

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. Антоненко^{1, *}, 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 $\text{RPt}[\text{PPh}_3]_2\text{X}$, ($\text{R} = 3,5$ -ди-*трет*-бутил-4-гидроксифенил; $\text{X} = \text{Cl}$ (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 РСА (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 межклеточные сшивки ДНК, однако имеются существенные различия в механизмах, объясняющих противоположный противоопухолевый эффект этих двух препаратов. Трансплатин стереохимически не способен к образованию 1,2-внутриклеточных или поперечных связей, что свидетельствует о различиях в противоопухолевой активности в результате различного характера искажений, индуцируемых в ДНК различными внутриклеточными 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-гидроксибензойная 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-гидроксибензилмеркурхлорид [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). Температуру 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 тетраakis-(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-гидроксибензил-бис-(трифенилфосфин)платина хлорид $RPt[PPh_3]_2Cl$ (I) выполняли по методике из тетраakis-трифенилфосфинплатины и 3,5-ди-трет-бутил-4-гидроксибензил-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-гидроксибензил-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, 2C(CH₃)₃); 4.35 (с., 1H, –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, 2C(CH₃)₃); 4.23 (с., 1H, –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-гидроксибензойной 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, 2C(CH₃)₃); 1.31 (с., 18H, 2C(CH₃)₃); 4.28 (с., 1H, –OH); 5.10 (с., 1H, –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 (C(CH₃)₃); 31.21 (C(CH₃)₃); 34.29 (C(CH₃)₃); 34.94 (C(CH₃)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 $\lambda_{\max} = 450$ 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:

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

где c – концентрация исследуемого вещества.

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

ления линолевой кислоты – соответствующих изомерных гидропероксидов при $\lambda_{\max} = 234$ 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 посева 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 erpendorf 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 добивались 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 *тетраakis*-трифенилфосфин-платины с 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксибензилмеркурхлоридом. Синтез соединений с общей формулой RPt[PPh₃]₂X 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 эквимолярное количество щелочи, так как избыток приводил к гидролизу лиганда по ацильной группе (схема 1). Реакцию соединения I с 3,5-ди-*трет*-бутил-4-гидроксibenзойной кислотой проводили в ацетоне с добавлением эквимолярного количества KOH для депротонирования карбоксильной группы и создания нуклеофильного центра. Исходный комплекс I растворялся полностью в ацетоне после добавления кислоты и основания, что указывало на прохождение реакции, в результате был получен комплекс IV (схема 1).

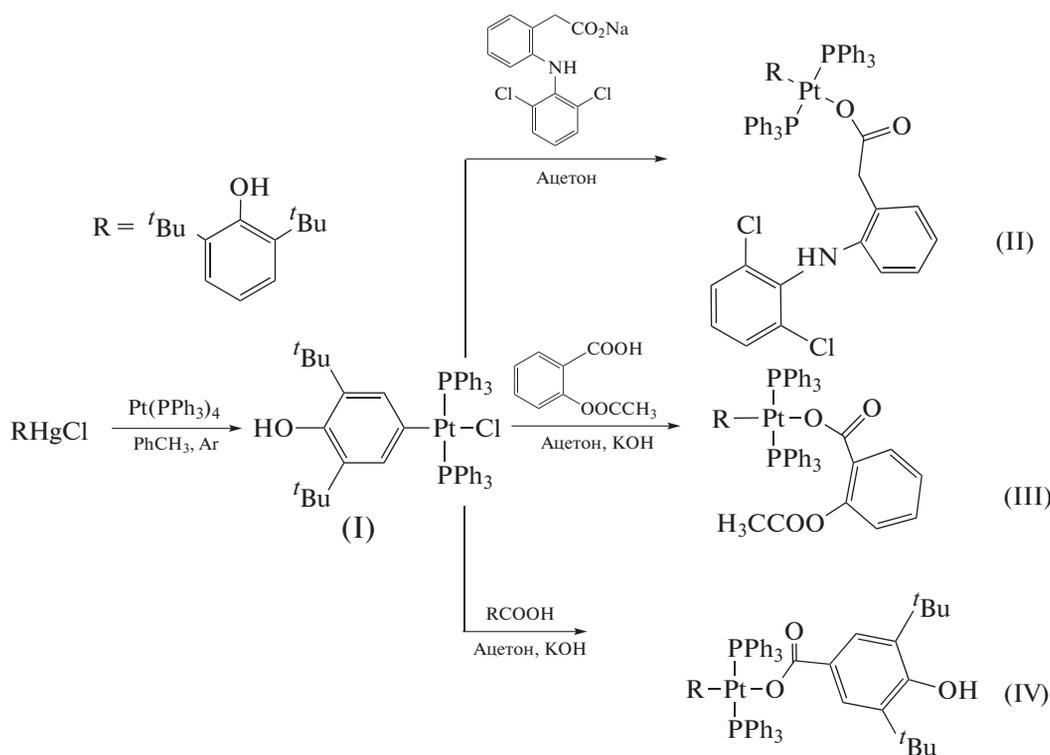


Схема 1.

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 O–H пространственно-затрудненной неассоциированной фенольной группы, валентные колебания связи C–N 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 H–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 P–Pt с константой ¹J_{P–Pt} = 3197 Гц.

Спектр ЯМР ¹H соединения II демонстрирует наличие спин-спинового взаимодействия H–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 PCA исследована молекулярная структура соединения I. Перекристаллизация соединения I из ацетона позволила получить светло-желтые монокристаллы, использованные для PCA.

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 OH-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-карбоную 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

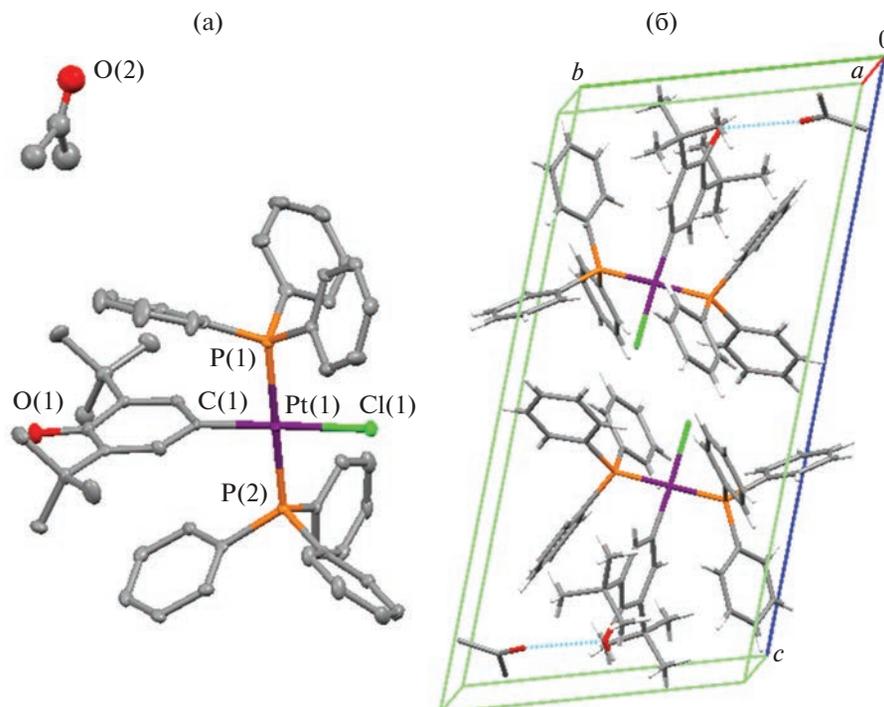


Рис. 1. Молекулярная структура соединения I (а), атомы водорода не показаны; водородные связи в упаковке кристалла I (б).

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 IC₅₀ (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) (IC₅₀ = 169.5 мкМ). Превышение значения IC₅₀ 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*-бутилфенола 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., Toledo 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., Rubezhov 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.