

УДК 541.122:541.49+546.593

О ВЗАИМОДЕЙСТВИИ КОМПЛЕКСОВ ЗОЛОТА(III) С СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. И. В. Миронов^a, *, В. Ю. Харламова^a

^aИнститут неорганической химии им. А.В. Николаева СО РАН,
пр-т Академика Лаврентьева, 3, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: imir@niic.nsc.ru

Поступила в редакцию 24.04.2023 г.

После доработки 29.05.2023 г.

Принята к публикации 06.06.2023 г.

Изучено взаимодействие комплексов золота(III) $(\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+)$, $\text{Au}(\text{phen})(\text{OH})_2^+$ и $\text{Au}(\text{dien-H})(\text{Cl})^+$ с сывороточным альбумином человека (HSA) в водном растворе (pH 7.4, $C_{\text{NaCl}} = 0.2 \text{ M}$, $C_{\text{Au}} = (2-10) \times 10^{-5} \text{ M}$, $C_{\text{HSA}} < 6 \times 10^{-4} \text{ M}$) при 25°C. Во всех случаях наблюдается восстановление золота(III) до золота(I), которое образует комплекс с HSA. При избытке HSA время полного превращения для изученных комплексов не превышает 1 ч. Дополнительно показано, что скорость редокс-взаимодействия комплексов золота(III) с цистеином намного выше, чем с метионином.

Ключевые слова: азотсодержащие лиганды, комплексообразование, тиолы

DOI: 10.31857/S0044457X23600639, EDN: LSVTRF

ВВЕДЕНИЕ

Комплексы золота находят широкое практическое применение, в частности в медицине. Экспериментально показано, что они обладают цитотоксическим действием и являются перспективными противоопухолевыми препаратами, во многих случаях превосходящими комплексы платины(II) [1–8]. Общепринятого представления о механизме их действия нет, хотя предполагается, что в основе лежит образование прочных связей с тиольными группами цистеиновых остатков ферментов [7]. Наибольшее распространение имеет гипотеза, что комплексы золота ингибируют тиоредоксинредуктазу [6, 9], что приводит к окислительному стрессу клетки. Согласно другой гипотезе, ингибируется Na^+/K^+ -аденозинтрифосфатаза [10, 11].

Чаще всего для биологических исследований используют комплексы золота(III) с полидентатными N-содержащими лигандами [3–5, 9, 12]. Однако практическое использование комплексов золота(III) в реальных физиологических условиях неминуемо сопряжено с их взаимодействием с компонентами из окружающей среды. В первую очередь это относится к цистеину и его остаткам в составе пептидов и белков. Подобные тиолсодержащие компоненты являются сильными восстановителями для золота(III) и лигандами для золота(I), с которыми они образуют высокоустойчивые тиолатные комплексы, высоколабильные в отношении обмена лигандами [13]. Поскольку константы устойчивости комплексов золота(I) с

тиолатами близки, в результате быстрого обмена вид лигандов в составе комплекса золота(I) определяется тиолами, присутствующими в данный момент в растворе вокруг него. При смене тиолатного окружения изменяется и лигандный состав комплексов. Таким образом, большинство комплексов золота(III) в физиологических условиях необратимо модифицируются, превращаясь в лабильные тиолатные комплексы золота(I), содержащие в качестве лигандов анионы тиолсодержащих компонентов из окружающей среды.

В работах [14, 15] на примере комплексов золота(III) с 1,10-фенантролином (phen) и 2,2'-бипиридилом (bipy), перспективных в качестве противоопухолевых препаратов (имеющих низкие IC_{50}), показано, что при взаимодействии с избытком цистеина (H_2Cys) или глутатиона (GSH_3) в нейтральной среде они быстро переходят в высокоустойчивые тиолаты золота(I) $\text{Au}(\text{RS})_2$. Однако концентрация глутатиона достаточно высока ($>10^{-3} \text{ M}$) только в цитоплазме, в то время как при медицинском применении комплекс золота(III) вначале попадает в кровь. В плазме крови концентрация свободных тиолов с низким молекулярным весом (H_2Cys , GSH_3 , дипептиды цистеина) мала ($\sim 2 \times 10^{-5} \text{ M}$) [16], при этом на таком же уровне находится допустимая концентрация золота [17–19]. Комплексы золота(III) могут взаимодействовать со свободными тиолами, однако большое значение в этих условиях имеет взаимодействие с белками, в частности с альбумином, составляющим

~50% всех белков крови. Помимо транспортной функции для золота(I), альбумин также может выступать в качестве восстановителя для золота(III). В сывороточном альбумине человека (HSA или САЧ) только один аминокислотный остаток (из 585) относится к неокисленному цистеину Cys₃₄SH. Концентрация HSA может составлять 35–50 г/л, что соответствует в среднем $\sim 6 \times 10^{-4}$ М. По данным [16], при физиологических условиях (рН 7–7.4) тиольная группа в AlbCys₃₄SH протонирована меньше, чем в свободном цистеине, что способствует комплексообразованию с золотом(I). Еще 34 остатка цистеина окислены и образуют дисульфидные связи –RSSR–. В состав альбумина также входит шесть остатков тиоэфира метионина H₃C–S–(CH₂)₂–CH(NH₃)⁺–COO[–] (HMet), который тоже способен восстанавливать золото(III) до золота(I), но не образует с золотом(I) устойчивых комплексов [20]. Другие аминокислоты восстанавливают золото(III) очень медленно [21, 22].

Цель настоящей работы – исследование взаимодействия комплексов золота(III), перспективных в качестве противоопухолевых препаратов, с сывороточным альбумином человека.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали раствор H₂AuCl₄ [23], хлористый натрий (ос. ч.), соляную кислоту (фиксанал), фосфатный буфер с рН 6.86 (фиксанал), L-цистеин (H₂Cys, Реахим, Россия, >98%), L-метионин (HMet, ПанЭко, Россия, >98%), фармакологический сывороточный альбумин человека (10%-ный раствор в 0.9% NaCl, Нижфарм, Россия), бычий сывороточный альбумин (BSA, Serva, США), 1,10-фенантролин (phen · H₂O), 2,2'-бипиридил (Reanal, Венгрия, ч. д. а.), раствор NaOH (без CO₂), бидистиллированную воду. Концентрацию H₂AuCl₄ устанавливали по УФ-поглощению раствора ($\epsilon = 5600 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при 314 нм, среда 0.1 М HCl).

Комплексы золота(III) с 1,10-фенантролином и 2,2'-бипиридилом (Au(phen)(OH)₂⁺ и Au(bipy)(OH)₂⁺) получали в растворе согласно [14, 15].

Эксперименты проводили при 25 и 37°C (водяной термостат U2) и $I = 0.20 \text{ М}$ (NaCl), что близко к составу физиологического раствора. Фосфатный буфер с рН 7.4 готовили из рН-метрического стандарта (рН 6.86) добавлением щелочи. Растворы цистеина, метионина и бычьего сывороточного альбумина готовили непосредственно перед экспериментом из сухих реактивов, растворы HSA – разбавлением исходного 10%-ного альбумина до нужной концентрации с добавлением NaCl до 0.2 М и буфера. В экспериментах к раствору, имеющему общий объем 3–5 мл и содержащему альбумин,

0.2 М NaCl и буфер (0.02 М), добавляли рассчитанный объем раствора комплекса золота(III), быстро перемешивали и начинали сканирование спектров через определенные промежутки времени. Мертвое время составляло 9–15 с. Изменение порядка (добавление альбумина к раствору комплекса в NaCl и буфере) значительного влияния на результаты не оказывало.

Спектры поглощения записывали на спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ “Спектр”) в диапазоне длин волн 220–400 нм, $l = 0.1\text{–}1 \text{ см}$, раствор сравнения – вода. Спектры флуоресценции растворов снимали на спектрофлуориметре Agilent Cary Eclipse, $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ нм}$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Поскольку при рассмотрении процессов взаимодействия имеют значение рН раствора и степень протонирования форм, мы используем обозначения, показывающие количество ионов H⁺ в молекуле (H₂Cys, GSH₃, HMet) вместо обычных Cys, GSH и Met.

Взаимодействие комплексов золота с белками

В литературе есть много данных о связывании золота(I) с различными белками [17, 24–30], что обусловлено многолетним использованием его комплексов в терапии ревматоидного артрита. Предполагается, что в белке золото(I) координировано к тиольной (S[–]) группе неокисленного цистеина, в случае альбумина – к AlbCys₃₄S[–] [29, 31]. Учитывая отмеченное выше большое различие концентраций альбумина и золота(I) (6×10^{-4} и 2×10^{-5} М), можно утверждать, что при рН ~ 7 золото(I) присутствует в плазме крови в виде прочного бис-комплекса (AlbCys₃₄S)AuX. В реальных условиях лиганд X – это либо простой тиолат (анион цистеина, глутатиона, дипептида цистеина), либо Cl[–]. Вследствие высокой концентрации альбумина и высокой устойчивости комплекса золота(I) в основном связано с белком в течение всего времени транспортировки [32], несмотря на высокую лабильность комплексов золота(I) при обмене лигандами.

Работы о взаимодействии с белками комплексов золота(III) проводили в связи с их противоопухолевыми свойствами [28, 29, 31, 33–36]. При этом нередко используемые концентрации белка и золота резко отличаются от тех, что встречаются в реальных системах. Например, концентрацию альбумина выбирают очень низкой, а соотношение золота/альбумин значительно >1. Очевидно, что такие резкие отличия от реальных условий могут полностью изменить картину взаимодействия, не говоря уже об их количественных характеристиках.

В работах [14, 15] показано, что в условиях, близких к физиологическим, комплексы золота(III) легко взаимодействуют с простыми тиолсодержащими кислотами. Процесс может включать несколько стадий (замещение лигандов, внутрисферное восстановление и др.), но при значительном избытке тиола в нейтральной области pH продуктами восстановления золота(III) всегда были высокоустойчивые мономерные бис-комплексы золота(I) $Au(RS^*)_2$. Основным продуктом окисления тиола в этих условиях является дисульфид RSSR. Мы используем обозначение RS^* для суммы форм с разным числом протонов (ΣRSH_i), которое может изменяться в зависимости от pH как в свободном лиганде, так и в комплексе вследствие наличия NH_2 - и COO^- -групп, не участвующих в координации к золоту(I), но способных к протонированию.

При взаимодействии золота(III) с белком (альбумином), несмотря на внешнее сходство с обычными тиолами из-за наличия $Cys_{34}SH$, способного восстанавливать золото(III), общий процесс, по видимому, может иметь отличия как при восстановлении золота(III), так и при последующем комплексообразовании золота(I). В частности, крайне маловероятна координация золота(I) сразу к двум молекулам белка. В упомянутых выше работах такие случаи также не отмечены [17, 24–30, 35].

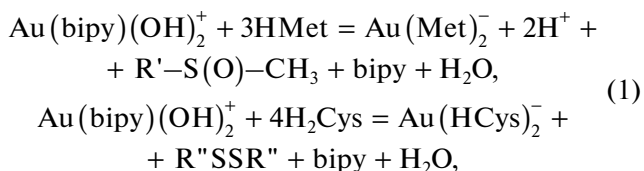
Наиболее вероятен, на наш взгляд, следующий порядок взаимодействия. Комплекс золота(III) взаимодействует с $AlbCys_{34}SH$ обычным образом, как с тиолсодержащими кислотами с низким молекулярным весом (цистеин, глутатион). Очевидной особенностью механизма является необходимость образования “прохода” к $-Cys_{34}SH$ в глобуле белка [32]. После этого остаток $AlbCys_{34}S^-$ замещает лиганд в комплексе золота(III), затем протекает внутрисферный двухэлектронный редокс-процесс, в результате которого остаток $-Cys_{34}S^-$ окисляется до сульфеновой кислоты, а золото(III) восстанавливается до золота(I). Однако образовавшийся остаток сульфеновой кислоты $AlbCys_{34}SO^-$, очевидно, является намного более слабым лигандом для золота(I) по сравнению с $AlbCys_{34}S^-$. Поэтому в результате быстрого обмена лигандами, в качестве которых могут выступать анионы свободных тиолсодержащих кислот с низким молекулярным весом или даже Cl^- , золото(I) оказывается координированным к остатку цистеина другой молекулы альбумина, образуя высокоустойчивый комплекс $(AlbCys_{34}S)AuX$. Таким образом, в предполагаемом идеальном случае во взаимодействии с одним атомом золота вовлекаются две молекулы белка: одна идет на восстановление золота(III) до золота(I), вторая — на комплексообразование с золотом(I). Однако вследствие возможных допол-

нительных процессов восстановления соотношение может оказаться несколько ниже, чем 2 : 1.

*Редокс-взаимодействие $Au(bipy)(OH)_2^+$
с H_2Cys и $HMet$*

Как указано выше, в молекуле альбумина есть немало групп, способных восстанавливать золото(III). Во-первых, это остаток неокисленного цистеина. Окисление $AlbCys_{34}SH$ в альбумине простыми двухэлектронными восстановителями малого размера, как H_2O_2 , описано в [16]. Скорость процесса ожидаемо в несколько (4–6) раз ниже, чем скорость окисления свободного цистеина в растворе при таком же значении pH, что связано со стерическими затруднениями доступа молекулы окислителя к $-Cys_{34}SH$. Продуктом окисления является сульфеновая кислота $AlbCys_{34}SOH$, которая по сравнению с сульфеновой кислотой свободного цистеина намного более устойчивая и долгоживущая. С увеличением размера молекулы окислителя скорость снижается [16].

Золото(III) может быть восстановлено до золота(I) метионином (6 остатков на 1 молекулу HSA), который в результате окисляется до сульфоксида $R'-S(O)-CH_3$ [37–39]. Однако есть основания считать, что это более медленный процесс по сравнению с восстановлением цистеином. На рис. 1 показано изменение УФ-спектра раствора $Au(bipy)(OH)_2^+$ под действием одинаковых избытков (5 : 1) свободного метионина и цистеина при $C_{Au} = 1.0 \times 10^{-4}$ М. В случае H_2Cys процесс восстановления протекает более чем на 90% за 15 с, в то время как для Met концентрация комплекса за 20 мин снизилась только на 25%. Общие уравнения процессов для метионина и цистеина можно представить в виде:



где $R' = -(CH_2)_2-CH(NH_3^+)-COO^-$, $R'' = -CH_2-CH(NH_3^+)-COO^-$. Несмотря на разную стехиометрию реакций (1), лимитирующей стадией в обоих случаях является внутрисферный редокс-процесс. Сравнение скоростей в предположении первого порядка показывает, что k_1^* реакции со свободным цистеином в ~700 раз выше, чем для реакции со свободным метионином. Аналогичная величина k_1^* реакции $Au(bipy)(OH)_2^+$ с HSA ($C_{HSA} = 3.85 \times 10^{-4}$ М) также в 8–10 раз выше, чем с метионином (см. ниже).

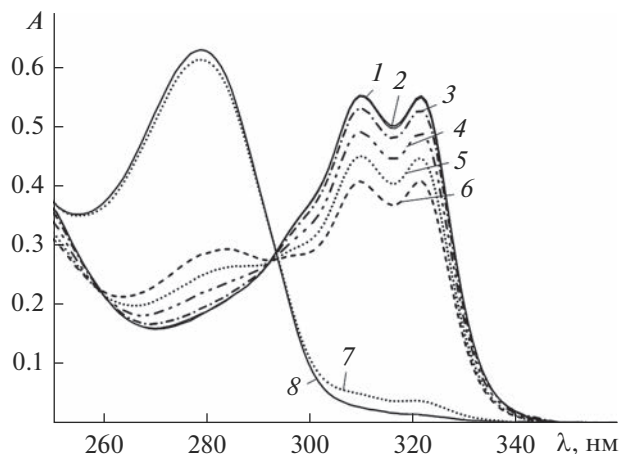


Рис. 1. Изменение спектров растворов при взаимодействии $\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+$ с метионином (1–6) и цистеином (7, 8). Время после смешения: 0 с (1); 30 с (2); 2 мин (3); 5 мин (4); 10 мин (5); 20 мин (6); 15 с (7); 30 с (8). $C_{\text{Au}} = 1.0 \times 10^{-4}$ М, $C_{\text{RSH}} : C_{\text{Au}} = 5 : 1$, pH 7.4, 0.2 М NaCl, $l = 0.5$ см.

По данным [20], в комплексе $\text{Au}(\text{Met})_2^-$ остаток метионина координирован к золоту(I) через атом азота аминогруппы. Устойчивость этого комплекса невелика и сравнима с устойчивостью глицинатного комплекса. В комплексе $\text{Au}(\text{HCys})_2^-$ остаток цистеина координирован к золоту(I) через атом S тиольной группы, аминогруппа в координации не участвует и находится в протонированном (NH_3^+) состоянии. Его устойчивость очень высока: для равновесия $\text{AuCl}_2^- + 2\text{Cys}^* = \text{Au}(\text{HCys})_2^- + 2\text{Cl}^-$ при pH 7.0 и $C_{\text{NaCl}} = 0.16$ М условная константа $\lg b_2^* = 19.9$. Таким образом, полагать, что золото(I) координировано в альбумине к остатку метионина или другой аминокислоты, можно только в случае, когда все остатки $\text{AlbCys}_{34}\text{SH}$ уже израсходованы на восстановление золота(III) или на комплексообразование с золотом(I), т.е. при $C_{\text{HSA}}/C_{\text{Au}} < 2$, что невозможно в реальных физиологических условиях.

Редокс-взаимодействие комплексов золота(III) с HSA

Эксперименты проводили с комплексами золота(III) $\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+$ и $\text{Au}(\text{phen})(\text{OH})_2^+$, поскольку именно они и их производные больше всего исследовались в качестве противоопухолевых средств и показали хорошие результаты [40]. Два эксперимента также были выполнены с $\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}^{2+}$, где dien — это диэтилентриамин ($\text{NH}_2(\text{CH}_2)_2\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$). При повышении pH координированный dien де-

протонируется, одновременно происходит замещение Cl^- на OH^- [41]. При pH 7.4 и $C_{\text{NaCl}} = 0.2$ М комплекс существует в виде смеси $\text{Au}(\text{dien-H})\text{Cl}^+$ и $\text{Au}(\text{dien-H})(\text{OH})^+$ (далее обозначена как “Audien”). Кроме того, на выбор комплексов влияла возможность определения их концентрации из УФ-спектров, несмотря на высокое поглощение HSA при $\lambda < 300$ нм ($\epsilon_{\text{max}} = 3.0 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при $\lambda_{\text{max}} = 278$ нм). Так, $\text{Au}(\text{phen})(\text{OH})_2^+$ и phen имеют собственное интенсивное поглощение, сравнимое с поглощением HSA ($\epsilon_{\text{max}} = 2.5 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при $\lambda = 268$ нм для комплекса и $\epsilon_{\text{max}} = 2.8 \times 10^4 \text{ М}^{-1} \text{ см}^{-1}$ при $\lambda = 264$ нм для phen), а комплексы $\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+$ и Audien имеют значительное поглощение при $\lambda > 300$ нм. Тем не менее из-за высокого поглощения HSA его концентрация в наших экспериментах была снижена по сравнению с физиологической.

В нескольких экспериментах вместо HSA использовали BSA (бычий сывороточный альбумин). Основная цель такой замены состояла в том, чтобы убедиться в отсутствии значимого влияния возможных посторонних микропримесей в HSA (которого по массе намного больше, чем золота) на характеристики изучаемых процессов. Очевидно, что вид и содержание примесей в BSA и HSA, полученных от разных производителей, не могут быть одинаковыми. С другой стороны, BSA и HSA очень похожи по составу, и можно ожидать, что при отсутствии влияния микропримесей характер превращений комплексов золота в обоих случаях будет как минимум близким. На рис. 2 показано изменение во времени величины $r = [\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+]/C_{\text{Au}}$ при взаимодействии с HSA и BSA при их одинаковых концентрациях (1%). Удовлетворительное совпадение данных для BSA и HSA свидетельствует об отсутствии влияния невыявленных компонентов, способных взаимодействовать с золотом(III).

Несмотря на то, что BSA доступен и часто используется в исследованиях, из-за биологической роли рассматриваемых комплексов золота(III) нас больше интересовали взаимодействия с участием HSA. Кроме того, из-за наличия в составе молекулы BSA двух остатков триптофана он имеет более высокое поглощение в УФ-области по сравнению с HSA (один остаток Trp), что является дополнительным серьезным осложнением исследования при перекрывании спектров комплекса и белка.

На рис. 3 показана типичная картина изменения спектра $\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+$ при взаимодействии с HSA. Полоса поглощения комплекса почти полностью исчезает за ~ 1 ч при 25°C . Одновременно наблюдается увеличение A в области 280 нм, что согласуется с высвобождением бипиридила при

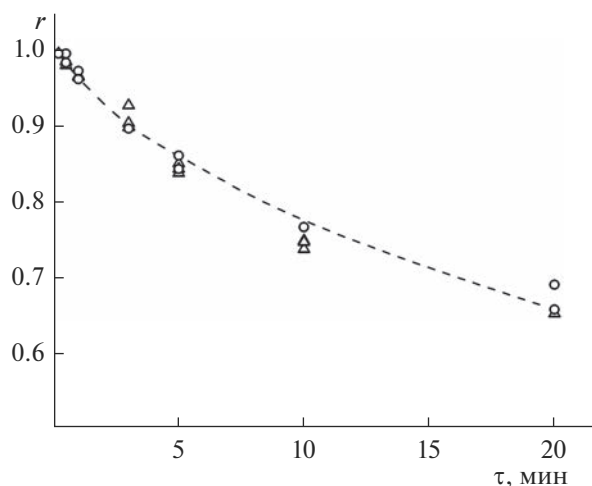


Рис. 2. Изменение $r = [\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+] / C_{\text{Au}}$ при взаимодействии с HSA (Δ) и BSA ($\circ$). $C_{\text{Au}} = 1.0 \times 10^{-4}$ М, $C_{\text{HSA}} = C_{\text{BSA}} = 1.5 \times 10^{-4}$ М (1%). pH 7.4, 0.2 М NaCl.

восстановлении золота(III) до золота(I) [15]. Добавление к раствору в конце GSH_3 в соотношении $C_{\text{GSH}_3} / C_{\text{Au}} = 1.5$ не приводит к появлению известного спектра полимерного комплекса золота(I) (AuGS^*)_m [23], который должен был образоваться в этих условиях, если бы золото(I) не было связано с HSA. Добавление цистеина в таких же условиях приводит к появлению небольшого количества белой мути, свидетельствующей о том, что по крайней мере часть золота(I) переходит в плохо растворимый цистеинат AuHSCys .

На рис. 4 показаны изменения спектра раствора в результате аналогичного взаимодействия с альбумином комплекса золота(III) $\text{Au}(\text{phen})(\text{OH})_2^+$. Значительное УФ-поглощение phen и $\text{Au}(\text{phen})(\text{OH})_2^+$ позволяет практически без потери точности проследить изменение их концентрации во времени, несмотря на перекрывание УФ-спектров со спектром HSA. На рис. 4 величина $\Delta A = A - A_{\text{HSA}}$, где A_{HSA} — УФ-поглощение 1.5%-ного раствора HSA при pH 7.4 и 0.2 М NaCl.

Как оказалось, остаточный спектр $\Delta A(\lambda)$ с высокой точностью является линейной комбинацией известных спектров phen и $\text{Au}(\text{phen})(\text{OH})_2^+$ [14]:

$$\Delta A(\lambda) / l = \varepsilon(\lambda)_{\text{phen}} a_{\text{phen}} + \varepsilon(\lambda)_{\text{к-с}} a_{\text{к-с}}. \quad (2)$$

Для расчетов использовали множественную регрессию. Стандартное отклонение аппроксимации $SD = \{[\sum (\Delta A(\lambda_i)_{\text{эксп}} - \Delta A(\lambda_i)_{\text{расч}})^2] / (N - 2)\}^{1/2}$ описания экспериментальной зависимости $\Delta A(\lambda)$ суммой (уравнение (2)) составляло 0.004–0.005 при числе точек $N = 100$ –150, что сопоставимо с экспериментальной погрешностью определения

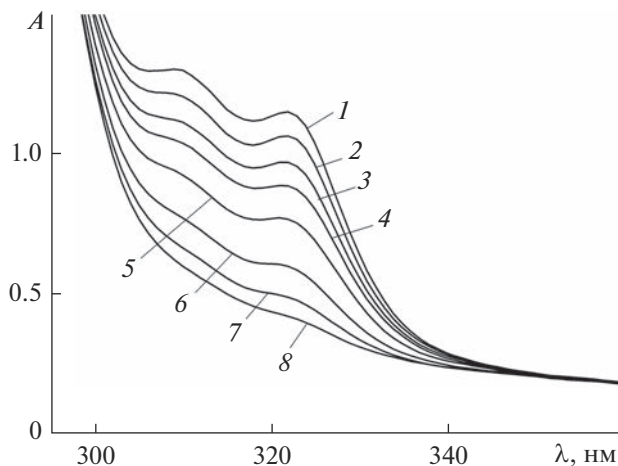


Рис. 3. Изменение спектра раствора во времени при взаимодействии $\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+$ с HSA: 9 с (1); 1 мин (2); 2 мин (3); 3 мин (4); 5 мин (5); 10 мин (6); 20 мин (7); 40 мин (8). $C_{\text{Au}} = 1.0 \times 10^{-4}$ М, HSA 2.5% (3.85×10^{-4} М), pH 7.4, 0.2 М NaCl, $l = 1$ см.

оптической плотности. Рассчитанные спектры также показаны на рис. 4 (кружки). Таким образом, для описания всех спектров растворов в ходе реакции $\text{Au}(\text{phen})(\text{OH})_2^+$ с HSA другие поглощающие формы не требуются. Следовательно, образующийся комплекс золота(I) в данной области

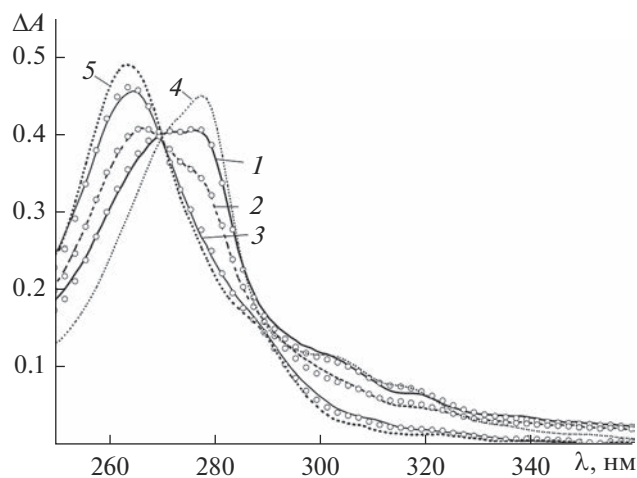


Рис. 4. Изменение спектра раствора во времени при взаимодействии $\text{Au}(\text{phen})(\text{OH})_2^+$ с HSA. Для удобства показаны только три спектра из семи: 40 с (1); 20 мин (2); 2 ч (3). Сплошные линии — эксперимент, кружки — расчет по уравнению (2) (показана каждая вторая точка), 4 и 5 — спектры форм $\text{Au}(\text{phen})(\text{OH})_2^+$ и phen при той же концентрации. $C_{\text{Au}} = 1.76 \times 10^{-4}$ М, HSA 1.5% (2.26×10^{-4} М), pH 7.4, 0.2 М NaCl.

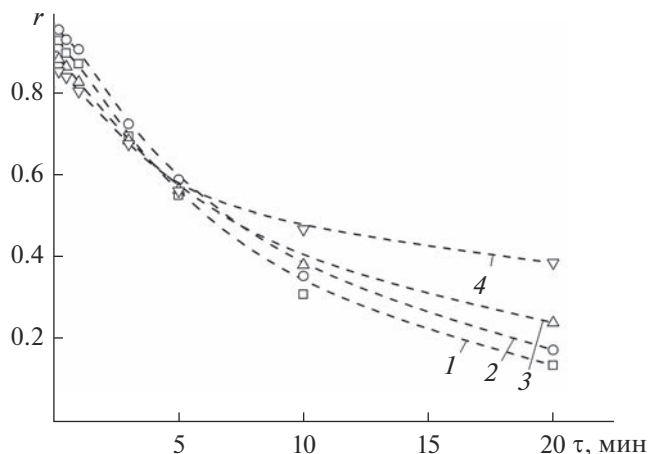


Рис. 5. Изменение во времени отношения $r = [\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2]^+ / C_{\text{Au}}$ при взаимодействии с HSA 2.5% (3.85×10^{-4} М). $C_{\text{Au}} = 2.0 \times 10^{-5}$ М (1); 5.0×10^{-5} М (2); 1.0×10^{-4} М (3); 2.0×10^{-4} М (4). pH 7.4, 0.2 М NaCl.

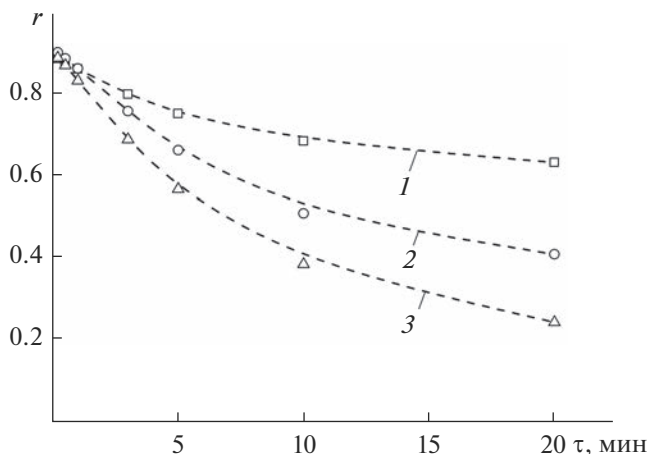


Рис. 6. Изменение $r = [\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2]^+ / C_{\text{Au}}$ при взаимодействии с HSA. $C_{\text{Au}} = 1.0 \times 10^{-4}$ М, C_{HSA} : 1 – 0.5% (7.7×10^{-5} М); 2 – 1.5% (2.3×10^{-4} М); 3 – 2.5% (3.85×10^{-4} М). pH 7.4, 0.2 М NaCl.

практически не поглощает. Постоянные коэффициенты a_{phen} и $a_{\text{к-с}}$ в уравнении (2) равны концентрациям phen и $\text{Au}(\text{phen})(\text{OH})_2^+$ в этих растворах. Независимая проверка полученных результатов состоит в том, что сумма ($a_{\text{phen}} + a_{\text{к-с}}$) должна быть равна общей исходной концентрации phen, что действительно выполнялось ($\pm 3\%$). Еще один вывод, следующий из этой обработки, состоял в том, что в ходе взаимодействия спектр HSA заметно не изменялся. Поскольку УФ-поглощение HSA обусловлено в основном остатками триптофана, тирозина и фенилаланина, можно заключить, что во взаимодействии золота(III) с HSA они не участвуют.

На рис. 5 показано изменение величин $r = [\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2]^+ / C_{\text{Au}}$ во времени при взаимодействии бипиридилного комплекса с HSA (2.5% или 3.85×10^{-4} М) для концентраций C_{Au} от 2.0×10^{-5} до 2.0×10^{-4} М. Несмотря на десятикратное различие исходных концентраций C_{Au} , отличие в изменениях r не очень велико и на начальном этапе (до 5 мин) практически отсутствует. В целом наибольшее отклонение наблюдается для максимальной концентрации $C_{\text{Au}} = 2.0 \times 10^{-4}$ М. Заметим, что в этом случае $2C_{\text{Au}} > C_{\text{HSA}}$, т.е. в соответствии с описанным выше предполагаемым порядком взаимодействия золота(III) с HSA альбумин находится в недостатке. Для меньших концентраций $C_{\text{Au}} \sim 80\%$ исходного золота(III) в комплексе восстанавливается под действием 2.5%-ного альбумина до золота(I) в течение 20 мин.

При 37°C скорость процесса с участием $\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+$ ожидаемо выше, чем при 25°C , хотя по-

вышение не такое большое – в 1.7 раза для 2.5%-ного HSA и $C_{\text{Au}} = 1 \times 10^{-4}$ М.

На рис. 6 показано изменение концентрации $[\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2]^+$ при взаимодействии с HSA различной концентрации (0.5, 1.5 и 2.5%) для $C_{\text{Au}} = 1.0 \times 10^{-4}$ М. Скорость процесса закономерно возрастает с ростом концентрации альбумина. Как в примере выше, для самой низкой концентрации HSA (0.5%) отношение $C_{\text{HSA}}/C_{\text{Au}} < 2$.

Из описанной выше предполагаемой картины взаимодействия комплекса золота(III) с альбумином следует, что это довольно сложный многостадийный процесс, включающий образование “проходов” [32] для доступа комплекса к $-\text{Cys}_{34}\text{SH}$, внутрисферное восстановление золота(III) до золота(I) и комплексообразование золота(I) с другой молекулой альбумина. Поэтому трудно рассчитывать на получение единого закона скорости процесса, хотя данные, представленные на рис. 5 и 6, эмпирически приблизительно соответствуют второму порядку для $C_{\text{Au}} \leq 1 \times 10^{-4}$ М: $dC_{\text{к-с}}/d\tau \sim -k_2 [\text{HSA}] C_{\text{к-с}}$, где $C_{\text{к-с}} = [\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2]^+$, а $k_2 \sim 270 \text{ М}^{-1} \text{ мин}^{-1}$. Это означает, что при 25°C и $C_{\text{HSA}} \gg C_{\text{Au}}$ для 2.5%-ного

HSA от исходного комплекса $[\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2]^+$ через 20 мин останется $\sim 13\%$. В частности, в примере на рис. 5 для $C_{\text{Au}} = 2.0 \times 10^{-5}$ М остаток составляет 14%. Для обычной физиологической концентрации HSA 5% остаток комплекса составит 1.5%, а при 37°C еще почти вдвое меньше.

Следует отметить, что при недостатке HSA ($C_{\text{HSA}}/C_{\text{Au}} < 2$) процесс сильно замедляется. Так, в примере на рис. 3 (избыток HSA) комплекс золота(III) практически полностью восстанавливает-

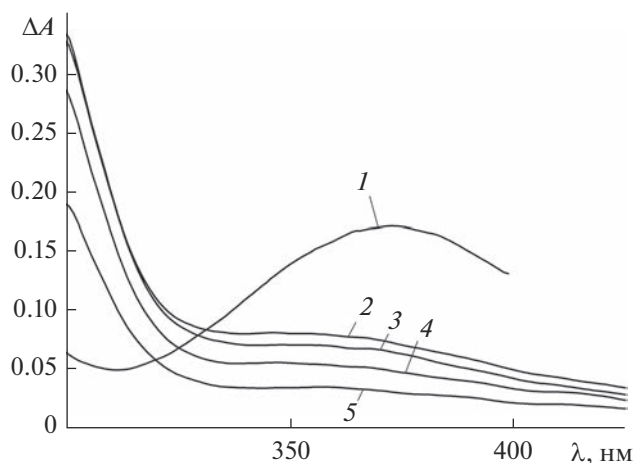


Рис. 7. Изменение во времени спектра раствора, содержащего Audien (1.0×10^{-4} М) и HSA (5%): 0 с (1), 12 с (2), 1 мин (3), 10 мин (4), 20 мин (5). pH 7.4, 0.2 М NaCl. $\Delta A = A - A_{\text{HSA}}$.

ся за 40–60 мин. В то же время в примерах на рис. 4, 5, 6, относящихся к недостатку HSA, требуется намного большее время.

Взаимодействие Audien с HSA не показало значимых особенностей (рис. 7). После смешения растворов комплекса и HSA наблюдается резкое уменьшение интенсивности в максимуме УФ-поглощения (370 нм). Одновременно появляется значительное поглощение в области $\lambda < 325$ нм, которое отсутствовало у исходного Audien. Возможно, оно относится к промежуточному комплексу, образовавшемуся при замещении лиганда в Audien на $\text{AlbCys}_{34}\text{S}^-$, поскольку для Audien иногда наблюдается замедленность редокс-процесса [38]. Впрочем, со временем эта интенсивность тоже снижается, и через 1 ч поглощение комплекса золота полностью исчезает.

Для определения строения белков широко применяется флуоресценция, в том числе в присутствии различных тушителей. Мы также предполагали при помощи этого метода получить более полную информацию о взаимодействии комплексов золота(III) с альбумином. Однако это оказалось невозможным. На рис. 8 показаны типичные спектры флуоресценции HSA и раствора, содержащего HSA с добавкой $\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+$ в такой же концентрации. Растворы не содержали буфер и NaCl. В отличие от данных [42], в нашем случае введение комплекса золота(III) не только понижало интенсивность, но и резко искажало форму спектра флуоресценции HSA. Очевидно, это искажение в значительной степени вызвано поглощением испущенного альбумином излучения находящимся в растворе комплексом $\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+$. Вероятно, это не единственная причина, поскольку интенсивность в максимуме (340 нм)

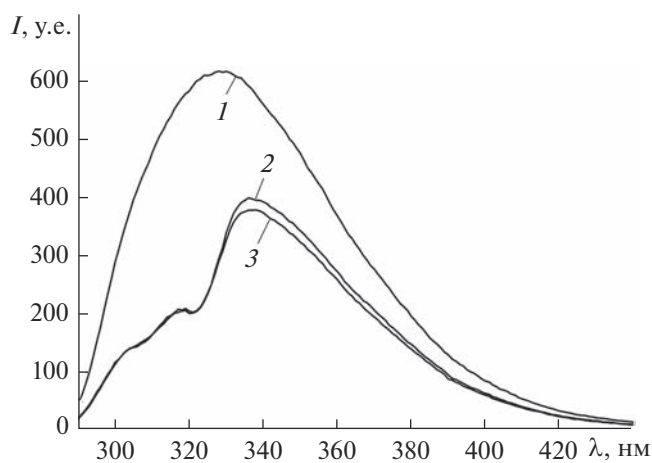


Рис. 8. Спектры флуоресценции растворов HSA (1) и HSA с добавкой $\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+$ (2, 3). Время: 1 мин (2), 10 мин (3). $C_{\text{Au}} = C_{\text{HSA}} = 5.0 \times 10^{-5}$ М.

медленно снижается (~5% за 10 мин), в то время как концентрация комплекса и его УФ-поглощение тоже уменьшаются.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что комплексы золота(III) $\text{Au}(\text{bipy})(\text{OH})_2^+$, $\text{Au}(\text{phen})(\text{OH})_2^+$ и $\text{Au}(\text{dien})\text{Cl}^{2+}$, испытанные в качестве противоопухолевых средств [34] и имеющие хорошие показатели IC_{50} (например, $8.8, 3.8, 8.2 \times 10^{-6}$ М соответственно для линии клеток A2780), нестабильны при физиологических условиях. В частности, они активно взаимодействуют с HSA. В результате золото(III) восстанавливается до золота(I), которое способно к быстрому обмену лигандами и образует высокоустойчивые комплексы с тиолатами, присутствующими в окружающем растворе. Например, хорошими лигандами являются молекулы HSA или другого белка, содержащие остатки неокисленного цистеина. Время полного превращения может зависеть от вида исходного комплекса золота(III), но для изученных примеров оно не превышает 1 ч. При помощи HSA золото(I) транспортируется к клеткам, где превращается в комплексы с другими белками и глутатионом. Таким образом, противоопухолевой активностью обладают не комплексы золота(III), а высокоустойчивые и высоколабильные тиолатные комплексы золота(I), лигандами в которых являются тиолаты, присутствующие в организме. Данные о высокой противоопухолевой активности ряда комплексов золота(I) также присутствуют в литературе [3, 7, 43]. Наиболее изученным из них является ауранофин [44–46], который уже около сорока лет используется в терапии ревматоидного артрита.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа поддержана Министерством науки и высшего образования РФ, проект № 121031700315-2.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dey D., Al-Hunaiti A., Gopal V. et al. // J. Mol. Struct. 2020. V. 1222. P. 128919.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2020.128919>
2. Корман Д.Б., Островская Л.А., Кузьмин В.А. // Вопросы онкологии. 2018. Т. 64. № 6. С. 697.
3. Yeo C.I., Ooi K.K., Tiekink E.R.T. // Molecules. 2018. V. 23. P. 1410.
<https://doi.org/10.3390/molecules23061410>
4. Van der Westhuizen D., Bezuidenhout D.I., Munro O.Q. // Dalton Trans. 2021. V. 50. P. 17413.
<https://doi.org/10.1039/d1dt02783b>
5. Radisavljević S., Petrović B. // Front. Chem. 2020. V. 8. P. 379.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2020.00379>
6. Yang Z., Jiang G., Xu Z. et al. // Coord. Chem. Rev. 2020. V. 423. 213492.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213492>
7. Lu Y., Ma X., Chang X. et al. // Chem. Soc. Rev. 2022. V. 51. P. 5518.
<https://doi.org/10.1039/d1cs00933h>
8. Zhang J., Li Y., Fang R. et al. // Front. Pharmacol. 2022. V. 13. 979951.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.979951>
9. Moreno-Alcántar G., Picchetti P., Casini A. // Angew. Chem. Int. Ed. 2023. V. 62. Issue 22. e202218000.
<https://doi.org/10.1002/anie.202218000>
10. Bondžić A.M., Vasić Aničević D.D., Janjić G.V. et al. // Curr. Med. Chem. 2021. V. 28. P. 4742.
<https://doi.org/10.2174/0929867328999210101233801>
11. Petrović V., Petrović S., Joksić G. et al. // J. Inorg. Biochem. 2014. V. 140. P. 228.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2014.07.015>
12. Radulović N.S., Stojanović N.M., Glišić B.D. et al. // Polyhedron. 2018. V. 141. P. 164.
<https://doi.org/10.1016/j.poly.2017.11.044>
13. Dickson P.N., Wehrli A., Geier G. // Inorg. Chem. 1988. V. 27. P. 2921.
<https://doi.org/10.1021/ic00290a006>
14. Миронов И.В., Харламова В.Ю. // Журн. неорганической химии. 2022. Т. 67. № 7. С. 972.
15. Миронов И.В., Харламова В.Ю., Ху Ц. // Журн. неорганической химии. 2023. Т. 68. № 3. С. 342.
16. Turell L., Radi R., Alvarez B. // Free Radic. Biol. Med. 2013. V. 65. P. 244.
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050>
17. Brown D.H., Smith W.E. // Chem. Soc. Rev. 1980. P. 217.
<https://doi.org/10.1039/CS98009000217>
18. Zou T., Lum C.T., Lok C.-N. et al. // Chem. Soc. Rev. 2015. V. 44. P. 8786.
<https://doi.org/10.1039/c5cs00132c>
19. Walz D.T., DiMartino M. J., Griswold D.E. et al. // Am. J. Med. Oral Gold Symposium. 1983. V. 75. P. 90.
[https://doi.org/10.1016/0002-9343\(83\)90481-3](https://doi.org/10.1016/0002-9343(83)90481-3)
20. Миронов И.В., Харламова В.Ю. // Журн. неорганической химии. 2017. Т. 62. № 12. С. 1672.
21. Soni V., Sindal R.S., Mehrotra R.N. // Polyhedron. 2005. V. 24. P. 1167.
<https://doi.org/10.1016/j.poly.2005.03.057>
22. Миронов И.В. // Журн. неорганической химии. 2007. Т. 52. № 5. С. 857.
23. Mironov I.V., Kharlamova V.Yu. // J. Solution Chem. 2020. V. 49. P. 583.
<https://doi.org/10.1007/s10953-020-00994-0>
24. Massai L., Grifagni D., De Santis A. et al. // Biomolecules. 2022. V. 12. P. 1675.
<https://doi.org/10.3390/biom12111675>
25. Roberts J.R., Xiao J., Schliesman B. et al. // Inorg. Chem. 1996. V. 35. P. 424.
<https://doi.org/10.1021/ic9414280>
26. Darabi F., Marzo T., Massai L. et al. // J. Inorg. Biochem. 2015. V. 149. P. 102.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2015.03.013>
27. Best S.L., Sadler P.J. // Gold Bull. 1996. V. 29. P. 87.
<https://doi.org/10.1007/BF03214741>
28. Gabbiani C., Massai L., Scaletti F. et al. // J. Biol. Inorg. Chem. 2012. V. 17. P. 1293.
<https://doi.org/10.1007/s00775-012-0952-6>
29. Massai L., Zoppi C., Cirri D. et al. // Front. Chem. 2020. V. 8. 581648.
<https://doi.org/10.3389/fchem.2020.581648>
30. Messori L., Cinelli M.A., Merlino A. // ACS Med. Chem. Lett. 2014. V. 5. P. 1110.
<https://doi.org/10.1021/ml500231b>
31. Pratesi A., Cirri D., Fregona D. et al. // Inorg. Chem. 2019. V. 58. P. 10616.
<https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01900>
32. Pacheco E.A., Tiekink E.R.T., Whitehouse M.W. Gold Chemistry: Applications and Future Directions in the Life Sciences. Chapter 6: Gold Compounds and Their Applications in Medicine. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2009. 283 p.
33. Messori L., Balerna A., Ascone I. et al. // J. Biol. Inorg. Chem. 2011. V. 16. P. 491. <https://doi.org/10.1007/s00775-010-0748-5>
34. Casini A., Hartinger C., Gabbiani C. et al. // J. Inorg. Biochem. 2008. V. 102. P. 564.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.11.003>
35. Nobili S., Mini E., Landini I. et al. // Med. Res. Rev. 2010. V. 30. P. 550.
<https://doi.org/10.1002/med.20168>
36. Casini A., Cinelli M.A., Minghetti G. et al. // J. Med. Chem. 2006. V. 49. P. 5524.
<https://doi.org/10.1021/jm060436a>
37. Al-Maythaly B.A., Wazeer M.I.M., Isab A.A., Ahmad S. // Spectroscopy. 2010. V. 24. P. 567.
<https://doi.org/10.3233/SPE-2010-0478>
38. Đurović M.D., Bugarčić Ž.D., Heinemann F.W., Eldik R. // Dalton Trans. 2014. V. 43. P. 3911.
<https://doi.org/10.1039/C3DT53140F>

39. Glišić B.Đ., Djuran M.I., Stanić Z.D., Rajković S. // Gold Bull. 2014. V. 47. P. 33.
<https://doi.org/10.1007/s13404-013-0108-7>
40. Casini A., Diawara M.C., Scopelliti R. et al. // Dalton Trans. 2010. V. 39. P. 2239.
<https://doi.org/10.1039/b921019a>
41. Baddley W.H., Basolo F., Gray H.B. et al. // Inorg. Chem. 1963. V. 2. P. 921.
<https://doi.org/10.1021/ic50009a011>
42. Marcon G., Messori L., Orioli P. et al. // Eur. J. Biochem. 2003. V. 270. P. 4655.
<https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03862.x>
43. Mirzadeh N., Reddy T.S., Bhargava S.K. // Coord. Chem. Rev. 2019. V. 388. P. 343.
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2019.02.027>
44. Kim J.H., Reeder E., Parkin S., Awuah S.G. // Sc. Rep. 2019. V. 9. P. 12335.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-48584-5>
45. Pavic A, Glišić B.Đ., Vojnovic S. et al. // J. Inorg. Biochem. 2017. V. 174. P. 156.
<https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2017.06.009>
46. Landini I., Lapucci A., Pratesi A. et al. // Oncotarget. 2017. V. 8. P. 96062.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.21708>