

УДК 546.72+661.982+547-305+579.842.11+579.86+577.1821

## СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА НИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С 2-ЭТИЛ-4-ПИРИДИНКАРБОТИОАМИДОМ

© 2023 г. Н. А. Санина<sup>1,2,3,\*</sup>, Г. В. Шилов<sup>1</sup>, Н. С. Ованесян<sup>1</sup>, В. А. Мумятова<sup>1</sup>, А. А. Балакина<sup>1</sup>, А. А. Терентьев<sup>1,2,3</sup>, О. В. Покидова<sup>1</sup>, С. М. Алдошин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии РАН, Черноголовка, Россия

<sup>2</sup>Научно-образовательный центр “Медицинская химия” в г. Черноголовка Государственного университета просвещения, Мытищи, Россия

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

\*e-mail: sanina@icp.ac.ru

Поступила в редакцию 28.02.2023 г.

После доработки 17.03.2023 г.

Принята к публикации 22.03.2023 г.

Представлены синтез и результаты исследования физико-химических характеристик и биологической активности нового нитрозильного комплекса железа  $(Q^+)_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]^{2-}$  (I), где  $Q^+$  – протонированный 2-этил-4-пиридинкарботиоамид ( $C_8H_{11}N_2S$ ). Строение и свойства комплекса изучено методами РСА, элементного анализа, ИК-, Мессбауэровской спектроскопии и амперометрии. Установлено, что комплекс обладает антибактериальной активностью и является эффективным ингибитором фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭ цГМФ), что позволяет прогнозировать его антигипертензивную, антиагрегационную и вазодилаторную активности.

**Ключевые слова:** биядерные тетранитрозильные комплексы железа(I) РСА, ИК-спектроскопия, Мессбауэровская спектроскопия, амперометрия, антибактериальная активность, биопленки, ампициллин, канамицин, стрептомицин, цефтриаксон, МТТ-тест, фосфодиэстераза

**DOI:** 10.31857/S0132344X23600169, **EDN:** WBRIFE

Эндогенный оксид азота (NO) играет важную роль в качестве первой линии обороны против различных патогенов: эффективно действует на вирусы [1, 2], обладает антибактериальной и противогрибковой [3–5] активностью. Образование NO усиливается в макрофагах, индуцированных инфекционными агентами или цитокинами [6].

Среди экзогенных средств генерации NO, рассматриваемых как противомикробные средства, можно выделить несколько основных классов [7]. Наряду с газообразным NO и различными системами его генерации [8–16] используются органические нитраты [17], NONO-агты [18, 19] и S-нитрозотиолы [20–22]. В последние годы растет интерес к низкомолекулярным миметикам нитрозильных ферредоксинов, содержащих природный  $Fe(NO)_2$  фрагмент [23, 24]. В качестве механизмов противомикробного действия NO-доноров этого класса рассматриваются: 1) индукция оксидативно-нитрозативного стресса [9]; 2) модификация тиолсодержащих аминокислот в белках [25]; 3) нитрозилирование и нарушение функции транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B [26]. Учитывая схожесть структур нитрозильных комплексов железа (НКЖ) с нату-

ральными нитрозильными белками [1Fe–2S] и [2Fe–2S], ожидается, что в их противомикробном действии участвуют новые механизмы, не связанные с ДНК как с первичной мишенью. Эти механизмы и требуют дополнительных исследований, включающих синтез новых НКЖ, преимущественно содержащих лиганды, обладающие противомикробной активностью, и изучение их на моделях *in vitro* и *in vivo*.

В подавляющем большинстве исследований в качестве лигандов для синтеза НКЖ используются различные алифатические и ароматические тиолы [27–30]. НКЖ на основе тиоамидов практически неизвестны и представляют большой практический интерес. Известно, что производные тиоамида демонстрируют противотуберкулезную [31, 32], противовирусную [33], противоопухолевую [34, 35] фунгицидную [36] активность, глистогонное и тиреотоксическое действие [37]. Тиоамиды обладают более высокой антибактериальной и противовирусной активностью, чем соответствующие амиды [38–43]. Аналоги 5-ацетокси и 5-гидроксиалкантиоамида показали высокую антибактериальную активность в отношении *Staphylococ-*

*cus aureus* [44]. Существуют фармацевтические соединения, содержащие тиокарбонильные группы: антитиреоидные препараты: метилтиоурацил и пропилтиоурацил, уменьшающие синтез тироксина в щитовидной железе, оказывая лечебное действие при ее гиперфункции; противотуберкулезный препарат тиаоацетазон, агонист андрогенных рецепторов энзалутамид; антиметаболит тиогуанин и др. [45]. С обнаружением природных тиоамидов интенсивно развиваются синтетические стратегии по созданию терапевтических препаратов, содержащих пептидные тиоамиды [46].

Для борьбы с туберкулезом применяют различные препараты из ряда ароматических тиоамидов с хорошей эффективностью, включая этионамид и изониазид. Структуры этионамида (А) и изониазида (Б) представлены на схеме 1.

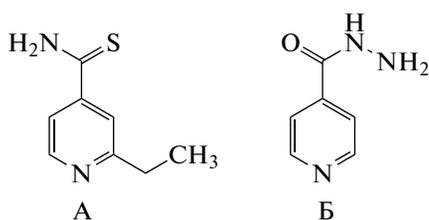


Схема 1.

Механизм их действия связан с подавлением синтеза белка в микобактериях. Этионамид угнетает рост и размножение микобактерий туберкулеза при внутриклеточном и внеклеточном расположении (в том числе действует на рефрактерные и атипичные формы); усиливает фагоцитоз в очаге туберкулезного воспаления и используется в сочетании с другими агентами в тех случаях, когда препараты первой линии неэффективны или противопоказаны. Его эффективное бактериостатическое действие против организмов, обладающих резистентностью к изониазиду, было продемонстрировано экспериментом и клиническими испытаниями на животных [47]. Активность этионамида зависит от pH среды: в кислой среде активность этионамида возрастает [48]. Несмотря на то что этионамид и его структурные аналоги широко используются в терапии, а в литературе содержится информация об их кристаллической структуре [49], весьма ограничена на сегодняшний день информация об их важных физико-химических параметрах, таких как растворимость, разделение в фармацевтически важных растворителях и мембранопроницаемость [50, 51].

В этой связи гибридные системы, содержащие в качестве лигандов два важных фармакофора — NO-группу и тиоамиды, — могут стать перспективными в NO-терапии инфекционных заболеваний. Полученные нами данные [52] свидетельствуют о том, что соединения, содержащие структурный фрагмент  $\{Fe(NO)_2\}^9$ , и тиоамид в составе гибридной молекулы — донора NO — смогут проявлять

синергизм противoinфекционных, противовоспалительных и иммуномодулирующих свойств.

Цель настоящей работы — синтез НКЖ ( $C_8H_{11}N_2S^+$ ) $_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4]^{2-}$  (I), исследование его строения и свойств в твердой фазе и в растворах, а также биологической активности.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение НКЖ I проводили в режиме низкотемпературного синтеза с использованием коммерческих реактивов, которые применяли без дальнейшей очистки NaOH (Aldrich),  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  (Aldrich), HCl (37% марки “х. ч.”) и 2-этил-4-пиридинкарботиоамид (Aldrich). Синтез НКЖ I осуществляли в три этапа: 1) получение газообразного NO по методике [53]; 2) синтез прекурсора НКЖ с тиосульфатным лигандом состава  $Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4] \cdot 2H_2O$  выполняли согласно методике [54]; 3) синтез НКЖ I с 2-этил-4-пиридинкарботиоамидом (см. схему 1). Все операции по приготовлению, смешиванию и хранению растворов проводили в атмосфере аргона. Для приготовления растворов использовали бидистиллированную воду. Растворители: метанол и диметилсульфоксид (ДМСО) очищали согласно методикам [55].

**Синтез I.** Сухую смесь  $Na_2[Fe_2(S_2O_3)_2(NO)_4] \cdot 2H_2O$  (0.77 мМ) и  $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$  (0.4 мМ) растворяли в 5 мл воды и фильтровали в реакционную колбу. Навеску (3.5 мМ) 2-этил-4-пиридинкарботиоамида (схема 1) растворяли в 1 мл концентрированной HCl и 3 мл воды и фильтровали в реакционную колбу при интенсивном перемешивании на магнитной мешалке при комнатной температуре. Мгновенно образовавшийся плотный и густой светло-коричневый аморфный осадок перемешивали в течение 20 мин, после чего отфильтровывали на мембранном фильтре и сушили в токе аргона при комнатной температуре. Выход I 85%.

Найдено % C 24.30; H 2.84; N 14.20; O 20.22; S 24.33; Fe 14.11.  
Для  $C_{16}H_{22}N_8O_{10}S_6Fe_2$  (I)

вычислено % C 24.31; H 2.81; N 14.17; O 20.24; S 24.34; Fe 14.13.

Монокристаллы I для РСА получали при перекристаллизации аморфного осадка из метанола медленным (в течение 2 недель) удалением растворителя при  $-18^\circ C$ .

Анализ на C, H, N, S, O-элементы в комплексах выполняли на CHNS/O-элементном анализаторе Vario El cube в АЦКП ФИЦ и ПХФ и МХ РАН. Анализ на железо проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии в пламени ацетилен-воздух с использованием дейтериевого корректора фона на атомно-абсорбционном спектрофотометре “AAS-3”, производства фирмы Carl Ceiss Jena (Германия). В работе использовали

**Таблица 1.** Основные кристаллографические данные, параметры эксперимента и уточнения структуры I

Параметры	Значение
Брутто-формула	$C_{16}H_{22}N_8O_{10}S_6Fe_2$
<i>M</i>	790.47
Температура, К	100 (1)
Размер кристалла, мм	0.15 × 0.10 × 0.05
$\lambda$ , Å	0.7107
Сингония	Триклинная
Пр. группа	$P\bar{1}$
<i>a</i> , Å	7.3417(4)
<i>b</i> , Å	7.4792(4)
<i>c</i> , Å	14.0322(11)
$\alpha$ , град	78.174(5)
$\beta$ , град	82.408(5)
$\gamma$ , град	78.372(5)
<i>V</i> , Å <sup>3</sup>	735.35(8)
<i>Z</i>	1
$\rho$ (выч.), г/см <sup>3</sup>	1.785
$\mu$ , мм <sup>-1</sup>	1.476
<i>F</i> (000)	402
Диапазон съемки $\theta$ , град	26.069
Измеренные отражения ( <i>R</i> <sub>int</sub> )	5513
Независимые отражения	2907
GOOF	1.247
<i>R</i> <sub>1</sub> , <i>wR</i> <sub>2</sub> ( <i>I</i> > 2 $\sigma$ ( <i>I</i> ))	0.0829, 0.2067
<i>R</i> <sub>1</sub> , <i>wR</i> <sub>2</sub> (все данные)	0.0862, 0.2081
Остаточная электронная плотность (max/min), e Å <sup>-3</sup>	1.857/−0.806

лампу с полым катодом. Определение железа проводили на резонансной линии  $\lambda = 248.3$  нм.

ИК-спектр I снимали на Фурье-спектрометре Bruker ALPNA в интервале частот 400–4000 см<sup>-1</sup> в режиме нарушенного полного внутреннего отражения (НВПО).

ИК ( $\nu$ , см<sup>-1</sup>): 3284 сл, 3132 сл, 2697 о.сл, 1780 ср, 1758 о.с, 1650 сл, 1632 сл, 1425 о.сл, 1362 о.сл, 1290 о.сл, 1255 сл, 1231 сл, 1188 ср, 1141 о.сл, 1016 ср, 924 о.сл, 838 сл, 815 о.сл, 775 о.сл, 735 о.сл, 710 о.сл, 686 о.сл, 600 ср, 530 ср.

РСА I проведен на дифрактометре XCalibur с EOS координатным детектором EOS (Agilent Technologies UK Ltd, Yarnton, Oxfordshire, England). Сбор рефлексов, определение и уточнение параметров элементарной ячейки проведен при температуре 100 К с использованием монохроматизированного  $MoK_{\alpha}$ -излучения с  $\lambda = 0.71073\text{Å}$  по программе CrysAlis PRO [56]. Структура решена прямыми методами. Положения и тепловые параметры неводородных атомов уточнены анизотропно по мето-

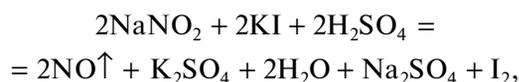
ду МНК. Все расчеты выполнены в программном комплексе SHELXTL [57]. Положения атомов водорода в анионе выявлены из разностных синтезов и уточнены в схеме наездника. Положения атомов водорода молекулы воды выявлены из разностных синтезов Фурье и уточнены с наложением ограничений на длины связей и тепловые параметры. Параметры элементарной ячейки и основные кристаллографические данные I представлены в табл. 1.

Полный набор рентгеноструктурных параметров депонирован в Кембриджском банке данных структур (CCDC № 2243554; www.ccdc.cam.ac.uk/data\_request/cif).

**Мессбауровские спектры** поглощения поликристаллического порошка I снимали на установке WissEl (Wissenschaftliche Elektronik GmbH, Германия), работающей в режиме постоянного ускорения. Источником служил  $Co^{57}$  в матрице Rh, находящийся при комнатной температуре. Обработку мессбауровских спектров проводили

методом наименьших квадратов в предположении лоренцевой формы составных линий поглощения.

**Исследование NO-донорной активности.** Для изучения NO-донорной активности I в растворах использовали сенсорный электрод amiNO-700 системы inNO Nitric Oxide Measuring System (Innovative Instruments, США). Метод основан на измерении диффузионного тока, возникающего вследствие изменения потенциала электрода при выделении NO исследуемым веществом. Концентрацию NO, генерируемого НКЖ I в течение 500 с, регистрировали с шагом 0.2 с в 0.1%-ном водном растворе ДМСО с концентрацией комплекса  $0.4 \times 10^{-5}$  М (рН 7.0;  $T = 25^\circ\text{C}$ ). Для калибровки амперометрического сенсора использовали стандартный водный раствор 1 мкМ  $\text{NaNO}_2$ , который добавляли в смесь, содержащую 18 мл  $\text{H}_2\text{O}$ , 20 мг KI и 2 мл 1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$  марки “х. ч.”. Реакция описывается уравнением:



согласно которому, соединения реагируют в соотношении 1 : 1 : 1. Это означает, что концентрация выделившегося NO эквивалентна концентрации добавленного нитрита. Добавление 10 мкл стандартного раствора нитрита приводит к выделению 50 нМ NO в 20 мл образующегося раствора. Расчет ведется по следующей формуле:

$$M_1V_1 = M_2V_2,$$

где  $M_1$  – молярность стандартного раствора нитрита;  $V_1$  – прибавленный объем стандартного раствора нитрита;  $M_2$  – молярность нитрита после прибавления стандарта в колбочку;  $V_2$  – общий объем. После этого навеску НКЖ I растворяли в 10 мл ДМСО, отбирали пробу  $V = 0.5$  мл, добавляли к 49.5 мл буферного раствора Buffer Hidrion (Sigma-Aldrich, США) с рН 7.0 и регистрировали выделение NO.

**Исследование антибактериальной активности.** Оценку антибактериальной активности I проводили путем определения минимальной подавляющей концентрации (МПК), а также способностью ингибировать образование биопленок микроорганизмов. Для определения МПК применяли микрометод последовательных серийных разведений согласно всем требованиям Методических указаний МУК 4.2.1890-04 [58]. Метод серийных разведений является современным стандартизированным и наиболее точным методом получения количественного показателя чувствительности микроорганизмов к антибактериальным агентам. Исследование проводили на культурах грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* (штамм ВВ) и грамположительных – *Micrococcus luteus* (штамм 21/26). Для проведения экспериментов готовили

рабочие суспензии обеих культур бактерий, разводили в 100 раз и высевали по 100 мкл в лунки 96-луночных планшетов. Конечная концентрация бактериального агента в лунке составляла  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл. Исследуемый комплекс I и его составляющие растворяли в ДМСО в исходной концентрации 200 мМ. Непосредственно перед нанесением соединения разводили в стерильной среде LB (пептон 1%, дрожжевой экстракт 0.5%, NaCl 1%, глюкоза 0.1%, рН 6.8–7.0) в 100 раз и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночных планшетов, содержащих суспензию бактерий. Конечные концентрации исследуемых соединений составляли 12 последовательных двукратных разведений от 1000 до 0.47 мкМ. Конечная концентрация ДМСО во всех образцах составляла 10%. Данная концентрация ДМСО не влияла на жизнеспособность микроорганизмов. Контрольные образцы выращивали в среде LB, в среде LB с 10% ДМСО при  $37^\circ\text{C}$  и в качестве отрицательного контроля в среде LB при  $4^\circ\text{C}$ . После внесения исследуемых соединений образцы инкубировали при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. В качестве контрольных антибактериальных агентов были использованы ампициллин (ОАО “Синтез”, Россия), канамицин (ОАО “Синтез”, Россия), стрептомицин (ОАО “Биохимик”, Россия) и цефтриаксон (ОАО “Биохимик”, Россия). Антибиотики были растворены в стерильной среде LB. Конечные концентрации антибиотиков составляли 12 последовательных двукратных разведений от 1000 до 0.47 мкМ.

Через 24 ч после начала инкубации проводили анализ результатов. МПК определяли как концентрацию, при которой видимый рост микроорганизмов по сравнению с контрольными образцами отсутствует.

**Исследование образования биопленок *M. luteus*.** Для проведения эксперимента рабочую суспензию бактерий высевали в 96-луночный планшет и вносили в лунки исследованное соединение и антибиотики в концентрации, соответствующей МПК. Контрольные образцы выращивали в LB, в LB с 10% ДМСО, а также LB без бактериального агента для определения фонового окрашивания подложки. Планшеты инкубировали при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 24 ч. Затем удаляли среду с планктонными клетками, промывали лунки стерильным буфером PBS (137 мМ NaCl, 2.68 мМ KCl, 4.29 мМ  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.47 мМ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , рН 7.4), затем высушивали для фиксации биопленок на подложке и окрашивали с помощью 0.1%-ного раствора генцианового фиолетового, после чего лунки промывали водой и высушивали при температуре  $37^\circ\text{C}$  в течение 60 мин. Связавшийся с биопленками краситель растворяли в 95%-ном этиловом спирте, оптическую плотность полученных растворов определяли фотометрически при длине волны 570 нм. За 100% принимали оп-

тическую плотность раствора в контрольных образцах с суспензией бактерий без добавления исследуемых комплексов. Из всех образцов вычитали фоновое окрашивание подложки (пустые лунки).

**Исследование цитотоксических свойств.** Работу проводили на культуре клеток Vero (почечный эпителий африканской зеленой марьшишки), полученных из коллекции ИНЦ РАН (Институт цитологии РАН). Культивирование клеток проводили по стандартной методике в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и температуре 37°C в среде DMEM (ПанЭко, Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (BioWest, Франция), пенициллина (50 ед./мл) и стрептомицина (50 мг/мл). Цитотоксические свойства определяли с помощью МТТ-теста. Клетки рассеивали в культуральные 96-луночные планшеты в концентрации  $5 \times 10^4$  клеток/мл. Соединения вносили в питательную среду через 24 ч после посева. Непосредственно перед внесением в культуральную среду соединения растворяли в ДМСО до максимальной концентрации 500 мМ. Конечная концентрация ДМСО в образцах не превышала 0.1%. Через 72 ч после введения ис-

следуемых соединений в инкубационную среду добавляли краситель 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолий бромид (МТТ, Диа-М, Россия) в концентрации 0.5 мг/мл. Окрашивание проводили в течение 3 ч в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> и температуре 37°C. Образовавшиеся кристаллы формазана растворяли в 100%-ном ДМСО. Измерение оптической плотности проводили при основной длине волны 570 нм и фоновой длине волны 620 нм с использованием многофункционального планшетного ридера Spark 10M (Tecan, Швейцария). Индекс цитотоксичности (IC<sub>50</sub>) определяли на основании дозозависимых кривых.

**Исследование ФДЭ ингибирующей активности.** Активность фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата (ФДЭ цГМФ) в присутствии комплекса I и его составляющих определяли по количеству образующегося в процессе ферментативной реакции гуанозинмонофосфата (ГМФ), которое, в свою очередь, равно количеству неорганического фосфата, образовавшегося из ГМФ при добавлении 5'-нуклеотидазы [59] (схема 2):

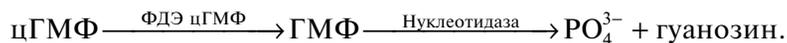


Схема 2.

В работе были использованы цГМФ, АТФ (Sigma-Aldrich, США), ДМСО, трихлоруксусная кислота (ТХУ), молибдат аммония (Реахим, Россия) после соответствующей дополнительной очистки, Трис-НСI буфер (Serva, Германия). Фермент ФДЭ цГМФ выделяли из коры головного мозга крыс линии Wistar [59]. Ткань головного мозга гомогенизировали в гомогенизаторе Поттера в 10-кратном по весу количестве охлажденного 0.2 М Трис-НСI буфера, рН 7.55. Гомогенат центрифугировали в течение 1 ч при 40000 g. Супернатант, содержащий ФДЭ цГМФ, замораживали в жидком азоте.

Влияние I и его составляющих на активность фермента и определение константы ингибирования данного соединения исследовали с помощью отработанного ранее метода [60], который заключается в определении концентрации фосфатов, образующихся в процессе реакции (схема 2). Для этого к 1 мл 0.2 М Трис-буфера (рН 7.6) добавляли аликвоту раствора ФДЭ цГМФ, содержащего 0.1 мг белка. Исследуемые соединения добавляли в виде растворов в ДМСО в объеме 0.2 мл, их конечная концентрация составляла 0.1, 0.01 или 0.001 мМ. Общий объем пробы – 2.0 мл. Через 15 мин преинкубации при комнатной температуре в пробу добавляли 0.1 мМ цГМФ. Пробу выдерживали в течение 20 мин при 30°C, после чего их помещали на 3 мин в кипящую водяную баню. Затем в охлажденные до комнатной температуры пробы добавляли 50 мкг нуклеотидазы (в виде яда кобры) и

выдерживали их при 30°C в течение 10 мин. Реакцию останавливали добавлением в каждую пробу по 0.2 мл 55% ТХУ. Реакционную смесь центрифугировали при 10000 g в течение 5 мин. При определении активности ФДЭ цГМФ содержание неорганического фосфата, накапливающегося в процессе ферментативной реакции, определяли спектроскопически по реакции с молибдатом аммония при  $\lambda = 735$  нм на спектрофотометре Spectord M-40. Относительную активность фермента рассчитывали по следующей формуле:

$$I = 100(A_0 - A)/A_0,$$

где  $I$  – относительная активность;  $A_0$  – удельное содержание неорганического фосфата в контрольной пробе (без исследуемого соединения);  $A$  – удельное содержание неорганического фосфата в опытной пробе (в присутствии исследуемого соединения).

Для определения характера ингибирования I исследовали зависимость скорости ферментативной реакции от концентрации субстрата в присутствии и отсутствии комплекса [61].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходный этионамид нерастворим в воде, но хорошо растворим в кислом водном растворе, который в этом виде и вводится в реакцию при

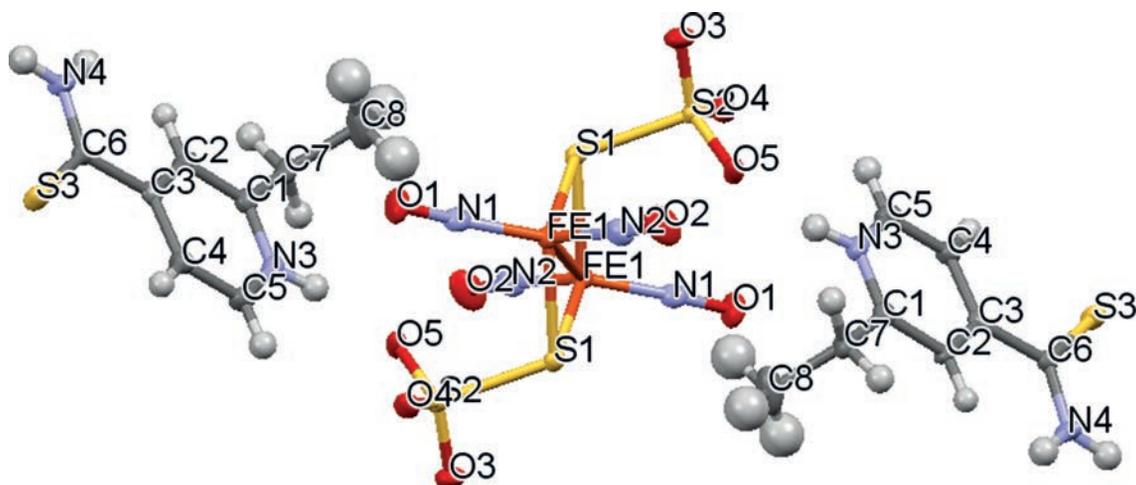


Рис. 1. Молекулярная структура комплекса I.

комнатной температуре. Комплекс I образуется обменной реакцией катиона натрия в соли

$\text{Na}_2^+[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]^{2-}$  на протонированный этионамид в кислой водной среде по схеме 3:

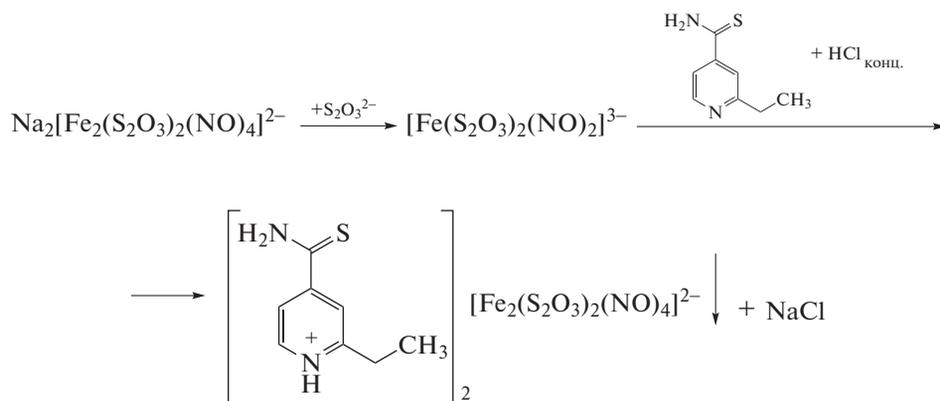


Схема 3.

Соединение I кристаллизуется в триклинной системе, кристаллическая структура уточнена в центросимметричной группе. На рис. 1 представлена молекулярная структура I. Ассиметричная часть включает половину центросимметричного биядерного нитрозильного железа с двумя тиосульфатными лигандами и ион этионамида. Каждый атом железа находится в тетраэдрическом окружении из двух атомов азота NO-лигандов и двух мостиковых атомов S дитиосульфатных анионов  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . Биядерный анион имеет заряд  $-2$ . В структуре на один биядерный дианион приходится два катиона этионамида. Следует отметить, что атом водорода при азоте N(3) найден из разностного синтеза, а не рассчитан геометрически исходя из электронейтральности. В табл. 2 представлены длины связей и валентные углы в I. Длины

связей Fe–N, N–O и углы FeNO в I совпадают в пределах трех ошибок.

На рис. 2 представлена упаковка для I. На элементарную ячейку приходится один биядерный дианион  $[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]^{2-}$  и два катиона этионамида  $\{\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}_2\text{S}\}^+$ , протонированного по атому азота пиридинового цикла.

На рис. 3 показаны цепочки межмолекулярных контактов, в которых участвуют NO-группы дианиона I, их значения представлены в табл. 3. Видно, что из двух независимых групп в межмолекулярных контактах участвует только одна N(2)–O(2) с мостиковыми атомами серы дианиона и атомом углерода катиона. По всей видимости, это находит свое отражение и в различии углов:  $\text{O}(1)\text{N}(1)\text{Fe}(1)$   $169.5(7)^\circ$  и  $\text{O}(2)\text{N}(2)\text{Fe}(1)$   $172.5(8)^\circ$ .

Наряду с ионными взаимодействиями в кристаллической структуре наблюдаются водород-

**Таблица 2.** Основные длины связей и валентные углы для I\*

Связь	$d, \text{Å}$	Связь	$d, \text{Å}$
Fe(1)–N(1)	1.669(8)	S(2)–O(4)	1.450(6)
Fe(1)–N(2)	1.674(8)	S(2)–O(5)	1.466(6)
Fe(1)–S(1)	2.253(2)	S(2)–S(1)	2.136(3)
Fe(1)–S(1) <sup>#1</sup>	2.260(2)	S(3)–C(6)	1.664(9)
Fe(1)–Fe(1) <sup>#1</sup>	2.712(2)	O(1)–N(1)	1.183(10)
S(2)–O(3)	1.447(6)	O(2)–N(2)	1.150(10)
Угол	$\omega, \text{град}$	Угол	$\omega, \text{град}$
N(1)Fe(1)N(2)	118.9(4)	O(3)S(2)O(5)	115.0(4)
N(1)Fe(1)S(1)	107.8(3)	O(4)S(2)O(5)	111.9(4)
N(2)Fe(1)S(1)	108.6(3)	O(3)S(2)S(1)	102.0(3)
N(1)Fe(1)S(1) <sup>#1</sup>	108.9(3)	O(4)S(2)S(1)	104.3(3)
N(2)Fe(1)S(1) <sup>#1</sup>	105.8(3)	O(5)S(2)S(1)	107.5(3)
S(1)Fe(1)S(1) <sup>#1</sup>	106.12(8)	S(2)S(1)Fe(1)	108.50(11)
N(1)Fe(1)Fe(1) <sup>#1</sup>	121.6(3)	S(2)S(1)Fe(1) <sup>#1</sup>	107.82(11)
N(2)Fe(1)Fe(1) <sup>#1</sup>	119.4(3)	Fe(1)S(1)Fe(1) <sup>#1</sup>	73.87(8)
S(1)Fe(1)Fe(1) <sup>#1</sup>	53.18(7)	O(1)N(1)Fe(1)	169.5(7)
S(1) <sup>#1</sup> Fe(1)Fe(1) <sup>#1</sup>	52.94(7)	O(2)N(2)Fe(1)	172.5(8)
O(3)S(2)O(4)	114.6(4)		

\* Преобразования симметрии, используемые для создания эквивалентных атомов: <sup>#1</sup>  $-x + 1, -y + 1, -z + 1$ .

ные связи (рис. 4) между атомами комплексного дианиона и катионом. В табл. 4 представлены значения водородных связей. Кристаллическая

структура I стабилизируется за счет ионных взаимодействий и водородных связей. В кристалле реализуются только два типа водородных связей, в

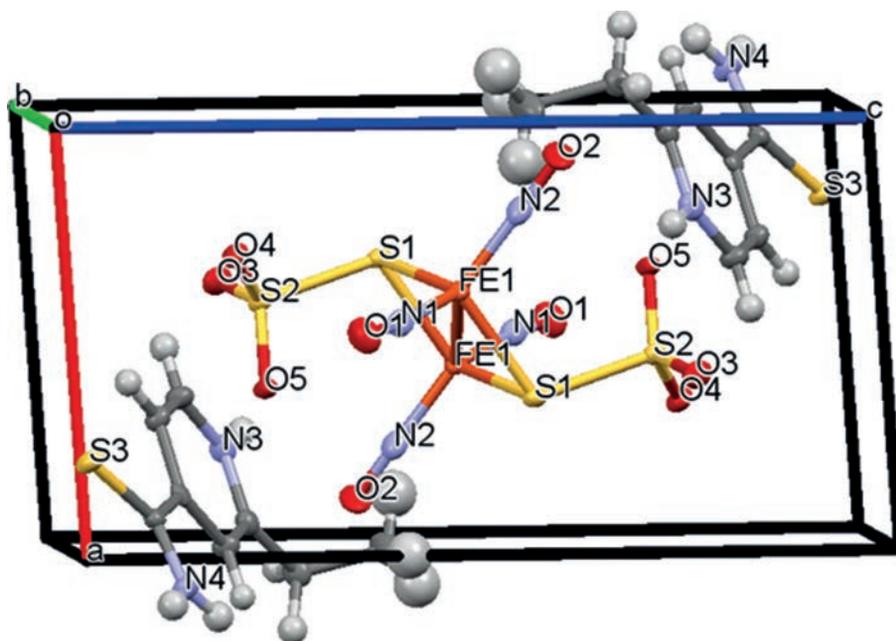


Рис. 2. Упаковка кристаллической структуры I.

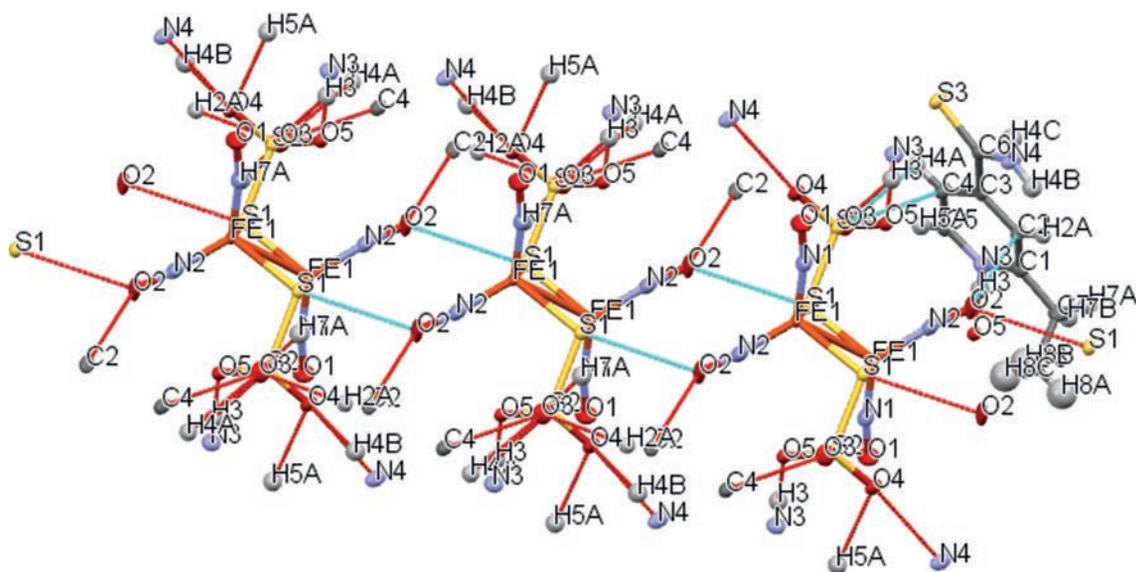


Рис. 3. Цепочки межмолекулярных контактов NO-группы дианиона I.

которых участвуют атомы водорода экзо- и эндоциклических аминогрупп N(3) и N(4) и атомы кислорода сульфогрупп. В табл. 4 представлены их значения.

Таким образом, взаимодействие между анионом и катионом осуществляется за счет электростатических взаимодействий и водородных связей внутрициклической аминогруппы N(3) и эндоциклической N(4) с атомами кислорода сульфогрупп.

Параметры мессбауэровского спектра для порошка I (изомерный сдвиг  $\delta_{\text{Fe}} = 0.090(3)$  мм/см; квадрупольное расщепление  $\Delta E_Q = 1.126(6)$  мм/см и ширина линии  $\Gamma = 0.275(8)$  мм/см при  $T = 293$  К близки к таковым для семейства нейтральных тетранитрозильных комплексов железа “ $\mu$ -S” структурного типа с дианионом  $[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]^{2-}$ , исследованных нами ранее [62–64].

Установлено, что в 1%-ных аэробных водных растворах ДМСО I генерирует NO без дополнительной активации (фото-, термо- или редокс-агентов). Выделение NO при разложении комплекса наблюдается уже в первые секунды после растворения. На рис. 5 представлены кинетические зависимости для I: в нейтральных аэробных растворах I эффективнее генерирует NO (18.2 нМ), чем в анаэробных (2.8 нМ). К 250-ой секунде кри-

вые выходят на “плато”, а количества образующегося NO не уменьшается к 500-ой секунде эксперимента, свидетельствуя об образовании в растворах этого комплекса долгоживущих нитрозильных интермедиатов, которые могут отвечать за пролонгированную NO-донорную активность. Комплекс I содержит в своей структуре дианион  $[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]^{2-}$ . Масс-спектрометрический анализ раствора комплекса с таким же дианионом показал, что через ~4 мин после его приготовления в масс-спектре в основном присутствуют ионы  $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)(\text{NO})_2]^-$ ,  $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)(\text{NO})]^-$  и  $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)]^-$  в соотношении 1 : 0.47 : 0.16. Через 24 мин содержание основных ионов  $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)(\text{NO})_2]^-$  составляет 40%, а через 64 мин – 10% от исходного при неизменном соотношении интенсивностей этого иона и ионов  $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)(\text{NO})]^-$  и  $[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)]^-$  [65]. Следует отметить, что pH раствора влияет на количество NO, генерируемое комплексом I, при этом ход кинетических кривых не меняется: в более кислых средах генерация комплексом I усиливается (как в аэробных, так и в анаэробных условиях), а в щелочных кислородсодержащих растворах уменьшается (табл. 5).

Таким образом, по данным амперометрии, I более эффективно генерирует NO в водных растворах в аэробных условиях при физиологических pH 6.5–7.0, что делает его перспективным донором NO для биомедицинских исследований.

Комплекс оказался эффективным как в отношении грамотрицательных, так и грамположительных микроорганизмов: антибактериальное действие его сравнимо с действием препаратов сравнения – канамицина и стрептомицина. В табл. 6 представлены значения МПК для I, этионамида и натриевой соли

Таблица 3. Межмолекулярные контакты в комплексе I

Атом 1	Атом 2	$d, \text{\AA}$
O(2)	S(1)	3.320
O(3)	C(4)	2.941
O(2)	C(2)	3.165

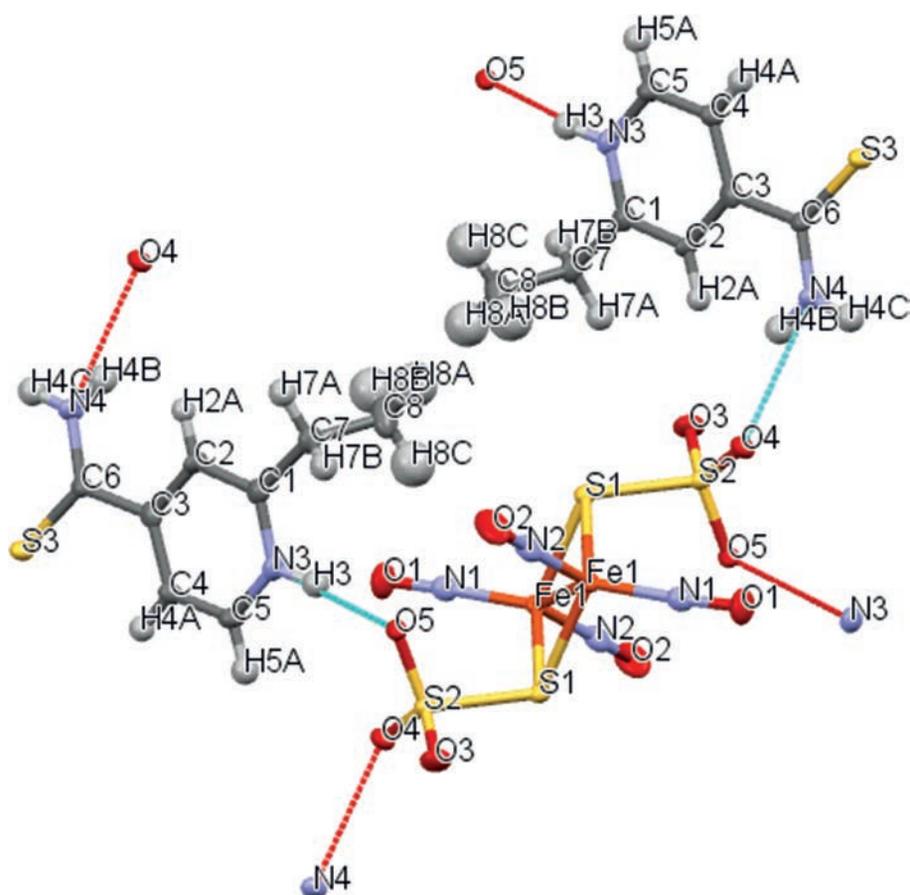


Рис. 4. Фрагмент кристаллической структуры I. Атомы представлены в виде эллипсоидов 50%-ной вероятности. Штриховыми линиями показаны водородные связи.

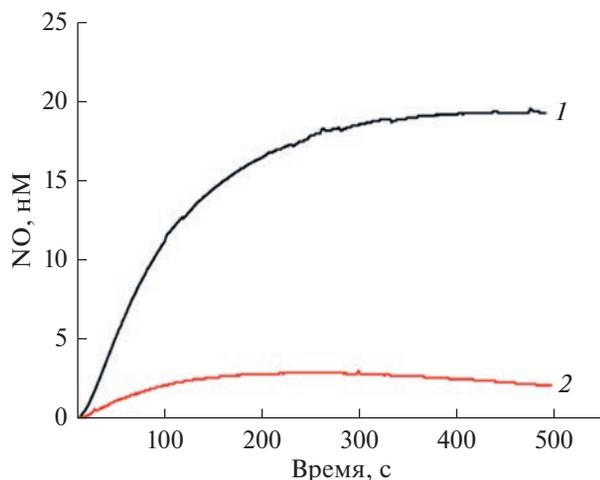
с дианионом  $[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]^{2-}$ . Как видно из полученных результатов, составляющие комплекса I, этионамид и  $[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]^{2-}$ , не оказывают антибактериального эффекта. Значения МПК для них составляет более 1000 мкМ. Таким образом, антибактериальное действие исследуемого комплекса I не определяется действием его составляющих.

Бактериальные биопленки представляют собой микробное сообщество, окруженное матриксом из внеклеточных полисахаридов, продуцируемых бактериями. В сравнении с планктонной

формой, бактериальные биопленки более устойчивы к действию антибиотиков из-за наличия защитного барьера, что затрудняет лечение инфекций. В этой связи поиск и разработка альтернативных антибактериальных соединений весьма актуальна [66]. На рис. 6 показано влияние I и соединений сравнения в концентрации, соответствующей МПК, на способность *M. luteus* образовывать биопленки. Комплекс I эффективно подавляет формирование биопленок *M. luteus* (39%), при этом его активность сравнима или существенно превосходит эффективность исследуемых антибиотиков.

Таблица 4. Геометрические параметры водородной связи в комплексе I

D–H...A	Расстояние, Å			Угол DHA, град	Координаты атома A
	D–H	H...A	D...A		
N(4)–H(4B)...O(4)	0.860	2.126	2.848	141.25	$x - 1, y, z$
N(4)–H(4C)...S(3)	0.860	2.518	3.363	167.60	$-x, -y + 1, -z + 2$
N(3)–H(3)...S(2)	0.850	2.887	3.648	149.98	$x, y - 1, z$
N(3)–H(3)...O(5)	0.850	1.829	2.672	170.85	$x, y - 1, z$



**Рис. 5.** Зависимости концентрации NO, генерируемого I ( $0.4 \times 10^{-5}$  M) в 0.1%-ном водном растворе ДМСО при pH 7.0 и  $T = 25^\circ\text{C}$  в аэробных (1) и анаэробных (2) условиях от времени.

Следует отметить, что антибактериальная активность I вдвое выше, чем комплекса с тиобензамидом: как в экспериментах по подавлению роста бактерий, так при исследовании образования биопленок. Антибактериальная эффективность НКЖ I и комплекса с тиобензамидом коррелирует с их NO-донорной активностью. Комплекс с тиобензамидом в этих же экспериментальных условиях генерирует 5.0 нМ NO [52], а НКЖ I – 18.2 нМ NO. В то же время анализ широкого ряда НКЖ показывает, что отчетливая корреляция между антибактериальными и NO-донирующими свойствами НКЖ отсутствует [52]. Возможно, антибактериальный эффект НКЖ обусловлен образованием долгоживущих нитрозильных интермедиатов.

Результаты изучения цитотоксического действия I и этионамида представлены на рис. 7. Рассчитанные на основании кривых значения  $IC_{50}$  приведены в табл. 6. Как видно из рис. 7, повышение концентрации I до концентрации 125 мкМ вызывает снижение жизнеспособности клеток,

**Таблица 5.** Максимальные количества NO, генерированные комплексом I (концентрация комплекса  $0.4 \times 10^{-5}$  M) в 1%-ных водных растворах ДМСО при различных pH

pH	NO, нМ	
	анаэробные условия	аэробные условия
6.5	11.2	19.3
7.0	2.8	18.2
8.0	2.8	0.4
9.0	9.1	1.0

при дальнейшем увеличении концентрации наблюдается сохранение жизнеспособности у 10% клеточной популяции. Структурные составляющие, входящие в состав I – этионамид (рис. 7, табл. 7) и  $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  [52] обладают низкой цитотоксической активностью.

В настоящей работе также было проведено экспериментальное исследование активности I как ингибитора ФДЭ.

Гидролитические ферменты из семейства ФДЭ осуществляют разрыв фосфоэфирной связи циклических нуклеотидов и, таким образом, регулируют их внутриклеточный уровень [67]. Ингибирование активности ФДЭ, наряду с активацией гаунилатциклазы NO, приводит к накоплению циклических нуклеотидов, являющихся универсальными регуляторами внутриклеточного метаболизма [68]. Известно, что ингибиторы фосфодиэстеразы широко используются в медицине для лечения легочной артериальной гипертензии, хронической обструктивной болезни легких, доброкачественной гиперплазии предстательной железы, эректильной дисфункции, острой декомпенсированной сердечной недостаточности, псориаза, атопического дерматита и т.д. [69–71].

Результаты по ингибированию ферментативной активности I и этионамида представлены в табл. 8. Согласно полученным данным, в диапазоне концентраций от 0.1 до 0.001 мМ комплекс I проявляет модулирующее действие на активность ФДЭ цГМФ. Он тормозит активность фермента в концентрации 0.1 мМ на 68.3%.

Действие I на функции фермента сопоставлено с действием этионамида, входящего в его состав. Показано, что этионамид в исследуемых концентрациях слабо ингибирует функции ФДЭ цГМФ и по сравнению с комплексом I в концентрации 0.1 мМ он тормозит ферментативные функции в 6.7 раз хуже. Таким образом, обнаруженная способность исследованного соединения к ингибированию ферментативной активности ФДЭ цГМФ позволяет прогнозировать его высокую терапевтическую активность.

Для получения более полного представления о механизме действия I на фермент был применен кинетический метод исследования ферментативных реакций, позволяющий судить о характере связывания фермента с ингибитором. Характер влияния обратимо действующего ингибитора определяется зависимостью обратных величин скорости ферментативной реакции ( $1/V$ ) от концентрации субстрата ( $1/S$ ) [61].

Как видно из рис. 8, исследуемый комплекс I тормозит активность ФДЭ цГМФ конкурентно с константой ингибирования  $K_i = 2.9 \times 10^{-4}$  M, что предполагает его связывание с активным центром фермента.

Ранее в [60] был изучен механизм действия  $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  на ферментативные функции ФДЭ цГМФ. Было установлено, что этот комплекс по сравнению с I эффективнее ингибирует активность фермента в исследуемых концентрациях: в 0.1, 0.01 и 0.001 мМ на 100, 87 и 65%, соответственно. При этом показано, что он является неконкурентным ингибитором, т.е. связывается вне активного центра фермента с константой ингибирования  $K_i = 1$  мкМ, что на два порядка ниже, чем константа для I. Видимо, в данном случае значительное влияние оказывает противоион – протонированный этионамид, который, как было показано в табл. 7, может сам ингибировать функции ФДЭ.

Таким образом, с помощью РСА установлено, что этионамид ( $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{S}$ ) в сильноокислых средах протонируется по атому азота пиридинового цикла и замещает катион  $\text{Na}^+$  в соли  $\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  с образованием биядерного комплекса  $(\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{S}^+)_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4]^{2-}$  – эффективного донора NO в физиологических условиях. Показано, что комплекс I обладает антибактериальной активностью в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, сопоставимой с действием антибиотиков канамицина и стрептомицина, и подавляет образование биопленок бактерий *Micrococcus luteus* с эффективностью, сравнимой с действием цефтриаксона. Впервые получены данные по цитотоксическому действию комплекса I: соединение проявляет токсичность по отношению к клеткам Vero с дозой  $\text{IC}_{50}$  около 70 мкМ. Показано, что комплекс I

**Таблица 6.** Значения МПК исследуемых соединений

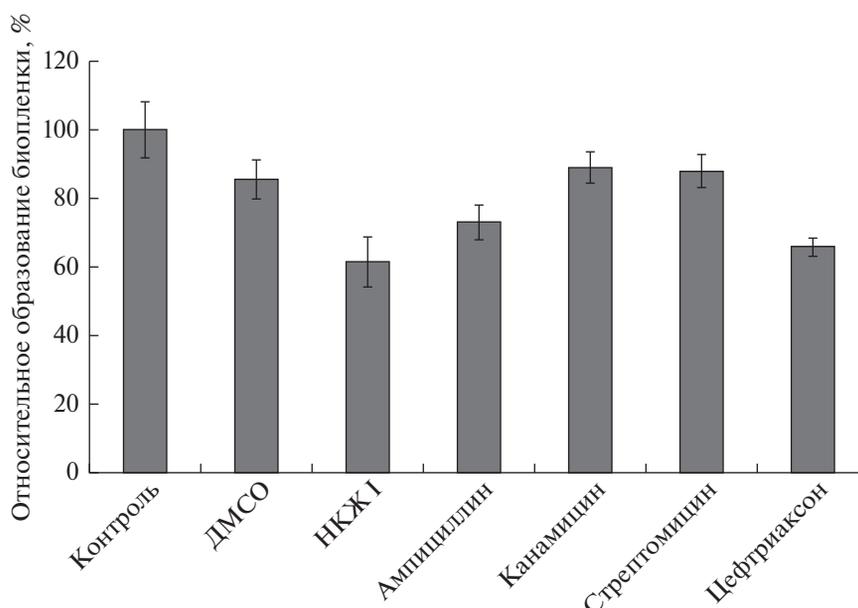
Соединение	МПК, мкМ	
	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>
I	31.25	62.5
Этионамид	>1000	>1000
$\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	>1000	>1000
Ампициллин	0.98	3.9
Канамицин	62.5	31.25
Стрептомицин	125	62.5
Цефтриаксон	3.9	0.98

**Таблица 7.** Значения  $\text{IC}_{50}$  исследуемых соединений для клеток Vero

Соединение	$\text{IC}_{50}$ , мкМ
I	$69.27 \pm 3.45$
Этионамид	>500
$\text{Na}_2[\text{Fe}_2(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	>500

является эффективным ингибитором гидролитического фермента – фосфодиэстеразы циклического гуанозинмонофосфата в исследованном диапазоне концентраций (0.1–0.01 мМ); он конкурентно тормозит функцию фермента с константой ингибирования  $K_i = 2.9 \times 10^{-4}$  М.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.



**Рис. 6.** Эффективность образования биопленки *M. luteus*, при действии исследуемых соединений в дозе МПК через 24 ч после введения.

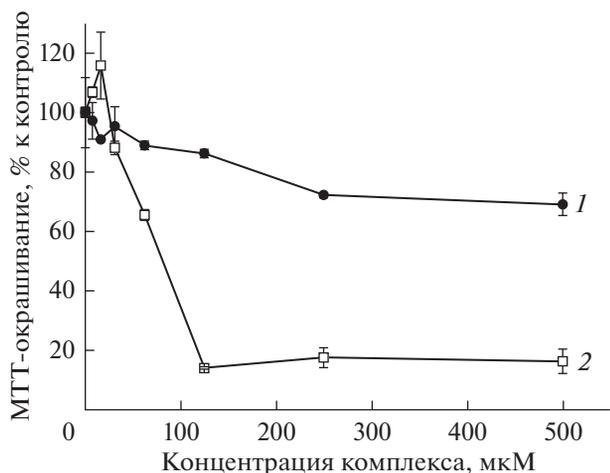


Рис. 7. Кривые “доза-эффект” для клеток Vero через 72 ч после действия этионамида (1) и комплекса I (2).

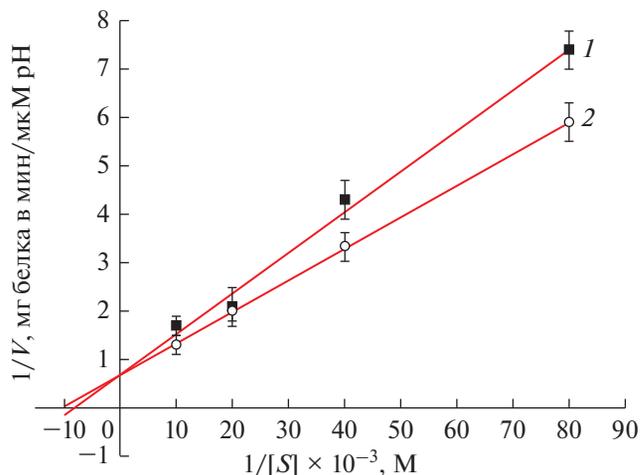


Рис. 8. Зависимость обратной скорости гидролиза цГМФ от концентрации субстрата (0.1, 0.05, 0.025, 0.0125 мМ) в координатах Лайнуивера–Берка: в присутствии  $1 \times 10^{-4}$  М I (1) и в отсутствие комплекса (2).

Таблица 8. Ингибирование ФДЭ цГМФ (в % от контроля) при действии I и этионамида

Соединение	Ингибирование активности фермента (в % от контроля)		
	концентрация, мМ		
	0.1	0.01	0.001
I	68.3	17.1	14.3
Этионамид	10.3	5.1	2.6

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (государственное задание № АААА-А19-119071890015-6).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Benencia F., Courreges M.C. // Immunology. 1999. V. 98. № 3. P. 363.
- Mehta D.R., Ashkar A.A., Mossman K.L. // PLoS One. 2012. V. 7. № 2. Art. e31688.
- McMullin B.B., Chittock D.R., Roscoe D.L. et al. // Respiratory Care. 2005. V. 50. № 11. P. 1451.
- Jones-Carson J., Zweifel A.E., Tapscott T. et al. // PLoS Negl. Trop. Dis. 2014. V. 8. № 8. Art. e3079.
- Fang F.C. // J. Clin. Invest. 1997. V. 99. № 12. P. 2818.
- De Groote M.A., Fang F.C. // Clin. Infect. Dis. 1995. V. 21. № 2. P. S162.
- Schairer D.O., Chouake J.S., Nosanchuk J.D. et al. // Virulence. 2012. V. 3. P. 271.
- Jones M.L., Ganopolsky J.G., Labbe A. et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 88. № 2. P. 401.
- Jones M.L., Ganopolsky J.G., Labbe A. et al. // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 87. № 2. P. 509.
- Fox S., Wilkinson T.S., Wheatley P.S. et al. // Acta Biomater. 2010. V. 6. № 4. P. 1515.
- Narin G., Albayrak C.B., Ulku S. // Appl. Clay Sci. 2010. V. 50. № 4. P. 560.
- Weller R., Ormerod A.D., Hobson R.P. et al. // J. Am. Acad. Dermatol. 1998. V. 38. № 4. P. 559.
- Ormerod A.D., White M.I., Shah S.A. et al. // Br. J. Dermatol. 1999. V. 41. № 6. P. 1051.
- Phillips R., Adjei O., Lucas S. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 2004. V. 48. № 8. P. 2866.
- Ormerod A.D., Shah A.A., Li H. et al. // BMC Res. Notes. 2011. V. 4. P. 458.
- Davidson R.N., Yardley V., Croft S.L. et al. // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2000. V. 94. № 3. P. 319.
- Daiber A., Wenzel P., Oelze M. et al. // Clin. Res. Cardiol. 2008. V. 97. № 1. P. 12.
- Deupree S.M., Schoenfisch M.H. // Acta Biomater. 2009. V. 5. № 5. P. 1405.
- Schairer D.O., Chouake J.S., Nosanchuk J.D., Friedman A.J. // Virulence. 2012. V. 3. № 3. P. 271.
- Cariello A.J., Bispo P.J., de Souza et al. // Clin. Ophthalmol. 2012. V. 6. P. 1907.
- Williams D.L.H. // Acc. Chem. Res. 1999. V. 32. № 10. P. 869.
- Laver J.R., Stevanin T.M., Messenger S.L. et al. // FASEB J. 2010. V. 24. № 1. P. 286.
- Jaouen G., Salmain M. The Bioorganometallic Chemistry: Applications in Drug Discovery, Biocatalysis and Imaging. Weinheim: Wiley-VCH, 2014. 424 p.

24. Hsiao H., Chung C., Santos et al. // Dalton Trans. 2019. V. 48. P. 9431.
25. Gould N., Doulias P.-T., Tenopoulou M. et al. // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 37. P. 26473.
26. Stupina T.S., Antonova N.O., Balalaeva et al. // Intern. Sci. J. Med. Biol. Sci. 2014. V. 1. № 1. P. 23.
27. Григорьев А.И., Владимиров Ю.А. Фундаментальные науки – медицине: Биофизические медицинские технологии. М.: МАКС Пресс, 2015. 448 с.
28. Санина Н.А., Козуб Г.И., Кондратьева Т.А. и др. // Изв. АН. Сер. хим. 2017. № 9. С. 1706.
29. Мумятова В.А., Козуб Г.И., Кондратьева Т.А. и др. // Изв. АН. Сер. хим. 2019. № 5. С. 1025.
30. Санина Н.А., Мумятова В.А., Терентьев А.А. и др. // Изв. РАН. Сер. хим. 2019. № 12. С. 2225.
31. Hanouille X., Wieruszkeski J.M., Rouseelot-Pailley P. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2005. V. 331. P. 452.
32. Vilchèze C., Weisbrod T.R., Chen B. et al. // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. V. 49. P. 708.
33. Yu K.L., Torri A.F., Luo G. et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002. V. 12. № 23. P. 3379.
34. Hitotsuyanagi Y., Hasuda T., Matsumoto Y. et al. // Chem. Commun. 2000. № 17. P. 1633.
35. Nakagawa Y., Irie K., Ohigashi H. et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2000. V. 10. № 18. P. 2087.
36. Wei Q.L., Zhang S.S., Gao J. et al. // Bioorg. Med. Chem. 2006. V. 14. № 21. P. 7146.
37. Wentland M.P., Sun X., Bu Y. et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2005. V. 15. № 10. P. 2547.
38. Krinková J., Doležal M., Hartl J. et al. // Il Farmaco. 2002. V. 57. № 1. P. 71.
39. Yu K.L., Torri A.F., Luo G. et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002. V. 12. № 23. P. 3379.
40. Davies D.J., Faust R., Garratt P.J. et al. // Bioorg Chem. 2004. V. 32. № 1. P. 1.
41. Boström J., Olsson R.I., Tholander J. et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010. V. 20. № 2. P. 479.
42. Thanigaimalai P., Sharma V.K., Lee K.C. et al. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2010. V. 20. № 16. P. 4771.
43. Brunhofer G., Studenik C., Ecker G.F. et al. // Eur. J. Pharm. Sci. 2011. V. 42. № 1–2. P. 37.
44. Shimotori Y., Hoshi M., Ogawa N. et al. // Heterocycl. Commun. 2020. V. 26. P. 84.
45. Регистр лекарственных средств России: Энциклопедия лекарств. Вып. 29 / Под ред. Вышковского Г.Л. Москва: Веданта, 2021.
46. Mahantaa N., Szantai-Kisc M., Peterssonc E.J. et al. // ACS Chem. Biol. 2019. V. 14. № 2. P. 142.
47. Vale N., Gomes P., Santos H. // Curr. Drug Metab. 2013. V. 14. № 1. P. 151.
48. Mills III, T., Roberson J.C. Instrumental Data for Drug Analysis. V. 2. N.Y.: Elsevier, 1992. 1577 p.
49. Eccles K.S., Morrison R.E., Maguire A.R. et al. // Cryst. Growth Des. 2014. V. 14. P. 2753.
50. Wysokinski R., Michalska D., Bienko D.C. et al. // J. Mol. Struct. 2006. V. 791. № 1–3. P. 70.
51. Vale N., Makila E., Salonen J. et al. // Eur. J. Pharm. Biopharm. 2012. V. 81. P. 314.
52. Sanina N.A., Starostina A.A., Utenyshev A.N. et al. // Molecules. 2022. V. 27. P. 6886.
53. Карякин Ю.В., Ангелов И.И. Чистые химические вещества. М.: Химия, 1974. 408 с.
54. Sanina N.A., Aldoshin S.M., Rudneva T.N. // Russ. J. Coord. Chem. 2005. V. 31. № 5. P. 301. <https://doi.org/10.1007/s11173-005-0093-3>
55. Weissberger A., Proskauer E., Riddick J.A. et al. Organic Solvents: Physical Properties and Methods of Purification. N.Y.: Interscience Publishers Inc., 1955. 1344 p.
56. Agilent. CrysAlis PRO. Yarnton—Oxfordshire (England): Agilent Technologies UK Ltd., 2011.
57. Sheldrick G.M. SHELXTL. Version 6.14. Structure Determination Software Suite. Madison (WI, USA): Bruker AXS, 2000.
58. МУК 4.2.1890–04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания: дата введения 2014-03-04. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с.
59. Либинзон Р.Е., Щеколдина Т.Г., Батолкина О.Е. и др. // Вопросы медицинской химии. 1977. 23. № 4. С. 526.
60. Татьянаенко Л.В., Котельников А.И., Доброхотова О.В. и др. // Хим.-фарм. журн. 2009. Т. 43. № 9. С. 45.
61. Березин И.В., Клесов А.А. Практический курс химической и ферментативной кинетики. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. 324 с.
62. Glidewell C., Hursthouse M.B., Lambert R.J. et al. // Dalton Trans. 1989. P. 2061.
63. Sanina N.A., Rakova O.A., Aldoshin S.M. et al. // Russ. J. Coord. Chem. 2001. V. 27. № 3. P. 179. <https://doi.org/10.1023/A:1009598228585>
64. Sanina N.A., Emel'yanova N.S., Chekhlov A.N. et al. // Russ. Chem. Bull. 2010. V. 59. P. 1126.
65. Sanina N.A., Sulimenkov I.V., Rudneva T.N. et al. // Dokl. Chem. 2009. V. 425. Pt 1. P. 60.
66. Chan C., Hardin T.C., Smart J.I. // Future Microbiol. 2015. V. 10. P. 1325.
67. Omori K., Kotera J. // Circ. Res. 2007. V. 100. P. 309.
68. Hardman J.G., Robison G.A., Sutherland E.W. // Annu. Rev. Physiol. 1971. V. 33. P. 311.
69. Padda I.S., Tripp J. Phosphodiesterase Inhibitors. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing LLC, 2022.
70. Baillie G.S., Tejeda G.S., Kelly M.P. // Nat. Rev. Drug Discov. 2019. V. 18. P. 770.
71. Miller M.S. // J. Receptor, Ligand Channel Res. 2015. V. 8. P. 19.