухолевых линий превышало 100 мкмоль $л^{-1}$.

На основании полученных данных можно сделать два важных вывода. Первый заключается в том, что введение аминокислотного лиганда в большинстве случаев не обеспечивает усиления цитотоксического эффекта полученных моноядерных комплексов палладия Pd4b-е по сравнению с исходным биядерным комплексом Pd4, содержащим только терпеновые лиганды. Второй — за цитотоксическую активность в целом отвечает координированный терпеновый лиганд, так как для некоординированного амина HL^4 активность не обнаружена.

Анализ влияния цитотоксичных металлокомплексов Pd4 и Pd4b-е на трансмембранный потенциал митохондрий проводили на изолированных митохондриях печени крыс, используемых в качестве модельной системы, с регистрацией флуоресценции потенциал-зависимой метки А. Сафранина. Установлено, что предварительная инкубация изолированных митохондрий печени крысы с комплексами палладия Pd4 и Pd4b-е вызывала нарастающую во времени деполяризацию митохондриальной мембраны (рис. 1а). Уровень наблюдаемой деполяризации митохондриальной мембраны по истечении 10 мин соединениями Pd4b-е был ниже, чем у исходного металлокомплекса Pd4 (рис. 1б), что, вероятно, и обуславливает их более низкую цитотоксичность в отношении опухолевых линий клеток. Полученные результаты свидетельствуют о том, что введение аминокислотных лигандов в молекулу снижает эффективность действия моноядерных комплексов Pd4b-е в отношении мембранного потенциала.

Установлено, что цитотоксическое действие палладациклов может быть связано со способностью данных веществ вызывать деструкцию ми-

тохондрий путем деполяризации митохондриальной мембраны, что, в свою очередь, способствует запуску процессов апоптоза за счет выхода проапоптотических факторов в цитоплазматическое пространство клетки. Анализ выявленных закономерностей структура—свойства позволяет сделать вывод о том, что за цитотоксическую активность в целом отвечает координированный с палладием терпеновый лиганд, а введение аминокислотного лиганда в большинстве случаев не обеспечивает усиления цитотоксического эффекта полученных моноядерных комплексов палладия Pd4b-е по сравнению с исходным биядерным комплексом Pd4.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ ЦИНКА С ТЕРПЕНОВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ЭТИЛЕНДИАМИНА

Комплексы цинка с органическими лигандами имеют большие перспективы как основа для создания потенциальных терапевтических препаратов. При сопоставлении биоактивности комплексов цинка с другими лекарственными средствами на основе металлов показано, что они обладают меньшей общей системной токсичностью, сниженным количеством побочных эффектов, но при этом имеют сравнимую эффективность [61]. Металлокомплексы, содержащие цинк, проявляют широкий спектр биологической активности, в том числе антибактериальную [62–64], противогрибковую [65–68], противоопухолевую [60, 69–73], противодиабетическую [74, 75] и противопаразитарную [76].

Цитотоксичность комплексов цинка Zn7,8,9,13,15,16 с терпеновыми производными этилендиаминa (схема 7) исследована в Институте физиологически активных веществ ФИЦ ПХФ и МХ РАН [77]. Установлено, что их активность существенно ниже, чем активность комплексов палладия аналогичного строения. Тем не менее представляло интерес изучить их модулирующее действие на функциональное состояние изолированных митохондрий крыс. Как было отмечено выше, митохондрии как центр клеточного метаболизма и основные регуляторы окислительно-восстановительного баланса играют решающую роль в развитии и прогрессировании широкого спектра различных заболеваний. В связи с этим, влияя на различные функциональные характеристики данных органелл, можно модулировать процессами жизнедеятельности клетки с целью достижения желаемого фармакологического действия.

Таблица 4. Цитотоксичность (*in vitro*) комплексов палладия(II) и исходных лигандов в отношении клеточных линий опухолевого происхождения

Соединение	IC ₅₀ , мкмоль л ⁻¹			
	SH-SY5Y	HeLa	A549	Hep-2
Цисплатин	11.31 ± 0.92	9.56 ± 1.01	17.65 ± 1.28	6.07 ± 0.04
Pd4	6.27 ± 0.14	22.45 ± 2.65	34.08 ± 0.71	53.94 ± 1.99
Pd4b	53.36 ± 0.31	47.32 ± 0.29	95.99 ± 1.91	77.20 ± 0.97
Pd4c	28.65 ± 0.36	60.03 ± 0.42	73.83 ± 0.02	70.01 ± 1.65
Pd4d	58.08 ± 0.27	52.97 ± 0.05	58.74 ± 0.01	15.80 ± 0.71
Pd4e	23.66 ± 0.41	57.09 ± 0.29	61.13 ± 0.78	65.20 ± 0.04
HL ⁴	≥100	≥100	≥100	≥100
Pro	≥100	≥100	≥100	≥100
Tyr	≥100	≥100	≥100	≥100
Ser	≥100	≥100	≥100	≥100
Ile	≥100	≥100	≥100	≥100

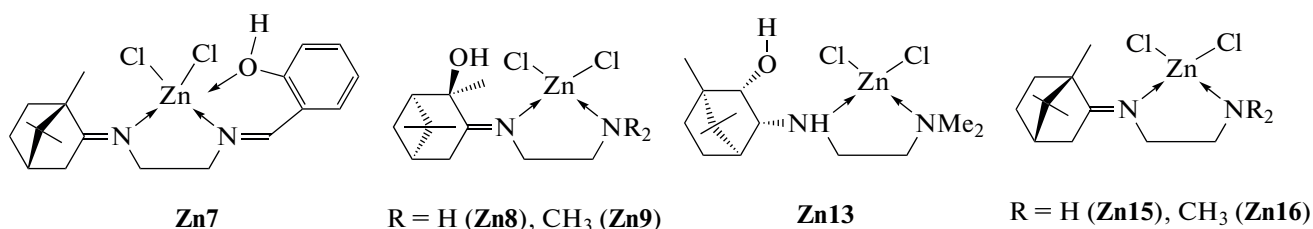


Схема 7.

Воздействие комплексов Zn7,8,9,13,15,16 и препаратов сравнения на функционирование митохондрий изучали по анализу влияния синтезированных соединений на следующие параметры: трансмембранный потенциал, “набухание” органелл и работа комплексов электрон-транспортной цепи. Так, митохондриальный мембранный потенциал ($\delta\Psi$), поддерживаемый протонной движущей силой дыхательной цепи, используется для генерации АТФ [78], и сильная деполяризация мембраны в первую очередь приводит к провоцированию открытия митохондриальных пор перехода проницаемости и индукции апоптоза. Поэтому влияние на “набухание” и $\delta\Psi$ является одним из механизмов ингибирования пролиферации опухолевых клеток [79], а также действия различных терапевтических агентов, таких как антипротоzoйные, противогрибковые и другие.

Хиральные комплексы цинка(II) Zn7,8,9,13,15,16 вызывают сильную деполяризацию митохондрий печени крыс и провоцируют их “набухание” (рис. 2). В качестве референсных соединений были использованы хлорид цинка и известный цитостатик цисплатин. Деполяризация митохондриальной мембраны и провоцирование “набухания” органелл, вызванные исследуемыми соединениями, сравнимы с действием цисплатина, в то

время как для хлорида цинка и производных этилендиамина L⁸, L¹⁶ и L¹³ активность в данных тестах отсутствует.

Хорошо известно, что дыхательная цепь митохондрий вносит важный вклад в физиологическую и патологическую продукцию активных форм кислорода – ключевых медиаторов гибели клеток [80]. На сегодняшний день достигнут значительный прогресс в исследовании функционирования комплексов (I, II, III, IV) электрон-транспортной цепи в качестве сенсоров апоптотической гибели клеток, а также роли их дисфункции при различных патологиях. Так, например, было показано, что ингибирование комплекса II дыхательной цепи в результате связывания митохондриального шаперона TRAP1 (tumor necrosis factor receptor associated protein 1) с сукцинатдегидрогеназой индуцирует онкогенез посредством формирования псевдогипоксического состояния [81, 82], а снижение ферментативной активности данного комплекса сопровождается ростом опухолей параганглиомы [83], феохромоцитомы [84] и других злокачественных новообразований [85, 86]. В свою очередь, нацеливание на электрон-транспортную цепь и, как следствие, стимулирование гибели клеток специфическим образом было выявлено для соединений различной химической структуры и те-

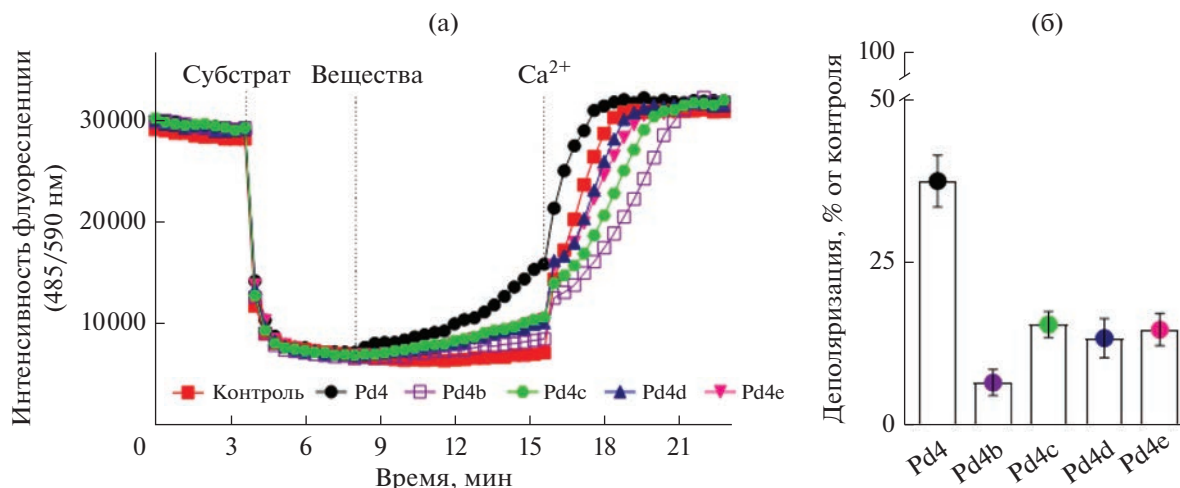


Рис. 1. Влияние комплексов палладия Pd4 и Pd4b-e на мембранный потенциал митохондрий печени крыс (0.5 мг мл): кинетические кривые изменения мембранного потенциала митохондрий (а), гистограммы для количественного отражения полученных результатов по истечении 10 мин инкубации с исследуемыми веществами при $\lambda_{\text{возб}} = 485$ нм, $\lambda_{\text{исп}} = 590$ нм (б). Концентрации соединений – 100, Ca^{2+} – 25 мкмоль л^{-1} ; в качестве контроля использовали эквивалентный объем растворителя (ДМСО); энергизацию митохондрий проводили сукцинатом калия (5 мкмоль л^{-1}) и ротеноном (1 мкмоль л^{-1}).

рапевтической направленности. Перспективным направлением также является разработка терапевтических стратегий для лечения малярии, где в качестве ключевой мишени фармакологического действия создаваемых препаратов рассматривается электрон-транспортная цепь [87]. На основе большого количества экспериментальных данных, становится очевидным тот факт, что попытки фармацевтического воздействия на дыхательную цепь переноса электронов для целенаправленной элиминации клеток являются многообещающей стратегией.

Добавление ротенона (специфического ингибитора комплекса I электрон-транспортной цепи) вызывало снижение потребления кислорода энергизованными митохондриями печени крыс (рис. 3). При инъекции сукцината (субстрата комплекса II) было обнаружено, что все исследуемые металлокомплексы Zn7,8,9,13,15,16 обладают способностью стимулировать сукцинатдегидрогеназный комплекс и усиливать интенсивность потока электронов, в то время как для исходных терпеновых производных этилендиамина L8, L16 и L13 не было обнаружено достоверных от контроля отличий (рис. 3). После добавления антимицина в контроле, как в норме, наблюдается снижение потребления кислорода, однако комплексы цинка Zn7,8,9,13,15,16 показывают нарушение тока электронов.

Полученные результаты позволяют считать, что исследованные хиральные комплексы цинка с терпеновыми производными этилендиамина обладают дестабилизирующим действием на митохондрии за счет деполаризации митохондриальной мембраны, индукции скачка митохондриальной

проницаемости и модулирующего действия на работу комплексов дыхательной цепи. Наличие таких свойств может иметь важное значение при поиске потенциальных лекарственных средств с возможным противоопухолевым, антипротозойным или антифунгицидным действием.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ КОМПЛЕКСОВ МЕДИ(II) С ТЕРПЕНОВЫМИ ПРОИЗВОДНЫМИ ЭТИЛЕНДИАМИНА

Комплексы меди(II) характеризуются большим потенциалом биомедицинского применения, что подтверждается многочисленными исследованиями. В ряде работ сообщается об антиоксидантной активности комплексов меди [88–97]. В последнее время большое внимание уделяется разработке и применению низкомолекулярных комплексов меди, обладающих свойствами, подобными действию антиоксидантного фермента – супероксиддисмутазы (СОД) [93, 98–103]. СОД является одним из важнейших антиоксидантных ферментов, который катализирует реакцию дисмутации супероксидных анион-радикалов, превращая их в перекись водорода и кислород. Было показано [104], что металлокомплексы обладают способностью эффективно катализировать дисмутацию супероксидных радикалов и могут быть хорошей альтернативой СОД. Интерес исследователей к комплексам меди(II) связан с тем фактом, что медь является жизненно важным металлом, который входит в состав многих витаминов, гормонов, ферментов, дыхательных пигментов и участвует в процессах обмена веществ, в тканевом дыхании и в других биохимических процессах [4].

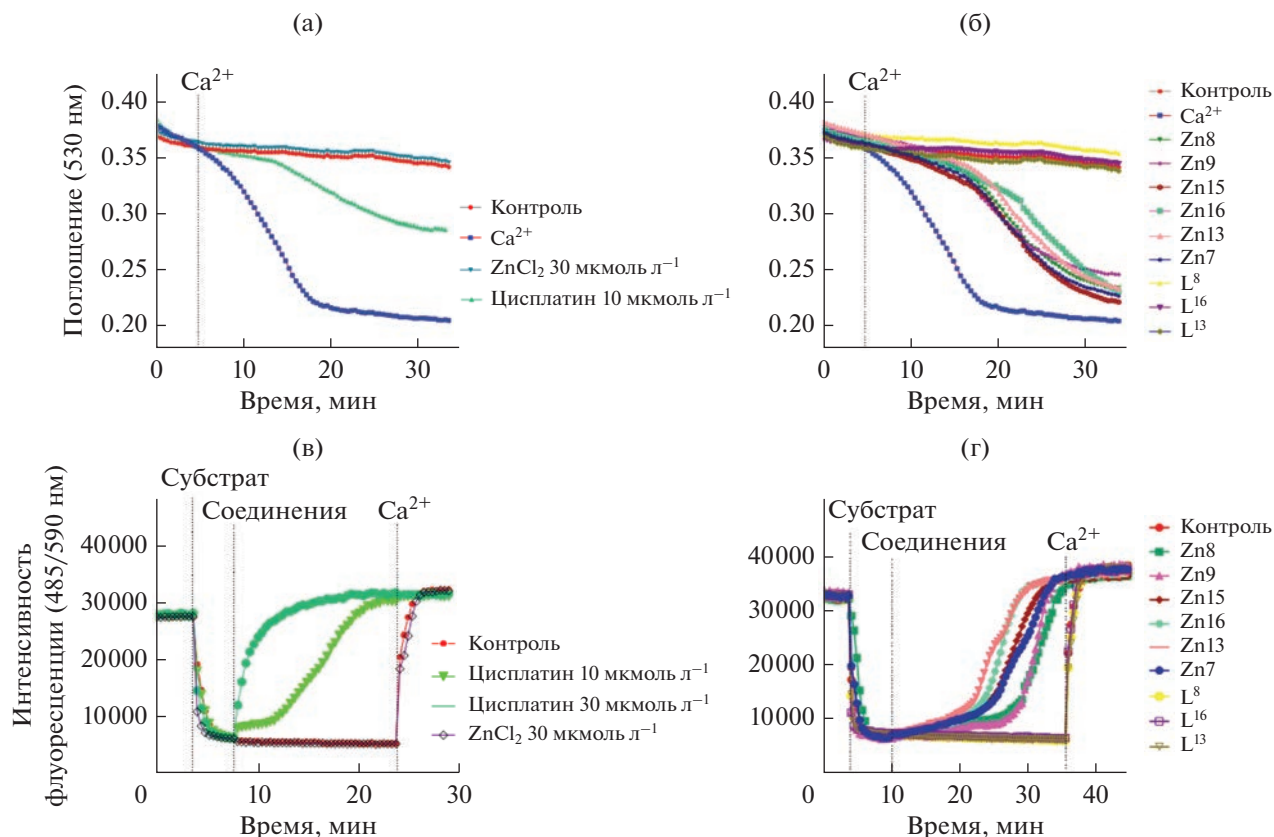
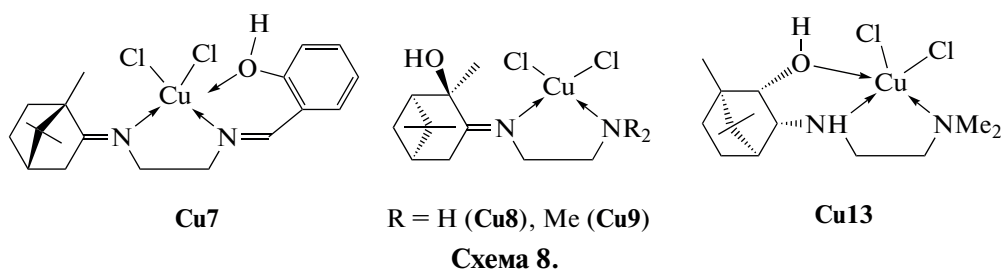


Рис. 2. Влияние введения исследуемых соединений Zn7,8,9,13,15,16, L^8 , L^{16} и L^{13} на мембранный потенциал (а, б) и “набухание” (в, г) изолированных митохондрий печени крыс. Концентрации соединений – 30, ротенона – 0.5, сукцината калия – 5, ZnCl_2 – 30, Ca^{2+} – 50 (а, б) и 25 (в, г), цисплатина – 10 и 30 (в) и 30 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (а). К – контроль, содержащий эквивалентное количество растворителя ДМСО. Данные представлены как среднее значение ($n = 3$).

Как избыток, так и недостаток меди может приводить к существенным нарушениям жизнеспособности организмов и развитию болезней [105, 106]. Анализ литературных данных позволяет сделать вывод о том, что синтез и исследование биологической активности комплексов меди(II) является весьма перспективным с точки зрения получения новых фармакологических препаратов. Тем не менее молекулярные механизмы действия комплексов меди исследованы недостаточно [107, 108].

Исследована антибактериальная и противогрибковая активность полученных нами хелатных комплексов меди(II) Cu7,8,9,13 (схема 8) с терпено-

выми производными этилендиамина [109]. Эффективность определяли по ингибированию роста клеток пяти видов бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium vaccae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) и трех видов грибов (*Candida albicans*, *Sporobolomyces salmonicolas*, *Penicillium notatum*). Эти виды широко распространены бактерий и грибов обладают множественными механизмами устойчивости к ряду клинических препаратов, что делает актуальным поиск новых бактерицидных и фунгицидных препаратов. Исследования выполнены в Институте биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН.



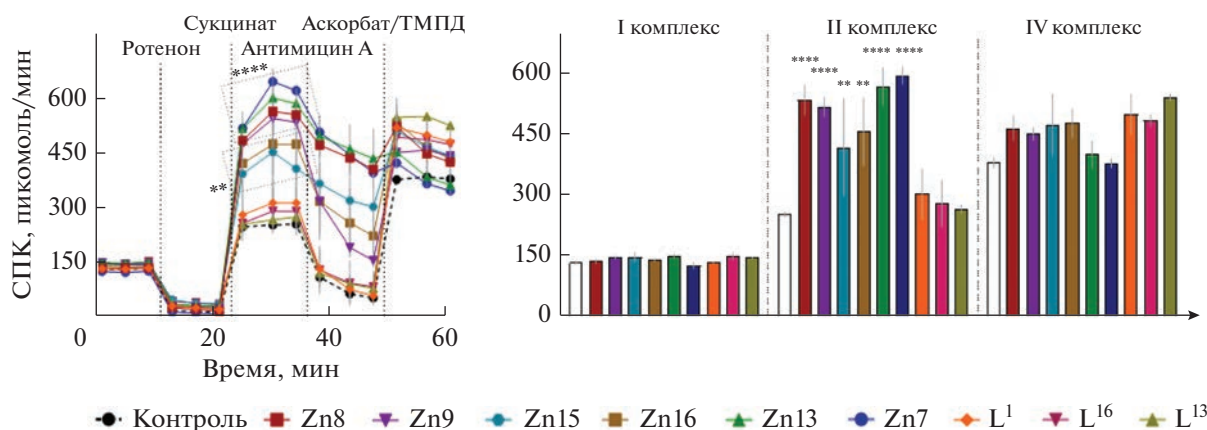


Рис. 3. Влияние соединений Zn7,8,9,13,15,16; L⁸, L¹⁶ и L¹³ на скорость потребления кислорода (СПК) изолированными митохондриями печени крыс (10 мкг на лунку) для оценки работы комплексов дыхательной цепи. Концентрация тестируемых веществ — 30 мкмоль л⁻¹, ротенона — 2 мкмоль л⁻¹, сукцината — 2, антимицина А — 4, аскорбат/тетраметилфенилендиамин (ТМПД) — 0.5 мкмоль л⁻¹. Данные представлены как среднее значение $\pm$ ошибка среднего ($n = 3$). ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0.0001$ по сравнению с контролем (двусторонний дисперсионный анализ one-way ANOVA).

В целом комплексы меди Cu7,8,9,13 проявили высокую антибактериальную и противогрибковую активность (рис. 4 и 5). Антибактериальную и противогрибковую активность определяли диск-диффузионным методом [110, 111] по ингибированию роста клеток пяти видов бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium vaccae*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*) и трех видов грибов (*Candida albicans*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Penicillium notatum*). В частности, выявлена высокая антибактериальная активность комплексов меди Cu7,8,9,13 в отношении мультирезистентного штамма золотистого стафилококка *S. aureus* (MRSA), устойчивого в том числе к антибиотику сравнения — ципрофлоксацину. В отношении штамма *S. aureus* (511 В3) активность этих комплексов сопоставима с активностью ципрофлоксацина (рис. 5).

Все исследованные комплексы меди Cu7,8,9,13 показали значительно более высокую противогрибковую активность в отношении штаммов *Candida albicans*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Penicillium notatum* по сравнению с активностью клинического противогрибкового препарата амфотерицина (рис. 5).

Для сравнения оценена антимикробная активность свободных лигандов и установлено, что они неактивны в отношении линейки исследованных штаммов патогенных микроорганизмов. Полученные данные подтверждают установленную во многих работах закономерность — металлокомплексы проявляют высокую антимикробную активность, а исходные лиганды — нулевую [91, 99, 112, 113]. Авторы объясняют такой результат увеличением липофильности иона Cu(II) вследствие координации к органическому лиганду [112].

Исследована антиоксидантная активность (АОА) комплексов меди Cu7,8,9,13 с использованием различных тест-систем (*in vitro*). Проведена сравнительная оценка АОА по способности ингибировать процессы перекисного окисления липидов (ПОЛ) в субстрате, содержащем липиды головного мозга лабораторных мышей. При этом использовали два способа инициирования ПОЛ — Fe²⁺/аскорбат или H₂O₂. Содержание вторичных продуктов ПОЛ, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой (ТБА-RS) определяли спектрофотометрически (рис. 6). Из анализа данных, полученных при концентрации соединений 500 мкМ, следует, что вне зависимости от способа инициирования ПОЛ в обеих парах лиганд-комплекс наибольшая ингибирующая активность отмечена для комплексов. Высокой АОА при указанной концентрации характеризуются также медные комплексы Cu13 и Cu7. Отметим, что результаты, полученные при инициировании ПОЛ различными способами, тесно коррелируют между собой (коэффициент ранговой корреляции Спирмена $R_s = 0.75$, $p = 0.05$, $n = 7$).

При снижении концентрации до 100 мкМ комплекс Cu7 практически не теряет своей способности ингибировать ПОЛ и сохраняет лидирующее положение (рис. 6). Это соединение сопоставимо по активности со стандартным антиоксидантом — 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенолом (ВНТ) при обоих способах инициирования ПОЛ (Fe²⁺/аскорбат- и H₂O₂). В структурном плане комплекс меди Cu7 имеет существенные отличия от соединений Cu8,9,13, так как содержит N,N,O-донорный тридентатный лиганд саленового типа. Можно предположить, что высокую АОА Cu7 обеспечивает наличие фенольного фрагмента. Для дальнейших

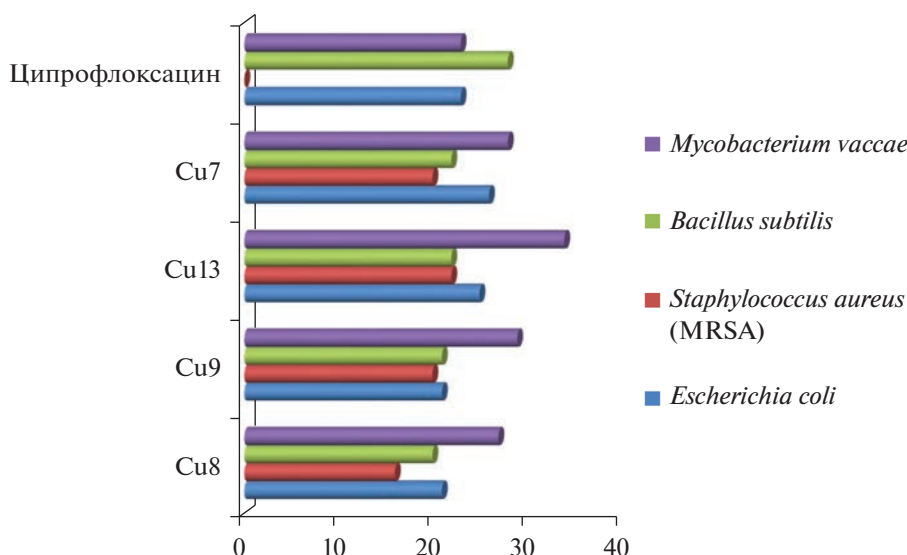


Рис. 4. Антибактериальная активность медных комплексов Cu7,8,9,13 в сравнении с антибиотиком Ципрофлоксацином.

исследований именно этот тип комплексов мы определяем как наиболее перспективный.

Прежде чем проводить сравнительное исследование мембранопротекторной активности (МПА) соединений Cu7,8,9,13, L8, L9 на модели окислительного гемолиза эритроцитов, мы оценили их токсичность по степени гемолиза эритроцитов. Установлено (рис. 7), что практически все исследуемые соединения в концентрации 10 мкМ характеризуются низкой гемолитической активностью — гибель эритроцитов в их присутствии незначительно превышает спонтанную. Лишь в присутствии комплекса Cu9 гемолиз эритроцитов превышает контрольные показатели в ~2 раза. Дальнейшие исследования биологической активности соединений с использованием клеток крови проводили при концентрации 1 мкМ.

Мембранопротекторную активность исследуемых медных комплексов Cu7,8,9,13 и лигандов L8, L9 определяли по степени ингибирования окислительного гемолиза эритроцитов крови лабораторных мышей. Для инициирования окислительного гемолиза использовали 2,2'-азо-бис-(2-амидинопропан)гидрохлорид (ААРН) либо H₂O₂. В водной среде при физиологических температурах путем мономолекулярного термического разложения ААРН с постоянной скоростью генерирует пероксильные радикалы, неспособные проникать внутрь клетки и воздействующие на мембрану с внешней стороны [114]. Окислительный гемолиз, инициируемый ААРН, широко используется для выявления антиоксидантной и мембранопротекторной активности различных соединений и растительных экстрактов [114–117]. Установлено, что все исследованные соединения (медные ком-

плексы Cu7,8,9,13, лиганды L8, L9) обладают статистически значимой МПА, что следует из снижения темпов клеточной гибели в их присутствии под воздействием радикалов ААРН (табл. 5). Так, спустя 2 ч после индукции окислительного стресса, уровень гемолиза в контроле составил 23.2%, в присутствии комплексов меди Cu7,8,9,13 — только 6.2–10.9%, лигандов L8, L9 — 12.1–15.0%. Наибольшая МПА среди всех исследованных соединений выявлена для комплекса Cu9, который превосходил по активности не только соответствующий лиганд L9, но и ВНТ, замедляя темпы окислительного гемолиза в течение всего эксперимента (5 ч).

Гидропероксид, наряду с ААРН, также широко используется для инициирования окислительного гемолиза при исследовании антиоксидантных и мембранопротекторных свойств различных соединений [117–119]. В отличие от ААРН, это соединение легко проникает внутрь эритроцита, а его первичной мишенью является гемоглобин [120]. В табл. 2 представлены результаты сравнительной оценки МПА исследуемых соединений в условиях H₂O₂-индуцированного гемолиза. В данном эксперименте наибольшая активность среди комплексов Cu7,8,9,13 выявлена для соединения саленового типа Cu7, содержащего фенольный фрагмент и отличающегося наибольшей АОА на модели инициированного окисления субстрата, содержащего животные липиды. Именно комплекс Cu7 в наибольшей степени ингибировал гибель клеток под воздействием H₂O₂ в течение всего периода эксперимента (5 ч).

Таким образом, на основании результатов исследования АОА терпеновых лигандов и медных

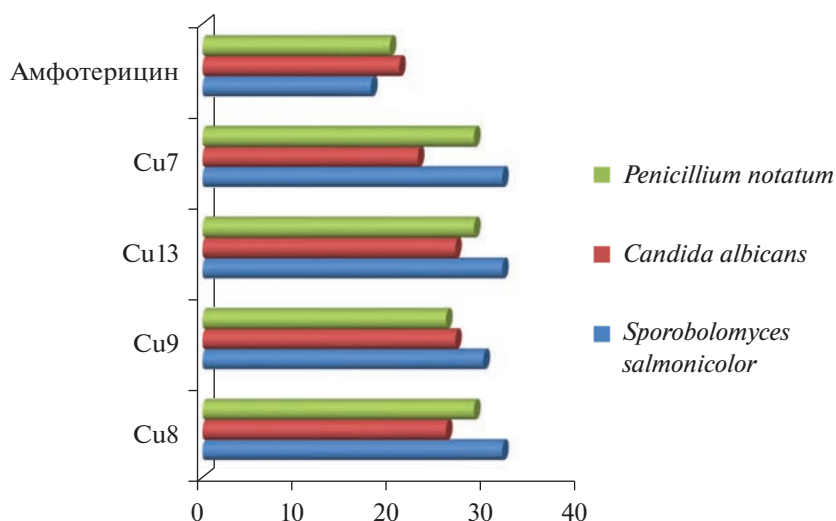


Рис. 5. Противогрибковая активность медных комплексов Cu7,8,9,13 в сравнении с фунгицидным препаратом Амфотерицином.

комплексов можно сделать следующие основные выводы: вне зависимости от способа инициирования окисления липидов (Fe^{2+} /аскорбат- или H_2O_2) в обеих парах лиганд–комплекс наибольшая ингибирующая активность отмечена для медных комплексов; показано, что комплекс саленового типа Cu7, отличающийся наибольшей АОА на модели инициированного окисления субстрата, содержащего животные липиды, и не проявляющий гемолитическую активность даже при концентрации 10 мкМ, превосходил другие медные комплексы по способности защищать эритроциты в условиях H_2O_2 -индуцированного гемолиза.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выполнены исследования разноплановой биологической активности комплексов палладия, меди и цинка с терпеновыми лигандами различного типа. Полученные результаты позволяют рассматривать их как потенциальные фармакологические препараты и свидетельствуют о перспективности поиска эффективных соединений в этой группе металлокомплексов.

Важным выводом является тот факт, что исходные лиганды в отличие от соответствующих металлокомплексов неактивны (или существенно менее активны) в исследованных биологических тестах, что подтверждает важную роль ионов металлов.

Комплексы палладия(II) различного строения проявили высокую избирательность в отношении различных бактериальных штаммов. Все исследованные соединения оказались неактивными в отношении грамотрицательных бактерий. В отношении грамположительных бактерий золотистого

стафилококка *Staphylococcus aureus* высокую ингибирующую активность проявляют комплексы палладия(II), относящиеся к группе циклометаллированных соединений. Лидер имеет МИК 1 мкг/мл, что соответствует активности антибиотика ванкомицина. Все исследованные комплексы палладия показали высокую противогрибковую активность в отношении *Candida albicans* и *Cryptococcus neoformans*. Оценка гемолитической активности и цитотоксичности в отношении эмбриональных клеток почек человека (НЕК293) позволила выявить нетоксичные соединения (с индексом селективности выше 128) и определить вектор дальнейших исследований.

Оценка цитотоксической активности комплексов палладия с терпеновыми лигандами различного типа в отношении панели клеточных линий опухолевого происхождения позволила выявить соединения-лидеры, для которых IC_{50} цитотоксического эффекта (концентрация, при которой наблюдается 50% гибели клеток) сопоставима с активностью клинического препарата цисплатина. Это прежде всего циклопалладированные терпеновые производные бензиламина. В ходе изучения возможных механизмов антинеопластического действия эффективных комплексов палладия было обнаружено, что данные вещества способны модулировать функциональные характеристики митохондрий, запуская процесс “набухания” органелл и оказывая деполяризующее действие на митохондриальную мембрану, а также ингибировать процесс гликолиза в клетках опухолевого происхождения HeLa.

Биядерные палладациклы, цитотоксическая и антимикробная активность которых подтверждена, являются хорошей базой для получения мультимо-

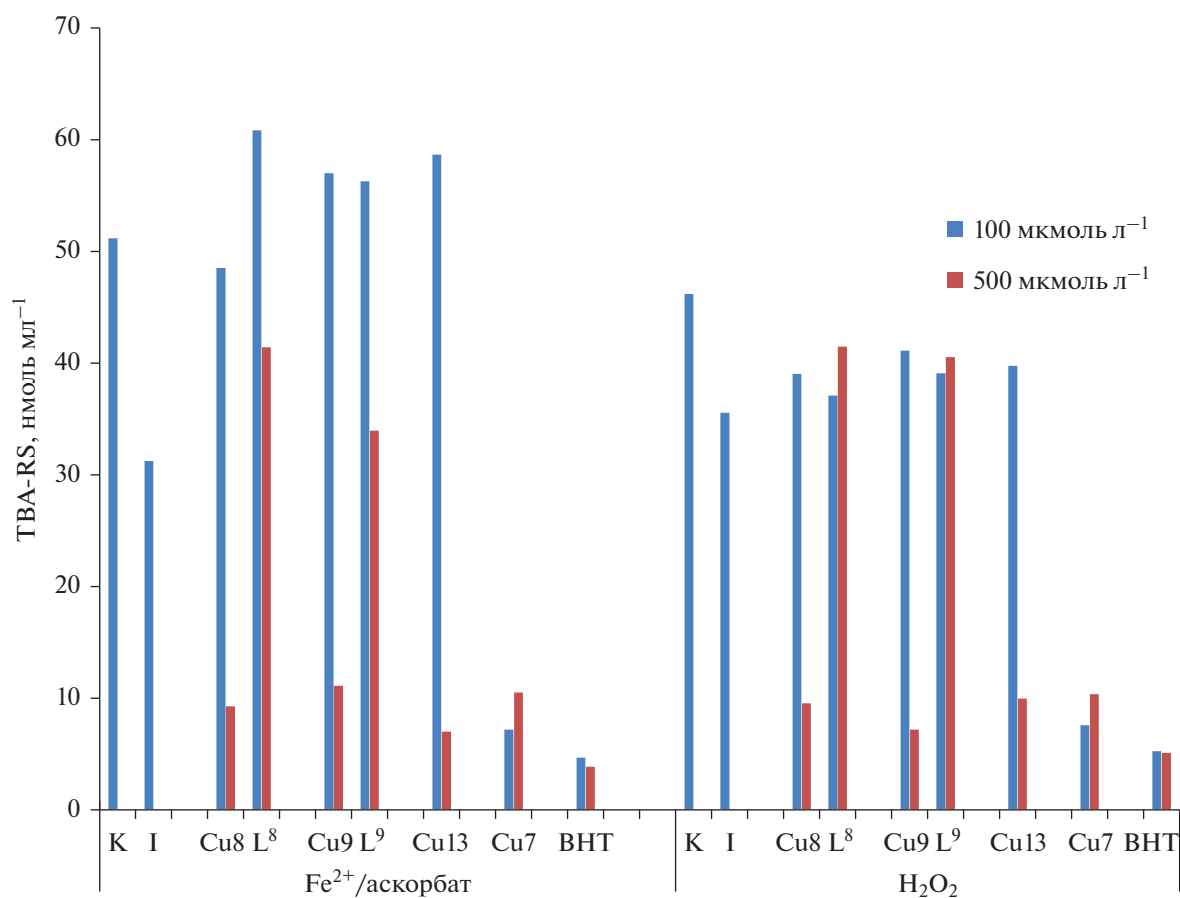


Рис. 6. Сравнительная оценка АОА исследуемых соединений (комплексы меди Cu7,8,9,13, лиганды L⁸, L⁹) в концентрациях 100 и 500 мкмоль л⁻¹. К — контроль без тестируемых соединений. I — интактные образцы (без инициированного окисления). ВНТ — стандартный антиоксидант 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол.

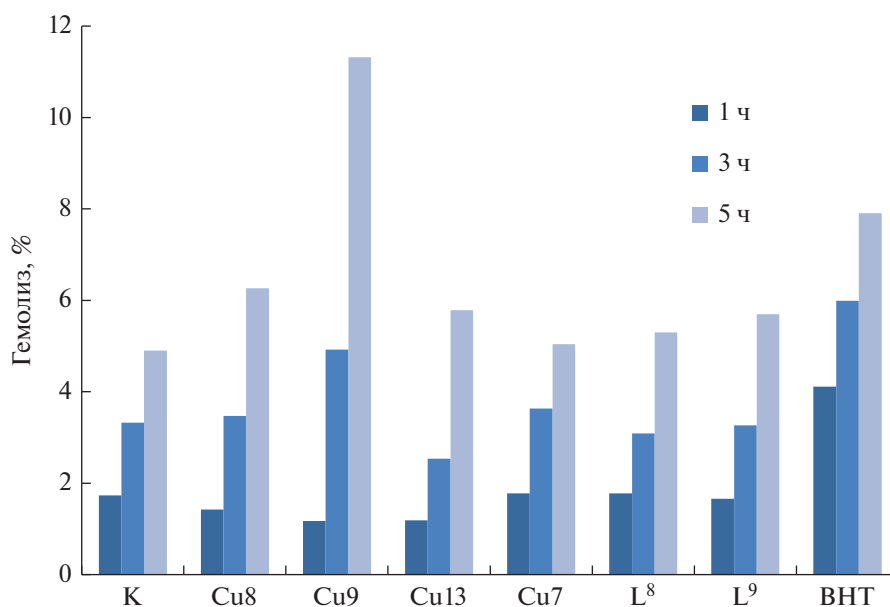


Рис. 7. Сравнительная оценка гемолитической активности исследуемых соединений (комплексы меди Cu7,8,9,13, лиганды L⁸, L⁹) в концентрации 10 мкмоль л⁻¹ через 1, 3 и 5 ч инкубации. К — контроль без тестируемых соединений. ВНТ — стандартный антиоксидант 2,6-ди-*трет*-бутил-4-метилфенол.

Таблица 5. Сравнительная оценка МПА комплексов меди Cu7,8,9,13 и лигандов L⁸, L⁹ в концентрации 1 мкМ в условиях ААРН- и H₂O₂-индуцированного гемолиза (1–5 ч инкубации)

Соединение	Гемолиз, %		
	1 ч	3 ч	5 ч
ААРН-индуцированный гемолиз			
K*	2.7 ± 0.0	55.9 ± 0.7	81.8 ± 0.4
Cu7	2.5 ± 0.0	45.5 ± 0.6	82.9 ± 0.4
Cu8	2.8 ± 0.0	42.4 ± 0.6	81.3 ± 0.6
Cu9	2.4 ± 0.1	31.6 ± 0.1	75.5 ± 0.7
Cu13	2.8 ± 0.0	47.1 ± 1.4	81.2 ± 0.8
HL ⁸	2.7 ± 0.0	42.7 ± 0.6	79.0 ± 0.7
HL ⁹	2.9 ± 0.2	47.5 ± 1.2	80.7 ± 1.7
ВНТ	3.0 ± 0.1	46.2 ± 0.8	81.0 ± 0.3
H ₂ O ₂ -индуцированный гемолиз			
K	11.5 ± 0.7	30.7 ± 0.7	39.9 ± 0.4
Cu7	10.9 ± 0.6	20.9 ± 0.5	28.0 ± 0.7
Cu8	7.1 ± 0.4	24.8 ± 0.9	34.5 ± 0.8
Cu9	6.9 ± 0.5	25.5 ± 0.3	33.5 ± 0.4
Cu13	11.0 ± 0.5	29.1 ± 0.8	40.5 ± 0.8
HL ⁸	8.0 ± 0.5	29.8 ± 1.5	36.3 ± 1.0
HL ⁹	10.3 ± 0.6	26.7 ± 0.5	31.2 ± 0.3
ВНТ	5.6 ± 0.4	11.9 ± 0.5	22.3 ± 1.1

* K – контроль без тестируемых соединений; ВНТ – стандартный антиоксидант 2,6-ди-*т*-прет-бутил-4-метилфенол.

дальних структур с целью поиска более эффективных препаратов с высоким индексом селективности. За счет раскрытия хлоридных мостиков можно легко вводить дополнительные биогенные лиганды. Результаты исследования палладациклов, содержащих аминокислоту в качестве солиганда, подтвердили тот факт, что основным структурным фактором, определяющим цитотоксическую активность, является наличие терпенового фрагмента координированного лиганда.

Хелатные комплексы цинка с терпеновыми производными этилендиамина имеют существенно более низкую цитотоксическую активность по сравнению с комплексами палладия такого же типа. Тем не менее установлено, что они обладают дестабилизирующим действием на изолированные митохондрии крыс, а это, согласно литературным данным, может иметь важное значение при поиске потенциальных лекарственных средств с антипротозойным или антифунгицидным действием.

Хелатные комплексы меди(II) с терпеновыми производными этилендиамина проявили высокую антибактериальную активность в отношении мультирезистентного штамма золотистого стафилококка *S. aureus* (MRSA), устойчивого в том числе к антибиотику сравнения – ципрофлоксацину.

Все исследованные комплексы меди(II) показали значительно более высокую противогрибковую активность в отношении штаммов *Candida albicans*, *Sporobolomyces salmonicolor*, *Penicillium notatum* по сравнению с активностью клинического противогрибкового препарата амфотерицина. Важно отметить, что на фоне низкой гемолитической активности комплексы меди проявили себя как эффективные антиоксиданты в тестах (*in vitro*) по способности ингибировать процессы перекисного окисления липидов.

Таким образом, полученные результаты по оценке биологической активности синтезированных нами металлокомплексов с терпеновыми лигандами различного типа позволяют считать данный класс соединений весьма перспективным с точки зрения поиска новых фармпрепаратов и определить “точки роста” для дальнейших исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Исследования противоопухолевой активности металлокомплексов проводились в Институте физиологически

активных веществ ФИЦ ПХФ и МХ РАН. Антибактериальная и противогрибковая активность комплексов палладия(II) исследована в рамках международного проекта CO-ADD (Австралия), комплексов меди(II) – в Институте биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН. АОО комплексов меди(II) с использованием различных тест-систем исследована на базе Института биологии ФИЦ Коми НЦ УрО РАН. Все полученные данные включены в соответствующие публикации. Авторы выражают благодарность всем соавторам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Medina-Franco J.L., López-López E., Andrade E. et al. // Drug Discov. Today. 2022. V. 27. P. 1420. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.02.021>*
2. *Miranda V.M. // Rev. Inorg. Chem. 2022. V. 42. P. 29. <https://doi.org/10.1515/revic-2020-0030>*
3. *Mjos K.D., Orvig C. // Chem. Rev. 2014. V. 114. P. 4540. <https://doi.org/10.1021/cr400460s>*
4. *Binding, Transport and Storage of Metal Ions in Biological Cells / Eds. Maret W., Wedd A. (Cambridge, UK): RSC, 2014. <https://doi.org/10.1039/9781849739979>*
5. *Garoufis A., Hadjikakou S.K., Hadjiladis N. // Coord. Chem. Rev. 2009. V. 253. P. 1384. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2008.09.011>*
6. *Medici S., Peana M., Nurchi V.M. et al. // Coord. Chem. Rev. 2015. V. 284. P. 329. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.08.002>*
7. *Alam M.N., Huq F. // Coord. Chem. Rev. 2016. V. 316. P. 36. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2016.02.001>*
8. *Cirri D., Pratesi A., Marzo T., Messori L. // Expert Opinion Drug Disc. 2021. V. 16. P. 39. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1819236>*
9. *Frei A., Elliott A.G., Kan A. et al. // JACS Au. 2022. V. 2. № 10. P. 2277. <https://doi.org/10.1021/jacsau.2c00308>*
10. *Carneiro T.J., Martins A.S., Marques M.P.M., Gil A.M. // Frontiers Oncology. 2020. V. 10. e590970. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.590970>*
11. *Omae I. // Coord. Chem. Rev. 2014. V. 280. P. 84. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.07.019>*
12. *Mahdy A.H.S., Salem E.Z., Ahmed M.A.B., Entesar A.H. // Tetrahedron. 2022. V. 121. Art. e132913. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2022.132913>*
13. *Zielińska-Błajet M., Feder-Kubis J. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. P. 7078. <https://doi.org/10.3390/ijms21197078>*
14. *Яровая О.И., Салахутдинов Н.Ф. // Успехи химии. 2021. Т. 90. С. 488 (Yarova O.I., Salakhutdinov N.F. // Russ. Chem. Rev. (Engl. Transl.) 2021. V. 90. P. 488). <https://doi.org/10.1070/RCR4969>*
15. *Ateba S.B., Mvondo M.A., Ngeu S.T. et al. // Curr. Med. Chem. 2018. V. 25. P. 3162. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180214110932>*
16. *Kumar A., Jaitak V. // Eur. J. Med. Chem. 2019. V. 176. P. 268. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.027>*
17. *Mahizan N.A., Yang S.K., Moo C.L. et al. // Molecules. 2019. V. 24. P. 2631. <https://doi.org/10.3390/molecules24142631>*
18. *Silva E.A.P., Carvalho J.S., Guimarães A.G. et al. // Expert Opin. Ther. Pat. 2019. V. 29. P. 43. <https://doi.org/10.1080/13543776.2019.1558211>*
19. *Залевская О.А., Гурьева Я.А., Кучин А.В. // Успехи химии. 2019. Т. 88. С. 979 (Zalevskaya O.A., Gur'eva Y.A., Kutchin A.V. // Russ. Chem. Rev. (Engl. Transl.) 2019. V. 88. P. 979). <https://doi.org/10.1070/RCR4880>*
20. *Гурьева Я.А., Залевская О.А., Фролова Л.Л. и др. // Хим. природ. соед. 2010. № 6. С. 783 (Gur'eva Y.A., Zalevskaya O.A., Frolova L.L. et al. // Chem. Nat. Comp. 2011. V. 46. № 6. P. 920). <https://doi.org/10.1007/S10600-011-9783-X>*
21. *Кучин А.В., Гурьева Я.А., Фролова Л.Л. и др. // Изв. АН. Сер. хим. 2013. № 3. С. 745 (Kuchin A.V., Gur'eva Ya.A., Frolova L.L. et al. // Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.). 2013. V. 62. № 3. P. 745). <https://doi.org/10.1007/s11172-013-0101-6>*
22. *Гурьева Я.А., Залевская О.А., Алексеев И.Н. и др. // Изв. АН. Сер. хим. 2014. № 7. С. 1543 (Gur'eva Y.A., Zalevskaya O.A., Alekseev I.N. et al. // Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.). 2014. V. 63. № 7. P. 1543). <https://doi.org/10.1007/s11172-014-0633-4>*
23. *Дворникова И.А., Буравлев Е.В., Супонитский К.Ю. и др. // Журн. орган. химии. 2015. Т. 51. С. 498 (Dvornikova I.A., Buravlev E.V., Chukicheva I.Y. et al. // Russ. J. Org. Chem. 2015. V. 51. P. 480). <https://doi.org/10.1134/S1070428015040041>*
24. *Гурьева Я.А., Залевская О.А., Алексеев И.Н. и др. // Журн. орган. химии. 2018. V. 54. P. 1274 (Gur'eva Y.A., Zalevskaya O.A., Alekseev I.N. et al. // Russ. J. Org. Chem. 2018. V. 54. P. 1285). <https://doi.org/10.1134/S1070428018090026>*
25. *Gur'eva Y.A., Alekseev I.N., Dvornikova I.A. et al. // Inorg. Chim. Acta. 2018. V. 477. P. 300. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.03.015>*
26. *Гурьева Я.А., Алексеев И.Н., Залевская О.А. и др. // Журн. орган. химии. 2016. Т. 52. С. 796 (Gur'eva Y.A., Alekseev I.N., Zalevskaya O.A. et al. // Russ. J. Org. Chem. 2016. V. 52. P. 781). <https://doi.org/10.1134/S107042801606004X>*
27. *Gur'eva Y.A., Slepukhin P.A., Kutchin A.V. // Inorg. Chim. Acta. 2019. V. 486. P. 602. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.11.016>*
28. *Zalevskaya O.A., Gur'eva Y.A., Kutchin A.V. et al. // Inorg. Chim. Acta. 2021. V. 527. e120593 <https://doi.org/10.1016/j.ica.2021.120593>*
29. *Frei A., Zuegg J., Elliott A.G. et al. // Chem. Sci. 2020. V. 11. P. 2627. <https://doi.org/10.1039/C9SC06460E>*
30. *Zalevskaya O.A., Gur'eva Y.A., Frolova L.L. et al. // Natural Science. 2010. V. 2. № 11. P. 1189. <https://doi.org/10.4236/ns.2010.211147>*
31. *Гурьева Я.А., Залевская О.А., Алексеев И.Н. и др. // Хим. природ. соед. 2014. № 4. С. 562 (Gureva Y.A., Zalevskaya O.A., Alekseev I.N. et al. // Chem. Nat. Comp. 2014. V. 50. № 4. P. 648. <https://doi.org/10.1007/s10600-014-1044-3>*
32. *Zalevskaya O., Gur'eva Y., Kutchin A., Hansford K. // Antibiotics. 2020. V. 9. № 5. Art. e277. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050277>*
33. *Fanelli M., Mauro F., Vieri F. et al. // Coord. Chem. Rev. 2016. V. 310. P. 41. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.11.004>*

34. *Vojtek M., Marques M.P.M., Ferreira I.M.P.L.V.O. et al.* // Drug Discov. Today. 2019. V. 24. P. 1044.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.02.012>
35. *Kapdi A.R., Fairlamb I.J.S.* // Chem. Soc. Rev. 2014. V. 43. P. 4751.
<https://doi.org/10.1039/C4CS00063C>
36. *Michelakis E.D., Webster L., Mackey J.R.* // Brit. J. Cancer. 2008. V. 99. P. 989.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604554>
37. *Štarha P., Trávníček Z.* // Coord. Chem. Rev. 2019. V. 395. P. 130.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.06.001>
38. *Omondi R.O., Ojwach S.O., Jaganyi D.* // Inorg. Chim. Acta. 2020. V. 512. Art. e119883.
<https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119883>
39. *Albert J., García S., Granell J. et al.* // J. Organomet. Chem. 2013. V. 724. P. 289.
<https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2012.11.034>
40. *Albert J., Bosque R., Crespo M. et al.* // Eur. J. Med. Chem. 2014. V. 84. P. 530.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.046>
41. *Albert J., D'Andrea L., Granell J. et al.* // J. Inorg. Biochem. 2014. V. 140. P. 80.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.07.001>
42. *Albert J., Granell J., Qadir R. et al.* // Organometallics. 2014. V. 33. P. 7284.
<https://doi.org/10.1021/om501060f>
43. *Karami K., Hosseini-Kharat M., Sadeghi-Aliabadi H. et al.* // Polyhedron. 2012. V. 50. P. 187.
<https://doi.org/10.1016/j.poly.2012.11.002>
44. *Karami K., Hosseini-Kharat M., Sadeghi-Aliabadi H. et al.* // Eur. J. Med. Chem. 2014. V. 73. P. 8.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.042>
45. *Karami K., Ramezanzpour A., Zakariazadeh M. et al.* // ChemSelect. 2019. V. 4. P. 5126.
<https://doi.org/10.1002/slct.201900707>
46. *Zmejkovski B.B., Savić A., Poljarević J. et al.* // Polyhedron. 2014. V. 80. P. 106.
<https://doi.org/10.1016/j.poly.2014.02.026>
47. *Stojković D.L., Jevtić V.V., Radić G.P. et al.* // J. Inorg. Biochem. 2015. V. 143. P. 111.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.12.001>
48. *Franich A.A., Živković M.D., Milovanović J. et al.* // J. Inorg. Biochem. 2020. V. 210. e111158.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2020.111158>
49. *Bošković M., Franich A.A., Rajković S. et al.* // Chem-Select. 2020. V. 5. P. Art. e10549.
<https://doi.org/10.1002/slct.202002350>
50. *Misirlic-Dencic S., Poljarevic J., Isakovic A.M. et al.* // Curr. Med. Chem. 2020. V. 27. P. 380.
<https://doi.org/10.2174/0929867325666181031114306>
51. *Srinivasan S., Guha M., Kashina A., Avadhani N.G.* // Biochim. Biophys. Acta Bioenerg. 2017. V. 1858. P. 602.
<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.004>
52. *Li W., Zhang C., Sun X.* // J. Vis. Exp. 2018. V. 135. Art. e56236.
<https://doi.org/10.3791/56236>
53. *Warburg O.* // Science. 1956. V. 124. P. 269.
54. *Wallace D.C.* // Nat. Rev. Cancer. 2012. V. 12. P. 685.
<https://doi.org/10.1038/nrc3365>
55. *Zheng Y., Liu P., Wang N. et al.* // Oxid. Med. Cell Longev. 2019. V. 2019. Art. e8781690.
<https://doi.org/10.1155/2019/8781690>
56. *Korga A., Ostrowska M., Iwan M. et al.* // FEBS Open Bio. 2019. V. 9. P. 959.
<https://doi.org/10.1002/2211-5463.12628>
57. *Zhang J., Zhang Q.* Methods in Molecular Biology. N.Y.: Humana Press, 2019. V. 1928. P. 353.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9027-618>
58. *Hashemi S., Karami K., Dehkordi Z.S. et al.* // J. Bio-molec. Struct. Dynam. 2022. V. 40. P. 5000.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1865202>
59. *Abedanzadeh S., Karami K., Rahimi M. et al.* // Dalton Trans. 2020. V. 49. Art. e14891.
<https://doi.org/10.1039/D0DT02304C>
60. *Гурьева Я.А., Залевская О.А., Николаева Н.С. и др.* // Изв. АН. Сер. хим. 2023. № 3. С. 793.
61. *Pellei M., Del Bello F., Porchia M., Santini C.* // Coord. Chem. Rev. 2021. V. 445. Art. e214088.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2021.214088>
62. *Abendrot M., Chęcińska L., Kusz J. et al.* // Molecules. 2020. V. 25. P. 951.
<https://doi.org/10.3390/molecules25040951>
63. *Кипрова Н.С., Кондратенко Ю.А., Уголков В.Л. и др.* // Изв. АН. Сер. хим. 2020. Т. 69. С. 1789 (*Kiprova N.S., Kondratenko Y.A., Ugolkov V.L. et al.* // Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.). 2020. V. 69. P. 1789).
<https://doi.org/10.1007/s11172-020-2963-8>
64. *Basu Baul T.S., Nongsiej K., Lamin Ka-Ot A. et al.* // Appl. Organomet. Chem. 2019. V. 33. Art. e4905.
<https://doi.org/10.1002/aoc.4905>
65. *Mastrolorenzo A., Scozzafava A., Supuran C.T.* // Eur. J. Pharm. Sci. 2000. V. 11. P. 99.
[https://doi.org/10.1016/S0928-0987\(00\)00093-2](https://doi.org/10.1016/S0928-0987(00)00093-2)
66. *Azevedo-França J.A., Borba-Santos L.P., Almeida Pi-mentel G. et al.* // J. Inorg. Biochem. 2021. V. 219. Art. e111401.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2021.111401>
67. *Matiadis D., Tsironis D., Stefanou V. et al.* // J. Inorg. Biochem. 2019. V. 194. P. 65.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.02.008>
68. *Zaltariov V.-F., Cazacu M., Avadanei M. et al.* // Polyhedron. 2015. V. 100. P. 121.
<https://doi.org/10.1016/j.poly.2015.07.030>
69. *Porchia M., Pellei M., Del Bello F., Santini C.* // Molecules. 2020. V. 9. Art. e5814.
<https://doi.org/10.3390/molecules25245814>
70. *Рукк Н.С., Кузьмина Л.Г., Давыдова Г.А. и др.* // Изв. АН. Сер. хим. 2020. Т. 69. С. 1394 (*Rukk N.S., Kuzmina L.G., Davydova G.A. et al.* // Russ. Chem. Bull. (Int. Ed.). 2020. V. 69. P. 1394).
<https://doi.org/10.1007/s11172-020-2914-4>
71. *Yu P., Deng J., Cai J. et al.* // Metallomics. 2019. V. 11. P. 1372.
<https://doi.org/10.1039/c9mt00124g>
72. *Garufi A., Giorno E., Gilardini Montani M.S. et al.* // Biomolecules. 2021. V. 11. P. 348.
<https://doi.org/10.3390/biom11030348>
73. *Shahraki S., Majd M.H., Heydari A.* // J. Mol. Struct. 2019. V. 1177. 536.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.10.005>
74. *Chukwuma C.I., Mashele S.S., Eze K.C. et al.* // Pharmacol. Res. 2020. V. 155. Art. e104744.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2020.104744>
75. *Motloung D.M., Mashele S.S., Matowane G.R. et al.* // J. Pharm. Pharmacol. 2020. V. 72. P. 1412.
<https://doi.org/10.1111/jphp.13322>

76. Rice D.R., Mendiola M.D.L.B., Murillo-Solano C. et al. // Bioorg. Med. Chem. 2017. V. 25. P. 2754.
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.03.050>
77. Гурьева Я.А., Залеская О.А., Николаева Н.С. и др. // Изв. АН. Сер. хим. 2022. № 12. С. 2612.
78. Fang D., Maldonado E.N. // Adv. Cancer Res. 2018. V. 138. P. 41.
<https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.02.002>
79. Zhao Y., Liu J., Liu L. // Mol. Med. Rep. 2020. V. 22. P. 3017.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2020.11341>
80. Quinlan C.L., Orr A.L., Perevoshchikova I.V. et al. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. Art. e27255.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.374629>
81. Sciacovelli M., Guzzo G., Morello V. et al. // Cell Metab. 2013. V. 17. P. 988.
<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2013.04.019>
82. Guzzo G., Sciacovelli M., Bernardi P., Rasola A. // Oncotarget. 2014. V. 5. Art. e11897.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.2472>
83. Moog S., Lussey-Lepoutre C., Favier J. // Endocr. Relat. Cancer. 2020. V. 27. P. 451.
<https://doi.org/10.1530/ERC-20-0346>
84. Withey S.J., Perrio S., Christodoulou D. et al. // Radiographics. 2019. V. 39. P. 1393.
<https://doi.org/10.1148/rg.2019180151>
85. Ibrahim A., Chopra S. // Arch. Pathol. Lab. Med. 2020. V. 144. P. 655.
<https://doi.org/10.5858/arpa.2018-0370-RS>
86. Gill A.J. // Histopathology. 2018. V. 72. P. 106.
<https://doi.org/10.1111/his.13277>
87. Stocks P.A., Barton V., Antoine T. et al. // Parasitology. 2014. V. 141. P. 50.
<https://doi.org/10.1017/S0031182013001571>
88. Onwudiwe D.C., Ekennia A.C. // Res. Chem. Intermed. 2017. V. 43. P. 1465.
<https://doi.org/10.1007/s11164-016-2709-2>
89. Ganji N., Aveli R., Narendrula V., Sreenu D.S. // J. Mol. Struct. 2018. V. 1173. P. 173.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2018.06.100>
90. Oladipo S.D., Omondi B., Mocktar C. // Polyhedron. 2019. V. 170. P. 712.
<https://doi.org/10.1016/j.poly.2019.06.038>
91. El-Medani S.M., Abdelmoneim A.M., Hussein M. et al. // J. Mol. Struct. 2020. V. 1208. Art. e127860.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.127860>
92. Ramesh G., Daravath S., Ganji N. et al. // J. Mol. Struct. 2020. V. 1202. 127338.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127338>
93. Psomas G. // Coord. Chem. Rev. 2020. V. 412. 213259.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213259>
94. Boussadia A., Beghidja A., Gali L. et al. // Inorg. Chim. Acta. 2020. V. 508. Art. e119656.
<https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119656>
95. Guerreiro J.F., Gomes M.A.G.B., Pagliari F. et al. // RSC Adv. 2020. V. 10. Art. e12699.
<https://doi.org/10.1039/d0ra00166j>
96. Said M. A., Al-unizi A., Al-Mamary M. et al. // Inorg. Chim. Acta. 2020. V. 505. Art. e119434.
<https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119434>
97. Boulguemha I.-E., Beghidja A., Khattabib L. et al. // Inorg. Chim. Acta. 2020. V. 507. e119519.
<https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119519>
98. Patel A.K., Jadeja R.N., Roy H. et al. // Polyhedron. 2020. V. 186. Art. e114624.
<https://doi.org/10.1007/s11164-016-2709-2>
99. Sakthivel A., Thangagiri B., Raman N. et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2020. V. 39. P. 6500.
<https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1801508>
100. Mo D., Shi J., Zhao D. et al. // J. Mol. Struct. 2021. V. 1223. Art. e129229.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129229>
101. Simunkova M., Lauro P., Jomova K. et al. // J. Inorg. Biochem. 2019. V. 194. P. 97.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.02.010>
102. Singh Y.P., Patel S.K. // J. Mol. Struct. 2021. V. 1228. Art. e129457.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.129457>
103. Siqueira J.D., de Pellegrin S.F., dos Santos S.S. // J. Inorg. Biochem. 2020. V. 204. Art. e110950.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110950>
104. Riley D.P. // Chem. Rev. 1999. V. 99. P. 2573.
<https://doi.org/10.1021/cr980432g>
105. Hordyjewska A., Popiołek L., Kocot J. // Biometals. 2014. V. 27. P. 611.
<https://doi.org/10.1007/s10534-014-9736-5>
106. Balsano C., Sideri S. // Metallomics. 2018. V. 10. P. 1712.
<https://doi.org/10.1039/c8mt00219c>
107. Santini C., Pellei M., Gandin V. et al. // Chem. Rev. 2014. V. 114. P. 815.
<https://doi.org/10.1021/cr400135x>
108. Zalevskaya O.A., Gur'eva Y.A. // Russ. J. Coord. Chem. 2021. V. 47. P. 861.
<https://doi.org/10.1134/S1070328421120046>
109. Gur'eva Y.A., Zalevskaya O.A., Shevchenko O.G. et al. // RSC Advances. 2022. V. 12. P. 8841.
<https://doi.org/10.1039/d2ra00223j>
110. Davis W.W., Stout T.R. // Appl. Microbiology. 1971. V. 22. P. 659.
<https://doi.org/10.1128/am.22.4.659-665.1971>
111. Davis W.W., Stout T.R. // Appl. Microbiology. 1971. V. 22. P. 666.
<https://doi.org/10.1128/am.22.4.666-670.1971>
112. Santiago P.H.O., Tiago F.S., Castro M.S. et al. // J. Inorg. Biochem. 2020. V. 204. Art. e110949.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.110949>
113. Gordon A.T., Abosede O.O., Ntsimango S., et al. // Inorg. Chim. Acta. 2020. V. 510. e119744.
<https://doi.org/10.1016/j.ica.2020.119744>
114. Takebayashi J., Chen A., Tai A.A. // Advanced Protocols in Oxidative Stress II. Totowa (NJ, USA): Humana Press, 2010. P. 287.
https://doi.org/10.1007/978-1-60761-411-1_20
115. Niki E. // Free Radical Biology Medicine. 2010. V. 49. P. 503.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.016>
116. Zou C.G., Agar N.S., Jones G.L. // Life Sciences. 2001. V. 69. P. 75.
[https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(01\)01112-2](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(01)01112-2)
117. Shiva Shankar Reddy C.S., Subramanyam M.V.V., Vani R., Asha Devi S. // Toxicol. Vitro. 2007. V. 21. P. 1355.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.06.010>
118. Ajila C.M., Rao P.U.J.S. // Food Chem. Tox. 2008. V. 46. P. 303.
<https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.08.024>
119. Rocha S., Costa E., Coimbra S. et al. // Blood Cells Molecules Diseases. 2009. V. 43. P. 68.
<https://doi.org/10.1021/cr980432g>
120. Ko F.N., Hsiao G., Kuo Y.H. // Free Radical Biol. Med. 1997. V. 22. P. 215.
[https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(96\)00295-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(96)00295-X)

УДК 546.92+548.31+546.05

Транс-КОМПЛЕКСЫ ПЛАТИНЫ С ДИКЛОФЕНАКОМ, АСПИРИНОМ И 2,6-ДИ-*трет*-БУТИЛФЕНОЛЬНЫМ ФРАГМЕНТОМ. СИНТЕЗ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ

© 2023 г. Т. А. Антоненко¹, *, Д. Б. Шпаковский¹, Ю. А. Грачева¹, К. А. Лысенко¹, Е. Р. Милаева¹

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: taisiya.antonenko@mail.ru

Поступила в редакцию 11.03.2023 г.

После доработки 27.03.2023 г.

Принята к публикации 29.03.2023 г.

Серия σ -арильных комплексов платины с пространственно-затрудненной фенольной группой общей формулы $RPt[PPh_3]_2X$, ($R = 3,5$ -ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил; $X = Cl$ (I), диклофенак (II), аспирин (III) и OOCR (IV)) синтезирована и охарактеризована методами спектроскопии ЯМР 1H , ^{13}C , ^{31}P и ИК, а также элементного анализа. Молекулярная структура соединения I определена методом PCA (CCDC № 2243100). Реакции переноса электрона и атома H изучены спектрофотометрически в CUPRAC- и ДФПГ-тестах. Комплексы I, II и IV оказались активными восстановителями $Cu(II)$. Антиоксидантная активность также исследована как способность соединений ингибировать липоксигеназу (LOX-1B). Обнаружено, что соединение I является ингибитором LOX-1B. Антипролиферативные свойства комплексов исследованы *in vitro* на раковых клетках HCT-116, MCF-7, A-549 и нормальных клетках WI-38. Найдено, что полученные соединения обладают более низкой антипролиферативной активностью по сравнению с цисплатином.

Ключевые слова: соединения $Pt(II)$, антиоксидантная активность, антипролиферативная активность, аспирин, диклофенак

DOI: 10.31857/S0132344X2360025X, **EDN:** NOTTIJ

Онкологические заболевания представляют собой важную социальную проблему, поскольку являются причиной ухудшения качества жизни пациентов и одной из основных причин смертности. Для их лечения используют хирургические методы, химиотерапию, лучевую терапию, гормональную терапию, иммунотерапию, таргетную терапию, генную инженерию. Химиотерапия является одним из наиболее популярных методов лечения различных видов злокачественных опухолей, в связи с чем поиск новых соединений, используемых в качестве цитостатиков, является перспективной задачей. Соединения платины (цисплатин, оксалиплатин, карбоплатин) занимают лидирующие позиции на рынке противоопухолевых препаратов. Механизм действия цисплатина включает связывание атома платины с азотистыми основаниями ДНК, что приводит к поперечному сшиванию спиралей, нарушению клеточного цикла и апоптозу [1]. Однако некоторые формы рака выработали устойчивость к этим соединениям. С целью разработки более эффективных противоопухолевых препаратов на основе платины исследован *in vitro* ряд комплексов $Pt(IV)$ с *транс*-координационной геометрией с центром на *транс*-аммин (цикло-

гексиламино-дихлордигидроксо) платине [2]. Обнаружено, что цисплатин и трансплатин способны образовывать внутри- и межцепочечные сшивки ДНК, однако имеются существенные различия в механизмах, объясняющих противоположный противоопухолевый эффект этих двух препаратов. Трансплатин стереохимически не способен к образованию 1,2-внутрицепочечных или поперечных связей, что свидетельствует о различиях в противоопухолевой активности в результате различного характера искажений, индуцируемых в ДНК различными внутрицепочечными поперечными связями, которые могут зависеть от природы лиганда и его координации.

Известны соединения платины, преодолевающие цисплатин-резистентность различных типов рака за счет лигандного окружения в комплексах платины. Например, введение в оксиплатин фрагмента нестероидного противовоспалительного препарата (НПВП) аспирина привело к получению асплатина, что позволило преодолеть резистентность раковых клеток к известным препаратам платины [3]. Сатраплатин, первый перорально вводимый комплекс $Pt(IV)$, не показал перекрестной

устойчивости с цисплатином на нескольких линиях раковых клеток человека *in vitro* [4].

Также обнаружено, что комплексы Pt(II), содержащие нестероидный противовоспалительный препарат диклофенак в лигандах с различными внутриклеточно расщепляемыми линкерами, являются мощными цитотоксическими агентами на нескольких различных линиях раковых клеток *in vitro*; они также значительно более эффективны в отношении цисплатин-резистентных опухолевых клеток [5, 6].

Таким образом, модификация физиологически активных комплексов платины может быть достигнута путем перехода к *транс*-комплексам, а также введением в лигандное окружение различных фармакофорных или редокс-активных групп.

Окислительно-восстановительные реакции связывают различные процессы жизнеобеспечения клетки. Например, окислительно-восстановительная регуляция протеинкиназ играет более общую роль в регуляции тирозинкиназ в селективной активации, продолжительности и усилении процесса фосфорилирования [7]. Окисление белков также является биологически необходимым процессом. Механизм передачи сигналов и контроля окислительно-восстановительного потенциала в значительной степени включает окислительную модификацию боковых цепей аминокислот в белках (цистеина, метионина, пролина, гистидина и триптофана) пероксидом водорода. Однако в данных реакциях могут возникать единичные ошибки, связанные с переносом активных метаболитов кислорода, что ведет к серьезным последствиям для метаболизма и важных химических процессов клетки. Окислительное повреждение ДНК приводит к невозможности полной передачи информации и, как следствие, невозможности правильного деления клетки [8]. В ряду веществ, которые контролируют негативные последствия окислительного стресса хорошо известны 2,6-диалкилфенолы, которые являются миметиками природного витамина Е и широко используются в качестве антиоксидантов и стабилизаторов [9, 10].

Цель настоящей работы заключается в молекулярном конструировании комплексов платины, в которых атом Pt(II), с одной стороны, образует σ -связь со стерически затрудненной фенольной группой, а с другой стороны, связан с хелатирующим фрагментом НПВП. В задачи работы входило также исследование их антиоксидантной, антипролиферативной и противовоспалительной активности *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3,5-Ди-*трет*-бутил-4-гидроксibenзойная кислота (99%, Sigma), трифенилфосфин (99%, Sig-

ma), ацетилсалициловая кислота (Asp) и диклофенак натрия (NaDicl) (Московская фармацевтическая фабрика), K_2PtCl_4 [11], 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенилмеркурхлорид [12] синтезировали по известным методикам. Растворители $CHCl_3$, CH_2Cl_2 , CH_3OH , C_2H_5OH , толуол, ДМСО, ацетон марок “х. ч.”, этанол (96%) и петролейный эфир (фракция 40–70°C) использовали без дополнительной очистки.

ИК-спектры поглощения записывали на спектрофотометре IR200 (Thermo Nicolet) с преобразованием Фурье в таблетках KBr. Спектры ЯМР получали на спектрометре “Bruker AMX-400” в $CDCl_3$ (1H , 400 МГц; ^{13}C , 100 МГц, ^{31}P 162 МГц). Элементный анализ проводили на C,H,N-анализаторе Vario Microcube (Elementar). Температуры плавления определяли капиллярным методом с помощью прибора для определения точки (температуры) плавления Stuart SMP10 (Bibby Scientific Limited Stone, UK).

Определение антиоксидантной активности соединений осуществляли с использованием планшетного (96 лунок) спектрофотометра MultiskanGo (Thermo Fisher Sci., USA). МТТ-тест проводили на планшетном спектрофотометре “Zenyth200rt (Anthos)”.

Синтез тетракис-(трифенилфосфин)платина $Pt[PPh_3]_4$ выполняли по методике [13]. Выход 0.81 г (72%). $T_{пл} = 148^\circ C$ ($T_{пл} = 148–153^\circ C$ [13]).

Синтез 3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил-бис-(трифенилфосфин)платина хлорид $RPt[PPh_3]_2Cl$ (I) выполняли по методике из тетракис-трифенилфосфинплатины и 3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил-меркурохлорида [14]. Выход 468 мг (56%). $T_{пл} = 247^\circ C$ ($T_{пл} = 248^\circ C$ [14]). После медленного испарения раствора продукта из ацетона при комнатной температуре в течение суток выделили кристаллы соединения I, пригодные для рентгеноструктурного анализа (РСА).

ЯМР 1H ($CDCl_3$; δ , м.д.): 0.97 (с., 18H, $2C(CH_3)_3$); 4.23 (с., 1H, $-OH$); 6.48 (с., 2H, $2CH$ (аром.), $^3J_{H_{Pt}} = 54$ Гц); 7.16–7.53 (м., 30H, $2 PPh_3$). ЯМР ^{13}C ($CDCl_3$; δ , м.д.): 29.73 ($C(CH_3)_3$); 32.83 ($C(CH_3)_3$); 107.26, 124.51 ($C-Pt$); 127.28 ($2C$, $^3J_{CP} = 10$ Гц); 129.42 ($2C$); 130.17 (C); 134.37 ($2C$, $^2J_{CP} = 12$ Гц), 134.82, 153.12. ЯМР ^{31}P ($CDCl_3$; δ , м.д.): 23.49 (т., 2P, $^1J_{P-Pt} = 3197$ Гц).

Синтез 3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксифенил-бис-(трифенилфосфин)платина 2-[2-(2,6-дихлоранилин)фенил]ацетат $RPt[PPh_3]_2Dicl$ (II). Смесь 56 мг I (0.058 ммоль) и 19 мг (0.058 ммоль) диклофенака натрия в 3 мл ацетона перемешивали в течение 24 ч. Далее растворитель отгоняли в вакууме, остаток промывали *n*-гексаном, водой и высуши-

вали на воздухе в течение 24 ч. Выход 34 мг (57%). $T_{пл} = 211^\circ\text{C}$.

Найдено, %: C 62.64; H 4.87; N 1.03.
Для $\text{C}_{64}\text{H}_{61}\text{O}_3\text{NP}_2\text{Cl}_2\text{Pt}$
вычислено, %: C 63.01; H 5.04; N 1.15.

ИК-спектр (KBr; ν , cm^{-1}): 3625 $\nu(\text{OH})$; 2869–3058 $\nu(\text{CH})$; 3100–3300 $\nu(\text{NH})$; 1611 $\nu(\text{COO})$, 1452, 1435, 1358, 1098, 745, 692.

ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.88 (с., 18H, $2\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 4.35 (с., 1H, $-\text{OH}$); 6.48 (т., 2H, 2CH (аром.)), $^3J_{\text{HH}} = 54$ Гц); 6.15–6.54 (м., 3H, (аром.)); 6.75–6.94 (м., 4H, (аром.)); 7.16–7.53 (м., 30H, (аром.)). ЯМР ^{31}P (CDCl_3 , δ , м.д.): 21.97 (с, 2P, $^1J_{\text{P-Pt}} = 3967$ Гц).

Синтез 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил-бис-(трифенилфосфин)платина ацетилсалицилат RPt[PPh₃]₂Asp (III). К смеси 75 мг (0.078 ммоль) I и 14 мг ацетилсалициловой кислоты (0.078 ммоль) в 5 мл ацетона добавляли по каплям 73 мкл (0.078 ммоль) 1 М КОН, смесь перемешивали 24 ч. Растворитель отгоняли в вакууме, остаток отфильтровывали, промывали водой и петролейным эфиром, высушивали на воздухе в течение 24 ч. Выход 72 мг (68%). $T_{пл} = 195^\circ\text{C}$.

Найдено, %: C 63.94; H 5.39.
Для $\text{C}_{59}\text{H}_{58}\text{O}_5\text{P}_2\text{Pt}$
вычислено, %: C 64.18; H 5.29.

ИК-спектр (KBr; ν , cm^{-1}): 3627 $\nu(\text{OH}$ своб.), 2870–3055 $\nu(\text{CH})$; 1607 $\nu(\text{COO})$, 1593, 1558, 1456, 1385, 1220, 1197, 755.

ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.97 (с., 18H, $2\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 4.23 (с., 1H, $-\text{OH}$); 6.48 (т., 2H, 2CH (аром.)), $^3J_{\text{HH}} = 54$ Гц); 7.16–7.53 (м., 30H, (аром.)).

ЯМР ^{31}P (CDCl_3 , δ , м.д.): 23.49 (с., 2P, $^1J_{\text{P-Pt}} = 3197$ Гц).

Синтез 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил-карбоксилата-3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил-бис-(трифенилфосфин)платина RPt[PPh₃]₂OOCR (IV). К смеси 77 мг (0.08 ммоль) I и 21 мг (0.08 ммоль) 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенозойной кислоты в 5 мл ацетона добавляли по каплям 80 мкл (0.08 ммоль) 1 М КОН, смесь перемешивали 24 ч. Образовался желтый раствор с осадком. Растворитель отгоняли в вакууме, бесцветный остаток отфильтровывали, промывали водой и петролейным эфиром, высушивали на

Таблица 1. Значения отдельных длин связей (Å) и углов (град) для соединения I

Связь d , Å	
Pt(1)–C(1)	2.004(5)
Pt(1)–P(1)	2.2981(16)
Pt(1)–P(2)	2.2971(16)
Pt(1)–Cl(1)	2.4116(17)
Угол ω , град	
C(1)Pt(1)P(1)	89.39(17)
C(1)Pt(1)P(2)	90.64(17)
P(1)Pt(1)P(2)	178.44(7)
C(1)Pt(1)Cl(1)	176.88(18)
P(1)Pt(1)Cl(1)	92.89(6)
P(2)Pt(1)Cl(1)	87.02(6)

воздухе в течение 24 ч. Выход 88 мг (75%). $T_{пл} = 201^\circ\text{C}$.

Найдено, %: C 66.48; H 6.39.
Для $\text{C}_{66}\text{H}_{74}\text{O}_4\text{P}_4\text{Pt}$
вычислено, %: C 66.71; H 6.28.

ИК-спектр (KBr; ν , cm^{-1}): 3633 $\nu(\text{OH}$ своб.), 3200–3500 $\nu(\text{OH}$ связ.); 2873–3050 $\nu(\text{CH})$; 1605 $\nu(\text{COO})$, 1544, 1387, 1234, 693.

ЯМР ^1H (CDCl_3 , δ , м.д.): 0.92 (с., 18H, $2\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 1.31 (с., 18H, $2\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 4.28 (с., 1H, $-\text{OH}$); 5.10 (с., 1H, $-\text{OH}$); 6.42 (с., 2H, 2CH (аром.)); 7.04 (с., 2H, 2CH (аром.)); 7.16–7.55 (м., 30H, (аром.)). ЯМР ^{13}C (CDCl_3 , δ , м.д.): 30.79 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 31.21 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 34.29 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 34.94 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$); 109.90; 111.73; 118.36; 124.64; 125.51; 126.14; 129.99; 135.96; 137.27; 150.18; 156.37; 181.00.

ЯМР ^{31}P (δ , м.д., CDCl_3): 22.18 (с.).

РСА проведен на дифрактометре BrukerQuest D8, оснащенный детектором Photon-III (ϕ - и ω -сканирование) при использовании MoK_α -излучения. Поправка на поглощение проведена с помощью процедуры мультисканирования, реализованной в SADABS (версия 2016/2) [15]. Структура расшифрована прямыми методами по программе SHELXT [16] и уточнена по F^2 по программе SHELXL-2018 [17]. Атомы уточнены с индивидуальными анизотропными (не атомы водорода) или изотропными (атомы водорода) параметрами смещения. Значения отдельных длин связей и углов в структуре I приведены в табл. 1.

Полный набор рентгеноструктурных параметров депонирован в Кембриджском банке структурных данных (№ 2243100; deposit@ccdc.cam.ac.uk; www: http://www.ccdc.cam.ac.uk).

Определение активности соединений в реакции переноса электрона (CUPRAC-тест). Тролокс (Sigma-Aldrich) использовали без дополнительной очистки. Метод получил свое название от аббревиатуры CUPRAC – Copper Reducing Antioxidant Capacity – способность антиоксиданта восстанавливать ион Cu(II) [18]. Данный метод основан на реакции восстановления меди в комплексе с неocupроином (2,9-диметил-1,10-фенантролин) и дает представление о способности исследуемого вещества выступать в качестве донора электрона. Эксперимент проводили по увеличению оптической плотности раствора комплекса при длине волны $\lambda_{\text{max}} = 450$ нм с использованием планшетного (96 лунок) спектрофотометра Thermo Scientific Multiskan. Реакционная смесь ($V = 0.2$ мл) содержала 0.05 мл ацетатного буфера, 0.05 мл 10^{-2} М раствора CuCl_2 , 0.05 мл 7.5 М раствора неocupроина и 0.05 мл 2×10^{-3} М раствора исследуемых соединений в метаноле.

Результаты представляли в тролокс-эквивалентах (ТЕАС), значения которых определяли графически по величине оптической плотности с использованием калибровочного графика – концентрационной зависимости количества восстановленного комплекса Cu(II) от содержания тролокса.

Исследование радикал-связывающей активности (ДФПГ-тест). Методика основана на спектрофотометрическом измерении падения оптической плотности при 517 нм в результате реакции радикала 2,2'-дифенил-1-пикрилгидразила (ДФПГ) с исследуемыми соединениями [19]. Реакция протекала в ячейках планшета Thermo Scientific MultiskanGo (96 лунок). Готовили серию растворов заданной концентрации; реакционная смесь содержала 0.1 мл ДФПГ и 0.1 мл исследуемых веществ различной концентрации (0.02, 0.04, 0.08, 0.12, 0.16, 0.2 мМ). Измерения проводили при 20°C в течение 30 мин.

Из полученных данных рассчитывали значение антиоксидантной активности в процентах (I , %) по формуле:

$$I = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100,$$

где A_0 – оптическая плотность контрольного раствора ДФПГ, A_1 – оптическая плотность раствора реакционной смеси.

Определение величин EC_{50} (эффективной концентрации) проводили путем аппроксимирования концентрационной зависимости логистической кривой общего вида:

$$I = 1 / (1 + [c] / \text{EC}_{50}) \times 100,$$

где c – концентрация исследуемого вещества.

Ингибирование фермента липоксигеназы. Определение активности липоксигеназы (LOX 1-B) проводили на основе спектрофотометрических измерений. Измеряли содержание продуктов окис-

ления линолевой кислоты – соответствующих изомерных гидропероксидов при $\lambda_{\text{max}} = 234$ нм [20]. Анализируемый раствор содержал 2 мл раствора линолевой кислоты (0.3 мМ), 0.89 мл боратного буфера (pH 9.0) и 0.01 мл раствора соединения в ДМСО. Реакцию инициировали добавлением 0.1 мл раствора фермента LOX 1-B (500 ед.), измерения проводили в течение 10 мин при 2°C. Для каждого вещества эксперименты проводили при пяти концентрациях и в трех повторностях.

Степень ингибирования липоксигеназы (I , %) определяли по формуле:

$$I = V_0 (\text{раствор вещества}) / V_0 (\text{ДМСО}) \times 100.$$

Методика работы с клеточными культурами. Культивирование клеток НСТ-116, MCF-7, A-549 и фибробластов WI-38 проводили в полной культуральной среде DMEM в стандартных условиях, пересевая их 2 раза в неделю в зависимости от плотности посева. Для пересева клетки смывали со стенок флакона 2 мл раствора Версена (0.02% ЭДТА), который хелатирует ионы кальция, необходимые для адгезии клеток, в результате чего происходит открепление клеток от подложки. Для более полного открепления клеточной массы флакон помещали в CO_2 -инкубатор на 15–20 мин (содержание CO_2 составляло 5%, $T = 37^\circ\text{C}$, инкубатор Galaxy 170S, New Brunswickan erppendorf company, США). Часть клеточной массы объемом около 100 мкл оставляли в культуральном флаконе, суспендировали в 7–8 мл среды DMEM и помещали в инкубатор для дальнейшего роста. Оставшуюся часть клеточной массы объемом 1.5–2 мл нейтрализовали добавлением 5 мл культуральной среды DMEM и осаждали клетки центрифугированием (2 мин, 2000 об./мин, центрифуга Universal 320R, Германия). После центрифугирования надосадочную жидкость удаляли, а осадок клеток суспендировали в 5 мл культуральной среды. Далее клеточную массу в объеме 50 мкл переносили в эппендорф и растворяли в 450 мкл DMEM. Количество клеток считали в камере Горяева, используя инверсионный биологический микроскоп Magnus (Германия).

Для подсчета клеток применяли формулу:

$$(n \times 25) / 100 \times [10]^5 \text{ кл./мл.}$$

Для дальнейшей работы с клеточными культурами добывались нужного разведения с помощью среды DMEM до получения плотности клеток 5×10^4 кл./мл. Далее в каждую лунку стерильного 96-луночного планшета вносили 190 мкл клеточной массы с последующим культивированием клеток в планшете в течение 24 ч в CO_2 -инкубаторе.

МТТ-тест основан на способности дегидрогеназ живых клеток, в частности сукцинат дегидрогеназы, восстанавливать неокрашенные

формы 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразола (МТТ) до голубого формазана, растворимого в ДМСО. МТТ-тест проводили по методике [21] с небольшими модификациями. Из исследуемых веществ готовили растворы с концентрациями 1, 0.25, 0.0625, 0.015, 0.00375 мМ в ДМЕМ. При необходимости вещества предварительно растворяли в ДМСО (концентрация ДМСО не более 0.5% от конечного объема раствора). Готовые растворы исследуемых веществ вносили в стерильный плоскодонный 96-луночный планшет, содержащий культуры клеток, микропипетками объемом 5 и 10 мкл, так чтобы конечная концентрация веществ в ячейках стала 50, 25, 12.5, 6.4, 3.2, 1.6, 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 мкМ. Планшет с клетками и исследуемыми веществами помещали в CO₂-инкубатор на 72 ч. Затем в каждую лунку планшета с первичной культурой и исследуемым веществом вносили по 10 мкл раствора МТТ 5 мкг/мл и инкубировали на протяжении 2 ч при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Через 2 ч экспозиции живые клетки восстанавливают желтый МТТ до темно-фиолетовых гранул формазана. Гранулы формазана растворяли в 150 мкл ДМСО, количество восстановленного продукта измеряли спектрофотометрически на планшетном ридере Zenyth 2000rt при длине волны 570 нм. Результаты теста представляли в виде графика зависимости % выживших клеток от концентрации исследуемых веществ. В качестве стандарта использовали

цисплатин. Эксперименты с тестируемыми соединениями проводили в трех повторностях.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходный σ -арильный комплекс платины (I) получен по реакции переметаллирования [14] взаимодействием *тетракис*-трифенилфосфин-платины с 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил-меркурхлоридом. Синтез соединений с общей формулой $\text{RPt}(\text{PPh}_3)_2\text{X}$ проводили с использованием реакции нуклеофильного замещения Cl в исходном соединении I (схема 1). Диклофенак представляет собой натриевую соль и является удобным нуклеофилом для введения в реакцию с I, в результате получен комплекс II. Для синтеза комплекса III в реакцию I с ацетилсалициловой кислотой было необходимо вводить эквимольное количество щелочи, так как избыток приводил к гидролизу лиганда по ацильной группе (схема 1). Реакцию соединения I с 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил-4-гидроксибензойной кислотой проводили в ацетоне с добавлением эквимольного количества KOH для депротонирования карбоксильной группы и создания нуклеофильного центра. Исходный комплекс I растворялся полностью в ацетоне после добавлении кислоты и основания, что указывало на прохождение реакции, в результате был получен комплекс IV (схема 1).

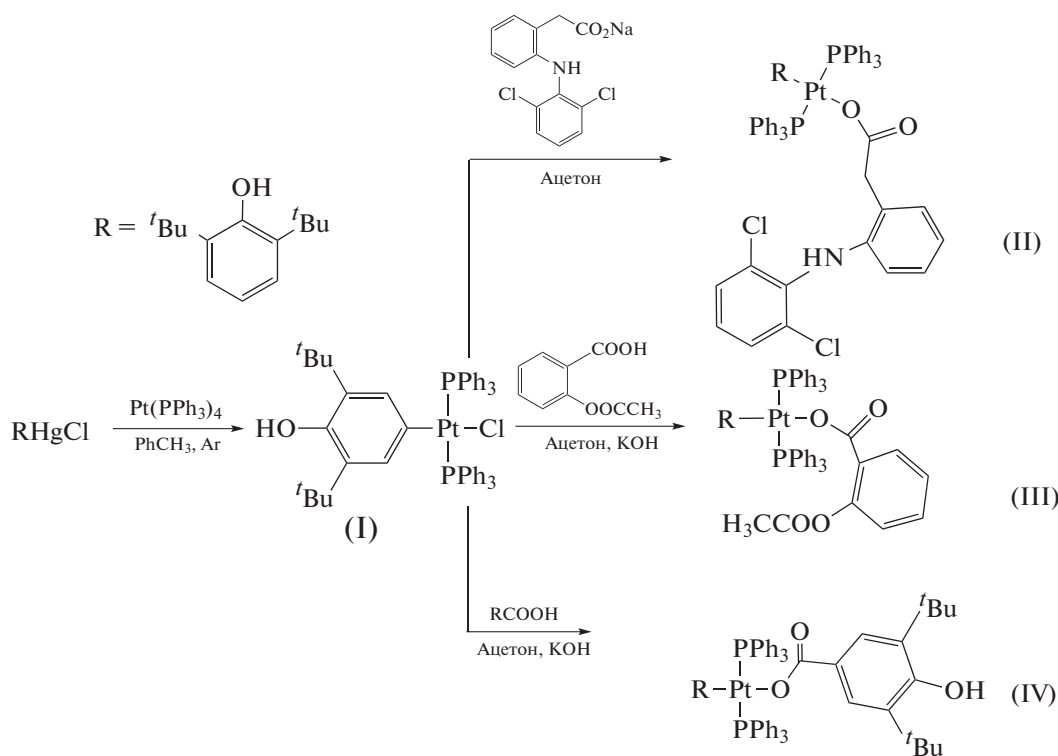


Схема 1.

Таблица 2. Значения ТЕАС и ЕС₅₀ (мкМ) для соединений платины I–IV, исходных лигандов и ионола (R = 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил)

Соединение	ТЕАС(CUPRAC)	ЕС ₅₀ , мкМ (ДФПГ)
I	1.84 ± 0.05	84 ± 5
II	1.57 ± 0.24	н/а*
III	0.66 ± 0.01	142 ± 62
IV	>3	104 ± 6
Диклофенак	н/а	н/а
Аспирин	н/а	н/а
RCOOH	1.56 ± 0.07	79 ± 3
R-CH ₃	1.10 ± 0.03	67 ± 4

* н/а – соединение неактивно.

Состав, чистота платинаорганических соединений подтверждены методами ЯМР ¹H, ¹³C, ³¹P-спектроскопии, ИК-спектроскопии и элементного анализа. Выходы соединений составляли 56–75%. В ИК-спектрах соединений I–IV присутствуют узкие полосы поглощения в области 3592–3639 см⁻¹, соответствующие валентным колебаниям связи О–Н пространственно-затрудненной неассоциированной фенольной группы, валентные колебания связи С–Н наблюдаются в области ~2800–3060 см⁻¹.

Спектр ЯМР ¹H соединения I в диапазоне 6.42–6.55 м.д. показывает наличие спин-спинового взаимодействия Н–Pt с константой ³J_{H–Pt} = 52 Гц. Смещение сигналов протонов ароматических колец в область слабого поля по сравнению с исходным лигандом подтверждает координацию с металлом. Спектр ЯМР ³¹P также содержит спин-спиновое взаимодействие Р–Pt с константой ¹J_{P–Pt} = 3197 Гц.

Спектр ЯМР ¹H соединения II демонстрирует наличие спин-спинового взаимодействия Н–Pt в области 6.65–6.73 м.д. с константой ³J_{H–Pt} = 32 Гц. Сигнал протонов *трет*-бутильного заместителя имеет химический сдвиг относительно исходного I, что подтверждает образование нового соединения. В спектре ЯМР ¹H проявляются сигналы ароматических протонов 6.30–6.90 м.д., относящиеся к фрагменту диклофенака. В спектре ЯМР ³¹P присутствует сигнал 21.97 м.д., сдвинутый относительно исходного соединения I (23.49 м.д.).

Соединение IV содержит два неэквивалентных фенольных фрагмента, поэтому в спектре ЯМР ¹H присутствуют две группы сигналов соответствующих заместителей. Так, в области 0.92 м.д. присутствует сигнал от *трет*-бутильных групп, σ-связанного с Pt фенольного фрагмента в I. Синглет 1.31 м.д. соответствует протонам *трет*-бутильных групп 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидрокси-

бензоата. Протоны фенольных групп платинадержавшего фрагмента и гидроксibenзоата проявляются при 4.28 и 5.10 м.д. соответственно.

В спектрах ЯМР ¹³C соединения IV наблюдается химический сдвиг сигналов углерода, что указывает на образование комплекса. Последовательность сигналов схожа с таковой для исходного соединения I, однако не все сигналы четко проявляются из-за низкой растворимости IV в CDCl₃. Спектр ³¹P соединения IV также демонстрирует получение комплекса из-за наличия химического сдвига (22.18 м.д.) по сравнению с 23.5 м.д. для соединения I.

В работе методом РСА исследована молекулярная структура соединения I. Перекристаллизация соединения I из ацетона позволила получить светло-желтые монокристаллы, использованные для РСА.

Установлено, что соединение кристаллизуется в триклинной сингонии, пространственная группа $P\bar{1}$; $a = 10.4531(18)$, $b = 11.828(2)$, $c = 22.049(4)$ Å; $\alpha = 75.160(4)^\circ$, $\beta = 86.396(5)^\circ$, $\gamma = 64.287(3)^\circ$; $V = 2370.6(7)$ Å³; $Z = 2$; $\Delta\rho_{\max}/\Delta\rho_{\min} = 2.155/1.178$ e/Å³; MoK_α -излучение; $\mu = 3.122$ мм⁻¹; R_1/wR_2 ($I \geq 2\sigma(I)$) = 0.0499/0.1105; GOOF = 1.020; Диапазон углов $\theta = 1.964^\circ$ – 25.998° ; размеры кристалла 0.1 × 0.2 × 0.2 мм. Обнаружено, что в кристаллическом состоянии соединения I представляет собой сольват с внешнесферной молекулой ацетона. КЧ(Pt) 4, координационный полиэдр – искаженный квадрат (рис. 1а).

Установлено наличие в структуре комплекса межмолекулярных водородных связей между ОН-группой 2,6-ди-*трет*-бутилфенольного фрагмента и атомом кислорода молекулы ацетона O(1)–H(1)···O(2) (H(1)···O(2) 2.37 Å, O(1)–H(1)···O(2) 4.06 Å, угол O(1)H(1)O(2) 66.43°) (рис. 1б).

Антиоксидантную активность соединений платины исследовали спектрофотометрически по их способности к одноэлектронному восстановлению иона Cu²⁺ до Cu⁺ с помощью CUPRAC-теста [18, 22]. Известно, что неокупроин (2,9-диметил-1,10-фенантролин) образует комплекс Cu(I) в присутствии антиоксидантов с максимумом поглощения при 450 нм. В качестве стандарта использовали 6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновую кислоту (Тролокс, ТЕАС = 1.00 ± 0.03). Результаты представлены в тролокс-эквивалентах ТЕАС (табл. 2).

Показано, что наиболее активными являются комплексы I, II и IV. Комплекс платины с диклофенаком обладает высокой активностью, в 1.5 раза превышающей активность известного антиоксиданта ионола (ВНТ).

В качестве еще одного метода изучения антиоксидантной активности полученных соединений оценивали их способность к восстановлению

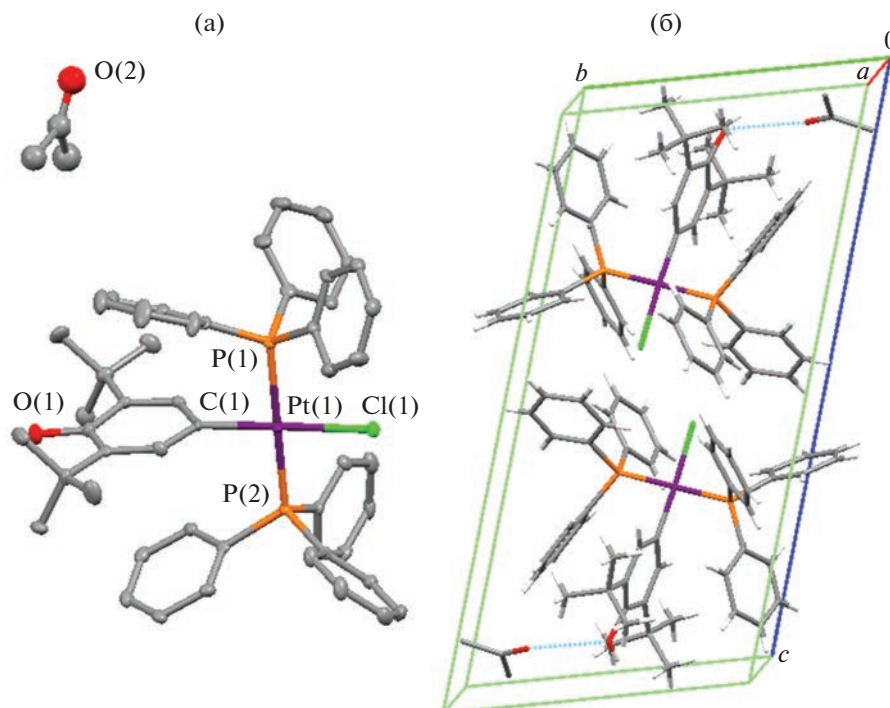


Рис. 1. Молекулярная структура соединения I (а), атомы водорода не показаны; водородные связи в упаковке кристалла I (б).

стабильного радикала 2,2-дифенил-1-пикрил-гидразила (ДФПГ) путем переноса атома водорода [19].

Активность соединений платины определяли методом электронной спектроскопии поглощения, измеряя уменьшение оптической плотности ДФПГ при длине волны 517 нм в течение 30 мин. Значение параметра эффективной концентрации соединения, необходимой для понижения концентрации радикала ДФПГ на 50% (EC_{50}) определяли графически по зависимости содержания оставшегося ДФПГ (в %) от первичной концентрации соединений (0.01–0.1 мМ). Значения EC_{50} приведены в табл. 2.

Антиоксидантные/противовоспалительные свойства соединений платины I–IV изучены в модельном процессе ферментативного окисления линолевой кислоты при действии липоксигеназы LOX 1-B *in vitro*. Побочными продуктами окисления являются активные метаболиты кислорода, накопление которых приводит к окислительному стрессу. Следовательно, способность к ингибированию липоксигеназы может свидетельствовать о потенциальных антиоксидантных и противовоспалительных свойствах изучаемых веществ. Определение активности липоксигеназы проводили методом спектрофотометрии, измеряя содержание продукта окисления линолевой кислоты – соответствующих гидропероксидов

при $\lambda_{max} = 234$ нм [20]. Обнаружено, что умеренным ингибитором липоксигеназы является только соединение I ($EC_{50} = 182.8 \pm 81$ мкМ). Особо следует отметить, что остальные соединения промотируют окисление линолевой кислоты.

Антипролиферативную активность полученных комплексов платины, а также исходных диклофенака и аспирина оценивали с помощью МТТ-теста [21] на клетках рака толстой кишки человека (НСТ-116), аденокарциномы молочной железы человека (MCF-7), карциномы легкого человека (A-549), а также диплоидной линии клеток человека, состоящей из фибробластов (WI-38) и определяли значения IC_{50} по сравнению с цисплатином (табл. 3).

Обнаружено, что, в отличие от цисплатина, полученные соединения обладают более низкой антипролиферативной активностью, что, по-видимому, определяется как *транс*-координационным окружением атома платины, так и наличием в молекуле цитопротекторной фенольной группы 2,6-ди-*трет*-бутилфенола. Это открывает возможность дальнейшего исследования данных соединений платины как потенциальных противоопухолевых препаратов с более мягким действием на организм. Следует особо отметить обнаруженную селективность действия соединения I по отношению к клеточной линии рака толстой кишки НСТ-116 ($IC_{50} = 59.6$ мкМ) и нормальным клет-

Таблица 3. Значения IC_{50} (мкМ) для комплексов I–IV, диклофенака, аспирина и цисплатина по отношению к клеточным линиям HCT-116, MCF-7, A-549 и WI-38

Соединение	IC_{50} , мкМ			
	HCT-116	MCF-7	A-549	WI-38
I	59.6 ± 6	101.5 ± 15	105.6 ± 12	169.5 ± 52
II	93.7 ± 15	146.5 ± 35	>200	51.8 ± 5
III	69.4 ± 11	118.2 ± 50	106.5 ± 62	65.3 ± 24
IV	187.6 ± 100	>200	>200	61.9 ± 10
Диклофенак	н/а*	>200	>200	81.7 ± 61
Аспирин	н/а*	н/а*	н/а*	111 ± 34
Цисплатин	9.04 ± 0.7	11 ± 1	16.7 ± 3	4.8 ± 0.5

* н/а – соединение неактивно.

кам WI-38 (диплоидная клеточная линия фибробластов человека) ($IC_{50} = 169.5$ мкМ). Превышение значения IC_{50} почти в 3 раза может послужить основой для поиска подобных *транс*-комплексов для достижения высокой степени селективности действия.

Таким образом, синтезированы и охарактеризованы *транс*-комплексы Pt(II), содержащие фрагменты 2,6-ди-*трет*-бутилфенола, а также нестероидных противовоспалительных препаратов аспирина и диклофенака. Исследована антиоксидантная активность соединений с помощью различных модельных реакций. Установлено, что введение в производные 2,6-ди-*трет*-бутил-фенола платинаорганического фрагмента приводит к возрастанию антиоксидантной активности. Обнаружено, что соединение I является ингибитором липоксигеназы, что может указывать на его потенциальные противовоспалительные свойства. Исследована *in vitro* антипролиферативная активность комплексов платины на клеточных линиях человека. Установлено, что, в отличие от цисплатина, полученные соединения обладают существенно меньшей активностью.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-63-00016).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Guddneppanavar R., Saluta G., Kucera G.L., Bierbach U. // J. Med. Chem. 2014. V. 49. № 11. P. 3204.
- Kelland L.R., Barnard F.G.C., Mellish K.J., Jones M. // Cancer Res. 1994. V. 8. P. 5618.
- Cheng Q., Wang H., Min Y., Wang J. // R. Soc. Chem. 2014. V. 50. P. 7427.
- Hager S., Ackermann C.J., Joerger M. et al. // Annals Oncology. 2016. V. 27. P. 975.
- Intini F.P., Zajac J., Novohradsky V. et al. // Inorg. Chem. 2017. V. 56. № 3. P. 1483.
- Ayoub S.S., Botting R.M., Joshi A.N. et al. // Mol. Cell. Biochem. 2009. V. 327. № 1–2. P. 101.
- D'Autréaux B., Toleda M.B. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2007. V. 8. № 10. P. 813.
- Sies H., Berndt C., Jones D.P. // Annu. Rev. Biochem. 2017. V. 86. P. 715.
- Antonenko T.A., Shpakovsky D.B., Vorobyov M.A. et al. // Appl. Organomet. Chem. 2018. V. 32. Art. e4381.
- Antonenko T.A., Gracheva Yu.A., Shpakovsky D.B. et al. // Int. J. Mol. Sci. 2023. V. 24. P. 2024.
- Брайэр Г., Руководство по неорганическому синтезу. М.: Мир, 1986. Т. 5. С. 1814.
- Милаев А.Г., Панов В.Б., Охлобыстин О.Ю. // Журн. общ. химии. 1981. Т. 51. № 12. С. 2715.
- Malatesta L., Cariello C. // J. Chem. Soc. 1958. № 6. P. 2323.
- Milaeva E.R., Rubeshov A.Z., Prokoph'ev A.I., Okhlobystin O.Yu. // J. Organomet. Chem. 1980. V. 188. № 3. P. C43.
- Krause L., Herbst-Irmer R., Sheldrick G.M., Stalke D. // J. Appl. Crystallogr. 2015. V. 48. P. 3.
- Sheldrick G.M. // Acta Crystallogr. A. 2015. V. 71. P. 3.
- Sheldrick G.M. // Acta Crystallogr. C. 2015. V. 71. P. 3.
- Apak R., Guglu K., Ozyurek M., Karademir S. // J. Agric. Food Chem. 2004. V. 52. P. 7970.
- Brand-Williams W., Cuvelier M. E., Berset C. // Food Sci. Technol. 1995. V. 28. P. 25.
- Ozturk I., Filimonova S., Hadjidakou S.K. // Inorg. Chem. 2010. № 7. P. 488.
- Niks M., Otto M. // J. Immunol. Methods. 1990. V. 130. № 1. P. 149.
- Ustafa M.O. // Agric. Food Chem. 2004. V. 52. P. 7970.

УДК 54.546.56+546.562+546.02+546.05+579.83+51.8+519.6

ФУРАНКАРБОКСИЛАТНЫЕ КОМПЛЕКСЫ МЕДИ(II) С 5-НИТРО-1,10-ФЕНАНТРОЛИНОМ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ АГЕНТЫ

© 2023 г. К. А. Кошенкова¹, Д. Е. Баравиков^{1, 2}, Ю. В. Нелюбина³, П. В. Примаков³, В. О. Шендер⁴, И. К. Мальянц⁴, О. Б. Беккер⁵, Т. М. Алиев³, Е. А. Бородин⁶, Д. Д. Котельников⁶, Н. Ю. Леусова⁷, С. Н. Мантров², М. А. Кискин¹, И. Л. Еременко^{1, 3}, И. А. Луценко^{1, *}

¹Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва, Россия

²Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

³Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, Россия

⁴Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

⁵Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

⁶Амурская государственная медицинская академия, Благовещенск, Россия

⁷Институт геологии и природопользования ДВО РАН, Благовещенск, Россия

*e-mail: irinalu05@rambler.ru

Поступила в редакцию 01.03.2023 г.

После доработки 18.04.2023 г.

Принята к публикации 03.05.2023 г.

Взаимодействие ацетата меди(II) с 2-фуранкарбоновой (HFur)/5-нитро-2-фуранкарбоновой (HNfur) кислотами и 5-нитро-1,10-фенантролином (Nphen) в метаноле привело к формированию биядерных координационных соединений состава $[\text{Cu}_2(\text{L})_4(\text{Nphen})_2] \cdot \text{X}$ (L = Fur (I), Nfur (II); X = H₂O (I)), строение которых установлено прямым методом рентгеноструктурного анализа (CCDC № 2244205 (I) и 2244206 (II)). По данным РСА, координационное окружение комплексообразователей в I и II складывается из двух атомов азота фрагментов Nphen и трех атомов кислорода анионов кислот, формируя тетрагональную пирамиду $\{\text{CuN}_2\text{O}_3\}$ с координационным числом атома меди, равным 5. В стабилизации надмолекулярных уровней I и II участвуют межмолекулярные водородные связи и стэкинг-взаимодействия между ароматическими кольцами Nphen. Характерной особенностью супрамолекулярной организации II является наличие координационной связи между катионом Cu^{2+} и кислородом группы NO_2^- лиганда Nphen параллельных цепей. Исследование биологической активности комплексов I и II в отношении цитотоксических свойств на клеточной линии аденокарциномы яичника человека (SKOV3) и микобактериального штамма *Mycolicibacterium smegmatis* показало эффективность подавления жизнедеятельности клеток. Методом математического моделирования вероятности связывания катиона Cu^{2+} с аминокислотными остатками белков *M. smegmatis* было предположено сродство комплексообразователя Cu(II) к ряду аминокислот в полипептидных сайтах. Рассчитано, что связывание ионов металла в белках микобактерии в большей степени характерно для фрагментов, содержащих гистидин и глутаминовую кислоту.

Ключевые слова: медь(II), координационные соединения, фуранкарбоксилаты, 5-нитро-1,10-фенантролин, кристаллическая структура, биологическая активность, *Mycolicibacterium smegmatis*, SKOV3, математическое моделирование

DOI: 10.31857/S0132344X23600212, EDN: MYGCWR

Координационные соединения металлов привлекают внимание исследователей из-за их уникальной возможности формировать структуры различного размера и ядерности, а возможность варьирования состава путем подбора лигандов позволяет получать соединения с нужными свойствами [1–3]. Для металлокомплексов характерен широкий круг практического применения – в качестве красителей и пигментов, катализаторов, молекулярных магнитов, аналитических агентов,

фунгицидов [4–7]. В последние десятилетия актуальны исследования возможностей использования комплексов металлов в медицине: как контрастное вещество в магнитно-резонансной томографии (МРТ), в радиофармпрепаратах, при лечении анемии, артрита, язвы и т.д. [8–11]. А открытие высокоэффективного противоракового агента цисплатина (CP) и последующий выход на фармацевтический рынок его аналогов стимулировало изучение комплексов различных металлов

(не только платиновой группы) и возможность их потенциального использования при лечении различных линий рака [12–17]. В настоящее время в качестве перспективных биологических агентов активно исследуются фенантролиновые комплексы с эссенциальными (жизненно необходимыми) металлами (Co, Fe, Zn, Mn, Cu и др.), поскольку многочисленные исследования показывают, что тандем 3*d*-металлов с фенантролиновыми фрагментами обладают антибактериальными, противоопухолевыми, противопаразитарными и другими свойствами благодаря способности лиганда взаимодействовать (интеркалировать) с молекулами ДНК [18–26]. Например, известная группа антиканцерогенных препаратов под торговым названием Casioreínas® на основе меди(II) с производными 2,2'-бипиридина и 1,10-фенантролина находится на заключительных стадиях клинических испытаний в Мексике [27–29].

В представляемой работе в качестве комплексобразователя была выбрана медь, являющаяся незаменимым элементом для живых организмов — выполняет ряд жизненно важных окислительно-восстановительных функций (например, транспорт электронов дыхательной цепи, окислительное фосфорилирование и удаление супероксидных радикалов и др.) [30–33]. Ранее [34–41] проведенные нами исследования антибактериальной и противораковой активности фураотных комплексов Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II) и Zn(II) и др. с различными N-донорными лигандами в отношении непатогенного микобактериального штамма *Mycolicibacterium smegmatis* и клеточного штамма — клеточной линии аденокарциномы рака яичников (*SKOV3*) — позволили установить, что наибольшую активность проявляют соединения Cu(II) и Au(III), содержащие в своем составе фенантролиновый фрагмент (подтверждение данного факта также встречается в публикациях [42, 43]). В связи с этим в представляемой работе приведены методики синтеза комплексов меди(II) с анионами 2-фуранкарбоновой (**HFur**) и 5-нитро-2-фуранкарбоновой (**HNfur**) кислот и 5-нитро-1,10-фенантролином (**Nphen**) — [Cu₂(Fur)₄(Nphen)₂] · H₂O (**I**) и [Cu₂(Nfur)₄(Nphen)₂] (**II**). Структуры полученных соединений установлены методом РСА, стабильность комплексов при растворении в физиологическом растворе фиксировалась электронными спектрами поглощения (**ЭСП**), а биологическая активность *in vitro* определена в отношении клеток *SKOV3* и модельного непатогенного штамма *M. smegmatis*. Для определения сродства катиона Cu²⁺ к ряду белков *M. smegmatis* был проведен межмолекулярный докинг с выделением потенциальных фрагментов аминокислотных остатков в полипептидных последовательностях.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез комплексов проводили на воздухе с использованием дистиллированной воды и растворителей без дополнительной очистки: метанол (х. ч., “Химмед”), ацетонитрил (х. ч., “Химмед”). Для синтеза использовали коммерчески доступные реактивы: моногидрат ацетата меди(II) (95%, “Acros”), 2-фуранкарбоновая кислота (98%, “Acros”), 5-нитро-2-фуранкарбоновая кислота (99%, “Aldrich”), 5-нитро-1,10-фенантролин (99%, “Fluorochem”).

Элементный анализ выполняли на автоматическом C,H,N-анализаторе Carlo Erba EA 1108. ИК-спектры соединений регистрировали на ИК-спектрофотометре с Фурье преобразованием Perkin-Elmer Spectrum 65 методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) в интервале частот 400–4000 см^{–1}.

ЭСП в УФ-видимой области снимали на спектрофотометре Shimadzu UV-2600 в 0.9%-ных растворах NaCl SoloPharm в диапазоне 220–400 нм. Стабильность комплексов I и II в растворе контролировали путем измерения спектров образца (50 мм) при комнатной температуре каждые 6 ч в течение 36 и 48 ч соответственно.

Биологическую активность I и II определяли в тест-системе *Mycolicibacterium smegmatis* mc² 155 диско-диффузионным методом с помощью бумажных дисков. Фиксировали величину зоны подавления роста штамма, засеянного газоном на агаризованной среде, вокруг бумажных дисков, содержащих вещество в различных концентрациях. Бактерии, смывые с чашек Петри со средой Триптон-соевый агар М-290 (Himedia), выращивали в течение ночи в жидкой среде Lemco-TW (Lab Lemco' Powder 5 г л^{–1} (Oxoid), Peptone special 5 г л^{–1} (Oxoid), NaCl 5 г л^{–1}, Tween-80) при 37°C до среднелогарифмической фазы роста при оптической плотности OD₆₀₀, равной 1.5, смешивали с расплавленной агаризованной средой М-290 в соотношении 1 : 9 : 10 (культура : Lemco-TW : М-290). Культуру инкубировали в течение 24 ч при 37°C. Минимальной ингибирующей концентрацией (**МИК**) считали концентрацию вещества, при которой зона подавления роста минимальна. Исследуемые соединения наносили на диски в разных концентрациях и регистрировали диаметр зоны (halo) ингибирования роста культуры.

Цитотоксический эффект различных концентраций I и II на клетках *SKOV3* и первичной культуре дермальных фибробластов человека (**HDF**) измеряли с помощью МТТ-теста. Данный тест основан на измерении активности митохондриального фермента сукцинатдегидрогеназы и широко используется для оценки противораковой активности потенциальных препаратов *in vitro*. По данным МТТ-теста была вычислена доза по-

лумаксимального ингибирования (IC_{50}) для обоих веществ. Клетки *SKOV3* получены из коллекции ATCC, первичная культура *HDF* получена от здорового донора. Клетки *SKOV3* и *HDF* культивировали в среде DMEM (10% FBS, 2 mM глутамин, 1% гентамицин). Культивирование клеток осуществляли в пластиковых флаконах в стерильных условиях, клетки инкубировали при 37°C в условиях 5% CO_2 . Стоковые растворы (50 мкМ) соединений I и II готовили в ДМСО, при добавлении к клеткам их разбавляли до необходимых концентраций в культуральной среде *SKOV3* и *HDF* и засевали в 96-луночные планшеты в количестве 4×10^3 и 3.5×10^3 клеток на лунку соответственно. Клеткам давали прикрепиться в течение не менее 14 ч, после чего методом раститровки добавляли различные концентрации тестируемых соединений или ДМСО (в качестве контроля) в трех повторах. Конечный объем среды в лунках составлял 100 мкл. Через 48 ч с момента добавления препаратов жизнеспособность клеток измеряли с помощью реагента МТТ (Sigma). В лунки с клетками (к 100 мкл среды) добавляли по 10 мкл рабочего раствора МТТ (7 мг/мл), инкубировали в течение 3 ч, после чего среду заменяли на раствор ДМСО. С помощью планшетного спектрофотометра (TECAN Infinite M Plex) определяли оптическую плотность каждой лунки при 570 нм с последующим вычитанием фонового поглощения. Значение концентрации, вызывающее 50%-ное ингибирование роста популяции клеток (IC_{50}), определяли на основе дозозависимых кривых.

Синтез $[Cu_2(Fur)_4(Nphen)_2] \cdot H_2O$ (I). Навески $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$ (0.200 г, 1 ммоль), $HFur$ (0.224 г, 2 ммоль) растворяли в 20 мл MeCN. К полученной суспензии добавляли $Nphen$ (0.225 г, 1 ммоль), растворенный в 10 мл MeOH. Реакционную смесь выдерживали при 70°C в течение 3 ч. Полученный синий раствор отфильтровывали, концентрировали до объема 20 мл и выдерживали маточный раствор при комнатной температуре. Через несколько дней образовывались кристаллы синего цвета, которые отделяли от маточного раствора декантацией, промывали MeCN и сушили на воздухе. Выход I 0.42 г (81%).

Найдено, %: C 50.84; H 2.72; N 8.12.

Для $C_{44}H_{28}N_6O_{17}Cu_2$ (I)

вычислено, %: C 50.82; H 2.71; N 8.08.

ИК (НПВО; ν , cm^{-1}): 3096 уш. сл., 2972 о.сл., 2293 о. сл., 2255 сл., 1803 о. сл., 1598 о.с., 1554 с., 1515 о. с., 1478 о.с., 1401 с., 1347 о.с., 1220 ср., 1186 с., 1142 ср., 1075 ср., 1009 с., 930 ср., 902 ср., 880 ср., 832 с., 806 о.с., 776 о.с., 720 с., 654 ср., 614 с., 559 ср., 516 ср., 469 с., 429 ср.

Синтез $[Cu_2(Nfur)_4(Nphen)_2]$ (II). Навески $Cu(OAc)_2 \cdot H_2O$ (0.200 г, 1 ммоль), $HNfur$ (0.314 г, 2 ммоль) растворяли в 20 мл MeOH. К полученной суспензии добавляли $Nphen$ (0.225 г, 1 ммоль), растворенный в 10 мл MeOH, и выдерживали реакционную смесь при 55°C в течение 3 ч. Полученный синий раствор отфильтровывали в шленк, концентрировали до объема 20 мл и выдерживали маточный раствор при комнатной температуре. Через несколько дней образовывались кристаллы бирюзового цвета, которые отделяли от маточного раствора декантацией, промывали MeCN и сушили на воздухе. Выход II 0.48 г (79%).

Найдено, %: C 44.01; H 1.89; N 11.59.

Для $C_{44}H_{22}N_{10}O_{24}Cu_2$ (II)

вычислено, %: C 43.97; H 1.85; N 11.66.

ИК (НПВО; ν , cm^{-1}): 3664 уш.сл., 3119 сл., 3086 уш. сл., 2980 уш. сл., 2903 уш. сл., 1638 с., 1575 ср., 1522 с., 1422 ср., 1393 ср., 1318 о.с., 1239 ср., 1152 ср., 1118 ср., 1064 ср., 1013 ср., 960 ср., 947 ср., 905 ср., 829 с., 809 с., 782 о.с., 723 с., 646 ср., 605 ср., 546 ср., 516 ср., 480 ср., 429 ср.

РСА комплексов I и II проведен при 100 К на дифрактометре Bruker Apex II DUO (CCD-детектор, MoK_{α} -излучение, $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$, графитовый монохроматор). Структуры расшифрованы с использованием программы ShelXT [44] и уточнены в полноматричном МНК с помощью программы Olex2 [45] в анизотропном приближении для неводородных атомов. Атомы водорода молекулы воды локализованы из разностных Фурье-синтезов, а положения остальных атомов водорода рассчитаны геометрически. Все они уточнены в изотропном приближении в модели “наездника”. Диффузный вклад разупорядоченных молекул растворителя описан с помощью опции Bypass (a.k.a. squeeze) пакета программ [44]. Основные кристаллографические данные и параметры уточнения приведены в табл. 1.

Полный набор рентгеноструктурных параметров депонирован в Кембриджском банке структурных данных (CCDC № 2244205 (I) и 2244206 (II); deposit@ccdc.cam.uk).

Математическое моделирование вероятности связывания катиона Cu^{2+} с аминокислотными остатками белков *M. smegmatis* проводили методом жесткого межмолекулярного докинга с использованием веб-сервера MIB2 [46], включающего разнообразные способы вычисления сродства катиона к аминокислотам. Структуры белков брали из открытой базы данных белков UniProtKB. Анализ результатов докинга проводили при помощи молекулярного визуализатора PyMol (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.5.4 Schrödinger, LLC). Отбор стыкованных кон-

Таблица 1. Кристаллографические параметры и детали уточнения структур I и II

Параметр	Значение	
	I	II
Брутто-формула	$C_{44}H_{28}N_6O_{17}Cu_2$	$C_{44}H_{22}N_{10}O_{24}Cu_2$
M	1039.80	1201.79
T , К	100	
Сингония	Моноклинная	Триклинная
Пр. группа	$P2_1/c$	$P\bar{1}$
Размер кристалла, мм; цвет	$0.3 \times 0.2 \times 0.1$; голубой	$0.2 \times 0.1 \times 0.1$; бирюзовый
a , Å	12.6015(2)	8.8569(4)
b , Å	17.7797(2)	10.6206(5)
c , Å	9.71830(10)	12.9265(6)
α , град	90	74.247(2)
β , град	108.3560(10)	84.403(2)
γ , град	90	76.162(2)
V , Å ³	2066.60(5)	1135.61(9)
Z	2	2
ρ (выч.), г/см ³	1.671	1.757
μ , мм ⁻¹	1.118	1.044
$F(000)$	1056	606
Область сбора данных по θ , град	2.05–26.00	2.043–25.494
R_{int}	0.0333	0.0340
Число измеренных отражений	21 234	11 100
Число независимых отражений	4049	4219
Число отражений с $I > 2\sigma(I)$	3609	3887
Количество уточненных переменных	361	381
GOOF	1.017	1.087
R -факторы по $F^2 > 2\sigma(F^2)$	$R_1 = 0.0256$, $wR_2 = 0.0646$	$R_1 = 0.0500$, $wR_2 = 0.1347$
R -факторы по всем отражениям	$R_1 = 0.0304$, $wR_2 = 0.0666$	$R_1 = 0.0532$, $wR_2 = 0.1377$
Остаточная электронная плотность (max/min), е/Å ³	0.432/–0.310	1.794/–0.707

формеров осуществляли по следующим параметрам: аминокислотных остатков (>2 , связывающихся с ионом); связей (>2 ; связь должна удовлетворять параметрам ковалентной/ионной/координационной); ранг (рейтинг в перечне получившихся комплексов для каждого из белка, ранжированный от большего значения оценочной функции к меньшему) и оценку (score) комплекса (>2 ; наивысшие при выполнении предыдущих условий). Отметим, что в данной работе ввиду отсутствия информации от авторов MIB2 о четкой методике интерпретации оценки получившихся комплексов, их абсолютное значение не учитывалось в сравне-

нии между комплексами и интерпретировалось с качественной точки зрения: возможности или невозможности связывания. Данное условие было принято во избежание неправильной интерпретации полученных результатов докинга и минимизации допущения ошибки I рода, так как работа алгоритма MIB2 основана на предсказательной модели и является вероятностной. Валидацию стыкованных комплексов, а также параметров связей проводили в PyMol с помощью плагина Show Contacts, показывающего возможные связи Cu^{2+} с атомами N и O в составе аминокислот ион-связывающих сайтов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез заключался в ионообменной реакции ацетата меди(II) с фуранкарбоновой кислотой в

ацетонитриле (I)/метаноле (II) с последующим добавлением Nphen, растворенного в метаноле (схема 1).

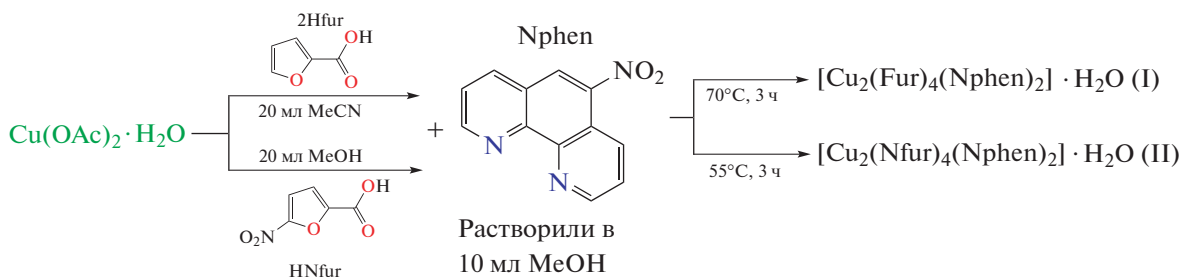


Схема 1.

На первой стадии образовывалась зеленая суспензия, дальнейшее добавление к которой Nphen приводило к образованию синего прозрачного раствора, который выдерживали еще в течение 3 ч и затем отфильтровывали. В результате медленного испарения маточного раствора были получены кристаллы, пригодные для рентгеноструктурного анализа.

Соединение I, которое представляет собой молекулярный биядерный комплекс меди(II), кристаллизуется в пространственной группе $P2_1/c$ моноклинной сингонии с одной молекулой воды, приходящейся на одну формульную единицу комплекса (табл. 1). Комплекс в кристалле занимает частное положение — центр инверсии, совпадающий с центром восьмичленного металлоцикла (рис. 1). Координационное окружение иона металла-комплексобразователя формируется двумя атомами азота лиганда Nphen и тремя атомами кислорода трех анионов Fur[−] и имеет форму искаженной тетрагональной пирамиды, КЧ(Cu) 5 (рис. 1; основные длины связей представлены в табл. 2). Два из трех анионов Fur[−] выполняют роль мостиковых лигандов, связывающих атомы меди(II) между собой, а третий образует водородную связь с сольватной молекулой воды (O...O 2.799(4) и 2.939(4) Å, ОН 168(8)° и 170(5)°; табл. 3). За счет таких водородных связей молекулы I в кристалле формируют водородно-связанные цепи вдоль диагонали кристаллографической плоскости $a0c$, которые, в свою очередь, объединяются в слои за счет стэкинг-взаимодействий между параллельными фенантролиновыми кольцами (расстояние между центроидами 3.4215(10) Å, величина смещения 1.3313(14) Å (рис. 2, табл. 3).

Комплекс II, кристаллизующийся в пространственной группе $P\bar{1}$ триклинной сингонии (табл. 1), имеет структуру, аналогичную таковой для I (рис. 3, табл. 2). Ввиду отсутствия сольватных молекул воды основной супрамолекулярной единицей яв-

ляются бесконечные цепи (рис. 4), образованные стэкинг-взаимодействиями между параллельными ароматическими кольцами молекул Nphen (расстояние между центроидами 3.558(2) Å, величина смещения 1.347(3) Å) соседних молекул комплекса. Они дополнительно стабилизированы слабой координационной связью (3.090(7) Å) между катионом Cu²⁺ и атомом кислорода одной из компонент разупорядоченной нитрогруппы Nphen-лиганда (рис. 4, табл. 2). Таким образом, в отличие от I, в котором комплексобразователь характеризуется КЧ 5, в II КЧ(Cu) составляет (5 + 1).

ЭСП I и II (2.5×10^5 М) были получены в физиологическом растворе (0.9% NaCl) в течение 48 ч при комнатной температуре (рис. 5). Оба соединения демонстрируют высокие скорости поглощения в области высоких энергий, полосы поглощения при длине волны около 275 нм соответствуют внутрилигандным переходам в молекуле Nphen, а полосы поглощения низкой интенсивности, лежащие в области 300–350 нм, связаны с переносом заряда металл–лиганд [47, 48]. Также следует отметить, исходя из спектров поглощения, солевой раствор I является высоко стабильным с течением времени, тогда как в растворе II отмечается небольшая деградация, связанная с гидролитическими процессами, происходящими в комплексе с течением времени. При этом важно отметить, что скорость гидролиза наиболее интенсивно протекает в первые 6 ч после растворения соединения, тогда как в оставшиеся 32 ч система находится в относительном равновесии.

Антибактериальная активность соединений I и II была определена в отношении непатогенного штамма *M. smegmatis*, который является модельным для вирулентного возбудителя туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ, палочка Коха). Известно, что устойчивость микобактерий к химиотерапевтическим агентам связана с низкой проницаемостью микобактериальной клеточной стенки, с ее необычной структурой. *M. smegmatis*

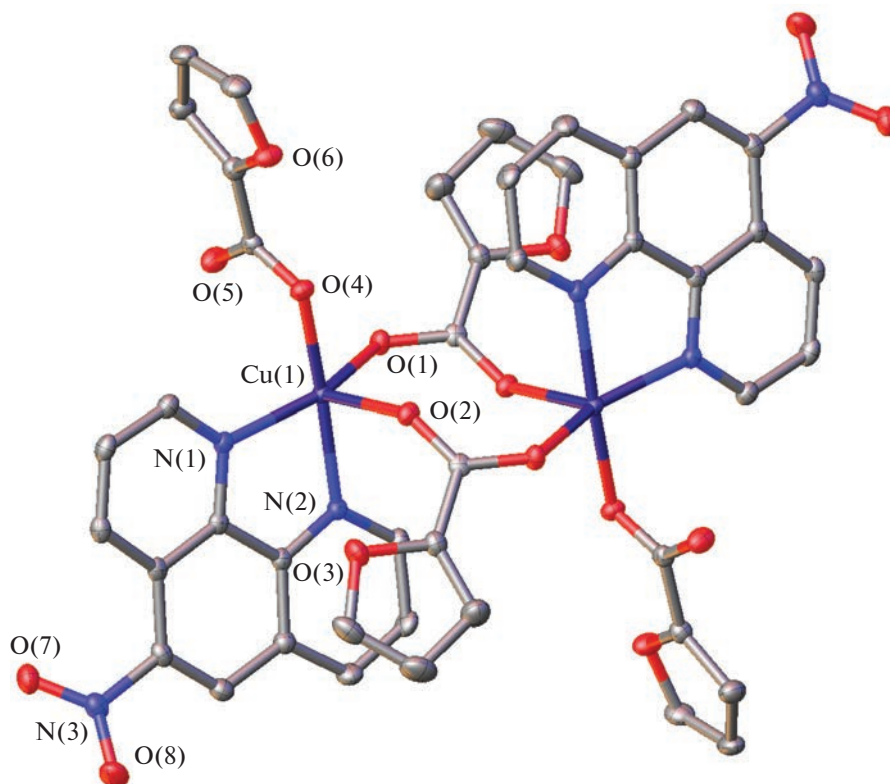


Рис. 1. Общий вид комплекса I. Здесь и далее атомы водорода (за исключением принадлежащих молекулам воды) не показаны, неводородные атомы представлены в виде эллипсоидов тепловых колебаний ($p = 50\%$), а нумерация приведена только для гетероатомов независимой части элементарной ячейки.

являются быстрорастущими непатогенными микобактериями и используется в качестве модельных организмов для медленно растущих бактерий *M. tuberculosis*, а также для первичного скрининга противотуберкулезных препаратов [49]. Тест-система *M. smegmatis* проявляет более высокую степень устойчивости к антибиотикам и противотуберкулезным агентам, чем МБТ, поэтому критерием отбора является концентрация вещества < 100 мкмоль/диск [50]. Все полученные результаты биоактивности *in vitro* исследованных соединений соотносились с активностью для изониазида (INH) и рифампицина (Rif) в данных условиях эксперимента. Вещества наносили на диски в разных концентрациях.

Результаты антибактериальной активности в тестовой системе *M. smegmatis* mc^2 155 и ее изменение с течением времени для соединений I и II приведены в табл. 4. Полученные комплексы с Nphen обладают высокой активностью, в частности II проявляет такую же эффективность, как ранее полученный высокоактивный $[Cu(Fur)_2Phen]$ [34] — она сопоставима с активностью рифампицина. Активности свободных лигандов в несколько раз ниже активностей I и II. Следует отметить,

что результаты анализа области “halo” II позволили установить характер воздействия соединения на бактериальную культуру — прозрачная зона вокруг диска свидетельствует о бактерицидном действии комплекса — зона ингибирования роста бактерий не зарастает через 120 ч. В отличие от II, I проявляет бактериостатический эффект (зона ингибирования с течением времени зарастает). Таким образом, полученные комплексы I и II являются одними из наиболее активных и перспективных среди изученных соединений цинка, кобальта(II), меди(II) и никеля(II) по отношению к *M. smegmatis* [33–40].

Поиск возможных путей воздействия катионов меди(II) на белковые молекулы микобактериального штамма *M. smegmatis* и локализации эффектов в полипептидной цепи был осуществлен с использованием математического моделирования методом жесткого межмолекулярного докинга. На рис. 6 представлен пример типичной конформации белка с Cu^{2+} . Структура белкового комплекса показывает потенциальное связывание N гистидина (His) и аргинина (Arg) — формируются координационные связи $2.3\text{--}3.0$ Å, а также между комплексообразователем и O аспарагина (Asp) — 2.9 Å.

Таблица 2. Основные длины связей (d) и валентные углы (ω) в структурах I и II*

Связь	$d, \text{\AA}$	Связь	$d, \text{\AA}$
I		II	
Cu(1)–O(4)	1.9313(12)	Cu(1)–O(1)	1.928(2)
Cu(1)–O(2) ^{1#}	2.1985(12)	Cu(1)–O(4)	1.937(2)
Cu(1)–O(1)	1.9417(13)	Cu(1)–O(2) ^{2#}	2.358(2)
Cu(1)–N(1)	2.0331(15)	Cu(1)–N(1)	2.014(3)
Cu(1)–N(2)	2.0192(15)	Cu(1)–N(2)	2.0149(3)
Cu(1)...Cu(1) ^{1#}	4.5653(4)	Cu(1)...O(11') ^{2#}	3.090(7)
		Cu(1)...Cu(1) ¹	4.3003(9)
Угол	ω , град	Угол	ω , град
N(1)Cu(1)N(2)	81.18(6)	N(1)Cu(1)N(2)	81.08(12)
N(1)Cu(1)O(1)	155.14(6)	N(1)Cu(1)O(1)	165.45(11)
N(1)Cu(1)O(2) ^{1#}	98.62(5)	N(1)Cu(1)O(2) ^{2#}	88.85(10)
N(1)Cu(1)O(4)	92.60(6)	N(1)Cu(1)O(4)	91.24(11)
N(2)Cu(1)O(1)	98.9(6)	N(2)Cu(1)O(1)	87.90(11)
N(2)Cu(1)O(2) ^{1#}	88.62(5)	N(2)Cu(1)O(2) ^{2#}	93.54(10)
N(2)Cu(1)O(4)	171.72(6)	N(2)Cu(1)O(4)	172.31(11)

* Коды симметрии: ^{1#} $-x, 1-y, -z$; ^{2#} $1-x, -y, 1-z$.**Таблица 3.** Геометрические параметры водородных связей в структуре I

D–H...A	Расстояние, $\text{\AA}$			Угол DHA, град
	D–H	H...A	D–A	
O(9)–H(9)...O(5)	0.86(6)	1.95(6)	2.799(4)	168(8)
O(9)–H(9)...O(5)	0.91(6)	2.04(6)	2.939(4)	170(5)

Результаты докинга для ряда белков *M. smegmatis* представлены в табл. 5. Эти данные показывают, что наиболее часто встречающимися аминокислотами в полипептидных сайтах белка, способными образовывать координационное связывание оказываются гистидин (**H** – 7 из общего количества связей для всех белков), глутаминовая кислота (**E** – 5 раз) и цистеин (**C** – 2); единичное связывание наблюдается для аргинина (**R**), глутамина (**Q**), серина (**S**), треонина (**T**) и аспарагиновой кислоты (**D**). Анализ результатов потенциального связывания катиона Cu^{2+} с аминокислотами выявил формирование координационных связей разной

эффективности (2.3–3.7 $\text{\AA}$), что подтверждает адекватность выбранной методики валидации результатов. Кроме этого, остатки Cys17 и Cys20 для белка MSMEG_5014, а также остатки His68 и Cys72 для белка MSMEG_0230 являются аннотированными ион-связывающими сайтами согласно базе данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABK71068.1>, MSMEG_5014 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ABK69823.1>, MSMEG_0230).

Цитотоксичность комплексов I и II была определена в отношении клеток *SKOV3* и *HDF* в качестве контроля нормальных неопухолевых клеток. На основе данных МТТ-теста была вычислена

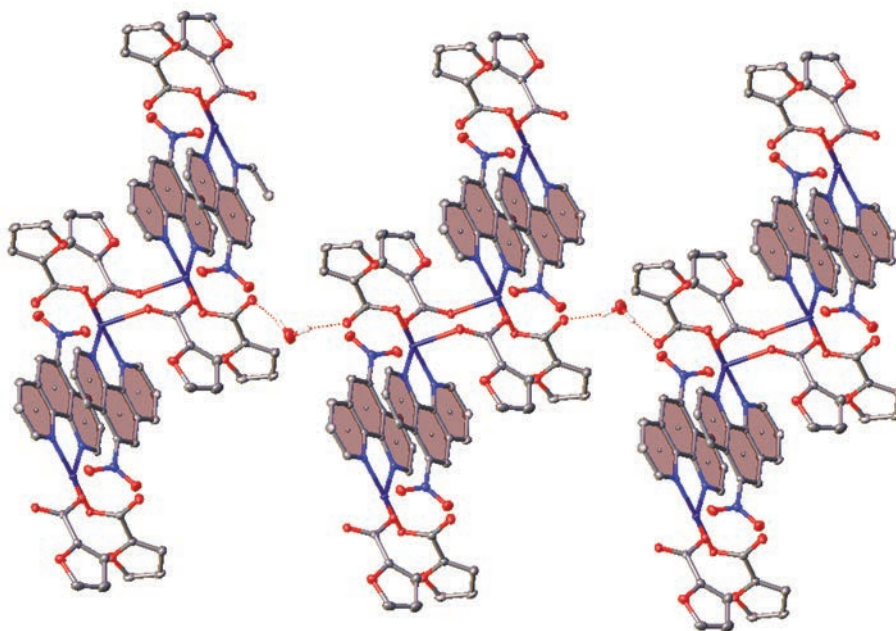


Рис. 2. Фрагмент кристаллической упаковки I. Пунктирными линиями обозначены водородные связи O—H...O, плоскости ароматических колец, участвующих в образовании межмолекулярных стэкинг-взаимодействий, выделены темным цветом.

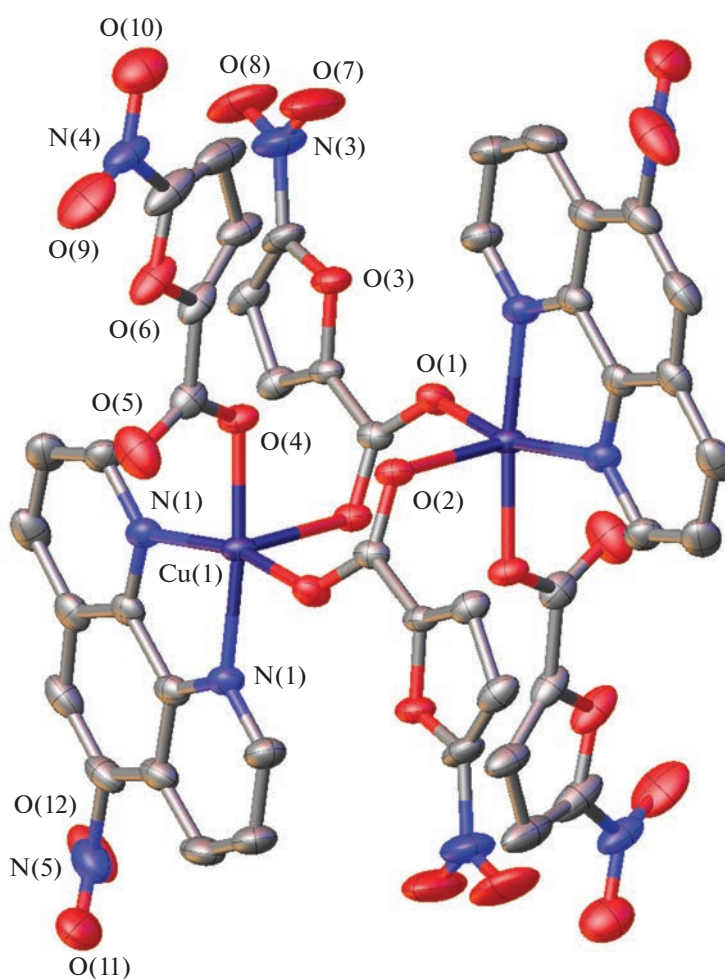


Рис. 3. Общий вид комплекса II. Минорные компоненты разупорядоченных нитрогрупп не показаны.

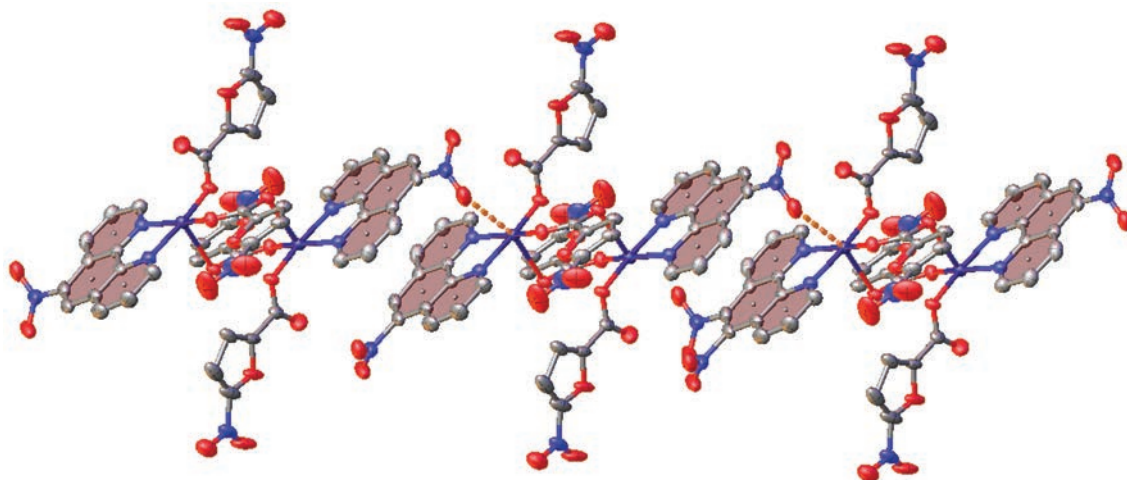


Рис. 4. Фрагмент кристаллической упаковки II. Пунктирными линиями обозначены дополнительные координационные связи Cu...O, плоскости ароматических колец, участвующих в образовании межмолекулярных стэкинг-взаимодействий, выделены темным цветом.

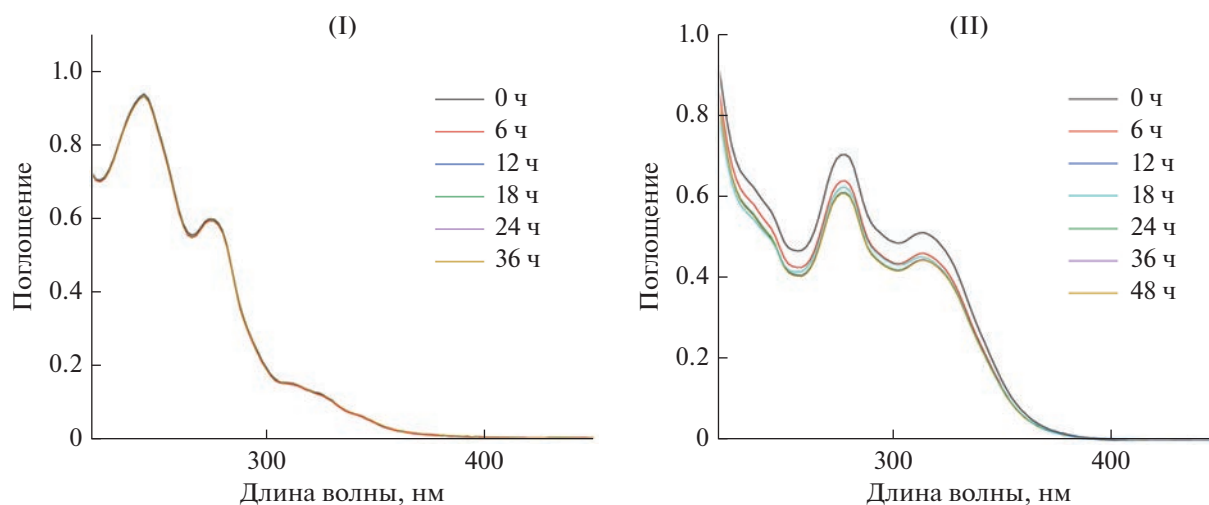


Рис. 5. УФ-видимые спектры I и II в физиологическом растворе (0.9% NaCl) при 25°C.

доза IC_{50} для каждого вещества. Перспективными считаются препараты, которые вызывают гибель опухолевых клеток при минимальных концентрациях, при этом в меньшей степени нарушая жизнеспособность нормальных клеток. Обсуждаемые комплексы в ~ 2 раза оказались более токсичными для клеток аденокарциномы яичника, чем для здоровых фибробластов (рис. 7, 8; табл. 6). При сравнении с цисплатином показано, что комплексы более чем в 2 раза эффективнее по отношению к опухолевым клеткам, однако токсичнее по отношению к здоровым фибробластам (индекс селективности (SI) ~ 2). При сравнении с ранее полу-

ченным медным комплексом $[Cu_2(Fur)_4(MeCN)_2]$ [34] можно отметить, что введение Nphen привело к увеличению цитотоксической активности более чем в 30 раз по отношению к раковым клеткам и в ~ 9 раз в сравнении с комплексом золота(III), $(H_2Phen)[AuCl_4]Cl$ [41]. Таким образом, с учетом дальнейшего изучения токсичности и подбора соответствующих доз комплексы могут рассматриваться в качестве потенциальных противоопухолевых агентов.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Таблица 4. Результаты антибактериальной активности *in vitro* комплексов I и II в отношении *Mycobacterium smegmatis*

Соединение	МИК, нмоль/диск	Зона ингибирования, мм		Литература
	24 ч	24 ч	120 ч	
I	10	7.0 ± 0.5	$6.4 \pm 0.17^{**}$	Настоящая работа
II	5	6.5 ± 0.5	6.47 ± 0.17	Настоящая работа
[Cu(Fur) ₂ (Phen)]	5	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	[29]
[Cu ₂ (Fur) ₄ (Py) ₂]	200	7.0 ± 0.5	$7.0 \pm 0.5^{**}$	[29]
[Cu(Fur) ₂ (Py) ₂ (H ₂ O)]	400	7.0 ± 0.5	$7.0 \pm 0.5^{**}$	[29]
[Cu(Fur) ₂ (Phpy) ₂ (H ₂ O)] · Phpy	250	7.0 ± 0.5	$7.0 \pm 0.5^{**}$	[33]
[Cu(Fur) ₂ (NH ₂ -Py) ₂]	1000	7.0 ± 0.5	$7.0 \pm 0.5^{**}$	[33]
[Cu ₂ (Fur) ₄ (MeCN) ₂]	187	7.0	7.0^{**}	[34]
[Cu(Fur) ₂ (Bipy)(H ₂ O)]	100	7.0 ± 0.5	$7.0 \pm 0.5^*$	[30]
[Cu(Fur) ₂ Neoc(H ₂ O)]	25	6.7 ± 0.3	6.6 ± 0.1	[35]
[Cu(Nfur) ₂ (H ₂ O) ₂] · 2H ₂ O	1000	6.7 ± 0.1	$6.4 \pm 0.1^{**}$	[36]
[Cu(Nfur) ₂ (Py) ₂ (H ₂ O)]	800	6.8 ± 0.3	$6.6 \pm 0^{**}$	[36]
[Cu ₂ (Nfur) ₄ (Bipy) ₂] · H ₂ O	20	7.0 ± 0.0	$6.9 \pm 0.1^{**}$	[36]
[Co ₃ (Fur) ₆ (Phen) ₂]	50	7.0 ± 0.5	7.0 ± 0.5	[31]
[Ni(Fur) ₂ (Phen)(H ₂ O) ₂] · H ₂ O	484	6.7 ± 0.3	$6.7 \pm 0.3^{**}$	[32]
[Zn(Fur) ₂ Neoc]	101	7.1 ± 0.3	$6.5 \pm 0.5^{**}$	[35]
2HFur	1000	6.5		
HNfur	>1000			
Nphen	25	6.2 ± 0.2		
1,10-Phen	45	7.5 ± 0.5		
Neoc*	100	6.46 ± 0.06		
Bipy*	500			
INH	100	$7 \pm 0.5^*$	$6.5 \pm 0.5^{**}$	
Rif	5	7.2 ± 0.3	7.0 ± 0.0	

* Неос – 2,9-диметил-1,10-фенантролин (неокупроин) и Вир – 2,2'-бипиридин.
 ** Зона ингибирования роста культуры бактерий, изначально возникшая после нескольких часов роста, начинает зарастать по всей поверхности зоны.

Таблица 5. Результаты математического моделирования MIB2

<i>M. smegmatis</i> (locus tag)	Cu ²⁺					
	ранг	оценка	аминокислоты ион-связывающего сайта	другие аминокислоты*	количество связей	длины связей, Å
MSMEG_5636	2	8.353	512R, 516H	540D	4	~2.3–3.0
MSMEG_0017	1	5.348	39Q, 42E	38H	3	~3.1–3.6
MSMEG_5014	4	4.730	17C, 20C (аннотированы)	16T, 20S	5	~3.2–3.6
MSMEG_6383	1	3.019	89H, 91H	34H, 82E, 102D	5	~2.6–3.7
MSMEG_0230	4	2.162	68H, 72C (аннотированны)		1	~3.3
MSMEG_5836	4	2.491	71H, 75E, 161E		3	~2.2–2.6

* Параметр, определенный при помощи Show Contacts *via* PyMol.

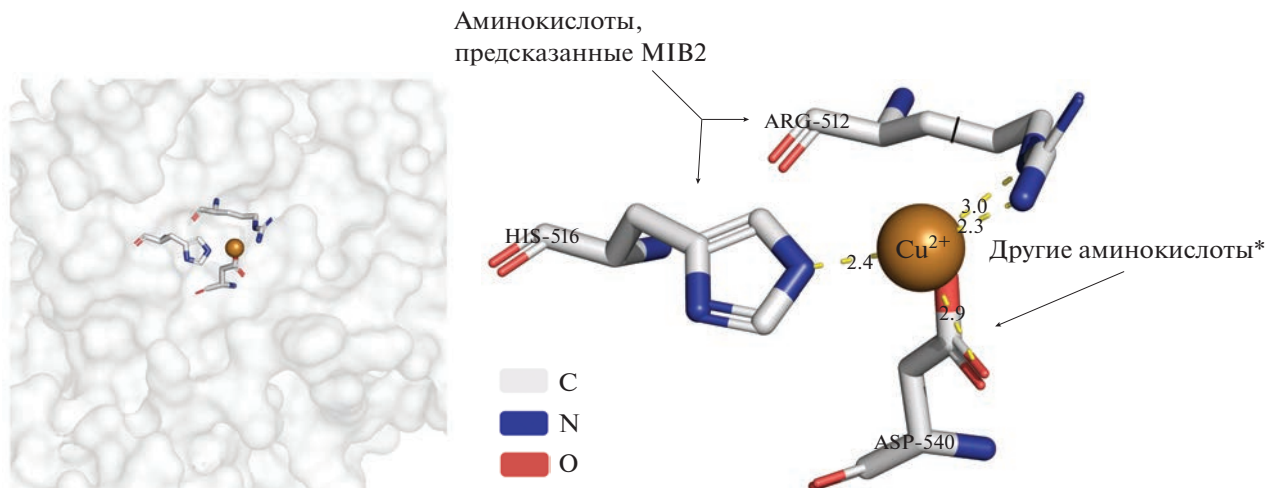


Рис. 6. Комплекс белка MSMEG_5636 с Cu^{2+} : план комплекса с полостью для катиона в структуре белка (а); изолированная структура ион-связывающего сайта и Cu^{2+} с указанием остатков аминокислот и координационных связей (пунктиров, обозначенных желтым цветом) (б); * — аминокислоты, потенциально участвующие в связывании катиона (см. табл. 5).

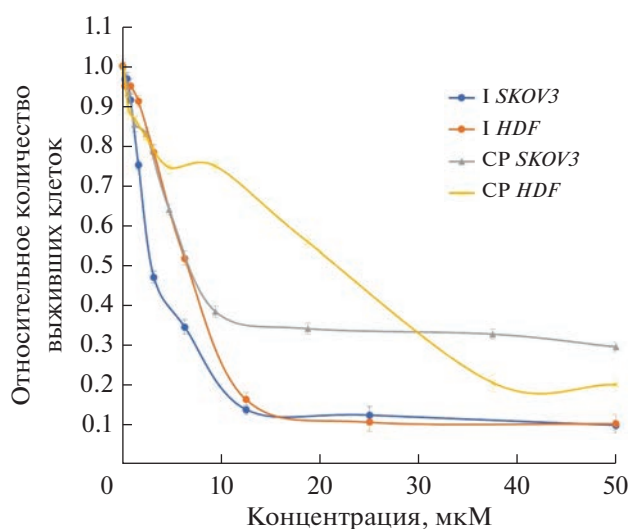


Рис. 7. Выживаемость клеток *SKOV3* и *HDF*, инкубированных с различными концентрациями I или ДМСО в качестве контроля по сравнению с цисплатином. Представлено среднее значение МТТ-индекса $\pm$ стандартное отклонение, рассчитанное по данным 3 измерений.

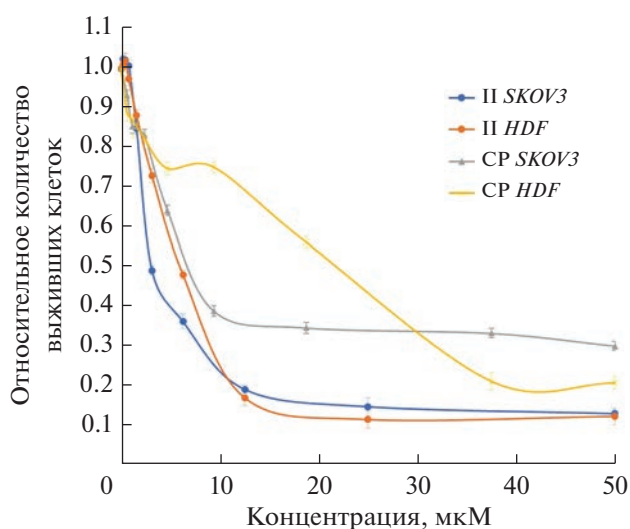


Рис. 8. Выживаемость клеток *SKOV3* и *HDF*, инкубированных с различными концентрациями II или ДМСО в качестве контроля по сравнению с цисплатином. Представлено среднее значение МТТ-индекса $\pm$ стандартное отклонение, рассчитанное по данным 3 измерений.

Таблица 6. Результаты цитотоксической активности *in vitro* комплексов I и II в отношении *SKOV3* и *HDF*

Соединение	IC_{50} <i>SKOV3</i> , мкМ	IC_{50} <i>HDF</i> , мкМ	SI	Литература
I	2.9	6.5	2.3	Настоящая работа
II	3.0	6.0	2.0	Настоящая работа
$[\text{Cu}_2(\text{Fur})_4(\text{MeCN})_2]$	>100	55	<0.55	[34]
$(\text{H}_2\text{Phen})[\text{AuCl}_4]\text{Cl}$	27.0	>150	5.6	[37]
CP	6.5	22.0	3.4	Настоящая работа

БЛАГОДАРНОСТИ

Рентгенодифракционные исследования проведены с использованием научного оборудования Центра исследования строения молекул ИНЭОС РАН при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (госзадание № 075-03-2023-642). Элементный анализ и ИК-спектроскопия выполнены с использованием оборудования ЦКП ФМИ ИОНХ РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-13-00175).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thompson K., Orvig C. // Dalton Trans. 2006. V. 6. P. 761.
2. Allardyce C., Dyson P. // Dalton Trans. 2016. V. 45. P. 3201.
3. Storr T., Thompson K.H., Orvig C. // Chem. Soc. Rev. 2006. V. 35. P. 534.
4. Gregory P. Comprehensive Coordination Chemistry II: From Biology to Nanotechnology, Oxford: Elsevier, 2005. V. 9. 1062 p.
5. Jalal M., Hammouti B., Touzani R. et al. // Mater. Today: Proceedings. 2020. V. 31. P. 122.
6. Hamza A., Al-Sibaai A.A., Alwael H. et al. // Results Chem. 2022. V. 4. P. 100422.
7. Li J., Ren G., Zhang Y. et al. // Polyhedron. 2019. V. 157. P. 163.
8. Barry N., Sadler P. // Chem. Commun. 2013. V. 49. P. 5106.
9. Chan W., Wong W. // Polyhedron. 2014. V. 83. P. 150.
10. Medici S., Peana M., Nurchi V. et al. // Coord. Chem. Rev. 2015. V. 284. P. 329.
11. Che C.-M., Siu F.-M. // Curr. Opin. Chem. Biol. 2010. V. 14. P. 255.
12. Dilruba S., Kalayda G.V. // Cancer Chemother. Pharmacol. 2016. V. 77. P. 1103.
13. Porchia M., Pellei M., Del Bello F. et al. // Molecules. 2020. V. 25. P. 5814.
14. Ali I., Mahmood L.M.A., Mehdarassin T.H. et al. // Inorg. Chem. Commun. 2020. V. 118. P. 108004.
15. Zhang Y., Zhou Y., Zhang H. et al. // J. Inorg. Biochem. 2021. V. 224. P. 111580.
16. Pellei M., Del Bello F., Porchia M. et al. // Coord. Chem. Rev. 2021. V. 445. P. 214088.
17. Paprocka R., Wiese-Szadkowska M., Janciauskiene S. et al. // Coord. Chem. Rev. 2022. V. 452. P. 214307.
18. Viganor L., Howe O., McCarron P. et al. // Curr. Top. Med. Chem. 2017. V. 17. P. 1280.
19. Al-Omair M. A. // Arab. J. Chem. 2019. V. 12. P. 1061.
20. Ye J., Ma J., Liu C. // Biochem. Pharmacol. 2019. V. 166. P. 93.
21. Simunkova M., Lauro P., Jomova K. et al. // J. Inorg. Biochem. 2019. V. 194. P. 97.
22. Gordon A.T., Abosedo O., Nsimango S. et al. // Inorg. Chim. Acta. 2020. V. 510. P. 119744.
23. Eremina J.A., Smirnova K.S., Klyushova L.S. et al. // J. Mol. Struct. 2021. V. 1245. P. 131024.
24. Eremina J.A., Ermakova E.A., Smirnova K.S. et al. // Polyhedron. 2021. V. 206. P. 115352.
25. Eremina J.A., Lider E.V., Kuratieva N.V. et al. // Inorg. Chim. Acta. 2021. V. 516. P. 120169.
26. Eremina J.A., Lider E.V., Sukhikh T.S. et al. // Inorg. Chim. Acta. 2020. V. 510. P. 119778.
27. Bravo-Gómez M., Campero-Peredo C., García-Conde D. et al. // Polyhedron. 2015. V. 102. P. 530.
28. Davila-Manzanilla S., Figueroa-de-Paz Y., Mejia C. et al. // Eur. J. Med. Chem. 2017. V. 129. P. 266.
29. Correia I., Borovic S., Cavaco I. et al. // J. Inorg. Biochem. 2017. V. 175. P. 284.
30. Linder M.C., Hazegh-Azam M. // Am. J. Clin. Nutr. 1996. V. 63. P. 797.
31. Kaim W., Rall J. // Angew. Chem. Int. Ed. 1996. V. 35. P. 43.
32. Crichton R.R., Pierre J.-L. // Biometals. 2001. V. 14. P. 99.
33. Луценко И.А., Баравиков Д.Е., Кискин М.А. и др. // Коорд. химия. 2020. Т. 46. № 6. С. 366 (Lutsenko I.A., Baravikov D.E., Kiskin M.A. et al. // Russ. J. Coord. Chem. 2020. V. 46. № 6. P. 411). <https://doi.org/10.1134/S1070328420060056>
34. Луценко И.А., Ямбулатов Д.С., Кискин М.А. и др. // Коорд. химия. 2020. Т. 46. № 12. С. 715 (Lutsenko I.A., Yambulatov D.S., Kiskin M.A. et al. // Russ. J. Coord. Chem. 2020. V. 46. № 12. P. 787). <https://doi.org/10.1134/S1070328420120040>
35. Lutsenko I.A., Yambulatov D.S., Kiskin M.A. et al. // Chem. Select. 2020. V. 5. P. 11837.
36. Uvarova M.A., Lutsenko I.A., Kiskin M.A. et al. // Polyhedron. 2021. V. 203. P. 115241.
37. Луценко И.А., Кискин М.А., Кошенкова К.А. и др. // Изв. АН. Сер. хим. 2021. Т. 3. С. 463 (Lutsenko I.A., Kiskin M.A., Koshenskova K.A. et al. // Russ. Chem. Bull. 2021. V. 70. № 3. P. 463). <https://doi.org/10.1007/s11172-021-3109-3>
38. Луценко И.А., Никифорова М.Е., Кошенкова К.А. и др. // Коорд. химия. 2022. Т. 48. С. 83 (Lutsenko I.A., Nikiforova M.E., Koshenskova K.A. et al. // Russ. J. Coord. Chem. 2021. V. 47. № 12. P. 879). <https://doi.org/10.31857/S0132344X22020049>
39. Lutsenko I.A., Baravikov D.E., Koshenskova K.A. et al. // RSC Advances. 2022. V. 12. P. 5173.
40. Кошенкова К.А., Луценко И.А., Нелюбина Ю.В. и др. // Журн. неорганич. химии. 2022. Т. 67. С. 1398 (Koshenskova K.A., Lutsenko I.A., Nelyubina Yu.V. et al. // Russ. J. Inorg. Chem. 2022. V. 67. P. 1545). <https://doi.org/10.31857/S0044457X22700106>
41. Луценко И.А., Лосева О.В., Иванов А.В. и др. // Коорд. химия. 2022. Т. 48. С. 739 (Lutsenko I.A., Loseva O.V., Ivanov A.V. et al. Russ. J. Coord. Chem. 2022. V. 48. P. 808). <https://doi.org/10.1134/S1070328422700178>
42. Naletova I., Satriano K., Cursi A. et al. // Oncotarget. 2018. V. 9. P. 36289.
43. Pivetta T., Trudu F., Valletta E. et al. // J. Inorg. Biochem. 2014. V. 141. P. 103.
44. Sheldrick G.M. // Acta Crystallogr. A. 2015. V. 71. P. 3.
45. Dolomanov O.V., Bourhis L.J., Gildea R.J. et al. // J. Appl. Cryst. 2009. V. 42. P. 339.
46. Lu C.H., Chen C.C., Yu C.S. // Bioinformatics. 2022. V. 38. № 18. P. 4428. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac534>
47. Toigo J., Farias G., Salla C.A.M. et al. // Eur. J. Med. Chem. 2021. V. 31. P. 3177.
48. Liu Y.-T., Yin X., Lai X.-Y. et al. // Dyes Pigm. 2020. V. 176. P. 108244.
49. Ramon-García S., Ng C., Anderson H. et al. // Antimikrob. Agen. Chemother. 2011. V. 8. P. 3861.
50. Bekker O.B., Sokolov D.N., Luzina O.A. et al. // Med. Chem. Res. 2015. V. 24. P. 2926.

УДК 547.589.4:612.352.121:615.014.425'212'276'281

ПОИСК ОТЕЧЕСТВЕННЫХ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СУБСТАНЦИЙ В РЯДУ МЕТАЛЛОКОМПЛЕКСОВ НА ОСНОВЕ (ГЕТ)АРИЛАМИДОВ 4-АРИЛ-2-ГИДРОКСИ-4-ОКСО-2-БУТЕНОВЫХ КИСЛОТ

© 2023 г. Н. А. Пулина¹, *, Ф. В. Собин¹, А. И. Краснова¹

¹Пермская государственная фармацевтическая академия, Пермь, Россия

*e-mail: fff-2005@mail.ru

Поступила в редакцию 01.03.2023 г.

После доработки 30.03.2023 г.

Принята к публикации 03.04.2023 г.

Обобщены полученные данные по синтезу и поиску биологически активных соединений в ряду металлокомплексов на основе (гет)ариламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот. Проведен анализ результатов по антимикробной, противовоспалительной, анальгетической, гипогликемической, антигипоксической и иммуностроительной активности синтезированных соединений. Обсуждена связь химического строения с биологической активностью хелатных комплексов и установлены некоторые закономерности. Выделены перспективные соединения для дальнейших исследований и создания новых отечественных фармацевтических субстанций.

Ключевые слова: металлокомплексы (гет)ариламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот, активность

DOI: 10.31857/S0132344X23600182, **EDN:** TGGNTC

Известно, что первые сведения о производных 2,4-диоксобутановых кислот появились в научной литературе конца XIX в. и касались преимущественно синтеза их эфиров [1, 2]. Во второй половине XX–начале XXI в. в России [3–5] и за рубежом [6–10] активно развивается химия и изучение фармакологической активности производных 4-арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот. Так, обнаружены соединения, обладающие *in vitro* антиоксидантным действием по отношению к клеткам печени [6], найдены потенциальные нейропротективные агенты [7], имеются данные о противоопухолевом действии данного ряда соединений [11, 12]. Перспективны исследования по поиску соединений с противомикробной [13–15] и противовирусной активностью [7–9, 16–19]. Найдены вещества, оказывающие выраженное действие на систему гемостаза [20–23].

Согласно современной концепции металлолигандного гомеостаза [24, 25], комплексообразование с активными и малотоксичными лигандами является одним из актуальных направлений современной медицинской химии. Наличие 1,3-дикарбонильного фрагмента в структуре производных 2,4-диоксобутановых кислот обуславливает возможность процесса активного хелатирования эссенциальными металлами. В настоящее время научные разработки, проводимые в данной области учеными Италии [26–29], США [30], Сербии [31–34], позволили обнаружить соединения с выраженным цитотоксическим, антимикробным и

противовирусным действием. В России научные исследования по синтезу комплексных соединений на основе производных 4-арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот осуществляются учеными Перми, Екатеринбурга [35–38], Оренбурга [39–41] и др.

Перспективными лигандами для получения биологически активных хелатов служат (гет)ариламиды 4-арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот (**1**), которые обладают различными видами фармакологического действия [42–48]. Их химическая модификация до металлокомплексов способна существенно изменить выраженность фармакологической активности, а также привести к обнаружению новых видов биологического действия. В качестве металлов-комплексообразователей авторами выбраны: марганец, кобальт, никель, медь и цинк как эссенциальные элементы; ванадий — микроэлемент с потенциальным влиянием на инсулинорезистентность; кадмий и ртуть для усиления антибактериального действия исходных лигандов.

Цель настоящей работы — обобщить и систематизировать опубликованные за последнее десятилетие результаты научных исследований комплексных соединений (гет)ариламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот с целью анализа установленных связей “химическое строение—биологическая активность”, а так-

же поиска потенциальных отечественных фармацевтических субстанций.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез металлокомплексов на основе (гет)ариламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот осуществлен взаимодействием (гет)ариламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот (**1a-aj**) с сульфатом ванадила или дихлоридами марганца, кобальта, никеля, меди, цинка, кадмия и ртути при соотношении лиганд—

металл 2 : 1, в результате чего были получены соответствующие бис{3-арил-1-[(гет)арил]карбоксамидо-1,3-пропандионато}оксованадий (**2a-x**) или марганец (**3a-i**), кобальт (**4a-n**), никель (**5a-m**), медь (**6a-q**), цинк (**7a-k**), кадмий (**8a-k**), ртуть (**9a-d**). Реакция протекает в среде спирта этилового, смеси вода—спирт этиловый (1 : 1) или смеси 1,4-диоксан—спирт этиловый (1 : 0.5), в результате образуются целевые продукты с высокими выходами (схема 1) [48–54].

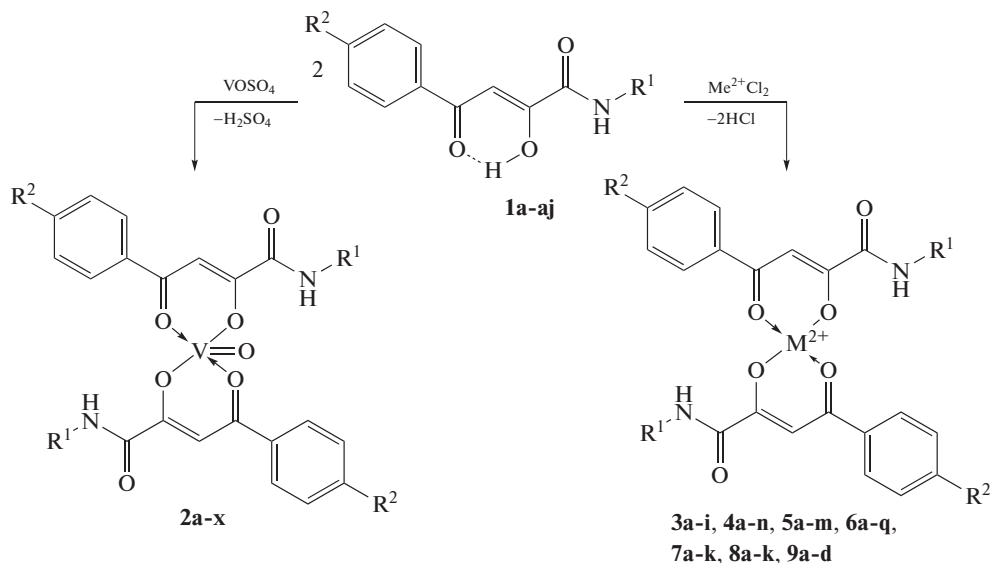


Схема 1.

1: $\text{R}^1 = 4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (a), CH_3 (b), CH_3O (c), Cl (d); $\text{R}^1 = 2\text{-C}_5\text{H}_4\text{N}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (e), CH_3 (f), CH_3O (g), Cl (h); $\text{R}^1 = \text{C}_5\text{H}_3\text{BrN}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (i), Cl (j); $\text{R}^1 = 3\text{-C}_5\text{H}_4\text{N}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (k), CH_3 (l), CH_3O (m), Cl (n); $\text{R}^1 = \text{C}_3\text{H}_2\text{NS}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (o), CH_3 (p), Cl (q); $\text{R}^1 = \text{C}_2\text{H}_4\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (r), CH_3 (s), CH_3O (t), Cl (u); $\text{R}^1 = \text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (v), CH_3 (w), CH_3O (x), Cl (y); $\text{R}^1 = \text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (z), CH_3 (aa), CH_3O (ab), Cl (ac); $\text{R}^1 = \text{C}_7\text{H}_5\text{N}_2$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (ad), Cl (ae); $\text{R}^1 = \text{C}_7\text{H}_4\text{NS}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (af), CH_3O (ag), Cl (ah); $\text{R}^1 = \text{C}_8\text{H}_4\text{ClNO}$, $\text{R}^2 = \text{Cl}$ (ai); $\text{R}^1 = \text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (aj); 2: $\text{R}^1 = 4\text{-CH}_3\text{C}_6\text{H}_4$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (a) [53], CH_3 (b) [53], CH_3O (c) [53], Cl (d) [53]; $\text{R}^1 = 2\text{-C}_5\text{H}_4\text{N}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (e) [52], CH_3 (f) [52], CH_3O (g) [52], Cl (h) [52]; $\text{R}^1 = 3\text{-C}_5\text{H}_4\text{N}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (i) [52], CH_3 (j) [52], CH_3O (k) [52], Cl (l) [52]; $\text{R}^1 = \text{C}_2\text{H}_4\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (m) [52], CH_3 (n) [52], CH_3O (o) [52], Cl (p) [52]; $\text{R}^1 = \text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (q) [52], CH_3 (r) [52], CH_3O (s) [52], Cl (t) [52]; $\text{R}^1 = \text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (u) [52], CH_3 (v) [52], CH_3O (w) [52], Cl (x) [52]; 3: $\text{Me}^{2+} = \text{Mn}^{2+}$, $\text{R}^1 = 2\text{-C}_5\text{H}_4\text{N}$, $\text{R}^2 = \text{Cl}$ (a) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_5\text{H}_3\text{BrN}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (b) [50]; $\text{R}^1 = 3\text{-C}_5\text{H}_4\text{N}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (c) [51]; $\text{R}^1 = \text{C}_3\text{H}_2\text{NS}$, $\text{R}^2 = \text{Cl}$ (d) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_2\text{H}_4\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (e)

[50]; $\text{R}^1 = \text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (f) [51]; $\text{R}^1 = \text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (g) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_7\text{H}_4\text{NS}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (h) [47], CH_3O (i) [47]; 4: $\text{Me}^{2+} = \text{Co}^{2+}$, $\text{R}^1 = 2\text{-C}_5\text{H}_4\text{N}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (a) [50], Cl (b) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_5\text{H}_3\text{BrN}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (c) [50]; $\text{R}^1 = 3\text{-C}_5\text{H}_4\text{N}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (d) [51], Cl (e) [51]; $\text{R}^1 = \text{C}_3\text{H}_2\text{NS}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (f) [50], Cl (g) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_2\text{H}_4\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (h) [50], Cl (i) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (j) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (k) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_7\text{H}_4\text{NS}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (l) [47], CH_3O (m) [47], Cl (n) [47]; 5: $\text{Me}^{2+} = \text{Ni}^{2+}$, $\text{R}^1 = 2\text{-C}_5\text{H}_4\text{N}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (a) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_5\text{H}_3\text{BrN}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (b) [50]; $\text{R}^1 = 3\text{-C}_5\text{H}_4\text{N}$, $\text{R}^2 = \text{Cl}$ (c) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_3\text{H}_2\text{NS}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (d) [50], Cl (e) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_2\text{H}_4\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (f) [50], Cl (g) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (h) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (i) [50]; $\text{R}^1 = \text{C}_7\text{H}_4\text{NS}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (j) [47], CH_3O (k) [47], Cl (l) [47]; $\text{R}^1 = \text{C}_8\text{H}_4\text{ClNO}$, $\text{R}^2 = \text{Cl}$ (m) [50]; 6: $\text{Me}^{2+} = \text{Cu}^{2+}$, $\text{R}^1 = 2\text{-C}_5\text{H}_4\text{N}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (a) [48], Br (b) [48]; $\text{R}^1 = \text{C}_5\text{H}_3\text{BrN}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (c) [48]; $\text{R}^1 = 3\text{-C}_5\text{H}_4\text{N}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (d) [48]; $\text{R}^1 = \text{C}_3\text{H}_2\text{NS}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (e) [48], CH_3 (f) [48], Br (g) [48]; $\text{R}^1 = \text{C}_2\text{H}_4\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{Cl}$ (h) [48]; $\text{R}^1 = \text{C}_3\text{H}_3\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (i) [48], Cl (j) [48]; $\text{R}^1 = \text{C}_4\text{H}_5\text{N}_2\text{S}$, $\text{R}^2 = \text{H}$ (k) [48], CH_3 (l) [48], Cl (m)

[48]; $R^1 = C_7H_4NS$, $R^2 = H$ (n) [47], CH_3O (o) [47], Cl (p) [47]; $R^1 = C_{11}H_{11}N_2O$, $R^2 = H$ (q) [49]; 7: $Me^{2+} = Zn^{2+}$, $R^1 = 2-C_5H_4N$, $R^2 = H$ (a) [49], Cl (b) [48]; $R^1 = C_5H_3BrN$, $R^2 = Cl$ (c) [48]; $R^1 = 3-C_5H_4N$, $R^2 = H$ (d) [48], Cl (e) [48]; $R^1 = C_3H_2NS$, $R^2 = H$ (f) [48], Cl (g) [48]; $R^1 = C_2H_1N_2S$, $R^2 = Cl$ (h) [49]; $R^1 = C_3H_3N_2S$, $R^2 = H$ (i) [49], Cl (j) [49]; $R^1 = C_7H_5N_2$, $R^2 = Cl$ (k) [49]; 8: $Me^{2+} = Cd^{2+}$, $R^1 = 2-C_5H_4N$, $R^2 = H$ (a) [49], Cl (b) [48]; $R^1 = 3-C_5H_4N$, $R^2 = H$ (c) [49], Cl (d) [48]; $R^1 = C_3H_2NS$, $R^2 = H$ (e) [48], Cl (f) [48]; $R^1 = C_3H_2NS$, $R^2 = H$ (g) [49]; $R^1 = C_4H_5N_2S$, $R^2 = H$ (h) [48], CH_3 (i) [48], Cl (j) [48]; $R^1 = C_7H_5N_2$, $R^2 = H$ (k) [49]; 9: $Me^{2+} = Hg^{2+}$, $R^1 = 2-C_5H_4N$, $R^2 = Cl$ (a) [48]; $R^1 = 3-C_5H_4N$, $R^2 = H$ (b) [48], Cl (c) [48]; $R^1 = C_3H_2NS$, $R^2 = H$ (d) [48], где $R^1 = 2-C_5H_4N$ (2-пиридил), C_5H_3BrN [2-(5-бром-пиридил)], $3-C_5H_4N$ (3-пиридил), C_3H_2NS [2-(1,3-тиазолил)], $C_2H_1N_2S$ [2-(1,3,4-тиадиазолил)], $C_3H_3N_2S$ [2-(5-метил-1,3,4-тиадиазолил)], $C_4H_5N_2S$ [2-(5-этил-1,3,4-тиадиазолил)], $C_7H_5N_2$ [2-бензимидазолил], C_7H_4NS [2-бензо[d]тиазолил], C_8H_4ClNO [2-(5-хлоризоксазолил)], $C_{11}H_{11}N_2O$ (1,5-диметил-3-оксо-2-фенил-2,3-дигидро-1Н-4-пиразолил).

Всего синтезировано 139 соединений (2–9), которые представляют собой бесцветные или окрашенные, в зависимости от природы металла, высокоплавкие кристаллические вещества, растворимые в ДМСО, ДМФА и смеси ДМСО–1,4-диоксан (1 : 1), малорастворимые в бензоле, хлороформе, 1,4-диоксане, нерастворимые в воде.

Структура металлокомплексов 2–9 доказана совокупностью данных ИК-, ЯМР 1H -спектроскопии, масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой, атомно-адсорбционного анализа, термogrавиметрии, количественным определением состава комплексов, а также подтверждается квантово-химическими расчетами. Согласно полученным данным, (гет)ариламида 4-арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот координируются металлами как бидентатные O–O-лиганды [48–54].

Для полученных металлокомплексов 2–9 были проведены исследования острой токсичности и фармакологический скрининг с целью поиска биологически активных веществ с противомикробной, противовоспалительной, анальгетической, гипогликемической, антиоксидантной и иммунотропной активностью. Острая токсичность соединений изучена на белых нелинейных мышах обоего пола массой 18–22 г с определением LD_{50} по методу Г.Н. Першина [55]. Противомикробную активность синтезированных соединений по отношению к тест-культурам микроорганизмов *St. aureus* ATCC 6538-R и *E. coli* ATCC 25922 определяли методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде. Для всех исследуемых веществ

определяли минимальные ингибирующие концентрации (МИК) в мкг/мл [55]. Препаратами сравнения служили хлоргексидин и диоксидин. Анальгетическую активность соединений определяли на белых нелинейных мышах (самцах) массой 18–22 г при болевом термическом раздражении лап в тесте “горячей пластины” [56]. Препаратами сравнения служил метамизол натрия (50 мг/кг) и диклофенак (50 мг/кг). Противовоспалительную активность полученных соединений определяли в опытах на белых нелинейных крысах обоего пола массой 220–260 г. Соединения вводили перорально за 1 ч до острого воспаления, вызываемого субплантарным введением 0.1 мл 1%-ного раствора каррагинена в заднюю лапу крысы [55]. Препаратом сравнения служил диклофенак в дозе 50 мг/кг. Гипогликемическую активность соединений изучали на белых нелинейных крысах обоего пола массой 180–200 г. Экспериментальную гипергликемию моделировали подкожным введением аллоксана тригидрата в дозе 170 мг/кг. Концентрацию глюкозы в крови животных определяли глюкозооксидазным методом с использованием набора Глюкоза ФКД (Россия) и фотоэлектроколориметра до введения исследуемых соединений, а также через 30 и 120 мин после него [57]. Антигипоксическую активность изучали на модели нормобарической гипоксии с гиперкапнией на белых нелинейных мышах массой 18–22 г. Регистрировали продолжительность жизни животных, по которой судили об эффективности исследуемого соединения. Препаратом сравнения служил пираретам в дозе 50 мг/кг, вводимый перорально в виде взвеси в 2%-ном крахмальном растворе [57]. О реакции иммунной системы судили по количеству Т-, В-лимфоцитов, фагоцитоза [55]. Изучаемые соединения вводили в дозе 50 мг/кг в виде взвеси в 2%-ном крахмальном растворе за час до проведения экспериментов. Все синтезированные соединения исследованы на фармакологическую активность.

Результаты фармакологических исследований обработаны статистически с применением *t*-критерия Стьюдента и дисперсионного анализа. Различия в данных считали достоверными при уровне $p < 0.05$ для всех значений представленных в обзоре. Статистическая обработка полученных результатов осуществлялась при помощи программы Sigma Stat 3.5, а также статистических программ Windows XP (Excel).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Химическая модификация (гет)ариламидов 1 до металлокомплексов 2–9 приводит к снижению острой токсичности по сравнению с исходными лигандами и неорганическими солями. LD_{50} большинства изученных соединений составляет 1500–4800 мг/кг и в целом данные хелаты могут быть отнесены к 4 и 5 классу опасности по классификации химической продукции [58]. Так, для металлокомплексов

Таблица 1. Противомикробная активность наиболее активных соединений

Соединение	МИК, мкг/мл	Соединение	МИК, мкг/мл
	<i>St. aureus</i> ATCC 6538-P/ <i>E. coli</i> ATCC 25922		<i>St. aureus</i> ATCC 6538-P/ <i>E. coli</i> ATCC 25922
3d	62/62	8d	62/62
3f	125/125	8e	2.0/3.9
4c	7.8/15.6	8f	1.0/1.0
7a	31/3.9	9b	3.9/7.8
7b	31/62	9c	0.25/2.0
8a	2.0/2.0	Хлоргексидин	125/125
8c	15.6/62	Диоксидин	62/62

2d, 3f, 4m и 7a ЛД₅₀ составляет, соответственно, 2800, 4800, 4300, 3500 мг/кг [48, 50, 59, 60]. Отметим, что более безопасны хелаты марганца и кобальта. При переходе к производным, содержащим ванадий и цинк, происходит некоторое увеличение токсического действия. Выявлено, что кадмиевые и ртутные хелаты более токсичны по сравнению с исходными амидами 1, но значительно безопаснее исходных неорганических солей, а также препаратов сравнения [50, 61, 62].

Выявлено, что химическая модификация (гет)ариламидов 1 до комплексных соединений 2–9 приводит к значительному увеличению антибактериальной активности. Наиболее сильный эффект, значительно превышающий активность препаратов сравнения, проявили металлокомплексы кадмия 8a,c,d-f и ртути 9b,c, содержащие в своей структуре фрагменты 2-, 3-пиридила и 2-тиазолила. Хелаты марганца 3 проявили различную активность, в зависимости от строения гетероциклического фрагмента, среди них лидирует соединение 3d, содержащее в структуре 2-тиазолил и оказывающее эффект на уровне диоксидина. Металлокомплекс 3f, имеющий фрагмент 2-(5-метил-1,3,4-тиадиазолила), проявляет действие лишь на уровне хлоргексидина. Цинковые хелаты 7a,b сопоставимы по активности с диоксидином и также содержат 2-пиридилный заместитель. Производные никеля 5 обладают, в основном, слабым антимикробным действием, независимо от строения гетероциклического и ароматического фрагментов [50, 51]. Остальные изученные металлокомплексы (в том числе хелаты кобальта 4) проявляли специфическую активность различной степени выраженности, при этом их показатели не достигали уровня препаратов сравнения. Результаты наиболее активных производных представлены в табл. 1.

В ряду хелатных комплексов 2–9 нами обнаружены вещества, проявляющие выраженное флоголитическое действие (рис. 1). Установлено, что на их противовоспалительное действие влияют в большей степени строение гетероцикла и характер металла-комплексобразователя. В частности, марганцевый

комплекс 3f оказывает фармакологический эффект на пике воспаления практически в 1.8 раза выше препарата сравнения в исследуемой дозе ($p < 0.05$). Кроме того, он в 6.4 раза менее токсичен, чем диклофенак [59]. В ряду кобальтовых, цинковых и кадмиевых производных наиболее активны соединения, содержащие в своей структуре фрагмент пиридила (соединения 4d,e,7c,d,8c). Замена пиридилного фрагмента на 2-тиазольный и 5-R-1,3,4-тиадиазольный не способствует росту противовоспалительного действия [51, 60]. Никелевые металлокомплексы 5 в основном показывают низкое противовоспалительное действие, существенного влияния природы заместителей в гетероциклической и ароматической части молекулы на проявление фармакологического эффекта не установлено. Однако обнаружено производное 5j с фрагментом бензо[d]тиазола, сопоставимое по выраженности эффекта с препаратом сравнения [48]. Остальные исследованные металлокомплексы проявляли специфическую активность меньшей степени выраженности, не достигая показателей препаратов сравнения.

Прошедшие биологический скрининг хелатные комплексы увеличивали время латентного периода оборонительного рефлекса мышей в различной степени (рис. 2). Для медных 6 и ртутных 9 хелатов значимого анальгетического действия выявлено не было. Наименее активны никелевые и кадмиевые комплексы 5a и 8a, а также оксованадиевые хелаты на основе ариламинов 2c,d, уступающие по силе действия препаратам сравнения [54, 63]. Кобальтовый хелат 4d сопоставим по силе действия с препаратами сравнения, а соединение 4f превосходит эффект метамизола натрия через 30 мин после введения [54]. Однако наибольшую активность проявил марганцевый комплекс 3f, который по силе действия превышает метамизол натрия практически в 2 раза ($p < 0.05$). Кроме того, как было показано ранее, он обладает высокой флоголитической активностью, что делает его перспективным для дальнейших исследований [59].

Было установлено, что введение в структуру исходных амидов 1 металлов комплексобразователей

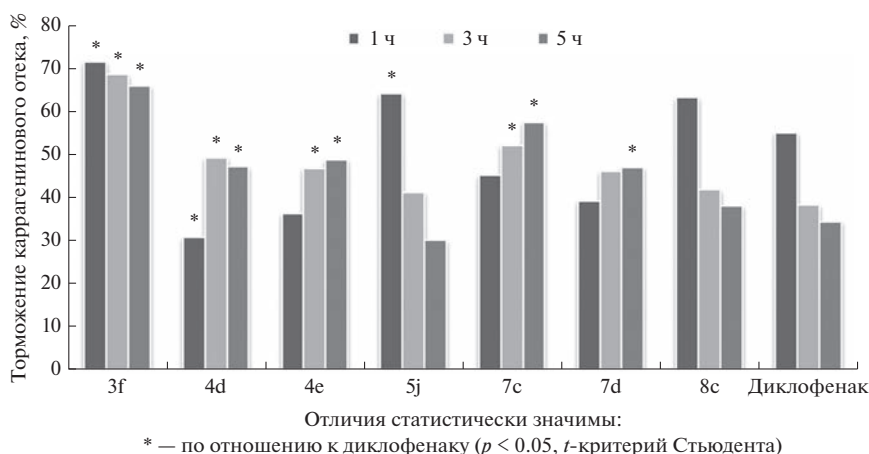


Рис. 1. Сравнительная характеристика противовоспалительной активности наиболее активных соединений и диклофенака.

значительно потенцирует сахароснижающий фармакологический эффект полученных соединений. Наибольший вклад в его проявление вносит оксованадий, марганец, цинк и кадмий, а также химическое строение лиганда. Так, ариламидные производные 2с, d, содержащие в своей структуре ванадил, в 1.1–1.3 раза превосходили по выраженности гипогликемического действия субстанцию метформина на 2-м часе наблюдения и действовали наравне с эталоном на 30 мин опыта, превосходя в 1.4–2.6 раза эффект ванадила сульфата во все сроки наблюдения ($p < 0.05$) [60, 63, 64]. Цинковые и кадмиевые хелаты 7с, d, 8а на основе 2(3)-(5-*R*)-пиридиламидов, а также кадмиевый металлокомплекс 8к на основе 2-бензимидазолиламида проявили выраженные гипогликемические свойства, превосходящие по активности исходные лиганды ($p < 0.05$) [53, 62, 63]. В ряду марганцевых комплексов наибольший вклад вносят фрагменты 1,3,4-тиадиазола и бензо[d]тиадиола. Большинство кобальтовых и никелевых хелатов независимо от природы гетероцикла практически не влияют на уровень сахара в крови животных. Исключение составляет кобальтовый хелат 4т, оказывающий выраженное гипогликемическое действие [48, 52, 63]. Результаты наиболее активных соединений представлены на рис. 3.

При выявлении взаимосвязи “структура–антигипоксическая активность” установлено, что наибольший эффект присущ оксованадиевым комплексам 2с, d, эффект которых уступает по силе действия пирасетаму, однако значительно превышает активность ванадила сульфата. На выраженность антигипоксического действия не оказывает значимого влияния характер заместителя при C^1 , при этом увеличение активности среди металлокомплексов на основе 4-метилфениламида кислоты наблюдается при наличии в арильном фрагменте электроно-акцепторного заместителя. Изученные цинковые хелаты 7с, d уступают по выраженности эффекта препарату-эталону, а также комплексам ванадия. У кадмиевого хелата 8к пол-

ностью отсутствует влияние на продолжительность жизни животных в условиях нормобарической гиперкапнии [63, 65]. Остальные изученные хелаты проявляли специфическую активность меньшей степени выраженности и не достигали показателей препаратов сравнения.

Для наиболее активного с гипогликемической точки зрения оксованадиевого хелата 2d были также проведены исследования иммуотропной активности на фоне аллоксаниндуцированного диабета. Было установлено, что введение металлокомплекса устраняло иммуносупрессию клеточного звена иммунитета, уменьшало выраженность аутоиммунных процессов, восстанавливало количество лейкоцитов у крыс с экспериментальным сахарным диабетом до уровня интактных животных, стабилизировало общее количество лимфоцитов. Кроме того, происходило восстановление количества моноцитов и уменьшение числа плазматических клеток. Следует отметить, что увеличение числа моноцитов до контрольного уровня свидетельствовало не только об устранении иммуносупрессии, но и восстановлении кооперации клеточного и гуморального звеньев иммунитета [63, 66].

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют о перспективности поиска новых фармацевтических субстанций в ряду комплексных соединений на основе (гет)ариламидов 4-арил-2-гидрокси-4-оксобут-2-еновых кислот. Следует выделить два наиболее активных соединения: *bis*{3-фенил-1-[2-(5-метил-1,3,4-тиадиазолил)]карбоксамидо-1,3-пропандионато}марганец (3f), оказывающий противовоспалительное, анальгетическое и антимикробное действие; *bis*[3-(4-хлорфенил)-1-(4-метилфенил)карбоксамидо-1,3-пропандионато]оксованадий (2d), обладающий гипогликемической активностью с дополнительными иммуотропным и антигипоксическим эффектами. Для веществ-лидеров разработана стратегия дальнейшего фармакологического изучения, проводится

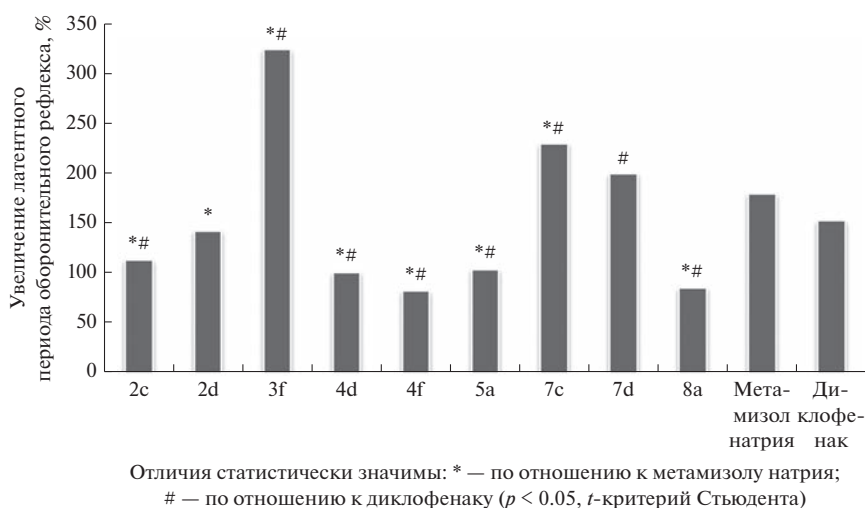


Рис. 2. Сравнительная характеристика анальгетической активности наиболее активных соединений, метамизола натрия и диклофенака.

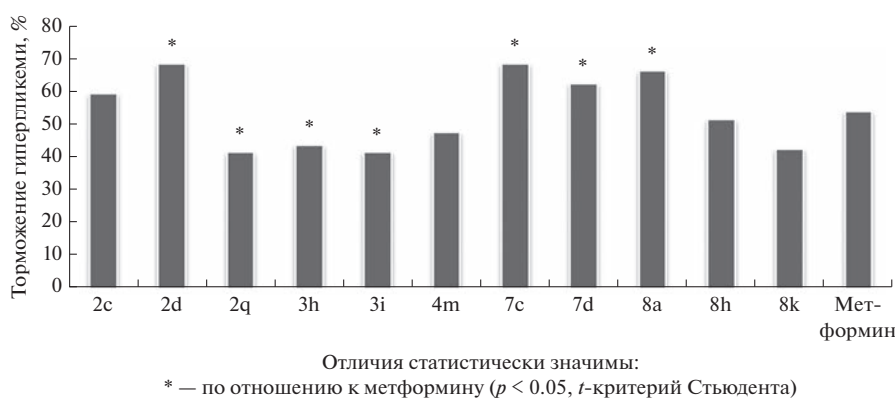


Рис. 3. Сравнительная характеристика гипогликемической активности наиболее активных соединений и метформина через 120 мин после введения.

подбор методов идентификации и очистки, а также формируется пул технологических параметров для их субстанций с целью создания возможных лекарственных форм. В частности, для производного 3f более рациональна разработка мягких лекарственных форм (мази, суппозитории), а для хелата 2d — твердых пероральных лекарственных форм (таблетки, капсулы). Выявленные закономерности могут быть использованы в целенаправленном синтезе новых металлокомплексных производных на основе 4-(гет)арил-2-гидрокси-4-оксо-2-бутеновых кислот.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках госзадания ПГФА (тема № 1022042500005-7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beyer C., Claisen L. // Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1887. № 2. P. 2178.
2. Brömme E., Claisen L. // Ber. Deutsch. Chem. Ges. 1888. № 1. P. 1131.
3. Андрейчиков Ю.С., Гейн В.Л., Залесов В.В. и др. Химия пятичленных 2,3-диоксогетероциклов. Пермь: Изд-во Перм. гос. ун-та, 1994. 211 с.
4. Перевалов С.Г., Бургарт Я.В., Салоутин В.И. и др. // Успехи химии. 2001. Т. 70. № 11. С. 1039 (Perevalov S.G., Burgart Ya.V., Saloutin V.I. et al. // Russ. Chical Rev. 2001. V. 70. № 11. P. 921).
5. Козьминых В.О., Козьминых Е.Н. // Хим.-фарм. журн. 2004. Т. 38. № 2. С. 10 (Kozminykh V.O., Kozminykh E.N. // Pharm. Chem. J. 2004. V. 38. P. 67).
6. Williams H.W.R., Eichler E., Randall W.C. et al. // J. Med. Chem. 1983. № 26. P. 1196.
7. Drysdale M.J., Hind S.L., Jansen M. et al. // J. Med. Chem. 2000. № 43. P. 123.
8. Pais G.C.G., Zhang X., Marchand C. et al. // J. Med. Chem. 2002. № 45. P. 3184.
9. Maurin C., Bailly F., Cotelle P. // Tetrahedron. 2004. № 60. P. 6479.
10. Maurin C., Bailly F., Mbemba G. et al. // Bioorg. Med. Chem. 2006. № 14. P. 2978.
11. Juranić I.O., Tošić A.V., Kolundžija B. et al. // Mol. Divers. 2014. V. 18. № 3. P. 577.

12. Mihajlovic K., Joksimović N., Radisavljević S. et al. // J. Mol. Struct. 2022. № 1270. P. 133943.
13. Drakulić B.J., Stavri M., Gibbons S. et al. // ChemMedChem. 2009. V. 4. № 12. P. 1971.
14. Cvijetic I.N., Verbić T.Z., Resende P.E. et al. // Eur. J. Med. Chem. 2017. № 143. P. 1474.
15. Пулина Н.А., Липатников К.В., Дубровина С.С. и др. Пат. РФ 2717243 С2 // Б.И. 2020. № 8. 8 с.
16. Stevaert A., Dallochio R., Dessì A. et al. // J. Virol. 2013. V. 87. № 19. P. 10524.
17. Пулина Н.А., Юшкова Т.А., Кузнецов А.С. и др. Пат. РФ 2655609 С2 // Б.И. 2018. № 16. 8 с.
18. Sanna V., Youssef M.F., Pala N. et al. // ASC Med. Chem. Lett. 2020. № 11. P. 857.
19. Fernández-García Y., Ter Horst S., Bassetto M. et al. // Antiviral Res. 2020. № 183. P. 104947.
20. Пулина Н.А., Сыропятов Б.Я., Собин Ф.В. и др. Пат. РФ 2461550 С2 // Б.И. 2012. № 26. 6 с.
21. Пулина Н.А., Кузнецов А.С., Старкова А.В. и др. Пат. РФ 2663624 С1 // Б.И. 2018. № 22. 7 с.
22. Пулина Н.А., Кожухарь В.Ю., Старкова А.В. и др. Пат. РФ 2679450 С2 // Б.И. 2019. № 5. 8 с.
23. Пулина Н.А., Кожухарь В.Ю., Кузнецов А.С. и др. // Изв. АН. Сер. хим. 2017. № 8. С. 1497 (Pulina N.A., Kozhukhar V.Y., Kuznetsov A.S. et al. // Russ. Chem. Bull. 2017. № 8. P. 1497).
24. Клименко Л.Л., Скальный А.В., Турна А.А. и др. // Микроэлементы в медицине. 2016. Т. 17. № 4. С. 3.
25. Barnhamabc K.J., Bush A.I. // Chem. Soc. Rev. 2014. № 43. P. 6727.
26. Sechi M., Bacchi A., Carcelli M. et al. // J. Med. Chem. 2006. № 49. P. 4248.
27. Bacchi A., Biemmi M., Carcelli M. et al. // J. Med. Chem. 2008. № 51. P. 7253.
28. Bacchi A., Carcelli M., Compari C. et al. // J. Med. Chem. 2011. № 54. P. 8407.
29. Carcelli M., Rogolino D., Sechi M. et al. // Eur. J. Med. Chem. 2014. № 83. P. 594.
30. Landry B.R., Turnbull M.M., Twamley B. // J. Chem. Crystallogr. 2007. № 37. P. 81.
31. Drakulić B.J., Stavri M., Gibbons S. et al. // ChemMedChem. 2009. № 4. P. 1971.
32. Joksimović N., Baskić D., Popović S. et al. // Dalton Trans. 2016. № 45. P. 15067.
33. Joksimović N., Janković N., Petronijević E. et al. // J. Med. Chem. 2020. № 16. P. 78.
34. Joksimović N., Petronijević E., Radisavljević S. et al. // RSC Adv. 2022. № 16. P. 30501.
35. Saloutin V.I., Perevalov S.G. // J. Fluor. Chem. 1999. № 96. P. 87.
36. Shchur I.V., Shchegolkov E.V., Burgart Ya.S. et al. // Polyhedron. 2020. № 177. P. 114279.
37. Shchegolkov E.V., Shchur I.V., Burgart Ya.S. et al. // Polyhedron. 2021. № 194. P. 114900.
38. Saloutin V.I., Burgart Ya.S., Edilova Yu.O. et al. // Russ. Chem. Bull. 2021. V. 70. № 5. P. 839.
39. Козьминых В.О., Муковоз П.П., Кириллова Е.А. и др. // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. 2009. № 1. С. 128.
40. Козьминых В.О., Кириллова Е.А., Виноградов А.Н. и др. // Вестн. Оренбург. гос. ун-та. 2009. № 4. С. 135.
41. Кунавина Е.А., Козьминых В.О., Сизенцов А.Н. и др. // Журн. общ. химии. 2019. Т. 89. № 1. С. 78.
42. Андрейчиков Ю.С., Милутин А.В., Крылова И.В. и др. // Хим.-фарм. журн. 1990. Т. 24. № 7. С. 33 (Andreychikov Yu.S., Milutin A.V., Krylova I.V. et al. // Pharm. Chem. J. 1990. V. 24. P. 473).
43. Милутин А.В., Амирова Л.Р., Назаметдинов Ф.Я. и др. // Хим.-фарм. журн. 1996. Т. 30. № 6. С. 47 (Andreychikov Yu.S., Milutin A.V., Krylova I.V. et al. // Pharm. Chem. J. 1996. V. 30. P. 332).
44. Козьминых В.О., Милутин А.В., Махмудов Р.Р. и др. // Хим.-фарм. журн. 2004. Т. 38. № 12. С. 21 (Kozminykh V.O., Milutin A.V., Makhmudov R.R. et al. // Pharm. Chem. J. 2004. V. 38. P. 665).
45. Пулина Н.А., Залесов В.В., Юшков В.В. и др. // Вопр. биол. мед. фарм. химии. 2008. № 2. С. 37.
46. Пулина Н.А., Юшкова Т.А., Краснова А.И. и др. // Фармация. 2009. № 7. С. 36.
47. Пулина Н.А., Краснова А.И., Собин Ф.В. и др. // Бюл. сиб. мед. 2011. № 5. С. 86.
48. Пулина Н.А., Собин Ф.В., Юшкова Т.А. и др. // Хим.-фарм. журн. 2014. Т. 48. № 8. С. 20 (Pulina N.A., Sobin F.V., Yushkova T.A. et al. // Pharm. Chem. J. 2014. № 8. P. 505).
49. Пулина Н.А., Залесов В.В., Мокин П.А. // Баш. хим. журн. 2007. № 3. С. 52.
50. Пулина Н.А., Мокин П.А., Юшков В.В. и др. // Хим.-фарм. журн. 2008. Т. 42. № 7. С. 14 (Pulina N.A., Mokin P.A., Yushkov V.V. et al. // Pharm. Chem. J. 2008. № 7. P. 389).
51. Пулина Н.А., Собин Ф.В., Одегова Т.Ф. и др. // Вопр. биол. мед. фарм. химии. 2010. № 10. С. 40.
52. Пулина Н.А., Собин Ф.В., Краснова А.И. и др. // Хим.-фарм. журн. 2011. Т. 45. № 5. С. 18 (Pulina N.A., Sobin F.V., Krasnova A.I. et al. // Pharm. Chem. J. 2011. № 5. P. 275).
53. Пулина Н.А., Краснова А.И., Юшкова Т.А. и др. // Вопр. биол. мед. фарм. химии. 2013. № 4. С. 26.
54. Пулина Н.А., Собин Ф.В., Коньшина Т.М. // Медицина и образование в Сибири. 2011. № 5. С. 19.
55. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под ред. Хабриева Р.У. М.: Медицина, 2005. 828 с.
56. Гацура В.В. Методы первичных фармакологических исследований биологически активных веществ. М.: Медицина, 1974. 39 с.
57. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
58. Юрасова А.А., Макарова А.С., Скобелев Д.О. // Токсикол. вест. 2011. № 1. С. 2.
59. Пулина Н.А., Юшков В.В., Собин Ф.В. и др. Пат. РФ 2396263 С2 // Б.И. 2010. № 22. 7 с.
60. Пулина Н.А., Юшкова Т.А., Краснова А.И. и др. Пат. РФ 2432355 С2 // Б.И. 2011. № 30. 7 с.
61. Пулина Н.А., Юшков В.В., Мокин П.А. и др. Пат. РФ 2342364 С1 // Б.И. 2008. № 36. 5 с.
62. Пулина Н.А., Юшков В.В., Юшкова Т.А. и др. Пат. РФ 2364591 С1 // Б.И. 2009. № 23. 6 с.
63. Краснова А.И. Дисс. канд. фарм. наук. Пермь: Перм. гос. фарм. акад., 2011.
64. Пулина Н.А., Юшкова Т.А., Краснова А.И. и др. // Вест. РУДН. Сер. Медицина. 2010. № 4. С. 423.
65. Пулина Н.А., Юшкова Т.А., Краснова А.И. // Хим.-фарм. журн. 2015. Т. 49. № 7. С. 29 (Pulina N.A., Yushkova T.A., Krasnova A.I. // Pharm. Chem. J. 2015. № 7. P. 459).
66. Юшкова Т.А., Краснова А.И., Пулина Н.А. // Росс. иммунол. журн. 2014. № 3. С. 58.

УДК 546.562+546.47+54.02+546.43+547.7+547.8

КОМПЛЕКСЫ Cu(II) И Zn(II) С АНИОНАМИ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ КИСЛОТ И 3,5-ДИМЕТИЛПИРАЗОЛОМ: СИНТЕЗ, СТРУКТУРА И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

© 2023 г. М. А. Уварова^{1, *}, М. В. Новикова^{1, 2}, В. А. Елисеенкова³, Д. Е. Баравиков^{1, 4},
Ф. М. Долгушин¹, О. Б. Беккер⁵, Е. В. Фатюшина¹, М. А. Кискин¹,
И. Л. Еременко¹, И. А. Луценко¹

¹Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Москва, Россия

²Московский физико-технологический институт, Москва, Россия

³Школа № 1553 им. В.И. Вернадского, Москва, Россия

⁴Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия

⁵Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва, Россия

*e-mail: yak_marin@mail.ru

Поступила в редакцию 01.03.2023 г.

После доработки 10.03.2023 г.

Принята к публикации 13.03.2023 г.

Взаимодействием ацетатов меди(II) и цинка (II) с 3-фуранкарбоновой (HFur) и 2-тиофенкарбоновой (HTph) кислотами с последующим добавлением 3,5-диметилпиразола (HDmpz) получены мономерные комплексы состава $[M(L)_2(HDmpz)_2]$ ($M = Cu(II), L = Fur^- (I), Tph^- (II); Zn(II), L = Fur^- (III)$). Строение полученных соединений I–III расшифрованы методом рентгеноструктурного анализа. По данным РСА, I и II являются изоструктурными – комплексообразователь Cu(II) находится в плоско-квадратном окружении двух атомов кислорода карбоксилат-анионов и атомов азота HDmpz; в III атом Zn находится в тетраэдрическом окружении двух фууроат-анионов и молекул HDmpz, формируя металлофрагменты состава $\{MO_2N_2\}$. Дополнительная стабилизация комплексов в кристалле осуществляется с помощью меж- (I и II) и внутримолекулярных (III) водородных связей. Биологическая активность I–III определена в отношении непатогенного штамма *Mycobacterium smegmatis*.

Ключевые слова: комплексы меди(II) и цинка(II), 3,5-диметилпиразол, 3-фуранкарбоновая кислота, 2-тиофенкарбоновая кислота, кристаллическая структура, биологическая активность

DOI: 10.31857/S0132344X23600200, **EDN:** OCUNPJ

Создание новых антибактериальных препаратов является одной из фундаментальных проблем медицины. Одним из возможных путей ее решения является разработка и изучение противомикробной активности новых координационных соединений на основе биогенных металлов. В современных исследованиях все больше появляется работ, подтверждающих, что комплексообразование способно значительно повышать активность уже известных органических препаратов [1–3]. Одним из недостатков металлокомплексных соединений, выступающих в качестве потенциальных лекарственных препаратов, может быть их возможная цитотоксичность, поэтому целесообразно в качестве комплексообразователя использовать ионы эссенциальных (биологически важных) металлов, например, меди и цинка. Важную роль в поиске биологически активных координационных соединений играет выбор органического лиганда. В

частности, пятичленные гетероциклы, такие как тιοфен, фуран, пиразол входят в состав многих противомикробных препаратов [4–6], а комплексы на их основе обладают биологической активностью [7–11].

Проводимые нашей группой исследования *in vitro* биоактивности фуранкарбоксилатных комплексов *d*-металлов [12–19] с различными N-донорными лигандами в отношении непатогенного микобактериального штамма *Mycobacterium smegmatis* позволили установить ряд закономерностей, в частности определены катионы, к которым наиболее чувствительна микобактерия, а также со-лиганды моно- и олигопиридины, способные усиливать/подавлять биологическую эффективность. Представлялось интересным исследовать биологическую активность соединений с принципиально иным типом со-лиганда – 3,5-диметилпиразолом (HDmpz), производные кото-

рого проявляют противомикробные, противовирусные и антиканцерогенные свойства [20–24]. Со структурной точки зрения, пиразол и его производные обладают широкими координационными возможностями, так как содержат два различных по химической природе атома азота — пиридиновый и пиррольный, обуславливающие различные типы связывания — за счет неподеленной электронной пары пиридинового атома азота реализуется монодентатная координация, а формирование пиразолат-аниона (за счет депротонирования пиррольного фрагмента) чаще всего приводит к мостиковому связыванию. Введение донорных CH_3 -групп в молекулу пиразола приводит к увеличению основности атомов азота (за счет “+” индуктивного эффекта заместителей), поэтому HDmpz, как правило, координируется к комплексообразователю монодентатно [25–30].

В настоящей работе представлены синтез и строение комплексов меди(II) и цинка с анионами $\text{Fur}^-/\text{Tph}^-$ и HDmpz, а также результаты исследования биологических свойств полученных соединений в отношении микобактериального штамма *Mycolicibacterium smegmatis* (является модельным для *Mycobacterium tuberculosis*).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Синтез комплексов проводили на воздухе с использованием растворителей без дополнительной очистки: ацетонитрил (ос. ч., Химмед). Для синтеза использовали коммерчески доступные реактивы: 3-фуранкарбоновая кислота (98%, Acros), 2-тиофенкарбоновая кислота (98%, Acros), ацетат цинка дигидрат (98%, Acros), ацетат меди(II) гидрат (98%, Acros). Элементный анализ выполняли на автоматическом C,H,N-анализаторе Carlo Erba EA 1108. ИК-спектры соединения регистрировали на ИК-спектрофотометре с Фурье преобразованием Perkin-Elmer Spectrum 65 методом нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО) в интервале частот 400–4000 см^{-1} .

Биологическую активность I–III определяли в тест-системе *M. smegmatis* mc^2 155 методом бумажных дисков. Фиксировалась величина зоны подавления роста штамма, засеянного газонном на агаризованной среде, вокруг бумажных дисков, содержащих вещество в различных концентрациях. Бактерии, смывые с чашек Петри со средой Триптон-соевый агар М-290 (Himedia), выращивали в течение ночи в жидкой среде Lemco-TW (Lab Lemco' Powder 5 г л^{-1} (Oxoid), Peptone special 5 г л^{-1} (Oxoid), NaCl 5 г л^{-1} , Tween-80) при 37°C до среднелогарифмической фазы роста при оптической плотности $\text{OD}_{600} = 1.5$ смешивали с расплавленной агаризованной средой М-290 в соотношении 1 : 9 : 10 (культура : Lemco-TW : М-290). Культуру инкубировали в течение 24 ч при 37°C.

Минимальной ингибирующей концентрацией (МИК) считали концентрацию вещества, при которой зона подавления роста минимальна.

РСА I–III проведен на дифрактометре Bruker ApexII (MoK_α , $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$, графитовый монохроматор, CCD-детектор) при температуре 100 К. Введена полуэмпирическая поправка на поглощение по программе SADABS [31]. Структуры расшифрованы с использованием программы ShelXT [32] и уточнены в полноматричном МНК с помощью программы ShelXL [33] в анизотропном приближении для неводородных атомов. Атомы водорода групп NH локализованы из разностных Фурье-синтезов и включены в уточнение в изотропном приближении без наложения ограничений; положения остальных атомов водорода рассчитаны геометрически, и все они уточнены в изотропном приближении по модели “наездника” с $U_{\text{изо}}(\text{H}) = 1.5U_{\text{экр}}(\text{C})$ для метильных групп и $U_{\text{изо}}(\text{H}) = 1.2U_{\text{экр}}(\text{C})$ для остальных атомов водорода. В структуре III один из фурановых циклов разупорядочен по двум позициям с заселенностями 0.63(1)/0.37(1). Основные кристаллографические данные и параметры уточнения соединений I–III приведены в табл. 1.

Полный набор рентгеноструктурных параметров депонирован в Кембриджском банке структурных данных (CCDC № 2243672 (I), 2243673 (II), 2243674 (III); deposit@ccdc.cam.uk).

Синтез $[\text{Cu}(\text{Fur})_2(\text{HDmpz})_2]$ (I). Навески $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.2 г, 1 ммоль) и HFur (0.33 г, 3 ммоль) растворяли в 10 мл ацетонитрила и кипятили в течение часа. Далее к раствору добавляли HDmpz (0.2 г, 2 ммоль) и перемешивали 30 мин. Полученный темно-синий раствор выдерживали 2 сут при комнатной температуре. Образовавшиеся синие кристаллы отделяли от маточного раствора декантацией. Выход 0.3 г (70%).

Найдено, %: C 50.31; H 4.67; N 11.74.

Для $\text{C}_{20}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_6\text{Cu}$ (I)

вычислено, %: C 50.26; H 4.64; N 11.72.

ИК (НПВО; ν , см^{-1}): 3670 с, 3182 с, 3095 с, 2981 с, 2933 с, 2869 с, 2779 с, 1705 с, 1541 с, 1501 с, 1411 с, 1364 с, 1306 с, 1256 с, 1206 с, 1151 с, 1062 с, 1013 с, 970 с, 831 с, 781 с, 736 с, 600 с, 547 с, 463 с, 431 с.

Синтез комплекса $[\text{Cu}(\text{Tph})_2(\text{HDmpz})_2]$ (II). Навески $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.2 г, 1 ммоль) и HTph (0.39 г, 3 ммоль) растворяли в 10 мл ацетонитрила и кипятили в течение часа. К полученному раствору добавляли HDmpz (0.20 г, 2 ммоль) и перемешивали 30 мин. Полученный темно-синий раствор отфильтровывали и выдерживали 2 сут. Образовавшиеся при этом фиолетовые кристаллы отде-

Таблица 1. Основные кристаллографические данные и параметры эксперимента I–III

Параметр	Значение		
	I	II	III
Брутто-формула	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ Cu	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₄ S ₂ Cu	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ Zn
<i>M</i>	477.95	510.07	479.78
<i>T</i> , К	100(2)	100(2)	100(2)
Сингония	Моноклинная	Моноклинная	Триклинная
Пр. группа	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> 2 ₁ / <i>n</i>	<i>P</i> $\bar{1}$
<i>a</i> , Å	5.7312(2)	5.9903(4)	8.3507(3)
<i>b</i> , Å	17.2051(7)	17.4745(11)	11.6130(4)
<i>c</i> , Å	10.4723(4)	10.5606(6)	12.1465(4)
α , град	90	90	96.1076(12)
β , град	104.4374(16)	103.5911(19)	101.9847(12)
γ , град	90	90	107.8456(10)
<i>V</i> , Å ³	1000.02(7)	1074.50(12)	1078.37(6)
<i>Z</i>	2	2	2
ρ (выч.), г см ^{−3}	1.587	1.577	1.478
μ , см ^{−1}	11.39	12.46	11.83
2 $\theta_{\max}$, град	60.0	60.0	60.0
<i>T</i> _{max} / <i>T</i> _{min}	0.895/0.812	0.907/0.685	0.871/0.789
Число измеренных рефлексов	17 296	12 273	17 613
Число независимых рефлексов	2912	3132	6274
Число наблюдаемых рефлексов с <i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>)	2429	2689	5617
Число уточняемых параметров	148	148	329
GOOF	1.089	1.085	1.045
<i>R</i> ₁ (по <i>F</i> для рефлексов с <i>I</i> > 2 σ (<i>I</i>))	0.0443	0.0385	0.0294
<i>wR</i> ₂ (по <i>F</i> ² для всех рефлексов)	0.1212	0.1028	0.0800
Остаточная электронная плотность (max/min), е Å ^{−3}	1.850/−0.500	1.070/−0.660	0.460/−0.860

ляли от маточного раствора декантацией. Выход 0.36 г (72%).

Найдено, %: С 47.15; Н 4.42; N 10.01.

Для C₂₀H₂₂N₄O₄S₂Cu (II)

вычислено, %: С 47.10; Н 4.35; N 10.10.

ИК (НПВО; ν , см^{−1}): 3092 с, 2933 с, 2859 с, 1542 сл, 1501 сл, 1411 сл, 1363 сл, 1305 ср, 1204 ср, 1150 ср,

1060 ср, 1011 ср, 830 сл, 780 сл, 736 сл, 599 ср, 546 ср, 462 сл, 431 ср.

Синтез комплекса [Zn(Fur)₂(HDmpz)₂] (III). Навески Zn(OAc)₂ · 2H₂O (0.22 г, 1 ммоль) и HFur (0.33 г, 3 ммоль) растворяли в 10 мл ацетонитрила и кипятили в течение часа. К полученному раствору добавляли HDmpz (0.20 г, 2 ммоль) и перемешивали 30 мин. Полученный прозрачный раствор оставляли на 5 сут при комнатной температуре.

Таблица 2. Параметры водородных связей в структурах I–III

D—H...A	Расстояние, Å			Угол DHA, град	Координаты атома <i>A</i>
	D—H	H...A	D...A		
I					
N(2)—H(2)...O(2)	0.85(3)	1.93(3)	2.752(3)	163(3)	$-x + 2, -y, -z + 1$
C(8)—H(8 <i>A</i>)...O(1)	0.95	2.38	3.281(3)	158	$x + 1, y, z$
C(10)—H(10 <i>A</i>)...O(3)	0.95	2.66	3.582(3)	164	$x - 1, y, z$
II					
N(2)—H(2)...O(2)	0.85(3)	1.94(3)	2.770(3)	167(3)	$-x, -y, -z$
C(8)—H(8 <i>A</i>)...O(1)	0.95	2.62	3.527(3)	161	$x - 1, y, z$
C(9)—H(9 <i>A</i>)...S(1)	0.95	2.88	3.556(3)	129	$x - 1, y, z$
III					
N(2)—H(2)...O(2)	0.85(2)	1.88(2)	2.695(2)	162(2)	
N(4)—H(4)...O(5)	0.81(2)	1.94(2)	2.722(2)	162(2)	
C(19)—H(19 <i>A</i>)...O(2)	0.95	2.21	3.156(2)	171	$x - 1, y - 1, z$

Образовавшиеся прозрачные кристаллы отделяли от маточного раствора декантацией. Выход 0.33 г (73%).

Найдено, %: C 50.20, H 4.88, N 11.74.

Для C₂₀H₂₂N₄O₆Zn (III)

вычислено, %: C 50.07, H 4.62, N 11.68.

ИК (НПВО; ν , см^{–1}): 3200 ср, 3131 ср, 3106 ср, 3036 ср, 2971 сл, 2932 ср, 2787 ср, 2608 с, 1594 ср, 1553 ср, 1481 ср, 1415 сл, 1365 ср, 1301 сл, 1199 с, 1151 ср, 1021 сл, 1010 сл, 840 сл, 777 сл, 737 ср, 604 с, 477 с, 425 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействием водных ацетатов меди(II) и цинка с HFur/HTph в соотношении 1 : 2 в ацетонитриле образуются гомогенные растворы, добавление к которым HDmpz (2 моль) приводит к получению мооядерных комплексов – синего [Cu(Fur)₂(HDmpz)₂] (I), фиолетового [Cu(Tph)₂(HDmpz)₂] (II) и бесцветного [Zn(Fur)₂(HDmpz)₂] (III) (схема 1). Для получения полноценных результатов биоактивности комплексов I–III был синтезирован ранее описанный комплекс [Zn(Tph)₂(HDmpz)₂] (IV) [30].

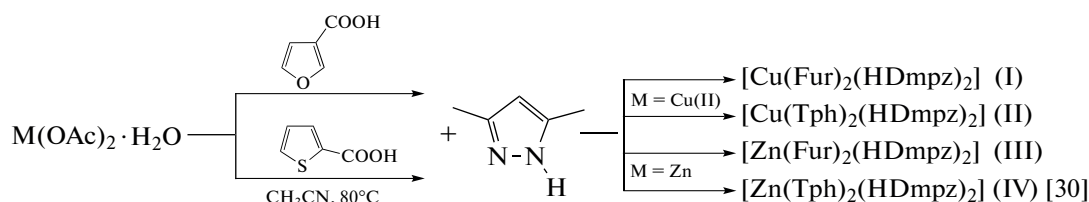


Схема 1.

Комплексы *транс*-[Cu(Fur)₂(HDmpz)₂] (I) и *транс*-[Cu(Tph)₂(HDmpz)₂] (II) кристаллизуются в пространственной группе *P*₂₁/*n* с почти совпадающими параметрами элементарных ячеек (табл. 1). В кристаллах ион меди(II) находится в частной позиции на центре инверсии и имеет плоскоквадратное окружение (рис. 1) из двух атомов кислорода остатков фуранкарбоновой в I (Cu(1)–O(1) 2.014(2) Å) или тиофенкарбоновой в II (Cu(1)–O(1) 1.995(1) Å) кислот, а также двух атомов азота монодентатно координированных N-донорных лигандов HDmpz (Cu(1)–N(1) 1.959(2) Å в I и

1.965(2) Å в II). Второй атом кислорода карбоксилатной группы O(2) находится заметно дальше от Cu²⁺ (расстояния Cu(1)–O(2) 2.578(2) Å в I и 2.622(2) Å в II). Протонированные атомы азота HDmpz образуют межмолекулярные водородные связи с карбоксилатными атомами кислорода, не участвующими в прочной координации с комплексообразователем (табл. 2). Эти водородные связи объединяют комплексы в цепи вдоль оси *a* кристалла (рис. 2). Цепи дополнительно стабилизированы несколькими взаимодействиями C–H...O в I или C–H...O и C–H...S в II (параметры

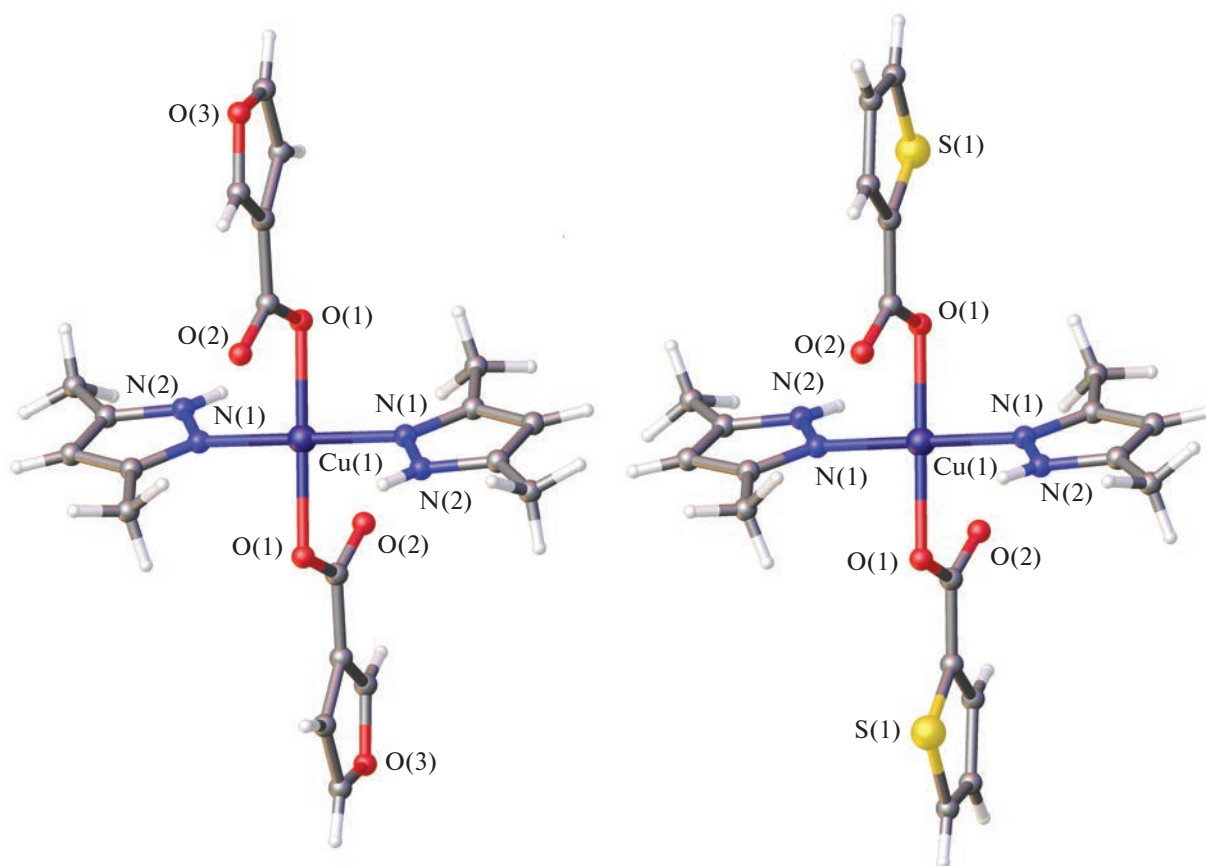


Рис. 1. Молекулярное строение комплексов I (слева) и II (справа) в представлении атомов эллипсоидами тепловых колебаний (вероятность 50%).

этих контактов также приведены в табл. 2). Водородно-связанные цепи объединяются в слои, параллельные плоскости *ac* кристалла, за счет $\pi\cdots\pi$ -стэкинг-взаимодействий между фурановыми заместителями (расстояние между центроидами соседних колец 3.855(2) Å (I) и 4.985(1) Å (II), кратчайшее межatomное расстояние C(10)...C(10)[#] (# 1 – *x*, –*y*, –*z*) 3.441(3) Å (I) и C(8)...C(9)[#] (# –*x*, –*y*, 1 – *z*) 3.416(3) Å (II)). Между слоями отсутствуют специфические межмолекулярные контакты.

Комплекс III кристаллизуется в триклинной пространственной группе $P\bar{1}$ и в кристалле занимает общую позицию. Ион цинка имеет тетраэдрическое координационное окружение (рис. 3), включающее два атома кислорода монодентатно координированных фураат-анионов (Zn–O 1.926(1) и 1.952(1) Å) и два атома азота двух монодентатно координированных молекул лиганда HDmpz (Zn–N 2.001(1) и 2.008(1) Å). Валентные углы при атоме цинка лежат в интервале значений 103.28(5)°–119.09(5)°. В отличие от комплексов меди I и II, в комплексе III карбоксилатные атомы кислорода O(2) и O(5) не участвуют в дополнительной координации с ионом металла (расстояния Zn–O до этих атомов кислорода составляют

3.123(1) и 3.301(1) Å). Эти некоординированные атомы кислорода вовлечены в образование внутримолекулярных водородных связей N–H...O с протонированными атомами азота HDmpz (табл. 2). Аналогичное строение наблюдается в ранее полученных комплексах цинка с анионами 2-фуранкарбоновой кислоты [Zn(2-Fur)₂(HDmpz)₂] [34] и тиофенкарбоновой кислоты [Zn(Tph)₂(HDmpz)₂] (IV) [30]. Реализация плоско-квадратного и тетраэдрического состояний катионов-комплексобразователей I–III в целом характеризуется металлоостовом {MO₂N₂}, в которых КЧ(Cu/Zn) 4. В кристалле III молекулы комплекса объединяются за счет относительно слабых межмолекулярных взаимодействий в двоянные цепи (рис. 4), распространяющиеся вдоль кристаллографического направления [1 1 0]. Цепи образуются за счет водородных связей C–H...O (табл. 2) между группой 4-СН фуранового кольца и не участвующим в координации с металлом атомом кислорода карбоксилатной группы. Параллельные цепи сдвигаются за счет стэкинг-контактов с участием одного из пиразольных колец и карбоксилатной группой при атоме C(11) (расстояния C(11)...C(2) 3.477(2) и C(11)...C(3) 3.500(2) Å). Атомы кислорода фурановых фрагментов не участвуют в обра-

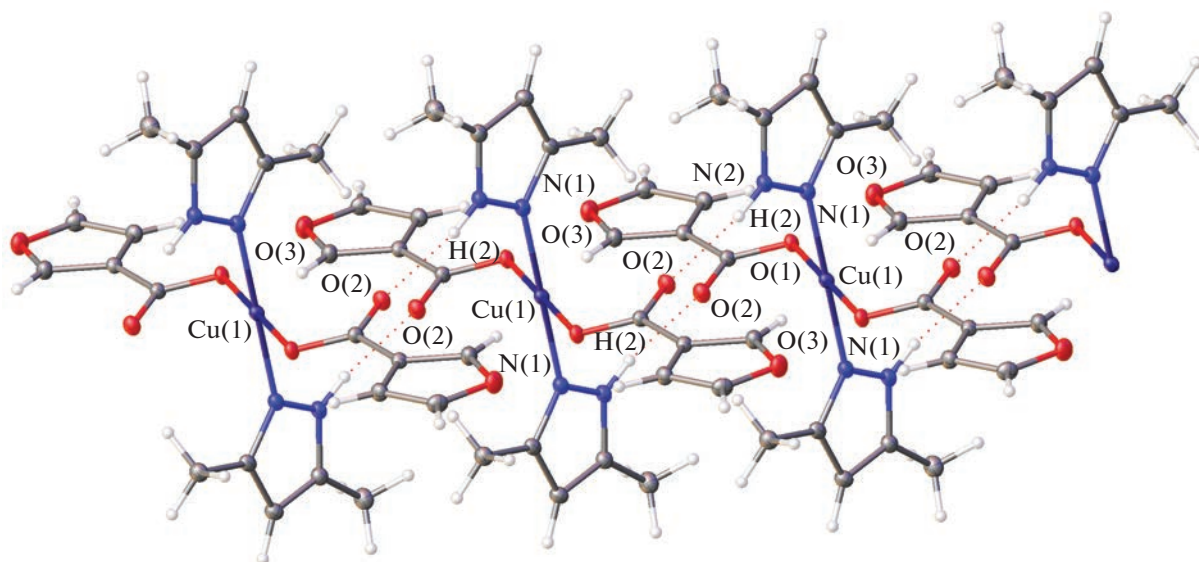


Рис. 2. Фрагмент водородно-связанной цепи в структуре I.

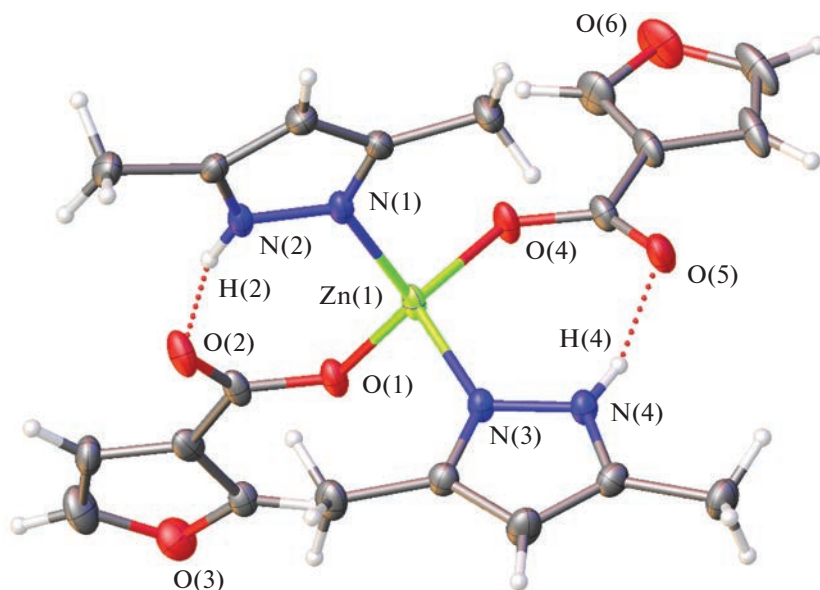


Рис. 3. Молекулярное строение комплекса III в представлении атомов эллипсоидами тепловых колебаний (вероятность 30%).

зовании укороченных межмолекулярных контактов. Между sdвоенными цепями в кристалле присутствуют только обычные ван-дер-ваальсовы контакты. Следует отметить, что кристаллическая упаковка III совпадает с описанной ранее для комплекса $[\text{Zn}(\text{2-Fur})_2(\text{HDmpz})_2]$ [34] (соединения изоструктурны). В то же время кристаллическая упаковка IV с тиюфеновыми заместителями заметно отличается за счет образования укороченных контактов C—H...S и стэкинг-контактов с участием тиюфеновых колец [30].

Антибактериальная активность I–IV была определена в отношении непатогенного штамма

M. smegmatis. Известно, что устойчивость микобактерий к химиотерапевтическим агентам связана с низкой проницаемостью микобактериальной клеточной стенки, с ее необычной структурой. *M. smegmatis* являются быстрорастущими непатогенными бактериями и поэтому используется в качестве модельного организма для медленно растущих бактерий *M. tuberculosis*, а также для первичного скрининга противотуберкулезных препаратов [35]. Тест-система *M. smegmatis* проявляет более высокую степень устойчивости к антибиотикам и противотуберкулезным агентам, чем *M. tuberculosis*, поэтому критерием отбора является концентрация

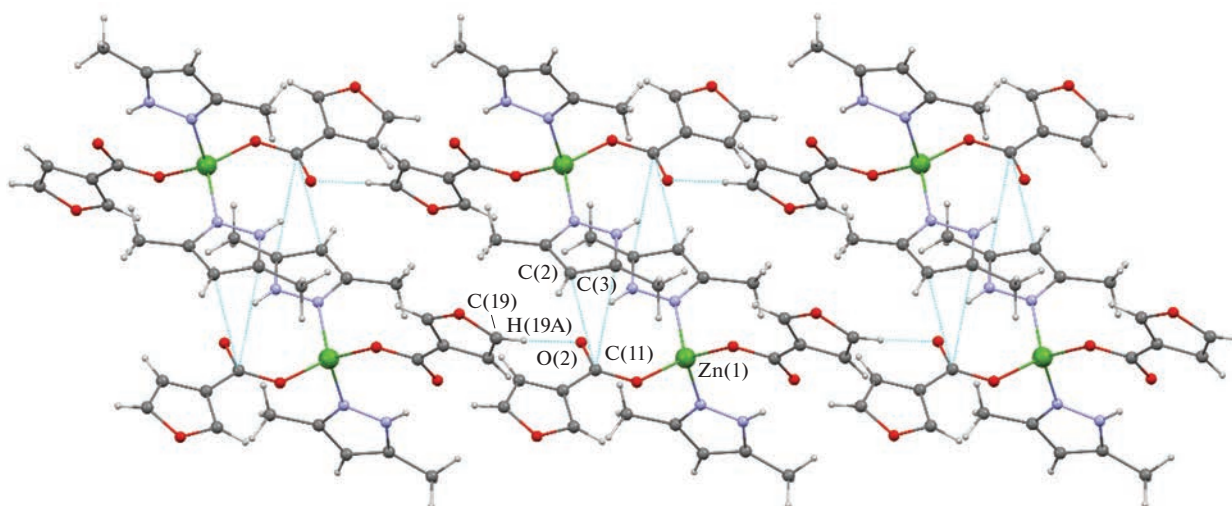


Рис. 4. Фрагмент кристаллической упаковки в структуре III, иллюстрирующий образование двойных цепей.

вещества <100 мкмоль/диск [36]. Все полученные результаты биоактивности *in vitro* исследованных соединений соотносились с активностью для изониазида (INH) и рифампицина (Rif) — препаратов первого ряда лечения туберкулеза — в данных условиях эксперимента. Вещества наносили на диски в разных концентрациях. Результаты антибактериальной активности в тестовой системе

M. smegmatis mc² 155 и ее изменение с течением времени для соединений I–IV приведены в табл. 3. Как следует из данных, невысокие значения МИК для I–IV (>200 нмоль/диск) свидетельствуют о низкой биоактивности комплексов по сравнению с веществами-сравнения INH и Rif (табл. 3). В целом, очевидно, что HDmpz в составе комплексов значительно снижает эффект воздействия на

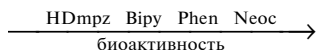
Таблица 3. Результаты антибактериальной активности в отношении *M. smegmatis*

Соединение	МИК, нмоль/диск	Зона ингибирования, мм		Литература
	24 ч	24 ч	120 ч	
I	300	6.4 ± 0.2*	6.1 ± 0.1	Настоящая работа
II	500	6.9 ± 0.2	6.5 ± 0.12	»
III	250	6.4 ± 0.1	6.1 ± 0.1	»
IV	200	6.5 ± 0.5*	6.1 ± 0.1	»
[Cu ₂ (5NO ₂ Fur) ₄ (Phen) ₂]	1	6.8 ± 0.29*	6.5 ± 0.1*	[19]
[Zn ₂ (2-Fur) ₄] _n	1000	6.6 ± 0.3	6.5 ± 0*	[18]
[Ni(2-Fur) ₂ (Phen)(H ₂ O) ₂]	484	6.7 ± 0.3	6.7 ± 0.3	[16]
[Ni(2-Fur) ₂ (HPz) ₄]	1200	6.5 ± 0.5	0	[16]
[Zn(2-Fur) ₂ Neoc]	101	7.1 ± 0.3	6.5 ± 0.5	[18]
[Cu ₂ (2-Fur) ₄ (Py) ₂]	200	7 ± 0.5	7 ± 0.5	[12]
[Cu(2-Fur) ₂ (Phen)]	5	7 ± 0.5	7 ± 0.5	[12]
3-HFur	50	7 ± 0.5*	6 ± 0.5*	Настоящая работа
HDmpz	>3000	**	**	»
HTph	2000	6.4 ± 0.1	**	»
INH	730	7.0 ± 0.5	6.5* ± 0.5	»
Rif	6	6.5 ± 0.5	6.5 ± 0.5	»

* Зона ингибирования роста культуры бактерий, изначально возникшая после нескольких часов роста, начинает зарастать по всей поверхности зоны.

** Зона ингибирования роста отсутствует.

штамм *M. smegmatis*. Так, ранее нами установлено [12–19], что введение в фуруатные комплексы Cu(II) и Zn(II) олигопиридинов (1,10-фенантролин (**Phen**), неocupроин (**Neoc**), 2,2'-бипиридин (**Bipy**)) способно в несколько раз повышать биологическую активность (табл. 3). Таким образом, ранее полученный ряд эффективности N-донорных лигандов [18] в отношении микобактерии можно представить в виде



Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

РСА, ИК-спектроскопия и С,Н,N,S-анализ выполнены с использованием оборудования ЦКП ФМИ ИОНХ РАН, функционирующего при поддержке государственного задания ИОНХ РАН в области фундаментальных научных исследований.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках государственного задания ИОНХ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Goodwin L. // Trop. Med. Hyg. 1995. V. 89. № 3. P. 339.
- Ngwane A.H., Petersen R.D., Baker B. et al. // IUBMB Life. 2019. V. 71. № 5. P. 532.
- Chen Z.F., Orvig C., Liang H. // Curr. Top. Med. Chem. 2017. V. 17. № 28. P. 3131.
- Chaudhary A., Jha K., Kumar S. // J. Adv. Res. 2012. V. 3. № 3. P. 3.
- Lukevits É., Demicheva L. // Chem. Heterocycl. Compd. 1993. V. 29. P. 243.
- Машиковский М.Д. Лекарственные средства. М.: Медицина. 2000. Т. 1. 736 с.
- Kuchtanin V., Moncol J., Mroziński J. // Polyhedron. 2013. V. 50. № 1. P. 546.
- Panagoulis D.E., Pontiki E., Skeva C. et al. // Inorg. Chem. 2007. V. 101. P. 623.
- Zheng X.F., Zhou Y.X., Wan X.S. // Inorg. Met.-Org. Nano-Met. Chem. 2007. V. 37. P. 255.
- Horn E., Kurosawa K., Tamura H., Nakahodo T. // Z. Krist. New. Cryst. Struct. 2001. V. 216. P. 77.
- Melnic S., Prodius D., Stoeckli-Evans H. et al. // Eur. J. Med. Chem. 2010. V. 45. P. 1465.
- Луценко И.А., Баравиков Д.Е., Кискин М.А. и др. // Коорд. химия. 2020. Т. 46. № 6. С. 366 (Lutsenko I.A., Kiskin M.A., Nelyubina Y.V. et al. // Russ. J. Coord. Chem. 2020. T. 46. № 6. P. 411). <https://doi.org/10.1134/S1070328420060056>
- Луценко И.А., Ямбулатов Д.С., Кискин М.А. и др. // Коорд. химия. 2020. Т. 46. № 12. С. 715 (Lutsenko I.A., Yambulatov D.S., Kiskin M.A. // Russ. J. Coord. Chem. 2020. T. 46. № 12. P. 787). <https://doi.org/10.1134/S1070328420120040>
- Lutsenko I.A., Yambulatov D.S., Kiskin M.A. et al. // ChemSelect. 2020. V. 5. № 38. P. 11837.
- Луценко И.А., Кискин М.А., Кошенкова К.А. и др. // Изв. АН. Сер. хим. 2021. № 3. С. 463 (Lutsenko I.A., Kiskin M.A., Koshenskova K.A. et al. // Russ. Chem. Bull. 2021. V. 70. № 3. P. 463). <https://doi.org/10.1007/s11172-021-3109-3>
- Uvarova M.A., Lutsenko I.A., Kiskin M.A. et al. // Polyhedron. 2021. V. 203. P. 115241. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2021.115241>
- Луценко И.А., Никифорова М.Е., Кошенкова К.А. и др. // Коорд. химия. 2022. Т. 48. № 2. С. 83 (Lutsenko I.A., Nikiforova M.E., Koshenskova K.A. et al. // Russ. J. Coord. Chem. 2021. V. 47. P. 879). <https://doi.org/10.1134/S1070328421350013>
- Lutsenko I.A., Baravikov D.E., Koshenskova K.A. et al. // RSC Adv. 2022. V. 12. P. 5173.
- Кошенкова К.А., Луценко И.А., Нелюбина Ю.В. и др. // Журн. неорган. химии. 2022. Т. 67. № 10. С. 1398 (Koshenskova K.A., Lutsenko I.A., Nelyubina Y.V. et al. // Russ. J. Inorg. Chem. V. 67. № 10. P. 1545). <https://doi.org/10.1134/S003602362270005X>
- Ansari A., Ali A., Asif M., Shamsuzzaman S. // New J. Chem. 2017. V. 41. № 1. P. 16.
- Xu Z., Gao C., Ren Q.C., Song X.F. et al. // Eur. J. Med. Chem. 2017. V. 139. P. 429.
- Karrouchi K., Radi S., Ramli Y. et al. // Molecules. 2018. V. 23. № 1. P. 134.
- Azam M., Mohammad Wabaidur S., Alam M. // Polyhedron. 2021. V. 195. P. 114991.
- Solanki A., Kumar S.B., Doshi A.A., Ratna Prabha C. // Polyhedron. 2013. V. 63. P. 147.
- Уварова М.А., Неведов С.Е. // Коорд. химия. 2020. Т. 46. № 2. С. 117 (Uvarova M.A., Nefedov S.E. // Russ. J. Coord. Chem. 2020. V. 46. № 2. P. 125). <https://doi.org/10.1134/S1070328420020062>
- Уварова М.А., Неведов С.Е. // Журн. неорган. химии. 2015. Т. 60. № 9. С. 1181 (Uvarova M.A., Nefedov S.E. // Russ. J. Inorg. Chem. 2015. V. 60. № 9. P. 1074). <https://doi.org/10.1134/S003602361509020X>
- Уварова М.А., Кушан Е.В., Неведов С.Е. // Журн. неорган. химии. 2012. Т. 57. № 5. С. 744 (Uvarova M.A., Kushan E.V., Nefedov S.E. // Russ. J. Inorg. Chem. 2012. V. 57. № 5. C. 676). <https://doi.org/10.1134/S0036023612050245>
- Уварова М.А., Неведов С.Е. // Коорд. химия. 2022. Т. 48. № 9. С. 543 (Uvarova M.A., Nefedov S.E. // Russ. J. Coord. Chem. 2022. V. 48. P. 565). <https://doi.org/10.1134/S107032842209007X>
- Uvarova M.A., Nefedov S.E. // Russ. J. Coord. Chem. 2022. T. 48. № 12. C. 909.
- Yuan Lu, Weiqiang Xu, Kaikai Hu et al. // Polyhedron. 2019. V. 159. P. 408.
- Krause L., Herbst-Irmer R., Sheldrick G.M., Stalke D. // J. Appl. Cryst. 2015. V. 48. P. 3.
- Sheldrick G.M. // Acta Crystallogr. A. 2015. V. 71. P. 3.
- Dolomanov O.V., Bourhis L.J., Gildea R.J. et al. // J. Appl. Cryst. 2009. V. 42. P. 339.
- Kaikai H., Shouwen J., Zuoran Xie, Ming G. et al. // Polyhedron. 2018. V. 139. P. 17.
- Ramon-García S., Ng C., Anderson H. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 2011. V. 8. P. 3861.
- Bekker O.B., Sokolov D.N., Luzina O.A. et al. // Med. Chem. Res. 2015. V. 24. P. 2926.

УДК 547.97:551.464.796

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ТЕТРАСУЛЬФОФТАЛОЦИАНИНА КОБАЛЬТА С ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ БЕЛКОМ ORF8 SARS-CoV-2

© 2023 г. О. И. Койфман^{1, 2}, В. Е. Майзлиш², Н. Ш. Лебедева¹, Е. С. Юрина¹, С. С. Гусейнов¹, Е. Л. Гурьев³, Ю. А. Губарев^{1, *}

¹Институт химии растворов им. Г.А. Крестова РАН, Иваново, Россия

²Ивановский государственный химико-технологический университет, Иваново, Россия

³Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Россия

*e-mail: gua@isc-ras.ru

Поступила в редакцию 19.01.2023 г.

После доработки 13.03.2023 г.

Принята к публикации 22.03.2023 г.

Методами спектроскопии и калориметрии изучено взаимодействие водорастворимого тетрасульфофталоцианина кобальта(II) (CoPc) с дополнительным белком ORF8 SARS-CoV-2. Установлено, что белок вызывает смещение агрегационного равновесия в растворах тетрасульфофталоцианина кобальта в сторону димеризации. Димер CoPc связывается с белком ORF8, вероятнее всего, со стороны большего β -листа, вызывая тушение флуоресценции. Константа аффинности белка к димеру CoPc составляет 1.5×10^5 . Методом дифференциальной сканирующей калориметрии установлено, что ORF8 подвергается термоиндуцированной денатурации в температурном интервале 38–67°C. Плавление белка ORF8 осуществляется в две стадии частично накладывающиеся друг на друга. Комплексообразование ORF8 с CoPc приводит к термостабилизации белка, препятствуя второму этапу разворачивания белка. Денатурация комплекса протекает в интервале от 40 до 77°C в две температурно разделенные стадии. Методами гельэлектрофореза и иммуноблоттинга показано, что фотооблучение растворов комплекса белка ORF8 с CoPc видимым светом не приводит к фотоокислению белка. Показано, что водорастворимый сульфозамещенный фталоцианин кобальта может рассматриваться как потенциальный препарат ингибирующий дополнительный белок ORF8.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, металлофталоцианины, белок, комплекс, фотоинаktivация

DOI: 10.31857/S0132344X23600042, **EDN:** TCRLOA

Заболевание COVID-19, вызванное коронавирусом SARS-CoV-2, появившееся в Китае, стремительно распространилось по всему миру и до настоящего времени наносит огромный экономический и социальный ущерб. К настоящему времени эта коронавирусная инфекция привела к смерти более 6.7 млн заболевших. Одной из наиболее частых причин летального исхода является цитокиновый шторм, в возникновении и развитии которого участвуют дополнительные белки вируса SARS-CoV-2, такие как ORF8, ORF10 и ORF3a. К настоящему времени нацеленных на дополнительные белки SARS-CoV-2 и разрешенных к применению лекарственных препаратов нет. Согласно действующим протоколам при возникновении цитокинового шторма используют сочетание ремдесивира с дексаметазоном. Дексаметазон — иммуномодулирующий препарат, но его эффективность при цитокиновом шторме весьма спорна. Например, по данным [1], смертность среди пациентов, получавших одновременно дексаметазон с ремдесивиром, составила 16.7%, а с дру-

гим препаратом тоцилизумабом — 5.3%. Есть сведения и о положительном влиянии применения дексаметазона с ремдесивиром [2]: 30-дневная смертность пациентов, получавших ремдесивир и дексаметазон в дополнение к SOC (стандарт медицинской помощи), составила 12.6% по сравнению с 19.7% для тех, кто получал только SOC. Поэтому поиск соединений способных ингибировать или инактивировать действие дополнительных белков SARS-CoV-2, модулирующих иммунный ответ хозяина и инициирующих цитокиновый шторм, является актуальной задачей. Макроциклические соединения относятся к классу потенциально пригодных для ингибирования и инаktivации вирусов [3, 4]. В наших предыдущих работах было показано, что макрогетероциклические соединения способны образовывать устойчивые комплексы с дополнительными белками SARS-CoV-2, в частности ингибитором белков ORF8 [5], ORF3a [6, 7], ORF10 [8], является 5,10,15,20-тетраakis-(N-метил-3-пиридил)хлорин. Более перспективным методом является фотоинаktivация белка. Мак-

рогетероциклические соединения порфиринового, хлоринового и фталоцианинового класса способны под действием света генерировать активные формы кислорода, которые могут окислять аминокислотные остатки белка необратимо нарушая его структуру и функции [3, 4, 9]. В случае дополнительных белков ORF3a и ORF10 ранее нами было установлено, что они подвергаются фотоинактивации в комплексах с тетрасульфоталоцианином кобальта(II). Эффективность ингибирования/фотоинактивации белка ORF8 SARS-CoV-2 с помощью тетрасульфоталоцианина кобальта(II) (**CoPc**) не исследовалась.

Цель настоящей работы — оценка фотокаталитической активности и ингибирующей способности **CoPc** в отношении дополнительного белка ORF8 SARS-CoV-2.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Соединение **CoPc** синтезировали методом “плавления мочевины” [10, 11]. Полученный расплав растирали, растворяли в воде, раствор отфильтровывали, фильтрат упаривали. Полученное вещество промывали концентрированной соляной кислотой до бесцветных фильтратов и сушили. Продукт растворяли в воде, водный раствор пропускали через колонку с катионитом КУ-2-8, затем хроматографировали на силикагеле и molselect G-10 последовательно в качестве адсорбентов, собирая наиболее окрашенную зону. Полученный раствор упаривали, а сухой продукт обрабатывали органическими растворителями (метанол, ацетон, бензол) в аппарате Сокслета. Продукт сушили под вакуумом при 100–110°C. Чистота **CoPc** составила не менее 98%.

Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду и фосфатно-солевой буфер pH 7.4 (**PBS**).

Найдено, %: C 42.5; H 1.9; N 12.3; S 14.2.

Для $C_{32}H_{16}NO_{12}S_4Co$

вычислено, %: C 43.1; H 1.8; N 12.6; S 14.4.

Спектр ЭСП (ДМСО; λ_{max} , нм (log ϵ)): 664(5.15), 602(4.50), 330(4.85) и совпадает с литературными данными [12].

ORF10 экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3) на основе pGBW-m4046950, подаренной Ginkgo Bioworks & Benjie Chen (плазмида Addgene 149258; <http://n2t.net/addgene:149258>; RRID: Addgene_149258). Процедура подробно описана в [6]. Молекулярную массу и аутентичность целевых белков подтверждали методами электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблоттинга.

Спектры поглощения и спектры флуоресценции регистрировали на спектрофотометре AvaSpec-

2048 (Avantes BV, Нидерланды) в кюветах 10 мм в термостатируемой ячейке при 25°C.

Термохимические исследования осуществляли на дифференциальном сканирующем калориметре (ДСК) теплового потока DSC 204 F1 (Netzsch Geratebau GmbH, Германия). Образцы (растворы) массой 10–15 мг помещали в запрессованные алюминиевые тигли. В качестве образца сравнения служил пустой алюминиевый тигель. Калориметрический эксперимент проводили в динамической атмосфере сухого аргона (содержание аргона 99.998%) с расходом газа 40 мл мин⁻¹ и скоростью нагрева 1°C мин⁻¹ в интервале температур 12–93°C. Все измерения выполняли относительно базовой линии, полученной для двух пустых тиглей. Температуру и чувствительность калориметра калибровали путем измерения температур и энтальпий фазовых переходов для 11 стандартных веществ: Hg, C₆H₁₂, C₁₂H₁₀, KNO₃, RbNO₃, In, Bi, Sn, Zn, KClO₄ и CsCl. Точность измерения температуры составляла 0.3°C, точность взвешивания — 0.01 мг (Sartorius M2P Balance). Для расчета удельной теплоемкости растворов белков использовали ДСК-кривые: базовая линия, стандарт, образец. В качестве стандарта служил сапфир. Все три измерения проводили последовательно в течение суток. Используя программное обеспечение для DSC 204 F1 Phoenix и экспериментальные значения температурной зависимости удельной теплоемкости стандарта (сапфира) были получены температурные зависимости удельных теплоемкостей раствора белка и чистого буфера. С помощью программы Origin, находили разность удельных теплоемкостей раствора белка в буфере и чистого буфера. По температурной зависимости разности удельных теплоемкостей после вычитания сигмоидальной базовой линии, определяли положения пиков.

Образцы для электрофореза и иммуноблоттинга готовили смешиванием в молярном соотношении 1 : 1 белка ORF8 с **CoPc** в **PBS**. Инкубировали в течение 1 ч в темноте или при облучении белым светом (мощностью 10 Вт). Пробы смешивали в объемном соотношении 4 : 1 с 5× буфером для образцов (0.3 M Tris-ОН pH 6.8, 10% SDS, 25% меркаптоэтанол, 50% глицерин, 0.005% бромфеноловый синий) и проводили электрофорез в 12% полиакриламидном геле (TGX Stain-Free™ Fast-Cast™ Acrylamide Kit 12%, Bio-Rad, США). Изображение геля получали по технологии бескарасочной визуализации с использованием системы ChemiDoc (Bio-Rad, США). В случае белка ORF10 электрофорез проводили в 15% полиакриламидном геле, который затем окрашивали раствором кумасси голубого R-250 (Thermo, США).

Белки переносили с геля на поливинилпирролидонную мембрану Immobilon-P (Merck, Германия) с использованием системы полусухого

переноса Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, США). Мембрану блокировали в течение 1 ч 5% раствором сухого молока в буфере TBS-T (20 mM трис, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.5). Инкубировали мембрану в течение 1 ч в 1 : 500 растворе первичных антител (Rabbit Polyclonal SARS-CoV-2 ORF8 Antibody, FabGenix, США) в 5% сухом молоке в буфере TBS-T. Трижды отмывали мембрану буфером TBS-T в течение 5 мин. Инкубировали мембрану в течение 1 ч в 1 : 10000 растворе вторичных антител (Goat Anti-Rabbit IgG H&L HRP, Abscam, Великобритания) в 5% сухом молоке в буфере TBS-T. Отмывали мембрану, как описано выше. Инкубировали мембрану 5 мин в растворе субстрата пероксидазы (Clarity Western ECL Substrate, Bio-Rad, США), визуализировали с помощью системы ChemiDoc.

Молекулярный докинг выполнен в программе AutoDock Vina 1.1.2 [13] и визуализирован в PyMol 2.4.1. Структура ORF8 D-I-Tasser (QHD43422.pdb) была загружена на сайте Лаборатории Жанга [14, 15]. Структура CoPc минимизирована в ORCA 4.0 [16] с использованием методов DFT. Для исключения сайтов связывания, с которыми не могут быть образованы связи из-за электростатического отталкивания на основе уравнения Пуассона—Больцмана [17], рассчитан заряд поверхности белковой глобулы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор водорастворимого кобальт(II)фталоцианина в качестве потенциального ингибитора и инактиватора обусловлен активностью данного металлофталоцианина в отношении других дополнительных белков SARS-CoV-2, но и вероятной локализацией CoPc в составе комплекса с ORF8 (рис. 1). Согласно данным молекулярного докинга, CoPc может стыковаться с ORF8 с достаточной высокой энергией, составляющей 8.2–8.7 ккал/моль двумя способами (рис. 1). Одна молекула CoPc локализуется в ORF8 вблизи аминокислотной последовательности 73–75, отвечающей за агрегацию белка ORF8 и стыковку с главным комплексом гистосовместимости I (MHC-I), предотвращая выделение вирусных антигенов на поверхность клетки под действием MHC-I [18]. Вторая CoPc расположена в непосредственной близости к N-терминальному фрагменту белка, отвечающему за встраивание в эндоплазматический ретикулум, подавляя выработку β -интерферонов [19]. Положительным также является факт близкого расположения одного из фотоулавливаемых аминокислотных остатков — цистеина, занимающего 20, 25, 83 и 90 положения в полипептидной цепи ORF8. Следует отметить, что, согласно полученным теоретическим данным, CoPc не образует аксиальных связей с электронодонорными атомами белка, что также является необходимым условием

для применения макрогетероциклического соединения для фотоинактивации [20].

Рекомбинантный белок ORF8 был спектрально охарактеризован ранее [5], наличие собственной флуоресценции белка с максимумом 345 нм позволило провести прямое флуоресцентное титрование растворов белка CoPc (рис. 2). Титрование раствором CoPc дополнительного белка ORF8 приводит к тушению флуоресценции белка. Обработка полученных результатов спектрального титрования в приближении Скетчарда показала, что аффинность белка к ORF8 достаточно высокая, константа Скетчарда составила 1.5×10^5 . Зависимость в координатах Скетчарда линейна ($R^2 = 0.988$), следовательно белок ORF8 связывает CoPc единственным возможным способом. Следует отметить, что в исходном фосфатном буферном растворе CoPc находится в частично димеризованном состоянии, о чем говорит наличие поглощения в области 630 нм (рис. 3) [21]. Обратное титрование растворов CoPc раствором белка с контролем по ЭСП CoPc показало, что увеличение содержания ORF8 в анализируемом растворе приводит к уменьшению отношения оптической плотности раствора при 650/630 нм. Это свидетельствует о том, что белок инициирует димеризацию макрогетероциклических молекул. Таким образом, судя по данным прямого и обратного титрования, можно заключить, что CoPc связывается с белком в димерной форме.

Дополнительную информацию о взаимодействии CoPc с ORF8 можно получить по данным ДСК. На рис. 4 представлены температурные зависимости избыточных удельных теплоемкостей растворов ORF8 и его комплекса с CoPc до и после облучения. Как видно из рис. 4, характер зависимости удельной теплоемкости растворов ORF8 сложный. На начальном этапе регистрируется эндозффект с максимумом 32.6°C, начиная с 45°C избыточная теплоемкость раствора ORF8 нелинейно возрастает. Возрастание значений теплоемкости раствора отражает увеличение степеней свободы и интенсивности молекулярных движений белка. Очевидно, что при повышении температуры появляется колебательная подвижность более крупных участков полипептидной цепи. Это делает возможным конформационные переходы белка, связанные с разрушением нативной структуры, дополнительной гидратацией аминокислотных остатков белка, изолированных ранее в структуре свернутой молекулы. Как видно из полученной зависимости (рис. 4), разворачивание белка происходит в два этапа, которым соответствуют два максимума на кривой избыточной теплоемкости при 47–48 и 57.6°C. Ядро ORF8 содержит два антипараллельных β -листа (beta-sheet). Меньший лист состоит из β_2 , β_5 и β_6 , а больший — из β_3 , β_4 , β_7 и β_8 [22]. Именно это строение позволяет ORF8

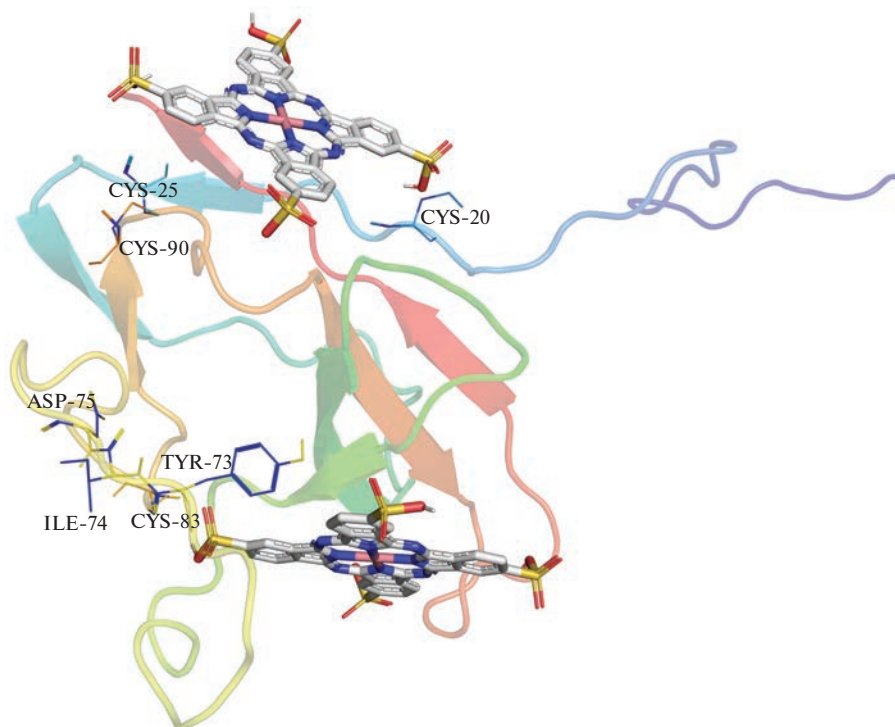


Рис. 1. Результаты молекулярного докинга дополнительного белка ORF8 SARS-CoV-2 с CoPc.

оказывать сильное ингибирующее действие на интерферон I типа (IFN- β), интерферон ISRE и промотор, чувствительный к NF- κ B [19]. Полученные термодинамические данные позволяют предположить, что первый пик на рис. 4 (область 47–48°C) связан с нарушением β -складчатости меньшего листа, а при 57.6°C происходит разворачивание большого листа. Дальнейшее уменьшение теплоемкости растворов, очевидно, связано

с агрегацией полипептидных цепей ORF8 после денатурации белка.

Связывание ORF8 с димерами CoPc приводит к изменению кривой удельной теплоемкости как в области низких, так и в области высоких температур, первый экстремум с максимумом 36.6°C имеет экзотермический характер, возможно, он связан со структурированием, происходящим в

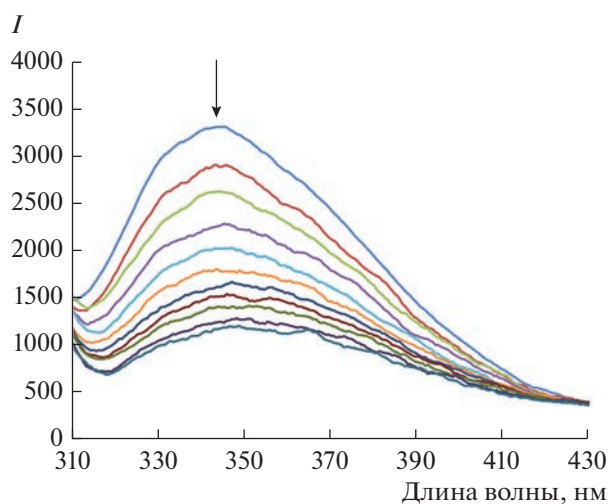


Рис. 2. Спектры флуоресценции ORF8 (2.24×10^{-5} M) при титровании CoPc ($0-2.2 \times 10^{-5}$ M) в PBS pH 7.4.

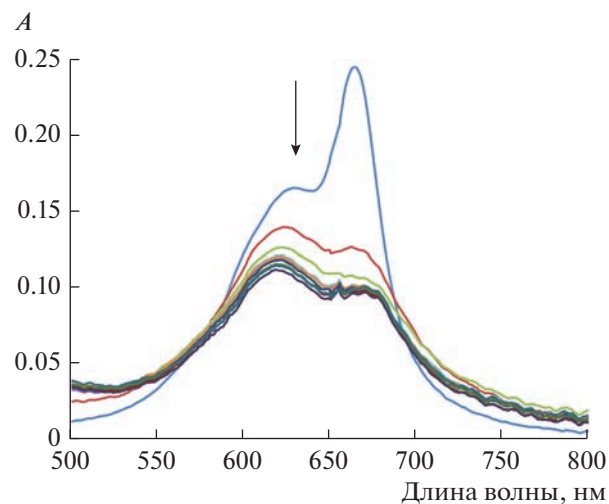


Рис. 3. ЭСП CoPc (1.1×10^{-5} M) при титровании ORF8 ($0-1.12 \times 10^{-5}$ M) в PBS (pH 7.4).

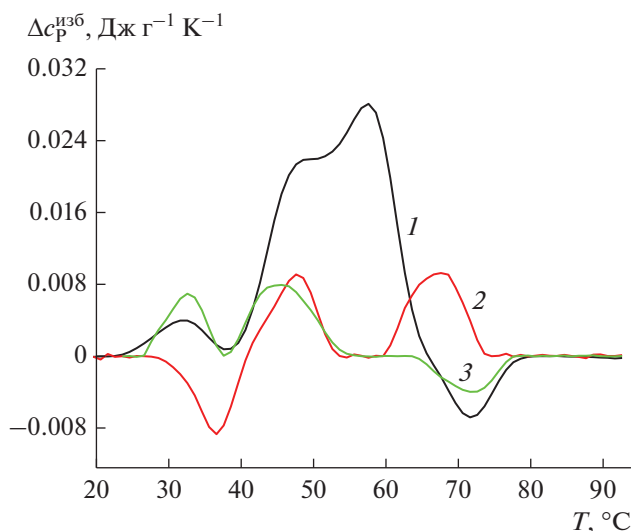


Рис. 4. Температурные зависимости избыточных удельных теплоемкостей растворов ORF8 (1) и его комплекса с CoPc до (2) и после облучения (3).

системе. Это может быть вызвано уменьшением электростатического отталкивания между противоположно заряженными группами CoPc и аминокислотными остатками полипептидной цепи. Процесс термоденатурации комплекса ORF8 с димерами CoPc, как и индивидуального белка ORF8, протекает в две стадии. Однако для ком-

плекса эти стадии температурно разделены. Первый эндоэффект имеет максимум при той же температуре, что и чистый белок (47.6°C). Второй эндоэффект в комплексе ORF8-CoPc по сравнению с ORF8 смещен в более высокотемпературную область, температура максимума 68°C. Очевидно, что димеры CoPc стабилизируют белок ORF8, препятствуя второму этапу разворачивания белка. Если наше предположение о последовательности термодеструкции ORF8 верно, то вероятнее всего, димеры CoPc расположены со стороны большого β-листа. Интересно отметить, что последующий экзоэффект в высокотемпературной области в случае ORF8-CoPc не регистрируется.

Следующим этапом работы являлась оценка фотовоздействия видимым светом (400–700 нм, 10 Вт, 1 ч) на комплекс димеров CoPc с ORF8. Облучение анализируемых растворов существенно повлияло на ход кривой избыточной теплоемкости. Ход кривой облученного комплекса ORF8-CoPc практически полностью совпадает с температурной зависимостью избыточной теплоемкости индивидуального белка ORF8 за исключением второго этапа, разворачивания белка, который в данном случае не фиксируется. Вероятно, фотооблучение приводит к незначительным локальным изменениям в ORF8, термическая денатурация которого в результате происходит в одну стадию, а сам комплекс во время облучения, вероятно, диссоциирует. Для получения дополнительной информации о влиянии фотооблучения на растворы ORF8-CoPc

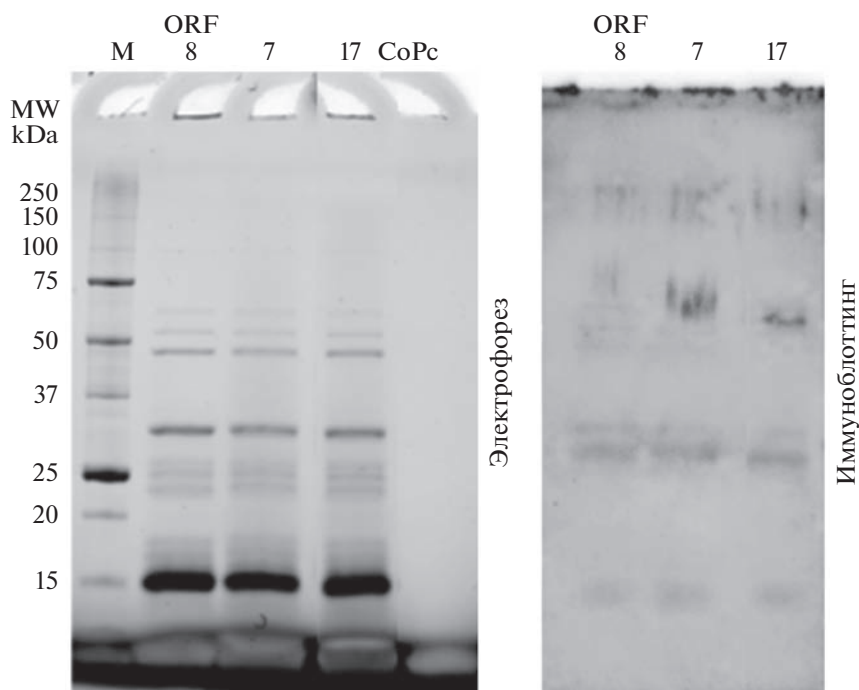


Рис. 5. Результаты электрофореза и иммуноблоттинга белка ORF8 до и после инкубации с CoPc: М — маркеры молекулярной массы; ORF8 — исходный белок ORF8; 7 — ORF8 + CoPc; 17 — ORF8 + CoPc + $h\nu$.

были проведены исследования исходного ORF8, СоРс и их комплексов до и после облучения методами электрофореза и иммуноблоттинга (рис. 5). В нижней части геля, вблизи фронта электрофореза, визуализируются СоРс. Инкубация белка ORF8 с веществом СоРс в темноте (рис. 5, дорожка 7) при облучении (рис. 5, дорожка 17) не привела к изменению картины электрофореза и иммуноблоттинга. Полученные данные подтверждают вывод, сделанный при анализе данных ДСК об отсутствии фотокаталитической активности СоРс в отношении белка ORF8. Возможной причиной низкой фотокаталитической активности СоРс в процессах окисления белка ORF8 является димеризация СоРс, вызывающая уменьшение квантового выхода синглетного кислорода.

SARS-CoV-2 развил несколько механизмов для уклонения от иммунной системы хозяина, таких как опосредованная ORF8, подавляющая регуляция МНС-I и ингибирование выработки β -интерферонов. Проведенное исследование показало, что взаимодействие водорастворимого тетрасульфозамещенного фталоцианина кобальта с белком ORF8 приводит к димеризации СоРс. Димеры сульфозамещенного фталоцианина кобальта связываются с дополнительным белком SARS-CoV-2, вероятно, в области большего β -листа, что может способствовать восстановлению адаптивного иммунитета во время инфекции SARS-CoV-2. По причине димеризации СоРс нецелесообразно рассматривать в качестве фотосенсибилизатора для фотоокисления ORF8 SARS-CoV-2, так как в димеризованном состоянии он проявляет низкую фотокаталитическую активность.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-73-20140).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Garcia-Vidal C., Meira F., C  zar-Llist   A. et al. // Revista Espa  ola de Quimioterapia. 2021. V. 34. P. 136. <https://doi.org/10.37201/req/018.2021>*
2. *Benfield T., Bodilsen J., Brieghel C. et al. // Clin. Infect. Dis. 2021. V. 73. P. 2031. <https://doi.org/10.1093/cid/ciab536>*
3. *Koifman O., Ageeva T., Kuzmina N.S. // Macroheterocycles. 2022. V. 15. P. 207. <https://doi.org/10.6060/mhc224870k>*
4. *Lebedeva N.S., Gubarev Y.A., Koifman M.O. et al. // Molecules. 2020. V. 25. P. 4368. <https://doi.org/10.3390/molecules25194368>*
5. *Gubarev Y.A., Lebedeva N.S., Yurina E.S. et al. // J. Biomol. Struct. Dyn. 2022. P. 1. <https://doi.org/10.1080/07391102.2022.2079562>*
6. *Lebedeva N.S., Gubarev Y.A., Mamardashvili G.M. et al. // Sci. Reports. 2021. V. 11. P. 1. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99072-8>*
7. *Koifman O.I., Lebedeva N.S., Gubarev Y.A. et al. // Chem. Heterocycl. Compd. 2021. V. 57. P. 423. <https://doi.org/10.1007/s10593-021-02920-8>*
8. *Koifman M.O., Malyasova A.S., Romanenko Y.V. et al. // Spectrochim. Acta. A. 2022. V. 279. P. 121403. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.saa.2022.121403>*
9. *Koifman O.I., Ageeva T.A., Beletskaya I.P. et al. // Macroheterocycles. 2020. V. 13. <https://doi.org/10.6060/mhc200814k>*
10. *Weber J.H., Busch D.H. // Inorg. Chem. 1965. V. 4. P. 469. <https://doi.org/10.1021/ic50026a007>*
11. *Шапошников Г., Кулинич В., Майзлиш В. Модифицированные фталоцианины и их структурные аналоги. М.: Красанд, 2012.*
12. *Майзлиш В., Мочалова Н., Снегирева Ф. и др. // Изв. вузов. Хим. и хим. технол. 1986. Т. 29. P. 3.*
13. *Trott O., Olson A.J. // J. Comput. Chem. 2010. V. 31. P. 455. <https://doi.org/10.1002/jcc.21334>*
14. *Zhang C., Zheng W., Huang X. et al. // J. Proteome Res. 2020. V. 19. P. 1351. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00129>*
15. *Zheng W., Zhang C., Li Y. et al. // Cell Reports Methods. 2021. P. 100014. <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100014>*
16. *Neese F. // Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Mol. Sci. 2022. V. 12. Art. e1606. <https://doi.org/10.1002/wcms.1606>*
17. *Baker N.A., Sept D., Joseph S. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2001. V. 98. P. 10037. <https://doi.org/10.1073/pnas.181342398>*
18. *Zhang Y., Chen Y., Li Y. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2021. V. 118. Art. e2024202118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2024202118>*
19. *Li J.-Y., Liao C.-H., Wang Q. et al. // Virus Res. 2020. V. 286. P. 198074. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198074>*
20. *Lebedeva N.S., Yurina E.S., Gubarev Y.A. et al. // J. Photochem. Photobiol. A. 2018. V. 353. P. 299. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2017.11.037>*
21. *Lebedeva N.S., Popova T., Mal'kova E. et al. // Russ. J. Phys. Chem. A. 2013. V. 87. P. 2030. <https://doi.org/10.1134/S0036024413120133>*
22. *Flower T.G., Buffalo C.Z., Hooy R.M. et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2021. V. 118. Art. e2021785118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021785118>*