

**СИНТЕЗ И ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ГАЛОГЕНИДНОГО ЗАМЕСТИТЕЛЯ НА
ЛЮМИНЕСЦЕНТНЫЕ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА
АЦИЛГИДРАЗОНОВ И КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ Zn(II)
НА ИХ ОСНОВЕ**

Новоселова Полина Ильинична^{1,2}, 11 класс

Руководители работы: Зорина-Тихонова Екатерина Николаевна, с.н.с., к.х.н.²

Матюхина Анна Константиновна, м.н.с.²

¹ГБОУ города Москвы «Школа на Юго-Востоке имени Маршала В. И. Чуйкова»,
111033, Москва, Таможенный проезд-4, 1303@schuv.ru.

²Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН,
119991, Москва, Ленинский проспект, 31, kamphor@mail.ru.

Е-mail участника: polinochka.novoselova@gmail.com

Аннотация

Получены новые ацилгидразоны на основе 3-аминобензгидразида, а так же комплексы Zn(II) на их основе. Описан синтез, строение ацилгидразонов и комплексов, исследованы люминесцентные и цитотоксические свойства. Обнаружено изменение цвета люминесценции с оранжевого на зеленый или белый при координации ацилгидразонов к атомам металла. Для комплексов выявлена цитотоксическая активность к культурам клеток HeLa (аденокарцинома шейки матки человека) и A549 (аденокарцинома легкого человека). Комплекс, содержащий в структуре бром, показал более долгое время затухания люминесценции и проявил лучшую активность в отношении обеих культур.

Ключевые слова: ацилгидразоны, координационные соединения цинка, люминесценция, цитотоксичность.

Введение

В области борьбы со злокачественными опухолями исследования в последние годы лишь набирают обороты. Так, по данным ВОЗ [1], онкологические заболевания по сей день занимают ведущую позицию в списке причин смерти в мире, поэтому столь актуально создание новых биоактивных молекул - компонентов универсальных лекарственных препаратов с минимальным риском резистентности. Несмотря на многочисленные успехи в этой области, по-прежнему необходимы усовершенствования существующих методов и подходов. Большинство современных противоопухолевых препаратов представляет собой координационные соединения, содержащие платиновые металлы в качестве центрального атома, поэтому такие соединения являются токсичными и для нормальных клеток организма [2].

Создание препаратов на основе биометаллов, например, цинка может стать решением данной проблемы [3]. Этот металл один из наиболее распространенных в организме человека. Он проявляет отличную биосовместимость, отвечает за рост и развитие костной и мышечной тканей, участвует в формировании полноценного иммунного ответа, секреторной активности сальных желез, а также поддержании здоровья кожи, волос, ногтей, зубов.

Однако кроме подавления уже обнаруженных злокачественных образований важна и их диагностика. Перспективным методом биовизуализации считаются флуоресцентные комплексы металлов, выступающие в роли сенсоров [4]. В этом амплуа цинк за счет своей электронной структуры (полностью заполненная d-орбиталь) в различных комплексных соединениях способен проявлять люминесцентные свойства [5].

Помимо центрального атома металла необходим эффективный выбор и лиганда. Так, ацилгидразоны – класс соединений с общей формулой $R^1-CO-NH-N=C-R^2R^3$, где R^1-R^3 алифатические или ароматические заместители. Эти соединения известны своей разнообразной биоактивностью, в том числе и противоопухолевыми свойствами [6]. Благодаря наличию иминового протона ацилгидразоны способны проявлять люминесценцию, которая может быть усилена при координации к d-металлам [7].

Актуальность тематики проекта

Остро стоит вопрос о более доступных, безопасных и универсальных препаратах для противоопухолевой терапии и методов диагностики онкологических заболеваний, что стимулирует поиск новых соединений с улучшенными фармакологическими свойствами. Это дает толчок к поиску и синтезу таких молекулярных систем, которые могли бы сочетать в себе люминесцентные и цитотоксические свойства. Так, координационные соединения на основе цинка с потенциальными биоактивными лигандами представляют из себя перспективное направление для решения указанных проблем.

Цели и задачи

Целью данной работы являлось исследование влияния галогенидного заместителя в ацилгидразонах и комплексах Zn(II) на их основе на люминесцентные свойства и цитотоксичность в отношении клеток HeLa (аденокарцинома шейки матки человека) и A549 (аденокарцинома легкого человека).

Для выполнения цели были поставлены следующие **задачи**:

- Синтез ацилгидразонов на основе 3-аминобензгидразида и координационных соединений Zn(II). Выделение полученных продуктов в кристаллическом виде;
- Установление строения полученных соединений, сравнительный анализ;
- Изучение люминесцентных свойств полученных соединений;
- Изучение цитотоксичности комплексных соединений.

Материалы и методы выполнения проекта

Синтез соединений проводили с использованием коммерчески доступных растворителей: этанола (EtOH, 96%, Химмед), диметилформамида (98%, Aldosa), и реактивов: Zn(OAc)₂·2H₂O (ч, Химмед), ZnCl₂ (ч, Химмед), триэтиламина (Et₃N, хч, Реахим), 3-аминобензгидразида (95%, ABCR), 5-хлорсалицилового альдегида (98%, ThermoScientific), 5-бромсалицилового альдегида (>98%, TCI), 1,2-бис(2-пиридил)этилена (2-bpe, 97%, Aldrich), 1,2-бис(4-пиридил)этилена (4-bpe, 97%, Aldrich).

Оборудование: лабораторная посуда (химические стаканы, воронки, шпатели, чашки Петри, пробирки), фильтры обеззоленные «Мелиор», магнитная мешалка с подогревом, аналитические весы «Acculab», автоматический дозатор.

Методы исследования: рентгеноструктурный анализ, рентгенофазовый анализ. Исследования выполнены м.н.с. А.К. Матюхиной (РСА) и с.н.с., к.х.н. Н.В. Гоголевой (РФА) на дифрактометрах центра коллективного пользования ИОНХ РАН. Исследование люминесцентных свойств выполнено сотрудниками ФИАН РАН, г. Москва. Исследование цитотоксичности выполнено м.н.с. А.А. Глобой в ФИЦ ПХФ и МХ РАН, г. Черноголовка.

Синтез 3-амино-N'-(5-хлор-2-гидроксibenзилиден)бензгидразида (H_2L^{Cl}): В химическом стакане растворяли 3-аминобензгидразид (1.000 г, 6.623 ммоль) в 50 мл EtOH, к нему приливали раствор 5-хлорсалициловый альдегида (1.004 г, 6.623 ммоль) в 50 мл EtOH. Полученный светло-желтый раствор перемешивали в течение трех часов под крышкой при 75°C. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры и медленно упаривали на воздухе до образования темно-желтых кристаллов, пригодных для РСА. Кристаллы отфильтровывали, промывали холодным EtOH (–5°C) и высушивали на воздухе. Выход 1.708 г (89% в пересчете на 3-аминобензгидразид).

Синтез 3-амино-N'-(5-бром-2-гидроксibenзилиден)бензгидразида (H_2L^{Br}): Методика аналогична H_2L^{Cl} . Соотношение реагентов: 3-аминобензгидразид (0.600 г, 3.973 ммоль), 5-бромсалициловый альдегида (0.800 г, 3.980 ммоль). Цвет кристаллов оранжевый. Выход 1.025 г (77% в пересчете на 3-аминобензгидразид).

Синтез $\{[Zn(HL^{Cl})Cl] \cdot 2DMF\}_n$ (1): В химическом стакане растворяли H_2L^{Cl} (0.106 г, 0.368 ммоль) в 20 мл EtOH при 60°C. К раствору добавляли Et_3N (0.051 мл, 0.368 ммоль), затем $ZnCl_2$ (0.050 г, 0.368 ммоль). Наблюдали помутнение раствора. К реакционной смеси приливали 10 мл DMF и после растворения осадка перемешивали при 60°C в течение 3 часов. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры и медленно упаривали на воздухе до образования светло-желтых кристаллов, пригодных для РСА. Кристаллы отфильтровывали, промывали холодным EtOH (–5°C) и высушивали на воздухе. Выход 0.049 г (25% в пересчете на $ZnCl_2$).

Синтез $\{[Zn(HL^{Br})Cl] \cdot 2DMF\}_n$ (2): Методика аналогична 1. Соотношение реагентов: H_2L^{Br} (0.123 г, 0.368 ммоль), Et_3N (0.051 мл, 0.368 ммоль), $ZnCl_2$ (0.050 г, 0.368 ммоль). Цвет кристаллов светло-желтый. Выход 0.041 г (20% в пересчете на $ZnCl_2$).

Синтез $\{[Zn(L^{Cl})] \cdot 2DMF\}_n$ (3): В химическом стакане на магнитной мешалке растворяли H_2L^{Cl} (0.066 г, 0.227 ммоль) в 10 мл DMF при 60°C. Далее к раствору добавляли Et_3N (0.031 мл, 0.227 ммоль) и $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ (0.050 г, 0.227 ммоль). Реакционную смесь (I) перемешивали при нагревании до полного растворения. В другом химическом стакане растворяли 2-бре (0.041 г, 0.227 ммоль) в 10 мл EtOH (раствор II). По методу медленной диффузии на дно пробирки медленно

приливали раствор I, затем прослойку из 10 мл смеси DMF : EtOH = 1 : 1, после чего раствор II. Спустя две недели после полного смешения содержимого пробирки, растворе переливали в химический стакан, закрыли пленкой. Через два месяца образовывались желтые кристаллы, пригодные для PCA.

Синтез $\{[Zn(L^{Br})] \cdot 2DMF\}_n$ (4): Методика аналогична 3. Соотношение реагентов: H_2L^{Br} (0.076 г, 0.227 ммоль), Et_3N (0.051 мл, 0.368 ммоль), $Zn(OAc)_2 \cdot 2H_2O$ (0.050 г, 0.227 ммоль), 4-бре (0.041 г, 0.227 ммоль). Цвет кристаллов желтый.

Полученные результаты

Были получены по реакции конденсации, выделены в кристаллическом виде и охарактеризованы методом рентгеноструктурного анализа 3-амино-N'-(5-хлор-2-гидроксibenзилиден)бензгидразид (H_2L^{Cl}) и 3-амино-N'-(5-бром-2-гидроксibenзилиден)бензгидразид (H_2L^{Br}) (рис. 1).

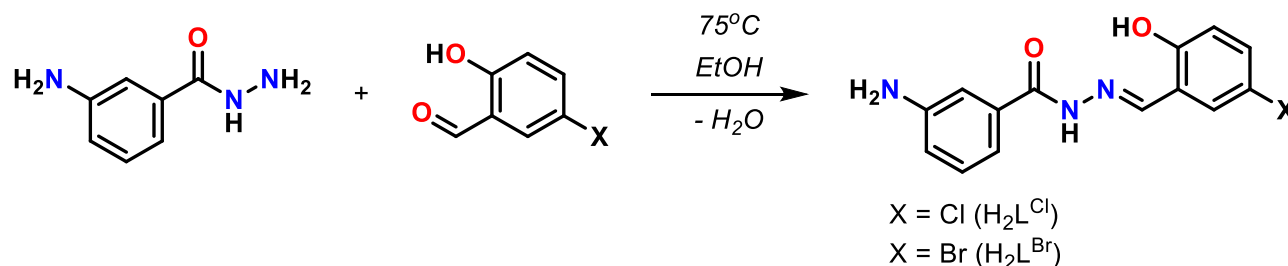


Рис. 1. Общая схема синтеза ацилгидразонов

При добавлении к H_2L^{Cl} хлорида Zn(II) в присутствии Et_3N был получен 1D-полимерный комплекс $\{[Zn(HL^{Cl})Cl] \cdot 2DMF\}_n$ (1). Замена H_2L^{Cl} на второй ацилгидразон (H_2L^{Br}) приводит к образованию изоструктурного комплекса $\{[Zn(HL^{Br})Cl] \cdot 2DMF\}_n$ (2).

По данным рентгеноструктурного анализа в обоих комплексах координация ацилгидразонового лиганда осуществляется через азометиновый атом азота (N1), атом азота аминогруппы (N3), карбонильный атом кислорода (O1) и фенильный атом кислорода (O2). При помощи атомов O2 мооядерные фрагменты связываются попарно (рис. 2а), а за счет атомов N3 из таких «пар» образуется бесконечная цепь (рис. 2б). Молекулы DMF находятся в кристаллической решетке в качестве сольватов. Ацилгидразон в комплексе монодепротонирован, и общий заряд

компенсируется хлорид-анионом, сохраняющимся из исходной соли. Таким образом, координационное окружение атомов Zn(II) соответствует октаэдрическому (таблица 1).

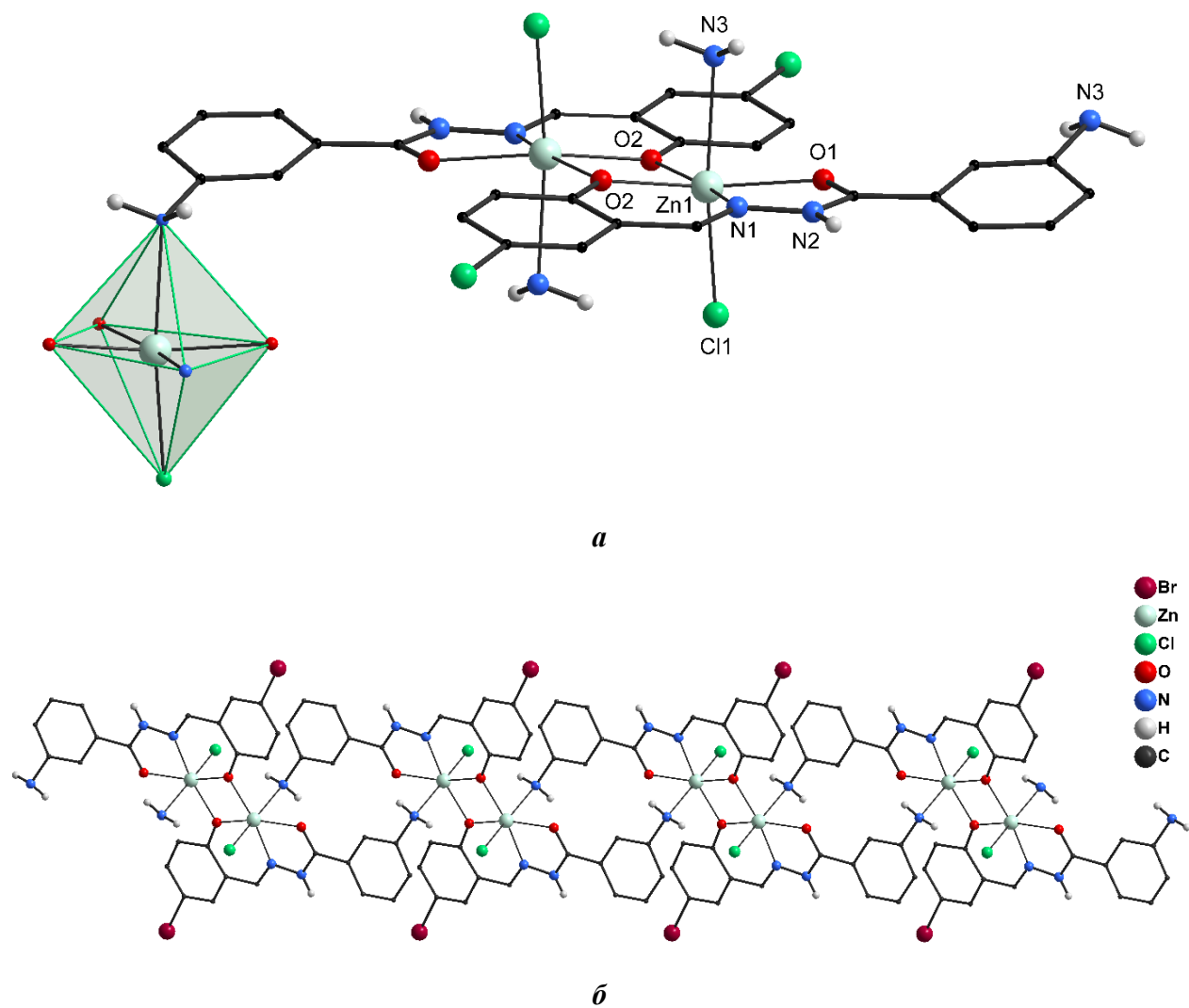


Рис. 2. Фрагмент комплекса **1** с выделенным координационным полиэдром (*a*), фрагмент цепи комплекса **2** (*б*). Атомы водорода при углеродных атомах и сольватные молекулы не показаны.

Таблица 1. Основные длины связей в комплексах **1** и **2** (Å).

Соединение/связь	Zn–N1	Zn–N3	Zn–O1	Zn–O2	Zn–Cl
1	2.119	2.377	2.103	2.036–2.065	2.393
2	2.115	2.373	2.101	2.044–2.060	2.391

При использовании ацетата цинка(II) в качестве исходной соли по методике «one-pot» не удалось получить кристаллический продукт. Изоструктурные комплексы $\{[\text{Zn}(\text{L}^{\text{Cl}})] \cdot 2\text{DMF}\}_n$ (**3**) и $\{[\text{Zn}(\text{L}^{\text{Br}})] \cdot 2\text{DMF}\}_n$ (**4**) были получены в результате медленного смешения и в присутствии дополнительных N-донорных соединений – 1,2-бис(*m*-пиридил)этилена (*m* = 4 (**3**), 2 (**4**)). Молекулы 2-бре и 4-бре в структуру не вошли.

Хелатно-мостиковая координация ацилгидразона аналогична комплексам **1** и **2**, однако замена хлорида цинка на ацетат приводит к образованию комплексов, в которых координационное число металла снижается до 5 (рис. 3*a*, *б*) и окружение соответствует квадратной пирамиде (таблица 2). Здесь ацетат-анион из исходной соли цинка(II), в отличие от хлорид-аниона, не входит в состав комплексов. Также реализуется двойное депротонирование ацилгидразона для сохранения нейтрального заряда комплекса.

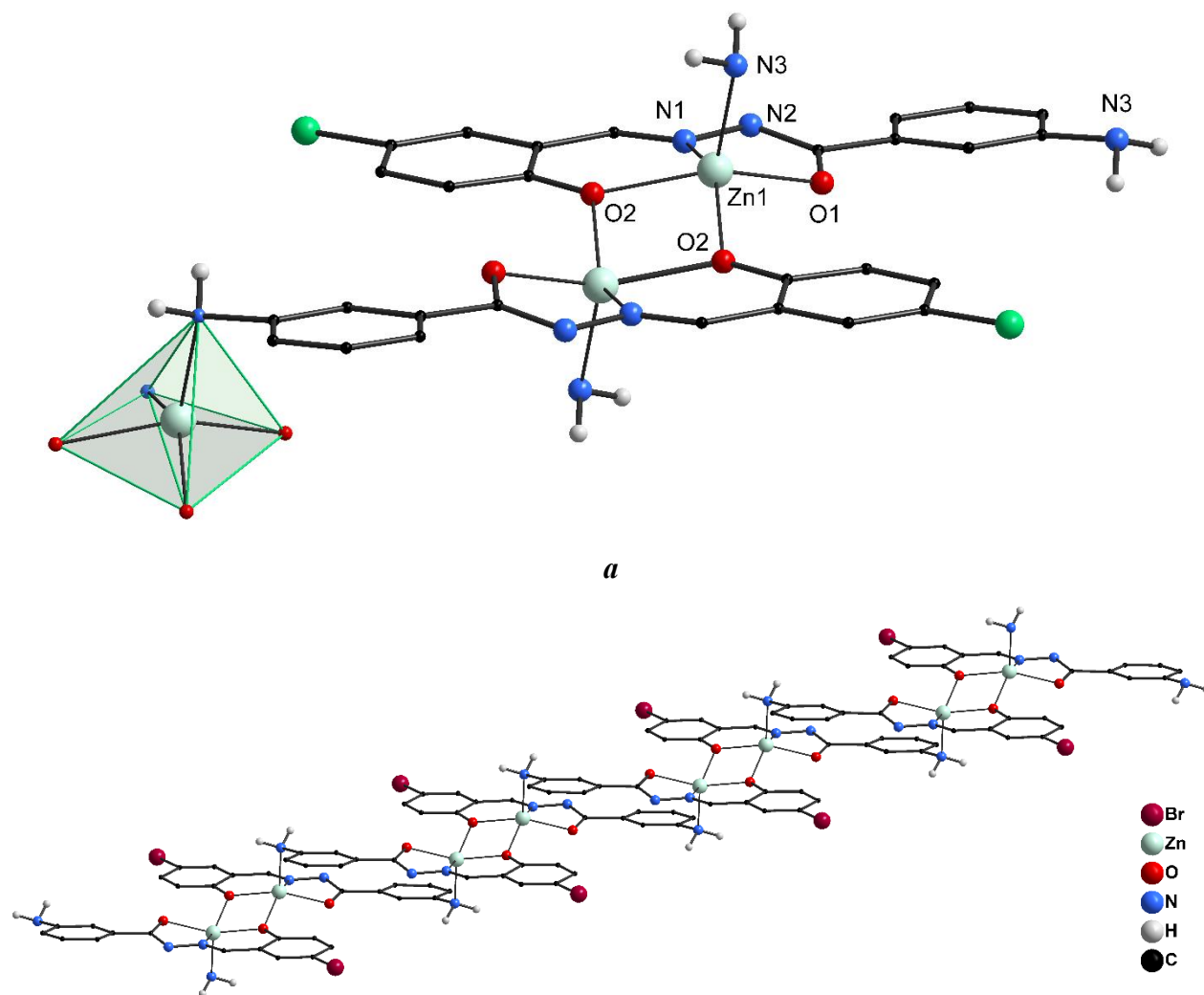


Рис. 3. Фрагмент комплекса 3 с выделенным координационным полиэдром (а), цепь комплекса 4 (б). Атомы водорода при углеродных атомах и сольватные молекулы не показаны.

Таблица 2. Основные длины связей в комплексах 3 и 4 (Å).

Соединение/связь	Zn–N1	Zn–N3	Zn–O1	Zn–O2
3	2.056	2.075	2.035	2.028–2.083
4	2.069	2.074	2.034	2.054–2.062

Для исследования люминесцентных и цитотоксических свойств были выбраны комплексы **1**, **2** и соответствующие ацилгидразоны, так как они достаточно просты в получении и по данным РФА не разрушаются на воздухе и не содержат примесей. Ацилгидразоны $\text{H}_2\text{L}^{\text{Cl}}$ и $\text{H}_2\text{L}^{\text{Br}}$ при возбуждении светом с длиной волны 440 нм демонстрируют схожий оранжевый цвет (Рис. 4). Комплексообразование приводит к изменению цвета на зеленый для комплекса **1** и на практически белый для комплекса **2**.

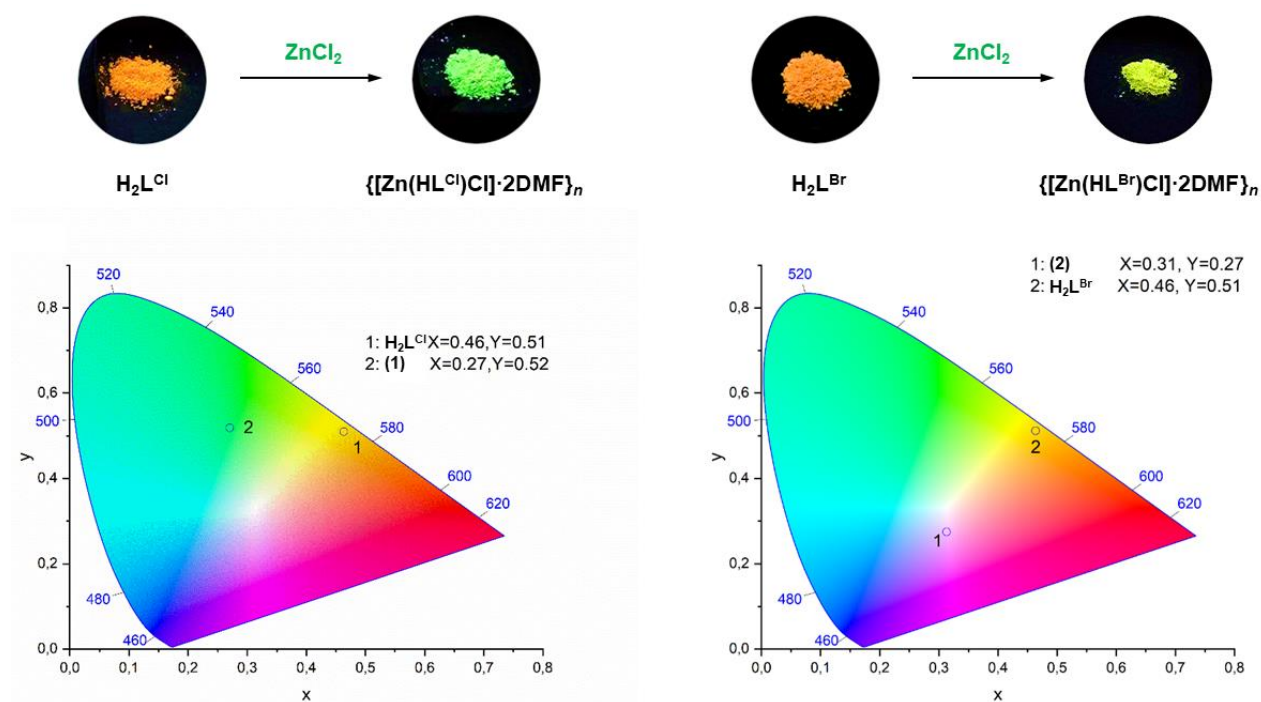


Рис. 4.

Цветовая диаграмма люминесценции для H_2L^{Cl} , H_2L^{Br} , комплексов 1 и 2.

Исследование кинетики люминесценции показало, что время затухания люминесценции для комплекса 1 составляет ~3 нс, для H_2L^{Cl} – 5 нс. То есть, комплексообразование с ионами Zn^{2+} в данном случае не приводит к заметного изменению. Кинетика люминесценции комплекса 2 характеризуется более длительным временем затухания (9 нс), в то время как для свободного ацилгидразона значение составляет те же 5 нс. То есть в случае бромзамещенного ацилгидразона H_2L^{Br} комплексообразование приводит к увеличению времени свечения.

Для комплексов 1 и 2 была изучена цитотоксичность к культурам клеток человека HeLa (аденокарцинома шейки матки) и A549 (аденокарцинома легкого) с определением значений концентраций полумаксимального ингибирования IC_{50} (таблица 3).

Таблица 3. Значения IC_{50} (μM) для тестируемых комплексов.

Соединение/клеточная линия	HeLa	A549
1	2.72 ± 0.05	19.10 ± 1.50
2	2.15 ± 0.06	11.51 ± 0.11

Из результатов в таблице видно, что клеточная линия HeLa более чувствительна к воздействию соединений **1** и **2**, чем линия клеток A549. Значения IC_{50} на линии HeLa лежат в диапазоне от 2 до 3 μM , что говорит о достаточной цитотоксической активности (высокая цитотоксичность соединений $<1 \mu M$). Комплекс **2**, содержащий Br в качестве заместителя в фенильном кольце, выявил большую активность в отношении обоих штаммов, нежели комплекс **1** с Cl-заместителем. Это указывает на большую перспективность бромсодержащих ацилгидразонов и комплексов на их основе.

Выводы

Были синтезированы и охарактеризованы методом PCA новые 1D-полимеры Zn(II) с хлор- и бромзамещенными ацилгидразонами. Показано, что при варьировании исходных солей образуются соединения, в которых атомы металла имеют различное координационное окружение. Реакции получения $\{[Zn(HL^{Cl})Cl] \cdot 2DMF\}_n$ (**1**) и $\{[Zn(HL^{Br})Cl] \cdot 2DMF\}_n$ (**2**) оказались наиболее простыми и масштабируемыми, что позволило наработать соединения в необходимом для исследований количестве.

Измерение люминесценции показало оранжевое свечение для свободных ацилгидразонов HL^{Cl} и HL^{Br} . Координация их к атомам Zn(II) привела к изменению цвета на зеленый для **1** и на практически белый для **2**. Наибольшее время затухание люминесценции было обнаружено для полимера **2**. Проведенное исследование **1** и **2** на проявление цитотоксичности в отношении опухолевых клеток HeLa и A549 выявило достаточные значения для обоих комплексов. Причем комплекс **2**, содержащий бром, выявил большую активность в отношении обеих клеточных культур.

Таким образом, полученные координационные соединения цинка(II) проявляют себя как бифункциональные молекулы, обладающие противоопухолевой активностью и фотолюминесцентными свойствами. Наличие атомов брома играет важную роль в структуре полимеров, так как приводит к большей эффективности с точки зрения как люминесценции, так и цитотоксичности.

Список литературы

- [1] J. Ferlay, M. Colombet, Is. Soerjomataram, D. M. Parkin, M. Piñeros, A. Znaor, F. Bray. Cancer statistics for the year 2020: An overview. *Int. J. Cancer* **2021**, 149, 778–789. Doi: 10.1002/ijc.33588.
- [2] N. Farrell. DNA Binding and Chemistry of Dinuclear Platinum Complexes. *Comments Inorg. Chem.* **1995**, 16, 373–389. Doi: 10.1080/02603599508035777.
- [3] M. Pellei, F. D. Bello, M. Porchia, C. Santini. Zinc coordination complexes as anticancer agents. *Coord. Chem. Rev.* **2021**, 445, 214088. Doi: 10.1016/j.ccr.2021.214088.
- [4] A. B. Chinen, C. M. Guan, J. R. Ferrer, S. N. Barnaby, T. J. Merkel, C. A. Mirkin. Nanoparticle Probes for the Detection of Cancer Biomarkers, Cells, and Tissues by Fluorescence. *Chem. Rev.* **2015**, 115, 10530–10574. Doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00321.
- [5] J. Tang, H.-Y. Yin, J.-L. Zhang. Inorganic and Organometallic Transition Metal Complexes with Biological Molecules and Living Cells (Chapter I). *Academic Press*. **2017**, 1–53. Doi: 10.1016/B978-0-12-803814-7.00001-0.
- [6] X. Yu, L. Shi, S. Ke. Acylhydrazone derivatives as potential anticancer agents: Synthesis, bio-evaluation and mechanism of action. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, 25, 5772–5776. Doi: 10.1016/j.bmcl.2015.10.069.
- [7] N. Kumari, S. Singh, M. Baral, B. K. Kanungo. Schiff Bases: A Versatile Fluorescence Probe in Sensing Cations. *J. Fluoresc.* **2023**, 33, 859–893. Doi: 10.1007/s10895-022-03135-6.