ЖУРНАЛ ОБЩЕЙ ХИМИИ, 2023, том 93, № 6, с. 967–977

УДК 547.56; 546.185; 546.47; 543.554.4

КОМПЛЕКСЫ МЕДИ(II) С 2-ГИДРОКСИ-5-ЭТИЛФЕНИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТОЙ: СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ, ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ И НАКОПЛЕНИЕ В КЛЕТКАХ HeLa

© 2023 г. Ю. И. Рогачева[1], М. А. Лапшина[1], В. Е. Баулин[1,*]

[1] *Институт физиологически активных веществ Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук, Северный проезд 1, Черноголовка, 142432 Россия*
**e-mail: mager1988@gmail.com*

Поступило в редакцию 25 апреля 2023 г.
После доработки 22 мая 2023 г.
Принято к печати 23 мая 2023 г.

С целью исследования физико-химических и биологических свойств координационных соединений ионов биоактивных металлов с производными 2-гидроксифенилфосфоновой кислоты впервые изучено взаимодействие 2-гидрокси-5-этилфенилфосфоновой кислоты (H_3L^1) с перхлоратом, сульфатом, нитратом и ацетатом меди(II) в воде. Установлено, что вне зависимости от соотношения реагентов в случае перхлората, сульфата и нитрата меди(II) с высоким выходом образуется комплекс состава $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$, в то время как в при использовании ацетата меди(II) образуется комплекс $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$, состав которого установлен на основании совокупности данных элементного анализа, ИК и электронной спектроскопии. Впервые выполнены квантово-химические расчеты для комплексов $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ и $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ методом теории функционала плотности (DFT). Исследованы цитотоксические свойства кислоты H_3L^1 и комплексов меди(II) состава $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ и $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ по отношению к опухолевым клеткам HeLa – аденокарциномы шейки матки человека. Методом лазерной конфокальной микроскопии доказано накопление полученных комплексов меди(II) в клетках HeLa.

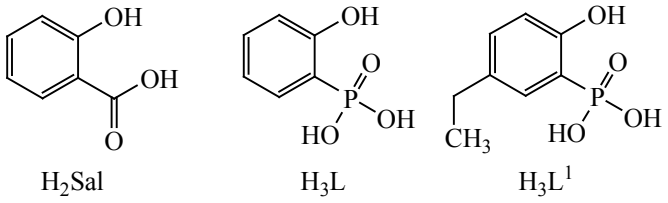
Ключевые слова: 2-гидроксифенил-5-этилфосфоновая кислота, комплексы меди(II), клетки HeLa, токсичность, лазерная конфокальная микроскопия

DOI: 10.31857/S0044460X23060161, **EDN:** FNJMGL

Синтез, изучение физико-химических и биологических свойств координационных соединений биоактивных металлов с органическими лигандами является эффективным подходом к созданию новых лекарственных средств. Варьируя природу, степень окисления иона металла и структуру органического лиганда можно влиять на проявление биологических свойств координационных соединений и получать более эффективные лекарственные средства терапевтического и диагностического назначения с минимальным проявлением побочных эффектов [1–6].

Среди биоактивных металлов особый интерес представляет медь, которая образует наиболее устойчивые комплексы с органическими лигандами среди 3*d*-металлов [7] и является одним из основных микроэлементов, необходимых для протекания жизненно важных биохимических процессов [8, 9]. В настоящее время накоплен многочисленный теоретический и экспериментальный

Схема 1.



H_2Sal H_3L H_3L^1

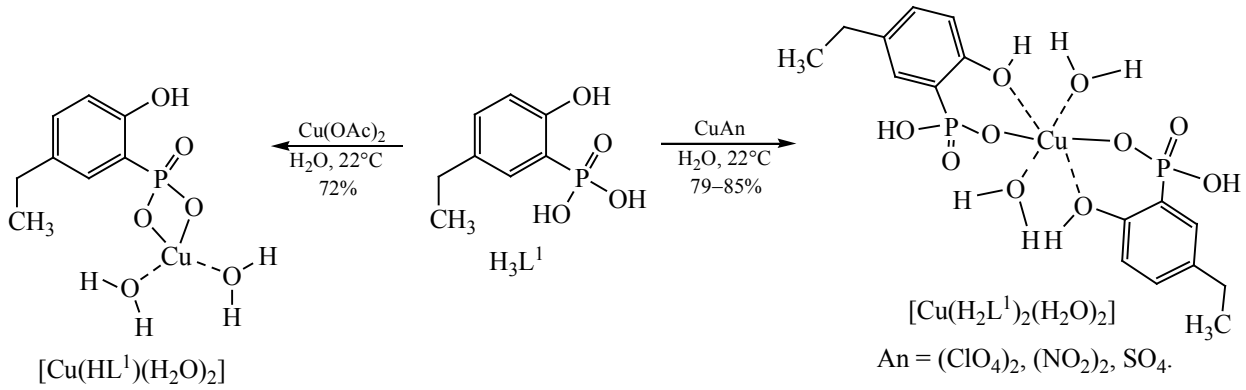
материал о роли комплексов меди в качестве биологически активных соединений [9–12]. В частности, доказано участие ионов меди в метаболизме железа в клетках [13], а также в биологических процессах, связанных с физиологией и патологией человека [14]. Огромный интерес к изучению биохимической и физиологической роли комплексов меди обусловлен их потенциальным использованием в качестве противомикробных, противовирусных, противовоспалительных, противоопухолевых средств, а также как ингибиторов многих ферментов. При этом комплексы меди с катионами металлов часто показывают более высокую биологическую активность и меньшую токсичность по сравнению со свободными лигандами, которые в настоящее время используются в клинической практике в качестве лекарственных средств [15–16]. В частности, описаны комплексы меди(II) с рядом нестероидных противовоспалительных препаратов, которые проявляют более высокую противовоспалительную активность, меньшую токсичность и ульцерогенность по сравнению со свободными препаратами [17]. Комплексы меди рассматривались в качестве альтернативы противоопухолевым препаратам на основе координационных соединений платины. В отличие от препаратов платинового ряда использование меди в составе комплексов является более физиологичным: снижает их токсичность и расширяет спектр противоопухолевой активности [18]. Более того, ряд координационных соединений изотопов ^{64}Cu и ^{67}Cu меди с органическими лигандами предоставляют интерес в качестве потенциальных терапевтических и диагностических радиофармацевтических препаратов [19–21].

Доказано, что структура органического лиганда в комплексах меди влияет на их биологическую активность [8–21]. 2-Гидроксифенилбензойная (салициловая кислота) является хорошо известным органическим лигандом хелатного типа. Производные салициловой кислоты проявляют анальгетическую и противовоспалительную активность и широко используются в различных областях биологии и медицины [22, 23]. Поскольку многие фармакологические свойства производных салициловой кислоты определяются способностью связывать ионов меди, синтез и исследования биологических свойств комплексов меди с аналогами салициловой кислоты, направленные на поиск новых соединений с улучшенными фармакологическими свойствами и минимальным проявлением побочных эффектов, представляют несомненный интерес.

Производные 2-гидроксифенилфосфоновых кислот являются структурным аналогом салициловой кислоты (H_2Sal), в которой карбоксильная группа заменена фосфоновым фрагментом. Физико-химические и биологические свойства этих соединений практически не изучены.

В отличие от салициловой кислоты известные 2-гидроксифенилфосфоновые кислоты хорошо растворимы в воде, что является важным критерием для отбора соединений, перспективных для применения в качестве лекарственных средств [24, 25]. Ранее, в опытах, *in vivo* нами было установлено, что незамещенная 2-гидроксифенилфосфоновая кислота (H_3L, схема 1) обладает заметной анальгетической, противовоспалительной активностью и низкой токсичностью [26]. В дальнейшем были определены константы протонирования кислоты H_3L и более липофильной 2-гидроксифенил-5-этилфосфоновой кислоты (H_3L^1) и константы устойчивости их комплексов с перхлоратом меди(II) в воде методом потенциометрического титрования [27, 28]. Взаимодействием

Схема 2.



водных растворов кислот H_3L и H_3L^1 с перхлоратом меди получены комплексы $[Cu(H_2L)_2(H_2O)_2]$ и $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$, кристаллическая структура которых была установлена рентгеноструктурным анализом (РСА) [27, 28].

С целью дальнейшего изучения координационных соединений меди(II) с кислотой H_3L^1 в настоящей работе изучено влияние природы аниона в используемых солях меди на состав и структуру образующихся комплексов (схема 2). Установлено, что при смешивании растворов кислоты H_3L^1 и нейтральных растворов перхлората, нитрата и сульфата меди(II) в мольном соотношении 2:1 образуется комплекс бледно-голубого цвета состава $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ с выходом 78–85%. Использование избытка одного из реагентов практически не менял выход и состав образующегося комплекса.

При смешивании водных растворов кислоты H_3L^1 и ацетата меди(II), водный раствор которого имеет pH ≥ 7, выпадает осадок желтого цвета. Выход полученного соединения составил 70–75%, при этом избыток ацетата меди практически не влиял на выход. Сравнительный анализ ИК спектров исходной фосфоновой кислоты и полученного комплекса показал, как и в случае комплекса $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$, отсутствие координации ато-

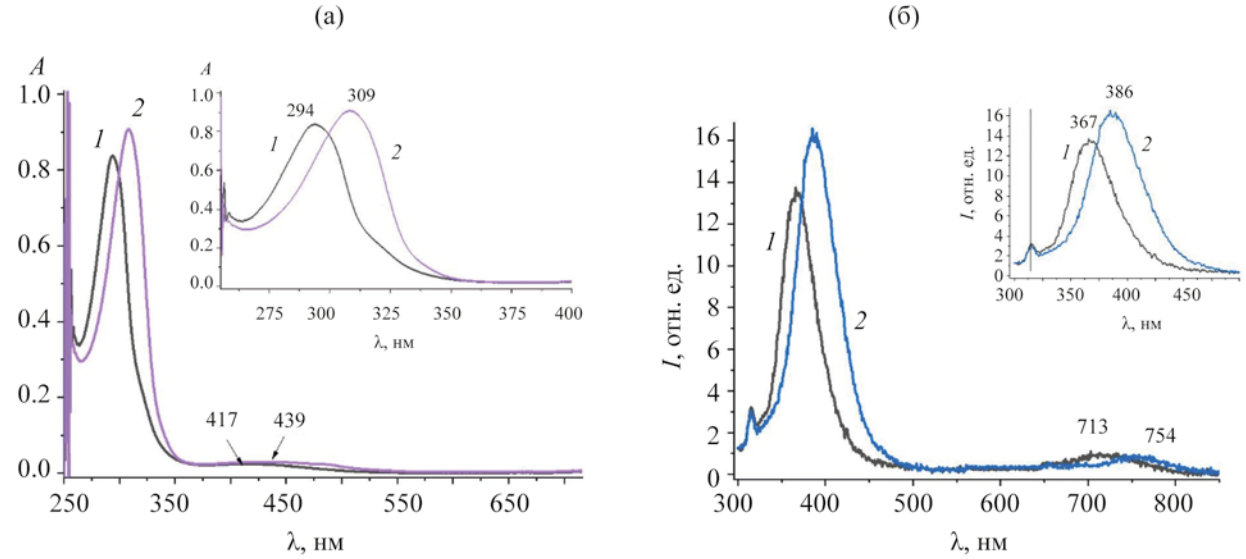


Рис. 1. Электронные спектры поглощения (а) и спектры флуоресценции (б) комплексов меди(II) с кислотой H_3L^1 в ДМСО. *1* – $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$, *2* – $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$. *c* 0.1×10^{-4} (а), 0.1×10^{-6} М. (б).

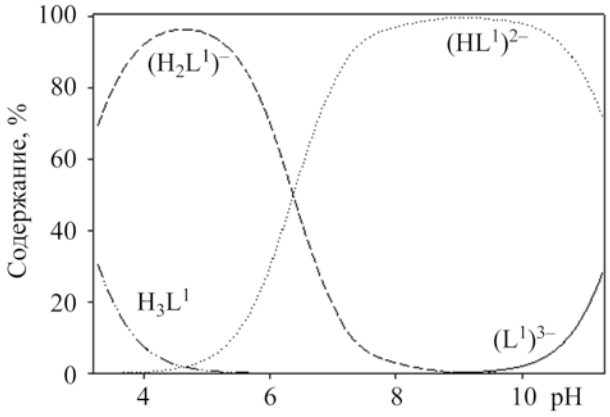


Рис. 2. Распределение химических форм кислоты H_3L^1 в зависимости от pH в воде при 298 K, ионной силе 0.1 M. и аналитической концентрации 1.0 мМ. [27].

ма кислорода фосфорильной группы с катионом меди. По данным ИК спектроскопии, в полученном комплексе также отсутствует ацетат-анион и связь Cu–Cu. Более того, данные элементного анализа (табл. 1), электронные спектры поглощения и спектры флуоресценции этих соединений существенно отличаются (рис. 1). Полученные комплексы $[Cu(HL^1)_2(H_2O)_2]$ и $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ стабильны при комнатной температуре, плохо растворимы в воде и в большинстве неполярных органических растворителях, хорошо растворимы в ДМФА и ДМСО.

На основании анализа аналитических и спектральных характеристик комплексу, полученному из ацетата меди(II), был приписан состав $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$.

Образование комплексов меди(II) с кислотами H_3L^1 различного состава можно объяснить с помощью диаграммы распределения ионных форм кислоты H_3L^1 в зависимости от pH [27]. Согласно ей, при pH < 6 кислота H_3L^1 существует преимущественно в форме аниона $(H_2L^1)^-$, в то время как при pH ≥ 7.5 преобладает анион $(HL^1)^{2-}$ (рис. 2). Взаимодействие этих анионов с катионом меди(II) и приводит к образованию комплексов разного состава – $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ и $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ соответственно.

Комплекс состава $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ был получен с выходом 53.5% взаимодействием кислоты H_3L^1 с сульфатом меди при pH 7.1, что подтверждает вывод о влияния pH среды на состав и структуру образующихся комплексов меди(II) с кислотой H_3L^1.

Вырастить кристалл комплекса $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$, пригодный для рентгеноструктурного анализа не удалось, поэтому нами было проведено моделирование его структуры (рис. 3) квантово-химическим методом с использованием программы Gaussian 06, функционал B3LYP с базисом [6-311+G(d,p)]. Для подтверждения корректности расчетов и выбранного базового набора были проведены квантово-химические расчеты строения комплекса $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$, структура которого однозначно установлена методом РСА [27]. Комплекс $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ представляет собой нейтральное соединение центросимметрично-

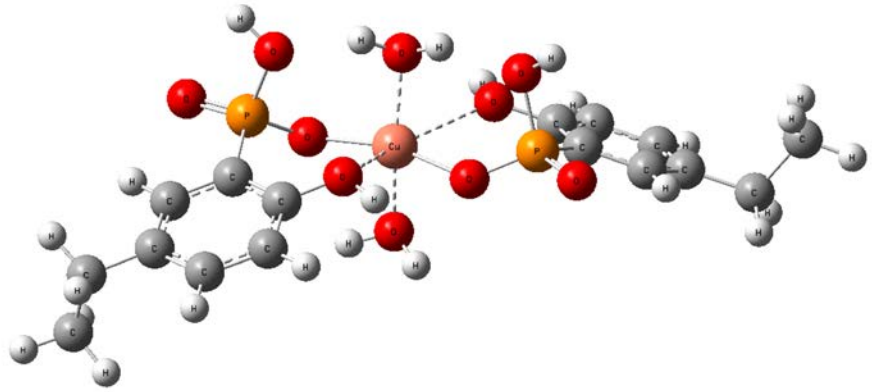


Рис. 3. Строение комплекса $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ по результатам квантово-химических расчетов.

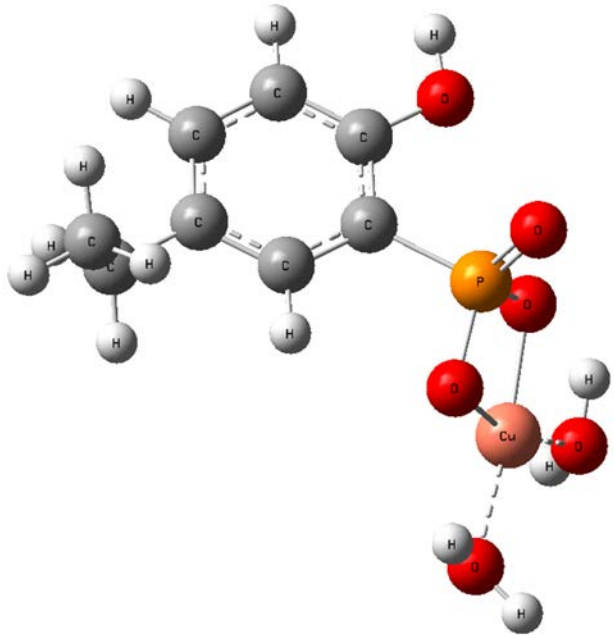


Рис. 4. Строение комплекса $[Cu(HL^1)H_2O)_2]$ по результатам квантово-химических расчетов.

го строения, в котором две молекулы кислоты H_3L^1 входит в состав комплекса в виде бидентатных моноанионов, способных к хелатной координации с катионом Cu^{2+} за счет непротонированного фенольного атома кислорода и одного депротонированного атома кислорода фосфонового фрагмента. Исходя из значений длин связей и углов, основу координационного узла комплекса составляет практически правильный квадрат. В комплекс входят две молекулы воды, которые выступают в качестве аксиальных лигандов, достраивающую координационную сферу катиона меди(II) до координационного числа 6 (рис. 3).

Результаты DFT-расчетов геометрии комплекса $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ хорошо согласуются с данными РСА [27], несмотря на то, что данные РСА относятся к твердой фазе, а расчеты модели комплекса проводились для изолированной молекулы в газовой фазе. В частности, расстояния между координирующими катион Cu^{2+} атомами кислорода кислоты H_3L^1 практически одинаковы: Cu–O(Ph) 2.47 Å (РСА: 2.39 Å); Cu–O(P) 1.92 Å (РСА: 1.96 Å), для участвующего в координации атома кислорода молекулы воды Cu–O(H_2O) 1.99 Å (РСА: 1.97 Å), что доказывает возможность применения алгоритма и выбранного базового набора для расчета строения других координационных соединений меди(II) с 2-гидроксифенил-5-этилфосфоновой кислотой.

По данным квантово-химических расчетов, комплекс $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ представляет собой нейтральное соединение, в который кислота H_3L^1 входит в виде дианиона, координированного с катионом Cu^{2+} посредством депротонированных гидроксигрупп фосфонового фрагмента. В комплекс входят две молекулы воды, которые выступают в качестве лигандов, достраивающих координационную сферу катиона меди до координационного числа 4. Диапазон длин связей в комплексе составляют 1.91–1.92 Å Cu–O(P), 2.06–2.07 Å Cu–O(H_2O) (рис. 4).

Данные о биологических свойствах кислоты H_3L^1 и ее комплексов с катионом меди очень ограничены, тем не менее, они позволяют сделать осторожный вывод перспективности применения этих соединений в качестве потенциальных нестероидных противовоспалительных препаратов. В частности, исследования *in vivo* 2-гидрокси-5-этилфенилфосфоновой кислоты и ее комплекса $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ показали, что анальгетическая активность комплекса значительно выше активности свободной кислоты H_3L^1 и анальгина, который использовался в качестве препарата сравнения [27]. Кроме того, вскрытие лабораторных животных, показало, что в отличие от салициловой кислоты, кислота H_3L^1 и ее комплекс $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ не оказывают ульцерогенного воздействия на желудочно-кишечный тракт в дозах, соответствующих $ЕД_{50}$.

Известно, что изучение токсичности биологически активных соединений является одним из необходимых этапов создания лекарственных препаратов. Применение клеточных культур и соответствующих методик определения биологических свойств новых веществ позволяет уменьшить количество достаточно затратных экспериментов *in vivo*, делает полученные данные прогностически более надежными при их экстраполяции на организм человека. В настоящей работе изучение кислоты H_3L^1 и комплексов $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ и

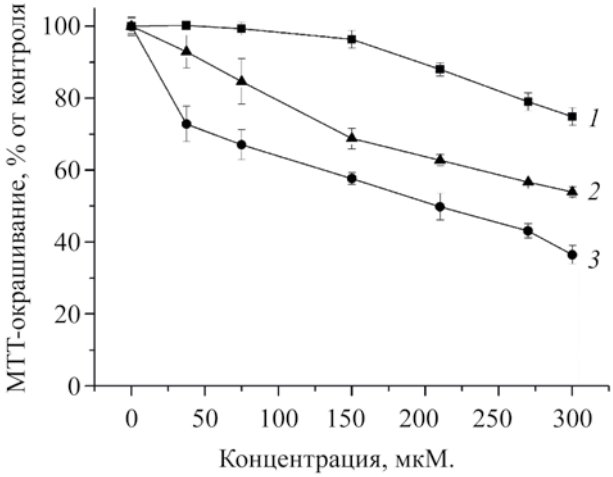


Рис. 5. Зависимость концентрация–эффект для клеток HeLa по результатам МТТ-теста при их обработке кислотой H_3L^1 (*1*) и комплексами $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ (*2*) и $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ (*3*), время инкубации – 48 ч.

$[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ проводили *in vitro* на клетках HeLa аденокарциномы шейки матки человека с использованием МТТ-теста, который считается классическим тестом для скрининга токсических свойств новых соединений. Применение данной методики имеет ряд достоинств: экономичность в использовании, высокая скорость проведения экспериментов, возможность исследования большого количества образцов, высокая воспроизводимость полученных результатов.

Данные по цитотоксичности кислоты H_3L^1 и ее комплексов $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ по результатам МТТ-теста показаны на рис. 5, согласно им, 2-гидрокси-5-этилфенилфосфоновая кислота является малотоксичными соединением: в концентрациях < 300 мкмоль/л практически не оказывает существенного влияния на выживаемость клеток HeLa. Следует отметить, что комплексы меди $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ и $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ также являются малотоксичными соединениями по отношению к клеткам HeLa, при этом их токсичность несколько выше, чем токсичность кислоты H_3L^1. Наибольшей токсичностью в отношении клеток HeLa обладает комплекс $[Cu(HL)(H_2O)_2]$. Результаты исследований цитотоксичности кислоты H_3L и комплекса $[Cu(H_2L)_2(H_2O)_2]$ в целом согласуются с результатами исследований на лабораторных животных [27].

Способность проникать во внутриклеточное пространство является одним из фундаментальных свойств биологически активных веществ, которая во многом определяет спектр их биологической активности, следовательно, подтверждение наличия либо отсутствия внутриклеточного накопления является важным этапом разработки новых лекарственных средств.

Результаты исследования внутриклеточного проникновения комплексов $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ и $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ на клеточной линии HeLa методом флуоресцентной микроскопии приведены на рис. 6. Проведение этого исследования стало возможным благодаря спектральным характеристикам комплексов меди(II) (рис. 1). Инкубацию клеток с комплексами проводили в течение 24 ч, добавляя растворенные в ДМСО $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ и $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ в питательную среду в конечной концентрации 100 мкмоль/л.

По данным флуоресцентной микроскопии (лазерная линия с длиной волны 405 нм), можно сделать вывод о том, что комплексы $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ и $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ проникают через клеточную мембрану клеток HeLa (рис. 6, *2*, *3*). В то время как в контрольных образцах (рис. 6, *1*) при возбуждении лазерной линией при 310–460 нм флуоресценция отсутствует. Факт проникновения и накопления комплекса в клетках HeLa позволяет сделать вывод о возможности применения комплексов 2-гидрокси-5-этилфосфоновой кислоты с изотопами ^{64}Cu и ^{67}Cu меди в качестве потенциальных радиофармацевтических средств терапевтического или диагностического назначения.

Таким образом, исследование взаимодействия 2-гидрокси-5-этилфенилфосфоновой кислоты с различными солями меди(II) в воде показало, что при смешении растворов кислоты и нейтральных растворов перхлората, нитрата и сульфата меди(II), в мольном соотношении 2:1, образуется и выпадает в осадок комплекс голубого цвета состава $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$, в то время как при смешении водных растворов кислоты H_3L^1 и ацетата меди(II), водный раствор, которого имеет pH ≥ 7.5, в мольном соотношении 2:1 выпадает комплекс желтого цвета состава $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$. По данным квантово-химических расчетов в комплекс $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ представляет собой нейтральное соединение, в который кислота H_3L^1 входит в виде

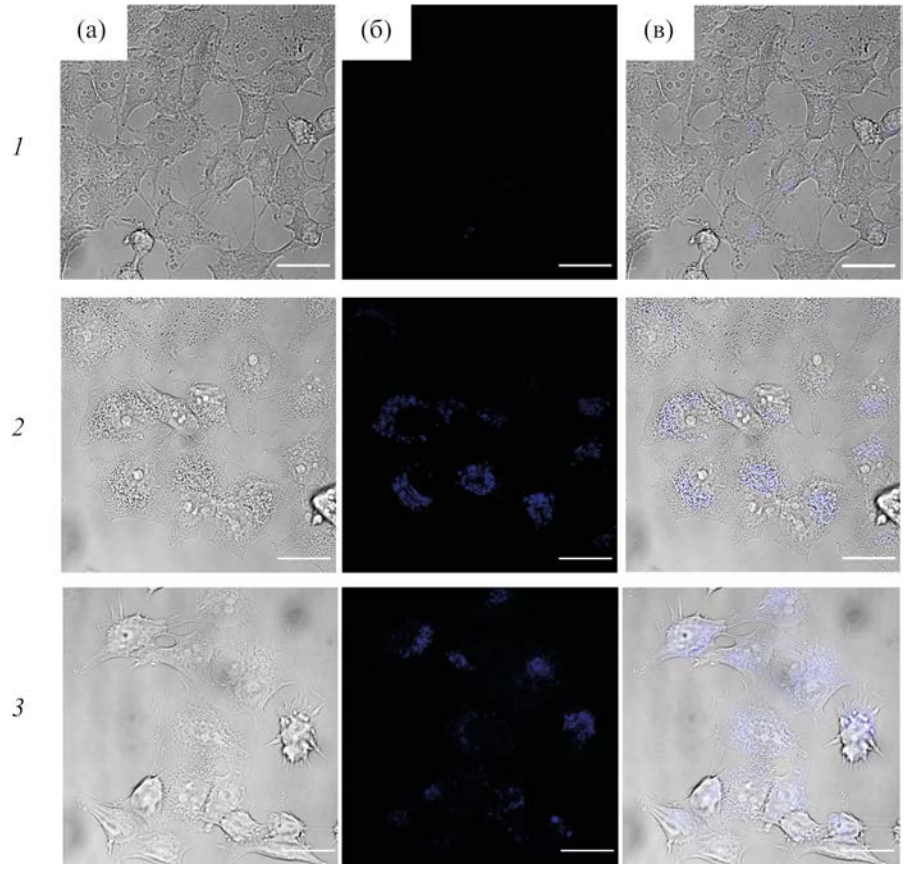


Рис. 6. Конфокальные изображения клеток HeLa без обработки (*1*) и при совместной инкубации в течение 24 ч с комплексами $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ (*2*) и $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ (*3*). (а) – фазовый контраст; (б) – локализация комплекса в клетках; (в) – совмещение изображений. Шкала – 20 мкм.

дианиона, координированного с катионом Cu^{2+} посредством депротонированных гидроксигрупп фосфонового фрагмента. В комплекс входят две молекулы воды, которые выступают в качестве лигандов, достраивающих координационную сферу катиона меди(II) до координационного числа 4.

Установлено, что 2-гидрокси-5-этилфенилфосфоновая кислота является малотоксичными соединением: в концентрациях < 300 мкмоль/л практически не оказывает существенного влияния на выживаемость клеток HeLa. Следует отметить, что комплексы меди $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ и $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ также являются малотоксичными соединениями по отношению к клеткам HeLa, при этом их токсичность несколько выше, чем токсичность кислоты H_3L^1. Наибольшей токсичностью в отношении клеток HeLa обладает комплекс $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$. Результаты исследования цитотоксичности кислоты H_3L^1 и комплекса $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$, в целом подтверждают результаты исследований на лабораторных животных [27].

Согласно данным флуоресцентной микроскопии можно сделать вывод о том, что полученные комплексы меди проникает через клеточную мембрану клеток HeLa, что является весомым аргументом в пользу дальнейшего изучения биологических свойств этих соединений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ^1H и ^{31}P записаны на спектрометре BrukerCXP-200; стандарты – ТМС (внутренний) и 85%-ная H_3PO_4 (внешний). Температуры плавления измерены на приборе Boetius PHMK 05. Анализ содержания углерода и водорода проводили

на C,H,N-анализаторе (Carlo Erba Strumentazione, Италия). Содержание фосфора и меди определяли методом атомной эмиссии с индуктивно связанной плазмой на приборе iCAP-6500 Duo (Thermo Scientific, США). ИК спектры записывали на ИК Фурье-спектрометре Инфралюм ФТ в диапазоне 4000–600 см$^{-1}$ с разрешением 1 см$^{-1}$. Электронные спектры поглощения записывали на спектрометре Cary-60 (двухлучевой), спектральный диапазон – 190–1100 нм. Измерения pH проводили с использованием pH-метра Mettler Toledo при 22°C. Спектры флуоресценции снимали на сканирующем спектрофлуориметре Agilent Cary Eclipse, спектральный диапазон – 190–1100 нм, концентрация раствора – 1 мкМ. (10^{-6} М). Рабочие растворы готовили по точным навескам. DFT-Расчеты синтезированных комплексов меди(II) выполняли с использованием программы Gaussian 06, функционал B3LYP с базисом 6-311+G(d,p).

2-Гидроксифенил-5-этилфосфоновая кислота синтезирована по методу, описанному в работе [27], и была дополнительно очищена от возможных примесей солей на колонке с катионитом Ку-2. Температура плавления, данные элементного анализа и спектров ЯМР ^{1}H и ^{31}P синтезированного образца соответствуют литературным данным. Для получения комплексов меди использовали гексагидрат перхлората меди(II), нитрат меди(II), пентагидрат сульфата меди(II) и ацетат меди(II) марки ХЧ без дополнительной очистки. Комплекс $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ синтезирован по методике, приведенной в работе [27], данные элементного анализа и ИК спектров соответствуют литературным.

Комплекс $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ получен в виде кристаллического осадка желтого цвета, который осаждается при смешивании 5 мл водных растворов, содержащих 0.32 г, (1.58 ммоль) H_3L^1 и 0.3 г (1.65 ммоль) ацетата меди. После фильтрования комплекс промывали водой (3×5 мл) и сушили 12 ч при комнатной температуре на воздухе, затем еще 12 ч под вакуумом в эксикаторе. Выход 0.34 г (72%). ИК спектр, ν, см$^{-1}$: 948 (P–O), 1228 (P=O), 1288 (Ph–O), 1690 [$\delta(H_2O)$], 3198 [$(OH)_{Ph}$], 3330 (H_2O). Найдено, %: C 32.12, 32.09; H 4.28, 4.20; P 10.50, 10.20; Cu 20.40, 20.96. $C_8H_{13}CuO_6P$. Вычислено, %: C 32.06; H 4.37; P 10.33; Cu 21.20.

Комплекс $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$. К раствору 0.20 г (1.0 ммоль) кислоты H_3L^1 в 5 мл дистиллированной воды (pH 1.2) по каплям и перемешивании добавляли свежеприготовленный 0.1 н. раствор едкого натра до pH 7.1. К полученной смеси добавляли раствор 0.35 г (1.0 ммоль) пентагидрата сульфата меди(II) в 5 мл воды. Практически мгновенно выпадал осадок желтого цвета, который отфильтровывали, промывали водой (3×5 мл) и сушили 12 ч при комнатной температуре на воздухе, затем еще 12 ч под вакуумом в эксикаторе. Выход 0.16 г (53.2%). Результаты элементного анализа и спектральные характеристики полученного вещества совпадают с аналогичными данными, полученными для комплекса $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$, полученного из кислоты H_3L^1 и ацетата меди меди(II). Найдено, %: C 38.75, 38.77; H 6.01, 5.93; P 12.01, 11.97; Cu 11.89, 12.40. $C_{16}H_{24}CuO_{10}P_2$. Вычислено, %: C 38.29; H 4.82; P 12.34; Cu 12.66.

Эксперименты по определению цитотоксичности синтезированных комплексов меди(II) проводили на клетках HeLa – аденокарцинома шейки матки человека, полученных из коллекции клеточных культур позвоночных (Санкт-Петербург, Россия). Клетки HeLa были выращены в среде Игла MEM (ПанЭко, Россия), содержащей эмбриональную сыворотку до 10% (HyClone, США), пенициллин (50 ед/мл), стрептомицин (50 мг/мл). Клетки культивировали при 37°C в увлажненной атмосфере воздуха и 5% CO_2. Клетки рассевали в 96-луночные планшеты в концентрации 5×10^4 клеток/мл. Через 24 ч тестируемые соединения, предварительно растворенные в диметилсульфоксиде (ДМСО), вносили в культуральную среду. Конечная концентрация соединений в инкубационной среде находилась в пределах от 37.5 до 300 мкМ. Затем клетки инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере воздуха и 5% CO_2 в течение 48 ч. Для каждой концентрации опыты проводили в трехкратной повторности. Конечная концентрация ДМСО составляла 1% и не была токсичной для клеток. Затем в инкубационную среду вносили 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2*H*-тетразолийбромид (MTT, Sigma-Aldrich) в концентрации 0.5 мг/мл. Окрашивание клеток проводили при 37°C в увлажненной атмосфере воздуха и 5% CO_2 в течение 2 ч. Далее инкубационную среду отбирали и кристаллы образованного MTT-формазана растворяли в 100% ДМСО. Интенсивность окраски определяли при длине волны

536 нм с помощью планшетного ридера Cytation 3 (BioTek, США). За 100% принимали интенсивность окраски контрольных клеток, не обработанных тестируемыми соединениями. С помощью программного обеспечения OriginPro 8 выполняли численный анализ данных, включая статистические операции и построение графика.

Изучение клеточной аккумуляции проводили на клетках HeLa, выращенных на покровных стеклах размером 24×24 мм, при плотности клеточной культуры 15×10^4/2 мл в 6-ти луночных планшетах, которые инкубировали с исследуемыми комплексами меди, растворенными в ДМСО. Конечная концентрация комплексов в инкубационной среде составляла 100 мкМ. Инкубацию с комплексами проводили в течение 24 ч. Далее клетки отмывали от остатков среды раствором PBS_{x1} (фосфатно-солевой буфер) и фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида 30 мин при комнатной температуре. Затем проводили пермеабилизацию в 0.5% растворе Triton X-100 в PBS_{x1} в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее образцы промывали буфером PBS_{x1} и деионизованной водой, сушили при комнатной температуре. Полученные образцы помещали на предметное стекло в каплю фиксатора Mowiol (Sigma-Aldrich, Германия) и заклеивали по периметру лаком. В качестве контроля использовали необработанные тестируемыми соединениями клетки. Изучение накопления комплексов меди в клетках проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). Изображения получали в инвертированном конфокальном режиме с использованием объектива C Plan-Apochromat 63x/1.4 Oil DIC M27. Для возбуждения флуоресценции комплексов использовали лазерное облучение с длиной волны 405 нм, сигнал детектировали в диапазоне длин волн 415–536 нм. Все полученные треки были сохранены в формате .czi. Полученные изображения были обработаны с помощью программы для анализа изображений ImageJ.

Данная статья не содержит описания исследований с использованием в качестве объектов животных или людей.

ФИНАНСОВАЯ ПОДДРЕЖКА

Работа выполнена в рамках государственного задания Института физиологически активных веществ Российской академии наук Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук и при финансовой поддержке Российского научного фонда (№ 22-13-00051, биологические исследования; проект № 21-43-00020, который реализуется совместно с Государственным фондом естественных наук Китая (NSFC), грант партнера № 52061135204, синтез лигандов и их медных комплексов, квантово-химические расчеты). Биологические исследования выполнены на оборудовании центра коллективного пользования Института физиологически активных веществ Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Zhang C., Lippard S.* // Curr. Opin. Chem. Biol. 2003. Vol. 7. P. 481. doi 10.1016/s1367-5931(03)00081-4
2. *Hambley T.* // Science. 2007. Vol. 318. P. 1392. doi 10.1126/science.1150504
3. *Barry N., Sadler P.* // ACS Nano. 2013. Vol. 7. P. 5654. doi 10.1021/nn403220e.
4. *Patra M., Gasser G.* // Chem. Biochem. 2012. Vol. 13. P. 1232. doi 10.1002/cbic.201200159
5. *Yu G., Jiang M., Huang F., Chen X.* // Curr. Opin. Chem. Biol. 2021. Vol. 61. P. 19. doi 10.1016/j.cbpa.2020.08.0076
6. *Pöthig A., Casini A.* // Theranostics. 2019. Vol. 9. P. 3150. doi 10.7150/thno.31828-6
7. *Mehrotra R., Bohra R., Gaur D.* Metal β-diketonates and allied derivatives. London; New York: Academic Press, 1978. P. 382.
8. *Solomon E., Heppner D., Johnston E., Ginsbach J., Cirera J., Qayyum M., Kieber-Emmons M., Kjaergaard C., Hadt R., Tian L.* // Chem. Rev. 2014. Vol. 114. P. 3659. doi 10.1021/cr400327t
9. *Hussain A., AlAjmi M., Rehman M., Rehman M., Amir S., Husain F., Alsalme A., Siddiqui M., AlKhedhairy A., Khan R.* // Sci. Rep. 2019. Vol. 9. P. 5237. doi 10.1038/s41598-019-41063-x
10. *Iakovidis I., Delimaris I., Piperakis S.* // Mol. Biol. Int. 2011. P. 594529. doi 10.4061/2011/594529
11. Tabti1 R., Tounsi N., Gaiddon C., Bentouhami *E., Désaubry L.* // Med. Chem. 2017. Vol. 75. P. 875. doi 10.4172/2161-0444.1000445

12. *Dalecki A., Crawford C., Wolschendorf F.* // Rev. Adv. Microb. Physiol. 2017. Vol. 70. P. 193. doi 10.1016/bs.ampbs.2017.01.007
13. *Arredondo M., Nunez M.* // Mol. Aspects Med. 2005. Vol. 26. N 4–5. P. 313. doi 10.1016/j.mam.2005.07.010
14. *Uriu-Adams J., Keen C.* // Mol. Aspects Med. 2005. Vol. 26. N 4–5. P. 268. doi 10.1016/j.mam.2005.07.015
15. *Crisponi G., Nurchi V., Fanni D., Gerosa C., Nemolato S., Faa G.* // Coord Chem Rev. 2010. Vol. 254 P. 876. doi 10.1016/j.ccr.2009.12.018
16. *Weder J., Dillon C., Hambley T., Kennedy T., Lay B., Biffin P., Regtop J., Davies H.* // Coord Chem Rev. 2002. Vol. 232. P. 95. doi 10.1016/s0010-545(02)00086-3.
17. *Muñoz C., López M., Olivares M., Pizarro F., Arredondo M., Araya M.* // Eur. Cytokine Netw. 2005. Vol. 16. N 4. P. 261.
18. *Ott I, Gust R.* // Arch. Pharm. Chem. Life Sci. 2007. Vol. 340. N 3. P. 117. doi 10.1002/ardp.200600151
19. *González-Vílchez F., Vilaplana R.* Metallotherapeutic Drugs and Metal-Based Diagnostic Agents. The Use of Metals in Medicine. New York: John Wiley & Sons, Ltd., 2005. P. 219. doi 10.1002/0470864052.ch12
20. *Szymański P., Frączek T., Markowicz M., Mikiciuk-Olasik E.* // Biometals. 2012. Vol. 25. P. 1089. doi 10.1007/s10534-012-9578-y
21. *Орлов А.П., Трофимова Т.П., Орлова М.А.* // Изв. АН. Сер. хим. 2022. № 3. С. 415; *Orlov A.P., Trofimova T.P., Orlova M.A.* // Russ. Chem. Bull. 2022. Vol. 71. N 3. P. 415. doi 10.1007/s11172-022-3429-y
22. *Ekinciz D., Senturk M., Kufrevioglu O.* // Expert Opin Ther Pat. 2011. Vol. 21. N 12. P. 1831. doi 10.1517/13543776.2011.636354
23. *Amann R., Peskar B.* // Eur. J. Pharmacol. 2002. Vol. 447. P. 1. doi 10.1016/s0014-2999(02)01828-9
24. *Egorova K., Gordeev E., Ananikov V.* // Chem. Rev. 2017. Vol. 117. P. 7132. doi 10.1021/acs.chemrev.6b00562
25. *Rodriguez-Aller M., Guillarme D., Veuthey J.-L., Gurny R.* // J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2015. Vol. 30. P. 342. doi 10.1016/j.jddst.2015.05.009
26. Баулин В.Е., *Калашникова И.П., Вихарев Ю.Б., Вихарева Е.А., Баулин Д.В., Цивадзе А.Ю.* // ЖОХ. 2018. № 9. С. 1438; *Baulin V.E., Kalashnikova I.P., Vikharev Yu.B., Vikhareva E.A., Baulin D.V., Tsivadze A.*Yu. // Russ. J. Gen. Chem. 2018. Vol. 88. N 9. P. 1786. doi 10.1134/S0044460X18090044
27. *Иванова И.С., Цебрикова Г.С., Лапшина М.А., Рогачева Ю.И., Илюхин А.Б, Соловьев В.П., Пятова Е.Н., Баулин В.Е.* // Изв. АН. Сер. хим. 2022. № 11. С. 2365; *Ivanova I.S., Tsebrikova G.S., Lapshina M.A., Rogacheva Yu.I., Ilyukhin A.B., Solov'ev V.P., Pyatova E.N., Baulin V.E.* // Russ. Chem. Bulletin. Vol. 71. N 11. P. 2365. doi 10.1007/s11172-022-3664-2
28. *Иванова И.С., Цебрикова Г.С., Рогачева Ю.И., Илюхин А.Б., Соловьев В.П., Пятова Е.Н., Баулин В.Е.* // ЖНХ. 2021. Т. 66. № 12. С. 1723; *Ivanova I.S., Tsebrikova G.S., Rogacheva Yu. I., Ilyukhin A.B., Solov'ev V.P., Pyatova E.N., Baulin V.E.* // Russ. J. Inorg. Chem. 2021. Vol. 66. N 12. P. 1846. doi 10.1134/S0036023621120068

Copper(II) Complexes with 2-Hydroxy-5-ethylphenylphosphosphonic Acid: Synthesis, Structure, Cytotoxicity, and Accumulation in Hela Cells

Yu. I. Rogacheva[a], M. A. Lapshina[a], and V. E. Baulin[a,*]

Institute of Physiologically Active Substances of the Federal Research Center for Problems of Chemical Physics and Medicinal Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, 1142432 Russia
**e-mail: mager1988@gmail.com*

Received April 25, 2023; revised May 22, 2023; accepted May 23, 2023

In order to study the physicochemical and biological properties of the coordination compounds of bioactive metal ions with 2-hydroxyphenylphosphonic acid derivatives, the reaction of 2-hydroxy-5-ethylphenylphosphonic acid (H_3L^1) with copper(II) perchlorate, sulfate, nitrate, and acetate in water was studied for the first time. It has been established that, regardless of the ratio of reagents, in the case of copper(II) perchlorate, sulfate, and nitrate, a complex of the composition $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ is formed in high yield, while in the case of using copper(II) acetate a complex $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ is formed, the composition of which is established on the basis of a combination of elemental analysis data, IR and electronic spectra. Quantum-chemical calculations of the structure of $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ and $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ complexes were performed for the first time by the density functional theory (DFT) method. The cytotoxic properties of H_3L^1 acid and copper complexes $[Cu(HL^1)(H_2O)_2]$ and $[Cu(H_2L^1)_2(H_2O)_2]$ with respect to HeLa tumor cells of human cervical adenocarcinoma were studied. The accumulation of the resulting copper(II) complexes in HeLa cells was proved by laser confocal microscopy.

Keywords: 2-hydroxy-5-ethylphenylphosphonic acid, copper(II) complexes, Hela cells, laser confocal microscopy