

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

## ВЛИЯНИЕ F-ЗАМЕСТИТЕЛЕЙ В ТИОФЕНОЛИЛЕ НА СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА $\mu_2$ -S-(ДИФТОРТИОЛАТ)ТЕТРАНITРОЗИЛЬНЫХ БИЯДЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

© 2023 г. Н. А. Санина<sup>a, b, c, \*</sup>, А. С. Конюхова<sup>a, b</sup>, Д. В. Корчагин<sup>a</sup>, Н. С. Ованесян<sup>a</sup>, А. В. Куликов<sup>a</sup>, В. А. Мумятова<sup>a</sup>, А. А. Терентьев<sup>a, b, c</sup>, С. М. Алдошин<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Федеральный исследовательский центр проблем химической физики

и медицинской химии РАН, пр-т Академика Семенова, 1, Черноголовка, 142432 Россия

<sup>b</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991 Россия

<sup>c</sup>Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

“Государственный университет просвещения”, ул. Веры Волошиной, 24, Мытищи, 141014 Россия

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

Поступила в редакцию 27.04.2023 г.

После доработки 30.05.2023 г.

Принята к публикации 31.05.2023 г.

Синтезированы новые нейтральные биядерные тетранитрозильные комплексы железа состава  $[\text{Fe}_2\text{R}_2(\text{NO})_4]$  (R = 2,4-дифтортиофенил (**1**) и 3,4-дифтортиофенил (**2**)) – доноры монооксида азота (NO). Комплексы исследованы методами мессбауэровской, ИК- и ЭПР-спектроскопии, рентгеноструктурного и элементного анализа. Впервые изучена антибактериальная активность и цитотоксичность на нормальных клетках *Verо* комплексов **1**, **2** и ранее синтезированного комплекса  $[\text{Fe}_2\text{R}'_2(\text{NO})_4]$  (R' = 2,4-дихлортиофенил (**3**)) и выполнен корреляционный анализ количество NO–биологическая активность в зависимости от природы и положения заместителя в тиофенильном лиганде. Установлено, что комплекс **2** обладает антибактериальной активностью, превосходящей известную антибиотика канамицина в 4 раза, и антибиопленочной активностью: на 46% ингибирует формирование биопленок и на 32% разрушает сформированные биопленки *M. luteus*, превосходя действие препаратов сравнения канамицина и ампициллина.

**Ключевые слова:** доноры оксида азота, PCA, спектроскопия, антибактериальная активность, МТТ-тест

**DOI:** 10.31857/S0044457X23600664, **EDN:** WRLQZC

### ВВЕДЕНИЕ

Нейтральные тетранитрозильные комплексы железа (эфирные “красной соли Руссена”, RREs) с алифатическими [1–13] и ароматическими тиолилами [14–21] представляют практический интерес для медицины [22, 23] как “рабочая форма” [24, 25] монооксида азота (NO) – важнейшей сигнальной молекулы в организме [26–45] из-за их хорошей стабильности, простоты синтеза и относительно низкой цитотоксичности [27]. RREs, находясь в равновесии с моноядерными динитрозильными комплексами железа, образующимися при трансформации RREs в полярных средах, участвуют в процессах транспорта NO к клеточным мишеням и являются перспективным классом экзогенных доноров NO для химиотерапии оксидом азота (NO-терапия) социально значимых заболеваний благодаря отсутствию необходимости их специальной (термо-, фото- или фер-

ментативной) активации для генерации NO [46]. Показано, что RREs обладают широким спектром фармакологических свойств в зависимости от природы тиолатных лигандов.

Перспективным направлением в дизайне новых представителей этого семейства являются синтез и исследование RREs, содержащих тиофенолил (PhS-) и его производные [14–18]. Нами получен ряд RREs на основе тиофенола и его производных с различными заместителями [47–53] и установлено, что природа заместителя в тиофенолильном лиганде оказывает влияние на их NO-донорную и связанную с ней фармакологическую активность. Для RREs с лигандами на основе тиофенола и его окси-, амино- и нитропроизводных было обнаружено три кинетических профиля генерации NO [54]. При NO-донировании “взрывного” типа, характерном для комплексов с аминотиофенильными лигандами, которые демон-

стрируют высокую противоопухолевую активность [49, 50, 55], значительная часть NO быстро высвобождается в раствор в течение 1–3 мин. В случае генерации NO, характерной для комплексов с тиофенолом и его нитропроизводными, демонстрирующих антибактериальную активность, сравнимую с антибиотиками [56], на кинетических кривых наблюдается быстрый выход на насыщение задолго до полного выхода в раствор всех групп NO, содержащихся в структуре исходного комплекса (псевдонасыщение). Пролонгированный тип NO-донирования, проявляемый антибактериальными RREs с гидроксифенильными лигандами, характеризуется практически постоянной скоростью выделения NO в раствор без выраженного перехода к насыщению (10–12 мин). Эти два последних типа NO-донирования обусловлены образованием в системе долгоживущих нитрозильных интермедиатов. Недавно нами было показано [57], что введение акцепторных заместителей – двух атомов хлора – в тиофенолил позволило получить RRE, который в ДМСО распадается на моноядерные динитрозильные комплексы с 3,4-дихлортиофенолильным и ДМСО-лигандами. Хранение этого RRE в ДМСО приводит к увеличению его NO-донорной активности (из-за координации ДМСО), а в реакции его с бычьим сывороточным альбумином образуется высокомолекулярный продукт с долговременной пролонгированной генерацией NO. Такой эффект для RREs был получен впервые и позволяет предположить, что введение акцепторных заместителей в тиофенолил обеспечит высокую антибактериальную активность новых RREs, которые могли бы стать заменой используемым в клинике антибиотикам и/или превосходить их в плане эффективности, малой токсичности и отсутствия развития бактериальной резистентности.

В настоящей работе впервые синтезированы два новых RREs общего состава  $[\text{Fe}_2\text{R}_2(\text{NO})_4]$ , где R = 2,4-дифтортиофенилил (комплекс **1**) и 3,4-дифтортиофенилил (комплекс **2**), исследовано их строение (методами РСА, ИК-, ЭПР-, мессбауэровской спектроскопии), а также антибактериальная активность и цитотоксические свойства в сравнении с ранее синтезированным комплексом  $[\text{Fe}_2\text{R}'_2(\text{NO})_4]$  с R' = 3,4-дихлортиофенилил (комплекс **3**) [57].

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали коммерческие препараты 2,4-дифтортиофенол (98%) и 3,4-дифтортиофенол фирмы Sigma-Aldrich. Соль  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  была получена по методике [58].

Методика приготовления нитрозильного комплекса **3** описана в работе [57].

Все операции по приготовлению и смешиванию растворов проводили в инертной атмосфере.

**Общая методика синтеза комплексов 1 и 2.** В трехгорлую колбу, продувную аргоном в течение 0.5 ч, помещали смесь 0.287 г  $\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{S}_2\text{O}_3)_2(\text{NO})_4] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  и 0.248 г  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  в 25 мл воды. Соответствующий дифтортиофенол (0.2 мл) смешивали с раствором 0.08 г NaOH в 2.5 мл воды. Полученный раствор при интенсивном перемешивании прикапывали в реакционную колбу в токе аргона и оставляли на сутки при температуре +4°C. Выпавший осадок отфильтровывали через стеклянный фильтр № 4 под аргоном и растворяли в хлористом метиле. Раствор частично упаривали и помещали в морозильную камеру при –18°C. Через сутки выпадали кристаллы, которые отфильтровывали через мембранный фильтр и сушили на воздухе. Выход составил 79% для комплекса **1** и 62% для комплекса **2**.

Кристаллы для рентгеноструктурного анализа были получены двойной перекристаллизацией реакционного продукта из абсолютного хлористого метилена, очищенного по методу [59] при –18°C.

**Элементный анализ** поликристаллов **1** и **2** выполнен в АЦКП ИПХФ РАН на CHNS/O-элементном анализаторе VarioMicrocube. Анализ на содержание железа проведен методом атомно-абсорбционной спектроскопии в пламени ацетилен–воздух с использованием дейтериевого корректора фона на атомно-абсорбционном спектрофотометре AAS-3 фирмы Carl Zeiss Jena (Германия). В работе была использована лампа с полым катодом. Определение железа проводили на резонансной линии  $\lambda = 248.3$  нм.

	C	H	N	S	O	F	Fe
Найдено, %:	27.60	1.20	10.69	12.30	12.24	14.55	21.42

Для  $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_4\text{S}_2\text{O}_4\text{F}_4\text{Fe}_2$  (**1**)

вычислено, %: 27.61; 1.16; 10.73; 12.28; 12.26; 14.56; 21.40.

	C	H	N	S	O	F	Fe
Найдено, %:	27.58	1.18	10.77	12.26	12.28	14.58	21.40

Для  $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{N}_4\text{S}_2\text{O}_4\text{F}_4\text{Fe}_2$  (**2**)

вычислено, %: 27.61; 1.16; 10.73; 12.28; 12.26; 14.56; 21.40.

**ИК-спектры** записывали на Фурье-спектрометре (Bruker ALPHA) в диапазоне частот 400–4000  $\text{cm}^{-1}$  в режиме НПВО при комнатной температуре.

ИК-спектр **1**: 3461 (оч. сл.), 3091 (сл.), 3003 (сл.), 1786 (ср.), 1746 (с.), 1701 (с.), 1620 (ср.), 1588 (оч. с.), 1479 (с.), 1416 (с.), 1454 (ср.), 1294 (ср.), 1261 (оч. с.), 1227 (ср.), 1139 (оч. с.), 1113 (оч. с.), 1058 (ср.), 1022 (ср.), 959 (с.), 947 (ср.), 849 (с.), 806 (с.), 732 (с.),

696 (ср.), 632 (ср.), 602 (ср.), 550 (ср.), 501 (ср.), 459 (ср.), 445 (ср.).  $\nu_{\text{NO}}$ ,  $\text{см}^{-1}$  = 1786, 1746, 1701.

ИК-спектр **2**: 3092 (сл.), 3002 (сл.), 1787 (ср.), 1743 (ср.), 1695 (ср.), 1600 (ср.), 1493 (с.), 1403 (ср.), 1269 (ср.), 1238 (ср.), 1196 (ср.), 1114 (ср.), 1061 (сл.), 1022 (ср.), 945 (с.), 898 (с.), 861 (с.), 808 (с.), 769 (с.), 645 (ср.), 621 (ср.), 589 (ср.), 573 (ср.), 448 (ср.).  $\nu_{\text{NO}}$ ,  $\text{см}^{-1}$  = 1787, 1743, 1695.

**Мессбауэровская спектроскопия.** Мессбауэровские спектры поглощения комплексов **1** и **2** снимали на установке WissEl (Германия), работающей в режиме постоянного ускорения. Источником  $\gamma$ -излучения служил  $^{57}\text{Co}$  в матрице Rh. Измерения спектров при низких температурах проводили с помощью проточного гелиевого криостата CF-506 (Oxford Instruments) с регулируемой температурой от 4.2 до 305 К. Калибровку скорости осуществляли с обогащенной железной фольгой  $^{57}\text{Fe}$  1 мкм.

Обработку мессбауэровских спектров проводили методом наименьших квадратов в предположении лоренцевой формы составляющих линий поглощения.

**Рентгенодифракционные эксперименты** для соединений **1** и **2** выполняли при температуре  $T = 100$  К на дифрактометре XCalibur с CCD-детектором с использованием  $\text{MoK}_\alpha$ -излучения ( $\lambda = 0.71073 \text{ \AA}$ ) и графитового монохроматора. Параметры элементарной ячейки определяли на основе отражений с  $2\theta = 4^\circ - 60^\circ$  и уточняли после завершения сбора данных по более чем 1000 отражений с  $I > 6\sigma(I)$ . Интегрирование интенсивностей и профильный анализ осуществляли с использованием процедуры, встроенной в программный комплекс CrysAlisPro (Agilent Technologies). Структуры расшифрованы прямым методом. Позиции и температурные параметры неводородных атомов уточнены в изотропном, а затем анизотропном приближении полноматричным методом наименьших квадратов. Атомы водорода выявлены из разностных синтезов Фурье, их позиции уточнены в изотропном приближении. Кристаллографические данные и основные параметры уточнения представлены в табл. 1, основные межатомные расстояния и валентные углы – в табл. 2. В структуре **2** один из атомов F разупорядочен по двум позициям с заселенностями 62 и 38%.

Все расчеты выполнены с помощью комплекса программ SHELXTL [60]. Координаты атомов и другие параметры уточнения структуры соединений **1** и **2** депонированы в Кембриджском банке структурных данных под № 2258437 и 2258436.

**ЭПР-спектроскопия.** Спектры ЭПР растворов **1** и **2** регистрировали на ЭПР-спектрометре Bruker Elexsys II E 500 при комнатной температуре. Растворы помещали в тонкостенные стеклянные ампулы с внутренним диаметром 1.0 мм. Концентрацию парамагнитных центров и  $g$ -фактор определя-

ли с помощью пакета программ Херг. Для проверки правильности этих процедур использовали водный раствор нитроксила и образец ДФПГ с  $g$ -фактором 2.0036. Процедура определения концентрации, используемая в пакете программ Херг, включает двойное интегрирование спектра, учитывает добротность резонатора и спиновый фактор  $S(S + 1)$ . Ниже принимается  $S = 1/2$ . Точность определения концентрации парамагнитных центров  $\sim 15\%$ .

**Определение концентрации нитрит-ионов с помощью реакции Грисса.** Растворы комплексов **1** и **2** с концентрацией  $6 \times 10^{-4}$  моль/л готовили в 0.05 М буфере *tris*-HCl, pH 7.0. Отбирали аликвоты реакционной смеси комплексов (0.3 мл) и вносили в посуду, содержащие 0.9 мл 0.5%-ного раствора сульфаниламида в 0.25 М HCl. Через 5 мин инкубации добавляли 0.6 мл 0.02%-ного раствора N-(1-нафтил)этилендиамина дигидрохлорида в 0.5 М HCl. Через 10 мин определяли величину оптической плотности при 540 нм. Концентрацию образующихся в процессе распада комплекса нитритов рассчитывали по калибровочной кривой, построенной для  $\text{NaNO}_2$ .

**Исследование цитотоксических свойств.** Оценку цитотоксических свойств проводили с помощью МТТ-теста на линии клеток *Vero* (почечный эпителий африканской зеленой марышки). Клетки высевали в 96-луночные планшеты в концентрации  $5 \times 10^4$  кл/мл. Исследуемые соединения вносили в культуральную среду через 24 ч после высевания. Комплексы растворяли в ДМСО в исходной концентрации 400 ммоль/л. Конечные концентрации комплексов составляли от 400 до 3 мкмоль/л. Конечная концентрация ДМСО в образцах составляла 0.001%. Данная концентрация ДМСО не влияла на жизнеспособность клеток. Краситель МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид **2**) добавляли в инкубационную среду через 24 и 72 ч после введения исследуемых соединений и проводили окрашивание клеток в течение 3 ч. 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 микропланшетного ридера Spark 10M (Tecan, USA). Значения доз IC50 вычисляли с помощью анализа медианного эффекта.

**Исследование антибактериальной активности** проводили модифицированным микрометодом серийных разведений путем определения минимальной концентрации, подавляющей видимый рост бактерий в бульонной культуре (МПК), с последующим определением минимальной бактерицидной концентрации (МБК), вызывающей гибель микроорганизмов. Исследования проводили на культурах грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* (штамм ВВ) и грамположительных

**Таблица 1.** Кристаллографические данные и основные параметры уточнения для комплексов **1** и **2**

Параметр	<b>1</b>	<b>2</b>
Брутто-формула	$C_{12}H_6Fe_2N_4O_4S_2F_4$	$C_{12}H_6Fe_2N_4O_4S_2F_4$
$M$ , г/моль	522.03	522.03
Сингония	Триклинная	Триклинная
Пр. гр.	$P$	$P$
$a$ , Å	6.3911(4)	6.3814(4)
$b$ , Å	6.7834(5)	6.9593(5)
$c$ , Å	10.8472(8)	11.1532(7)
$\alpha$ , град	82.858(6)	78.326(6)
$\beta$ , град	75.952(7)	75.378(5)
$\gamma$ , град	69.777(6)	66.858(6)
$V$ , Å <sup>3</sup>	427.65(6)	437.74(5)
$Z$ , $\rho_{расч}$ , г/см <sup>3</sup>	1, 2.027	1, 1.973
$\mu$ , мм <sup>-1</sup>	2.011	1.964
$F(000)$	258	258
Размер кристалла, мм	0.35 × 0.25 × 0.2	0.4 × 0.25 × 0.2
Область сканирования по $\theta$ , град	3.204–29.248	3.205–29.250
Интервал индексов $h, k, l$	$-8 \leq h \leq 8,$ $-9 \leq k \leq 7,$ $-14 \leq l \leq 14$	$-8 \leq h \leq 8,$ $-8 \leq k \leq 9,$ $-14 \leq l \leq 15$
Метод сканирования	$\omega$	$\omega$
Количество измеренных отражений	3925	4187
Количество независимых отражений ( $R_{int}$ )	2332 (0.0266)	2382 (0.0266)
Количество отражений с $I \geq 2\sigma(I)$	2054	1953
Число уточняемых параметров	127	137
GOOF	1.058	1.052
$R1$ ( $I \geq 2\sigma(I)$ )	0.0296	0.0344
$wR2$ (по всем отражениям)	0.0647	0.0783
$\Delta\rho_{max}/\Delta\rho_{min}$ , $e \text{ Å}^{-3}$	0.463/–0.388	0.413/–0.393

**Таблица 2.** Отдельные длины связей и валентные углы в комплексах **1** и **2**

Связь	<b>1</b>	<b>2</b>
	$d$ , Å	$d$ , Å
Fe...Fe	2.6993(6)	2.6942(7)
Fe–S	2.2656(6), 2.2721(6)	2.2602(7), 2.2630(6)
Fe–N	1.672(2), 1.673(2)	1.670(2), 1.673(2)
N–O	1.165(2), 1.174(2)	1.165(3), 1.168(2)
S–C	1.787(2)	1.783(3)
Угол	$\omega$ , град	$\omega$ , град
FeNO	170.2(2), 172.3(2)	170.3(2), 171.9(2)
NFeN	118.49(8)	118.59(10)
SFeS	106.99(2)	106.88(2)

бактерий *Micrococcus luteus* (штамм 21/26). Для проведения экспериментов рабочие суспензии обеих культур бактерий разводили в 100 раз в стерильной среде LB (пептон 1%, дрожжевой экстракт 0.5%, NaCl 1%, глюкоза 0.1%, pH 6.8–7.0) и высевали по 100 мкл в лунки 96-луночных планшетов. Конечная концентрация микроорганизмов в лунке составляла  $5 \times 10^5$  КОЕ/мл. Комплексы и лиганды растворяли в ДМСО в исходной концентрации 400 ммоль/л. Перед нанесением соединения разводили в стерильной среде LB 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 2000 до 0.98 мкмоль/л. 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°C и в качестве отрицательного контроля в среде LB при 4°C. После внесения исследуемых соединений образцы инкубировали при температуре 37°C в течение 18–24 ч. В качестве контрольных антибактериальных агентов использовали ампициллин (ОАО “Синтез”, Россия) и канамицин (ОАО “Синтез”, Россия). Антибиотики растворяли в стерильной среде LB. Конечные концентрации антибиотиков составляли 12 последовательных двукратных разведений от 1000 до 0.47 мкмоль/л.

МПК определяли как концентрацию, при которой видимый рост микроорганизмов по сравнению с контрольными образцами отсутствует.

Для определения МБК аликвоту из каждой лунки без видимого роста бактерий разводили свежей средой LB в 10, 100, 1000 раз, перемещали в новые лунки и инкубировали при 37°C. Через 24 ч визуально оценивали видимый рост бактерий. Минимальную концентрацию образца с отсутствием роста бактерий принимали за МБК.

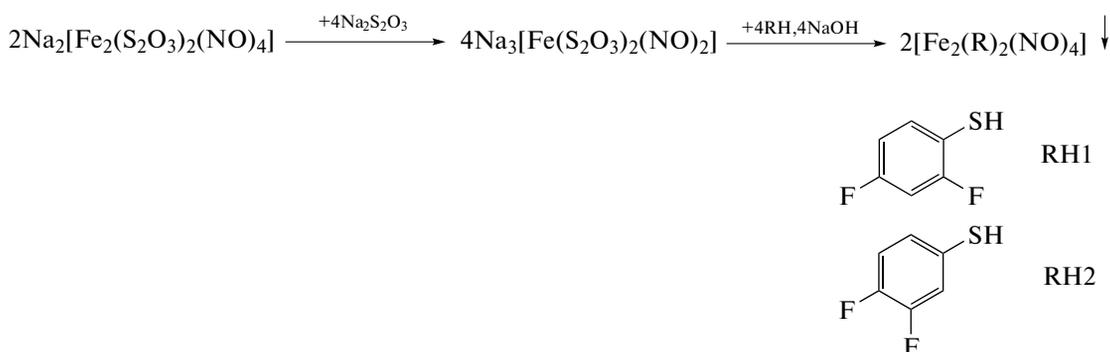
**Исследование ингибирования образования биопленок *M. luteus*.** Для получения биопленок грамположительные бактерии *Micrococcus luteus* в концентрации 10<sup>8</sup> КОЕ/мл культивировали в 96-луночном планшете при 37°C в присутствии исследуемых комплексов и препаратов сравнения в концентрациях, соответствующих МПК. Контрольные образцы выращивали в LB, в LB с 10% ДМСО, а также в LB без бактерий для определения фонового окрашивания планшета. Через 24 ч после начала культивирования удаляли среду с планктонными клетками, лунки промывали стерильным буфером PBS (137 мМ NaCl, 2.68 мМ KCl, 4.29 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4). Окрашивание биопленок проводили с помощью 0.1%-го раствора кристаллического фиолетового при 37°C в те-

чение 20 мин, после чего лунки промывали PBS и высушивали 15 мин. Связавшийся с биопленками краситель растворяли в 95%-ом этиловом спирте, оптическую плотность полученных растворов определяли фотометрически при длине волны 570 нм с использованием многофункционального микропланшетного ридера Spark 10M (Tecan, USA). За 100% принимали оптическую плотность раствора без добавления исследуемых комплексов.

**Исследование степени деструкция биопленок *M. luteus*.** Для получения биопленок грамположительные бактерии *Micrococcus luteus* в концентрации 10<sup>8</sup> КОЕ/мл культивировали в 96-луночном планшете при 37°C в отсутствие исследуемых образцов. Через 24 ч в лунки вносили образцы и препараты сравнения ампициллин и канамицин в концентрациях, соответствующих МПК. Спустя 24 ч удаляли среду с планктонными клетками, лунки промывали стерильным буфером PBS (137 мМ NaCl, 2.68 мМ KCl, 4.29 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.47 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4). Окрашивание биопленок проводили с помощью 0.1%-го раствора кристаллического фиолетового при 37°C в течение 20 мин, после чего лунки промывали PBS и высушивали в течение 15 мин. Связавшийся с биопленками краситель растворяли в 95%-ом этиловом спирте, оптическую плотность полученных растворов определяли фотометрически при  $\lambda = 570$  нм с использованием многофункционального микропланшетного ридера Spark 10M (Tecan, USA). За 100% принимали оптическую плотность раствора без добавления исследуемых комплексов.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

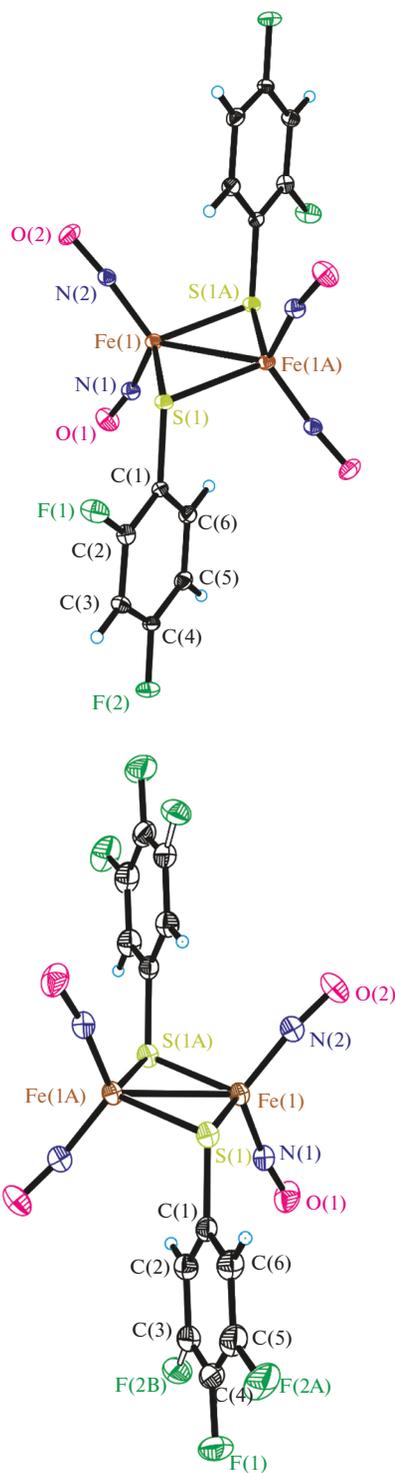
Нитрозильные комплексы были получены обменной реакцией тиосульфатных лигандов на ароматические дифтортиолилы в водно-щелочной среде по схеме 1:



**Схема 1.** Схема синтеза комплексов общей формулы  $[\text{Fe}_2(\text{R})_2(\text{NO})_4]$ , где R = 2,4-дифтортиофенил (RH1), 3,4-дифтортиофенил (RH2).

Исходные тиолы для синтеза комплексов **1** и **2** — жидкости, которые не смешиваются с водой, по-

этому использовали водно-щелочные растворы лигандов и в этом виде вводили в реакцию. Кри-



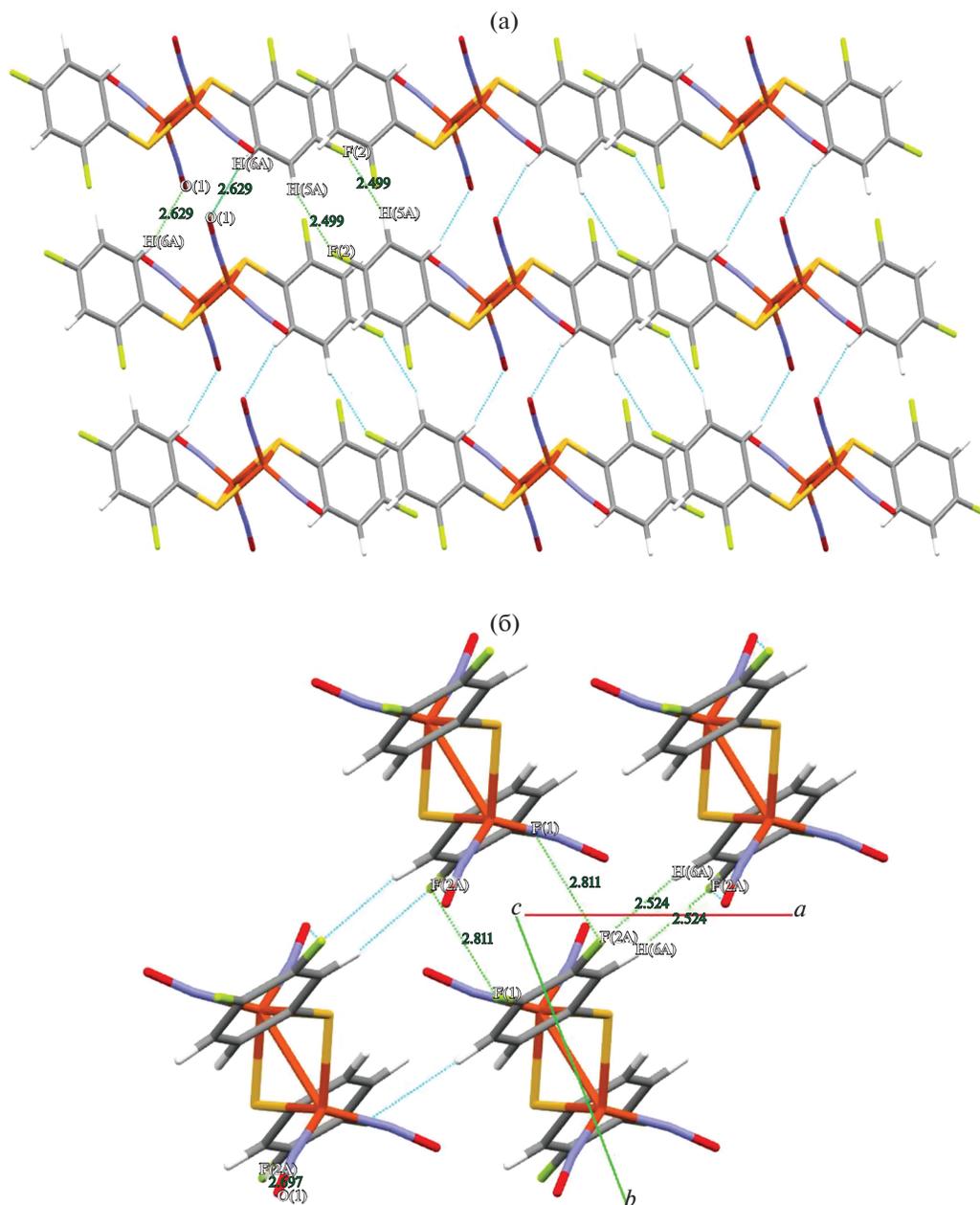
**Рис. 1.** Молекулярные структуры соединений **1** (а) и **2** (б) и нумерация атомов в них. Показано разупорядочение одного из атомов F в **2** по двум позициям (F(1A) и F(2B)).

сталлы **1** и **2** вырастают в течение нескольких суток при низкой температуре из раствора хлористого метилена.

Комплексы **1** и **2**, как и большинство известных RREs, нерастворимы в воде и других полярных органических растворителях, растворимы в ДМСО и хлористом метилена.

Комплексы **1** и **2** кристаллизуются в триклинной сингонии (пр. гр. *P1* с одной молекулой комплекса в элементарной ячейке) и имеют centrosymmetric биядерную структуру  $\mu_2$ -S-типа (рис. 1), аналогичную структурам ранее исследованных нейтральных эфиров красной соли Руссена с тиофенолилами [14–18, 52, 53, 57]. Ионы железа имеют искаженное тетраэдрическое окружение, образованное двумя мостиковыми атомами серы и двумя нитрозильными группами, при этом в **1** и **2** наблюдаются короткие расстояния Fe...Fe, что является характерной особенностью RREs [14–18, 52, 53, 57]. Межатомные расстояния Fe...Fe отличаются незначительно и составляют 2.6993(6) и 2.6942(7) Å для **1** и **2** соответственно, они находятся в хорошем согласии со средним значением 2.70(2) Å, полученным при рассмотрении структур нейтральных тетранитрозильных комплексов железа  $\mu_2$ -S-типа с тиольными лигандами [61]. Как и в ранее изученных нейтральных RREs [14–18, 52, 53, 57], в комплексах **1** и **2** наблюдаются незначительные различия в строении NO-групп в одном структурном фрагменте  $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}_2^0$ , которые в наибольшей степени проявляются у валентных углов FeNO, в то же время длины связей Fe–N и N–O в пределах погрешности измерений очень близки между собой внутри каждого комплекса и между **1** и **2** и находятся в полном согласии со средними значениями 1.67(1) и 1.17(2) Å (табл. 2). Связи C(1)–S(1) близки по величине и составляют 1.787(2) и 1.783(3) Å для **1** и **2** соответственно, что совпадает со средним значением 1.78(1) Å в подобных биядерных нитрозильных комплексах железа [61].

На рис. 2 представлены проекции фрагментов кристаллической структуры комплексов **1** и **2** на плоскости *ac* (а) и *ab* (б) соответственно. В структуре **1** обнаружены сокращенные межмолекулярные контакты двух типов: F(2)⋯H–C 2.50 Å и O(1)NO⋯H–C 2.63 Å, которые стабилизируют кристаллическую структуру. Несмотря на близость кристаллических упаковок рассматриваемых соединений, изменение позиций F-заместителей в лигандах приводит к небольшому различию в сокращенных межмолекулярных контактах в **1** и **2**. Так, при сохранении аналогичных контактов F⋯H–C (2.52 Å) в кристалле **2** наблюдаются отличные от **1** сокращенные контакты F(1)⋯F(2A) (2.81 Å) и O(1)NO⋯F(2A) (2.80 Å), тогда как контакт O(1)NO⋯H–C уже не наблюдается. Оба рассматриваемых соединения по характеру кристаллической упаковки отличаются от аналога комплекса **2** – полученного нами ранее комплекса с хлорными заместителями в тиофенольных лиган-



**Рис. 2.** Проекция фрагментов кристаллической структуры соединения **1** на плоскость  $ac$  (а) и соединения **2** на плоскость  $ab$  (б). Сокращенные контакты показаны штриховой голубой линией. Разупорядочение атомов F не показано для ясности.

дах [57], в котором атомы галогена не участвуют в межмолекулярных взаимодействиях и отсутствует разупорядочение одного из атомов Cl, а само соединение кристаллизуется в моноклинной сингонии (пр. гр.  $C2/c$ ).

Различный характер участия нитрозильных групп в межмолекулярных взаимодействиях, по всей видимости, либо является следствием, либо обуславливает незначительную структурную неэквивалентность нитрозильных групп в узле  $Fe(NO)_2$ .

Мессбауэровские спектры комплексов **1** и **2** представляют собой одиночные квадрупольные дублеты (рис. 3а и 3б). Параметры спектров (изомерный сдвиг, квадрупольное расщепление, ширина линий) комплексов при температуре 296 К приведены в табл. 3. Там же для сопоставления даны средние длины связей Fe–S соответствующих комплексов по данным PCA настоящей и ранее опубликованных работ [47–53, 57].

В нейтральных тиофенильных комплексах RREs, исследованных нами ранее и содержащих

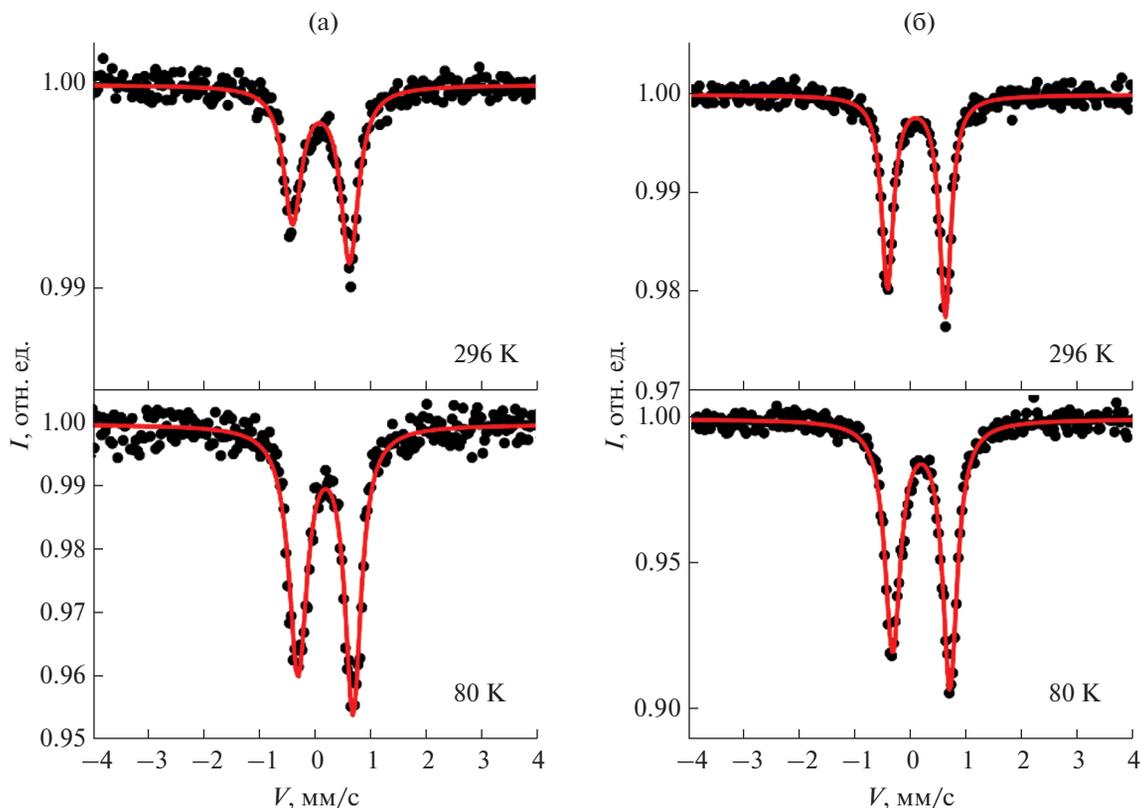


Рис. 3. Мессбауэровские спектры поликристаллов **1** (а) и **2** (б).

два структурных фрагмента  $\{\text{Fe}(\text{NO})_2\}^9$ , возрастание изомерного сдвига коррелирует с увеличением среднего расстояния Fe–S (табл. 3).

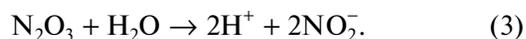
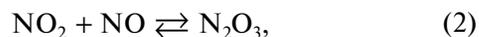
Тенденция к увеличению значений изомерного сдвига для комплексов **1** и **2** по сравнению с таковыми для комплексов с  $\text{NH}_2^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{OCH}_3^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  и Cl-содержащими тиофенолилами позволяет предположить, что более электроотрицательный фтор оттягивает часть электронной плотности от железа, координированного S-лигандом. Уменьшение зарядовой плотности на ядрах железа ( $d^7$ ) приводит к увеличению изомерного сдвига в **1** и **2** в соответствии с возрастанием расстояния Fe–S (см. выше). Имеются также отличия в значениях изомерных сдвигов для **1** и **2**, различающихся положением второго атома фтора. По данным ЭПР-спектроскопии, в порошках комплексы **1** и **2** диамагнитны, а спектры ЭПР их растворов в ДМСО имеют характеристические особенности моноядерных динитрозильных комплексов железа с  $g = 2.03$  (рис. 4). Растворы характеризуются пятью линиями сверхтонкой структуры, обусловленной взаимодействием неспаренного электрона с двумя эквивалентными ядрами азота. Это согласуется с распадом биядерных комплексов на моноядерные. Число парамагнитных центров на соответствующий комплекс для рас-

твора представлено в табл. 4. Малая величина  $N$  объясняется тем, что распад биядерных комплексов сопровождается распадом моноядерных комплексов. Амплитуда и форма спектров ЭПР для растворов **1** и **2** слабо изменяются в течение 1.5 ч.

Установлено, что комплексы **1** и **2** генерируют NO (рис. 5). Известно, что нитрит-ионы являются основным продуктом реакции NO с кислородом в водном аэробном растворе [62, 63]. NO окисляется на первой стадии этого процесса. Это реакция третьего порядка с константой скорости  $k_{\text{aq}} = 2 \times 10^6 \text{ M}^{-2} \text{ c}^{-1}$  при 25°C (скорость реакции зависит от  $[\text{NO}]^2$ ,  $[\text{O}_2]$ ) [64]:



На следующей стадии быстро образуется  $\text{N}_2\text{O}_3$  ( $k = 1.1 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ ) [63], который далее реагирует с водой с образованием  $\text{NO}_2^-$  [62, 63]:



Таким образом, донорную активность NO-комплексов в водном растворе на воздухе удобно оценивать по кинетике накопления нитрита. Концентрация  $\text{NO}_2^-$  измеряется с помощью реакции Грисса [65]. На рис. 5 показаны результаты экспе-

**Таблица 3.** Мессбауэровские параметры  $Fe^{57}$  и средние межатомные расстояния Fe–S для нейтральных RREs состава  $[Fe_2R_2(NO)_4]$  с различными тиолилами R при температурах 296, 80\* и 85 K\*\*

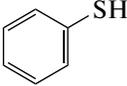
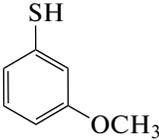
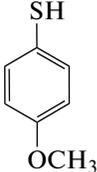
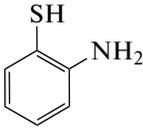
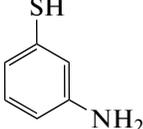
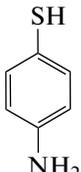
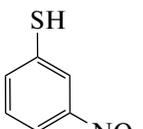
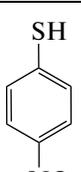
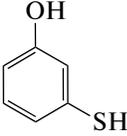
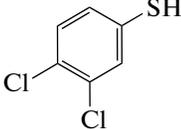
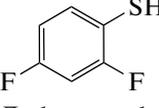
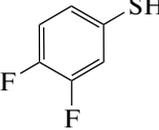
№	RSH	$\delta_{Fe}$ , мм/с <sup>1</sup>	$\Delta E_Q$ , мм/с <sup>2</sup>	$\Gamma$ , мм/с <sup>3</sup>	Fe–S <sub>ср</sub> , Å	Литература
1	 Тиофенол	0.075(1)	0.970(1)	0.280(3)	2.260	[47]
2	 3-Метокситиофенол	0.078(1)	1.149(1)	0.251(2)	2.257	[48]
3	 4-Метокситиофенол	0.073(1)	0.984(1)	0.249(3)	2.258	[48]
4	 2-Аминотиофенол	0.096(1)	1.122(1)	0.264(1)	2.272	[49]
5	 3-Аминотиофенол	0.108(1)	1.148(1)	0.237(1)	2.273	[52]
6	 4-Аминотиофенол	0.062(1)	0.926(3)	0.242(5)	2.267	[50]
7	 3-Нитротиофенол	0.115(1)	1.171(1)	0.241(1)	2.274	[53]
8	 4-Нитротиофенол	0.175(1)**	1.154(2)**	0.260(1)**	2.265	[51]

Таблица 3. Окончание

№	RSH	$\delta_{Fe}$ , мм/с <sup>1</sup>	$\Delta E_Q$ , мм/с <sup>2</sup>	$\Gamma$ , мм/с <sup>3</sup>	Fe–S <sub>ср</sub> , Å	Литература
9	 3-Гидрокситиофенол	0.089(1)	1.050(1)	0.245(1)	2.270	[52]
10	 3,4-Дихлортиофенол	0.091(1)	1.029(1)	0.285(1)	2.257	[57]
11	 2,4-Дифтортиофенол	0.087(1) 0.191(2)*	1.016(6) 0.981(5)*	0.390(1) 0.390(1)*	2.269	Настоящая работа
12	 3,4-Дифтортиофенол	0.113(3) 0.175(1)*	1.025(3) 1.025(3)*	0.254(1) 0.338(6)*	2.262	Настоящая работа

<sup>1</sup> Изомерный сдвиг (отн.  $\alpha$ -Fe), <sup>2</sup> квадрупольное расщепление, <sup>3</sup> ширина линий дублета.

\* Значения мессбауэровских параметров образцов комплексов N11 и N12, снятых при 80 К.

\*\* Значения мессбауэровских параметров образцов комплекса N8, снятых при 85 К.

риментов в буферном растворе. Максимальные количества нитрит-ионов для комплексов **1** и **2** составляют 4.0 и 2.5 мкМ соответственно при исходной концентрации комплексов  $0.6 \times 10^{-5}$  моль/л, что свидетельствует об их разной NO-донорной способности, которая оказалась ниже, чем для RREs **3** с 3,4-дихлортиофенолилами (2.3 мкМ при исходной концентрации комплекса  $0.2 \times 10^{-5}$  моль/л, растворитель – буфер *tris*-HCl, pH 7.0, 23°C) [57]. Мы полагаем, что реакции комплексов **1** и **2** с кислородом необратимы. Как и в случае с комплексом **3**, содержащим в качестве лигандов 3,4-дихлортиофенолилы, кислород, встраи-

вается в структуру комплексов. При этом наблюдается долговременная (с выходом на плато через 8–10 мин) кинетика выделения NO, обусловленная, скорее всего, образованием более устойчивых, чем в случае **3** (RRE с 3,4-дихлортиофенолилами), нитрозильных интермедиатов, строение которых требует дополнительных спектральных исследований и квантово-химических расчетов.

Цитотоксические свойства исследуемых комплексов и соответствующих тиолов изучены на клеточной культуре *Vero*, рекомендованной в качестве тест-объекта для проведения токсикологических исследований. Обнаружено, что комплексы не проявляют существенных цитотоксических свойств в исследуемом диапазоне концентраций как при 24, так и при 72 ч инкубации (рис. 6, табл. 5), и действие комплексов сопровождается сохранением жизнеспособности клеток от 80% и выше (рис. 6). Исследование цитотоксического действия соответствующих тиолов показало, что они, в отличие от содержащих их нитрозильных комплексов железа (НКЖ), обладают высокой токсичностью для клеток *Vero*, при этом наблюдается сходная картина выживаемости клеток при 24 и 72 ч инкубации.

Таблица 4. Результаты исследования комплексов **1** и **2** в растворе ДМСО методом ЭПР

Комплекс	Время, мин*	$N$ , $\pm 15\%$ **
<b>1</b>	3	0.27
	95	0.21
<b>2</b>	3	0.39
	90	0.28

\* Время с начала растворения комплекса.

\*\* Отношение числа парамагнитных центров в образце, определенное методом ЭПР, к числу, определенному по навеске.

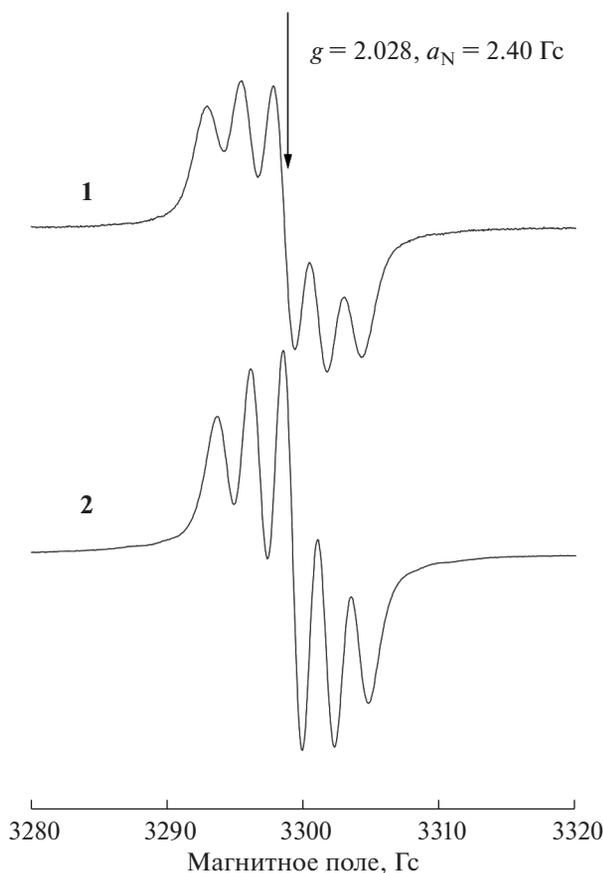


Рис. 4. Спектры ЭПР свежеприготовленных растворов комплексов **1** и **2** в ДМСО.

Отсутствие изменения токсичности при увеличении времени инкубации наблюдалось нами ранее для других НКЖ [66]. Таким образом, подобная противоречивая картина цитотоксического действия характерна для некоторых представителей этого класса.

Интересно, что состав и положение заместителей слабо влияют на цитотоксичность соответствующих тиолов: значения  $IC_{50}$  для тиолов  $R_1$ – $R_3$  различаются на  $\sim 25\%$ . В то же время заместители оказывают существенное влияние на цитотоксичность НКЖ, и токсичность комплекса **3** с хлорсодержащим лигандом значительно превышает токсичность НКЖ **2** и **3** с фторсодержащими лигандами.

Важнейшим наблюдением является отсутствие токсичности НКЖ при высокой токсичности соответствующих тиолов. Механизм распада НКЖ на сегодняшний день изучен плохо и трудно поддается исследованию в связи с быстрой кинетикой процесса. Предполагается, что при распаде НКЖ в водных аэробных растворах помимо оксида азота могут выделяться входящие в их состав лиганды. Полученные нами данные по цитотоксичности НКЖ и соответствующих тиолов

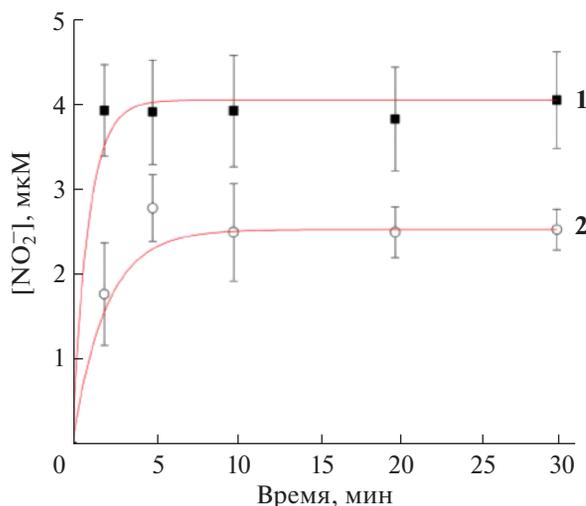


Рис. 5. Кинетика накопления нитрит-ионов при разложении комплексов **1** и **2** в аэробных растворах. Условия: исходные концентрации комплексов  $0.6 \times 10^{-5}$  моль/л, растворитель – буфер *tris*-HCl, pH 7.0, 23°C.

показывают, что при распаде НКЖ свободные лиганды практически не образуются, иначе комплексы проявляли бы более высокую токсичность.

При отсутствии цитотоксических свойств в отношении клеток *Vero* комплексы проявляют антибактериальную активность. В табл. 6 представлены значения МПК и МБК для исследуемых комплексов и соответствующих тиолов. Показано, что комплексы **1–3** и соответствующие тиолы проявляют антибактериальные свойства только в отношении грамположительных *M. luteus*. Комплекс **2** эффективнее ингибирует рост бактерий, чем комплекс **1**, несмотря на их близкие NO-донорные свойства. Очевидно, что именно присутствие атомов F в положениях 3 и 4 в тиофенолиле определяет антибактериальную активность комплекса **2**. Следует отметить, что МПК комплекса **2** в 4 раза превосходит МПК препарата сравнения – канамицина.

Таблица 5. Значение доз  $IC_{50}$  для клеток линии *Vero* при действии комплексов **1–3** и соответствующих тиолов в течение 24 и 72 ч

Соединение	$IC_{50}$ , мкМ	
	24 ч	72 ч
<b>1</b>	>400	>400
RH1	$41.67 \pm 2.85$	$52.3 \pm 1.79$
<b>2</b>	>400	>400
RH2	$28.62 \pm 3.1$	$30.05 \pm 2.24$
<b>3</b>	$246.12 \pm 2.46$	$216.23 \pm 2.16$
R <sub>3</sub>	$29.44 \pm 2.9$	$22.76 \pm 2.76$

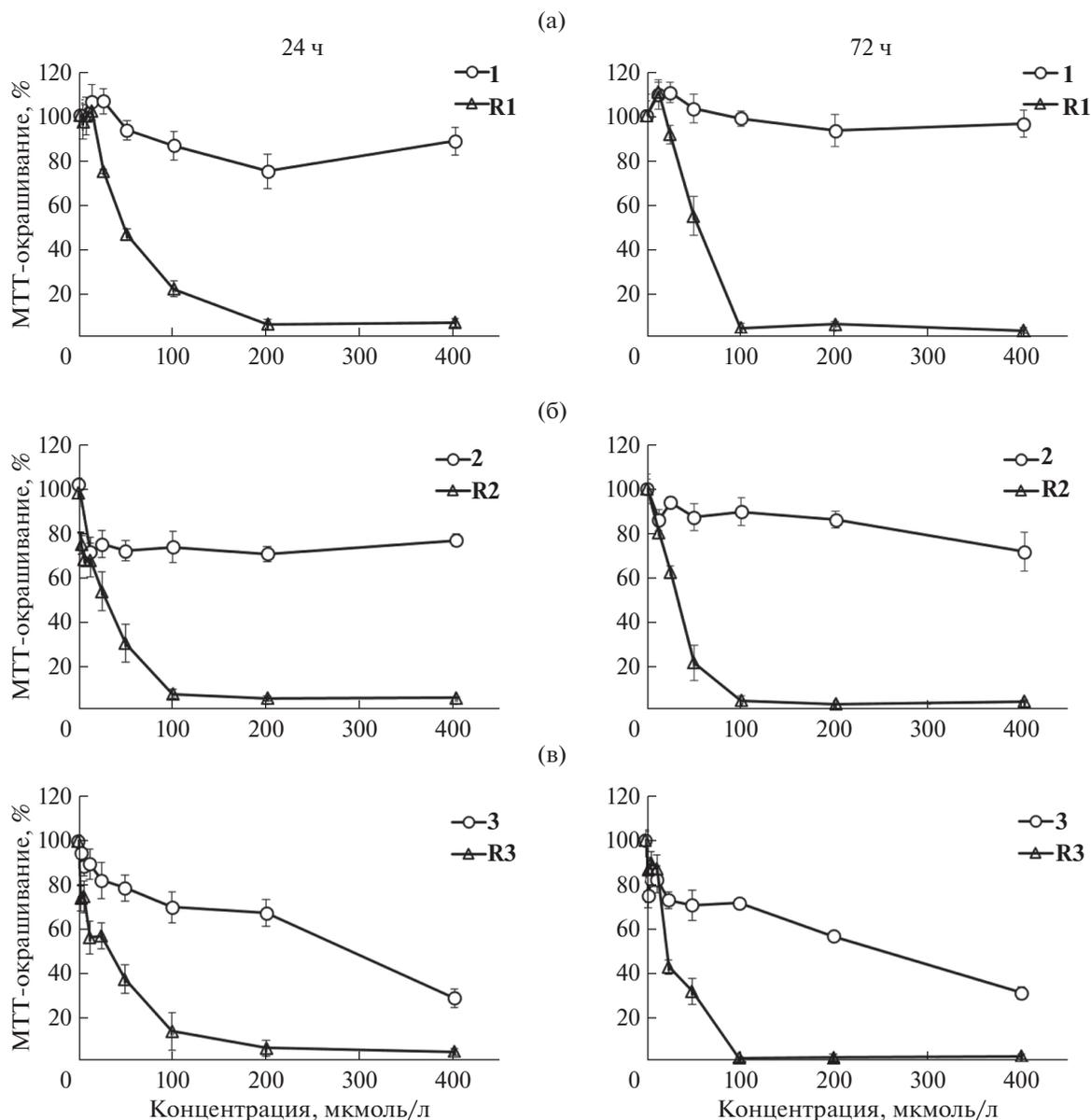


Рис. 6. Кривые доза-эффект при действии комплексов 1 (а), 2 (б) и 3 (в) и их лигандов в течение 24 (а) и 72 (б) ч на клетки *Vero*.

Комплекс 3 проявляет низкую антибактериальную активность, сопоставимую с активностью комплекса 1. Это указывает на то, что антибактериальные свойства комплексов определяются не только положением атомов в структуре лиганда, но и их природой. Введение атомов хлора в положения 3 и 4 тиофенолила повышает цитотоксические свойства (табл. 5), но снижает антибактериальную активность комплекса.

В отношении грамотрицательных бактерий *E. coli* исследуемые комплексы и соответствующие тиолы не проявляют активности. Значения МПК в исследуемом диапазоне концентраций установить не удалось, в связи с этим МБК в отношении

*E. coli* не определяли. Возможно, такой эффект связан с тем, что грамотрицательные бактерии часто проявляют повышенную устойчивость к различным соединениям за счет многослойной клеточной стенки. В ее состав входит большое количество макромолекул, в особенности липополисахаридов, обеспечивающих низкую проницаемость мембраны бактерий, что приводит к ограничению действия антибиотиков и развитию резистентности [67, 68].

Анализ бактерицидных свойств комплексов показал, что антибактериальный эффект комплекса 2 связан в первую очередь с бактериостатическим действием, поскольку МБК превышает МПК в

16 раз. Эффекты комплексов **1** и **3** отличаются близкими или равными значениями МБК и МПК, т.е. эти НКЖ проявляют значительную бактерицидную активность. Тем не менее комплекс **2** является наиболее активным, поскольку демонстрирует самые низкие значения и МПК, и МБК.

Тиолы, взятые для синтеза НКЖ **1–3**, проявляют относительно низкую антибактериальную активность (табл. 5). Таким образом, антибактериальные свойства НКЖ **2** определяются общей структурой комплекса, и хотя НКЖ **2** образует меньше NO по сравнению с НКЖ **1** (рис. 5) и **3** [57], антибактериальные свойства НКЖ не коррелируют с их NO-донирующей активностью. Принимая во внимание, что распад комплекса не приводит к образованию лигандов, можно сделать вывод, что биологическое действие НКЖ определяется интермедиатами, отличными от NO и лигандов.

Известно, что большинство бактериальных инфекций вызвано микроорганизмами, организованными в сообщества – биопленки, представляющие серьезную проблему, для решения которой необходимо применение новых терапевтических стратегий, способных привести к разработке более эффективных ингибиторов биопленок, чем обычные методы лечения [69]. Именно с образованием биопленок связан механизм хронического развития инфекций, а также резистентности. Бактерии в биопленках более устойчивы к антибиотикам, чем планктонные клетки. В основе механизма такой устойчивости лежат структурные особенности организации биопленок. Для них характерно наличие внеклеточного экзополимерного матрикса, состоящего из полисахаридов, белков, липидов и нуклеиновых кислот, который защищает микроорганизмы от факторов внешнего воздействия [70]. Существует два основных способа воздействия на биопленки: предотвращение образования биопленок на ранней стадии формирования и прикрепления планктонных клеток, а также разрушение уже сформированной биопленки.

Исследовано влияние комплексов и их лигандов в концентрации МПК на формирование, а также на эффективность деструкции сформированных биопленок *M. luteus*. Результаты исследования представлены на рис. 7 и 8. Обнаружено, что комплекс **2** ингибирует образование биопленок бактерий на 46%, что на 13 и 33% эффективнее действия препаратов сравнения – канамицина и ампициллина соответственно. Комплекс **1** ингибирует формирование биопленок на 28%, что схоже с действием ампициллина (31%). Следует отметить, что соответствующие тиолы также оказывают влияние на формирование биопленок, однако оно выражено в меньшей степени. Комплекс **3** не оказывает влияния на образование биопленок.

**Таблица 6.** Значения МПК и МБК исследуемых комплексов **1–3** и соответствующих тиолов для грамотрицательных бактерий *E. coli* и грамположительных бактерий *M. luteus*

Соединение	<i>M. luteus</i>		<i>E. coli</i>
	МПК, мкМ	МБК, мкМ	МПК, мкМ
<b>1</b>	1000	1000	>2000
<b>2</b>	15.62	250	>2000
<b>3</b>	1000	500	>2000
RH <sub>1</sub>	500	>2000	>2000
RH <sub>2</sub>	500	>2000	>2000
RH <sub>3</sub>	>2000	–	>2000
Ампициллин	0.98	250	3.9
Канамицин	62.5	62.5	31.25

Примечание. Прочерк – значение МБК не определяли.

Исследование свойств его исходного RH<sub>3</sub> не проводили в связи с неустановленной МПК.

Комплексы **1** и **2** вызывают также деструкцию биопленки бактерий *M. luteus* на 21 и 32% соответственно. Эффективность деструкции в обоих случаях превосходит эффективность действия препаратов сравнения. Комплекс **3** менее эффективен по сравнению с НКЖ **1** и **2**, однако его активность по деструкции биопленок превышает действие канамицина. Исходные тиолы, которые были использованы для синтеза НКЖ **1, 2** оказывают слабый эффект на сформированные биопленки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые синтезированы нейтральные RRSs с дифтортиофенильными лигандами, исследовано их строение и биологическая активность. Показано, что природа и положение акцепторных заместителей в тиофенолиле существенным образом влияют на электронное и кристаллическое строение нейтральных RRSs на основе тиофенола и его производных: в твердой фазе участие атомов F в тиофенольных лигандах обуславливает формирование более устойчивых биядерных структур, чем в случае других акцепторных заместителей (Cl, NO<sub>2</sub>). Это снижает их NO-донорную активность в растворах.

Исследование цитотоксической активности показало низкую токсичность комплексов для клеток *Vero* при высокой токсичности лигандов. Это демонстрирует низкий вклад лигандов в токсичность исследованных НКЖ. Анализ результатов антибактериальной активности показывает зависимость значений МПК и МБК от положения атомов фтора в тиофенильном лиганде: комплекс **2**, в отличие от комплекса **1**, эффективно подавляет рост бактерий *M. luteus*. Оба комплекса ингибируют образование бактериальной биопленки *M. luteus*, и

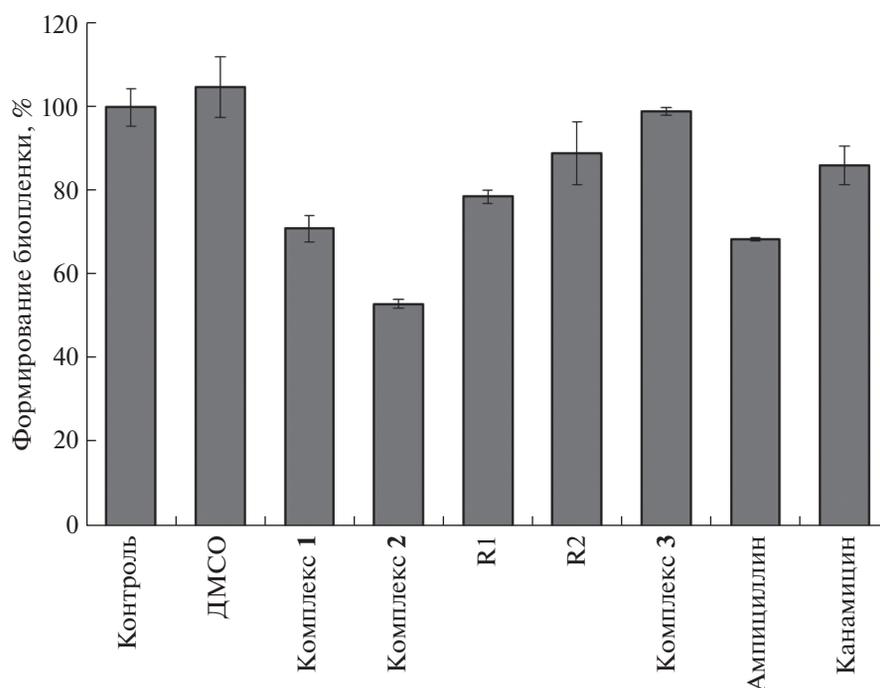


Рис. 7. Эффективность образования биопленки *M. luteus* при действии комплексов и лигандов в дозе МПК через 24 ч.

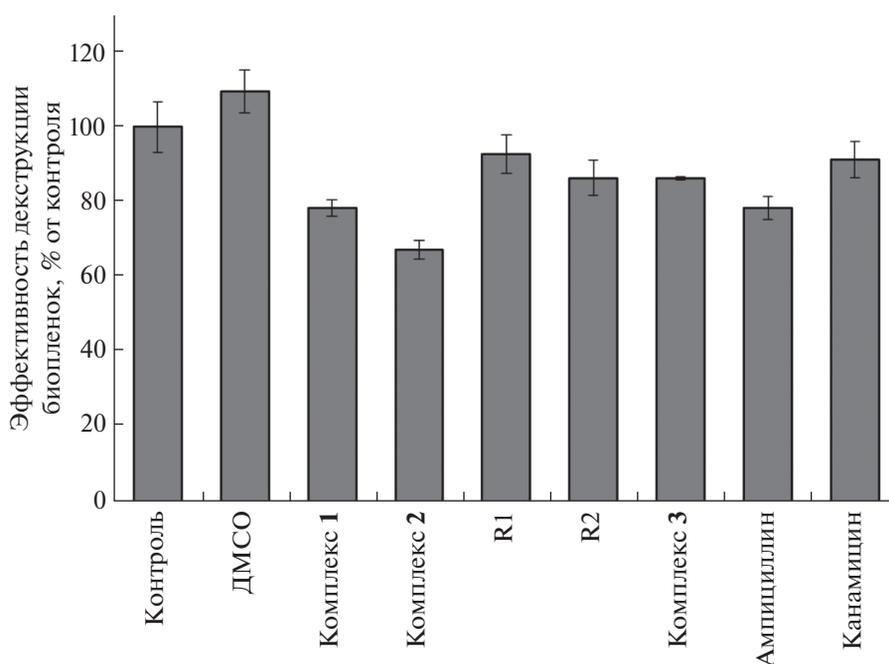


Рис. 8. Эффективность деконструкции биопленок *M. luteus* при действии комплексов и лигандов в дозе МПК через 24 ч.

НКЖ **2** разрушает сформированные биопленки *M. luteus* эффективнее, чем используемые в клинике антибиотики канамицин и ампициллин.

Суммируя результаты цитотоксических и антибактериальных свойств, видно, что комплекс **2** при концентрациях, оказывающих антибактери-

альное действие, проявляет очень низкую токсичность для клеток млекопитающих. Результаты исследований *in vitro* показывают, что комплекс **2** является наиболее перспективным из исследованных НКЖ и может рассматриваться в качестве прототипа антибактериального средства,

действующего на принципах, отличных от механизмов действия существующих антибиотиков.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

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

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

Автор Н.А. Санина придумала и разработала эксперимент, автор А.С. Конюхова синтезировала образцы и провела исследование их NO-донорной активности. Авторы Д.В. Корчагин и С.М. Алдошин провели исследование соединений методом рентгеноструктурного анализа. Автор Н.С. Ованесян, исследовал образцы методом мессбауэровской спектроскопии. Автор А.В. Куликов выполнял исследования образцов методом ЭПР-спектроскопии. Авторы В.А. Мумятова и А.А. Терентьев исследовали антибактериальную и цитотоксическую активность соединений. Все авторы участвовали в обсуждении результатов.

#### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Онлайн-версия содержит дополнительные материалы, доступные по адресу <https://doi.org/10.31857/S0044457X23600664>.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Thomas J.T., Robertson J.H., Cox E.G.* // *Acta Crystallogr.* 1958. V. 11. P. 599. <https://doi.org/10.1107/S0365110X58001602>
2. *Butler A.R., Glidewell C., Hyde A.R. et al.* // *Polyhedron.* 1985. V. 4. P. 797. [https://doi.org/10.1016/S0277-5387\(00\)87029-1](https://doi.org/10.1016/S0277-5387(00)87029-1)
3. *Butler A.R., Glidewell C., Hyde A.R. et al.* // *Inorg. Chem.* 1985. V. 24. P. 2931. <https://doi.org/10.1021/ic00213a012>
4. *Glidewell C., Harman M.E., Hursthouse M.B. et al.* // *J. Chem. Res.* 1988. V. 212–213. P. 1676.
5. *Harrop T.C., Song D., Lippard S.J. et al.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 3528. <https://doi.org/10.1021/ja060186n>
6. *Tsou C.-C., Lu T.-T., Liaw W.-F. et al.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. P. 12626. <https://doi.org/10.1021/ja0751375>
7. *Lee H.M., Chiou S.-J.* // *Acta Crystallogr., Sect. E: Struct. Rep. Online.* 2009. V. 65. № m1600. <https://doi.org/10.1107/S1600536809048065>
8. *Chen Y.-J., Ku W.-C., Feng L.-T. et al.* // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. P. 10929. <https://doi.org/10.1021/ja11494m>
9. *Chiou S.-J., Wang C.-C., Chang Ch.-M. et al.* // *J. Organomet. Chem.* 2008. V. 693. P. 3582. <https://doi.org/10.1016/j.jorganchem.2008.08.034>
10. *Tsai M.-C., Tsai F.-T., Lu T.-T. et al.* // *Inorg. Chem.* 2009. V. 48. P. 9579. <https://doi.org/10.1021/ic901675p>
11. *Lu T.-T., Huang H.-W., Liaw W.-F. et al.* // *Inorg. Chem.* 2009. V. 48. P. 9027. <https://doi.org/10.1021/ic9012679>
12. *Wang R., Camacho-Fernandez M.A., Xu W. et al.* // *Dalton Trans.* 2009. V. 5. P. 777. <https://doi.org/10.1039/B810230A>
13. *Chang H.-H., Huang H.-J., Ho Y.-L. et al.* // *Dalton Trans.* 2009. V. 32. P. 6396. <https://doi.org/10.1039/B902478F>
14. *Rauchfuss T.B., Weatherill T.D.* // *Inorg. Chem.* 1982. V. 21. P. 827. <https://doi.org/10.1021/ic00132a071>
15. *Tsai M.-L., Liaw W.-F.* // *Inorg. Chem.* 2006. V. 45. P. 6583. <https://doi.org/10.1021/ic0608849>
16. *Tsai M.-L., Hsieh C.-H., Liaw W.-F. et al.* // *Inorg. Chem.* 2007. V. 46. P. 5110. <https://doi.org/10.1021/ic0702567>
17. *Harrop T.C., Song D., Lippard S.J.* // *J. Inorg. Biochem.* 2007. V. 101. P. 1730. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2007.05.006>
18. *Chen C.-H., Chiou S.-J., Chen H.-Y. et al.* // *Inorg. Chem.* 2010. V. 49. P. 2023. <https://doi.org/10.1021/ic902324d>
19. *Tsou C.-C., Liaw W.-F.* // *Chem. Eur. J.* 2011. V. 17. P. 13358. <https://doi.org/10.1002/chem.201100253>
20. *Shih W.-C., Lu T.-T., Yang L.-B. et al.* // *J. Inorg. Biochem.* 2012. V. 113. P. 83. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.03.007>
21. *Lu C.-Y., Liaw W.-F.* // *Inorg. Chem.* 2013. V. 52. P. 13918. <https://doi.org/10.1021/ic402364p>
22. *Lu T.-T., Wang Y.-M., Hung Ch.-H. et al.* // *Inorg. Chem.* 2018. V. 5720. P. 12425. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.8b01818>
23. *Hsiao H.-Y., Chung C.-W., Santos J.H. et al.* // *Dalton Trans.* 2019. V. 48. P. 9431. <https://doi.org/10.1039/C9DT00777F>
24. *Ostrowski A.D., Ford P.C.* // *Dalton Trans.* 2009. V. 48. P. 10660. <https://doi.org/10.1039/B912898K>
25. *Vanin A.F.* // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. P. 10356. <https://doi.org/10.3390/ijms221910356>
26. *MacMicking J., Xie Q., Nathan C.* // *Annu. Rev. Immunol.* 1997. V. 15. P. 323. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.15.1.323>
27. *Wink D. A., Mitchell J.B.* // *Free Radic. Biol. Med.* 1998. V. 25. P. 434. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00092-6](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00092-6)
28. *Murad F.* // *Biosci Rep.* 1999. V. 19. P. 133. <https://doi.org/10.1023/A:1020265417394>
29. *Chung H.-T., Pae H.-O., Choi B.-M. et al.* // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V. 282. P. 1075. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4670>
30. *Davis K.L., Martin E., Turko I.V. et al.* // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2001. V. 41. P. 203. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.203>

31. Webb D.J., Megson I.L. // *Expert Opin. Investig. Drugs*. 2002. V. 11. P. 587. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0707224>
32. Bredt D.S. // *Mol. Pharmacol.* 2003. V. 63. P. 1206. <https://doi.org/10.1124/mol.63.6.1206>
33. McCleverty J.A. // *Chem. Rev.* 2004. V. 104. P. 403. <https://doi.org/10.1021/cr020623q>
34. Singel D.J., Stamler J.S. // *Annu. Rev. Physiol.* 2005. V. 67. P. 99. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.67.060603.090918>
35. Liu V.W.T., Huang P.L. // *Cardiovascular Research*. 2008. V. 77. P. 19. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.06.024>
36. Hirst D.G., Robson T. // *Curr. Pharm. Des.* 2010. V. 16. P. 45. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.07.002>
37. Toledo J.C., Jr Augusto O. // *Chem. Res. Toxicol.* 2012. V. 25. P. 975. <https://doi.org/10.1021/tx300042g>
38. Heinrich T.A., da Silva R.S., Miranda K.M. et al. // *Br. J. Pharmacol.* 2013. V. 169. P. 1417. <https://doi.org/10.1111/bph.12217>
39. Choudhari S.K., Chaudhary M., Bagde S. et al. // *World J. Surg. Oncol.* 2013. V. 11. P. 118. <https://doi.org/10.1186/1477-7819-11-118>
40. Bondonno C.P., Croft K.D., Hodgson J.M. // *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 2015. V. 56. P. 2036. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.811212>
41. Basudhar D., Ridnour L.A., Cheng R. et al. // *Coord. Chem. Rev.* 2016. V. 306. P. 708. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2015.06.001>
42. Deppisch C., Herrmann G., Graepler-Mainka U. et al. // *Infection*. 2016. V. 44. P. 513. pmid:26861246 <https://doi.org/10.1007/s15010-016-0879-x>
43. Ignarro L.J., Freeman B.A. *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology*. London: Elsevier, 2017. 411 p. <https://www.sciencedirect.com/book/9780128042731/nitric-oxide#book-info>
44. Kamm A., Przychodzen P., Kuban-Jankowska A. et al. // *Nitric Oxide*. 2019. V. 93. P. 102. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.09.005>
45. Lehnert N., Kim E., Dong H.T. et al. // *Chem. Rev.* 2021. V. 121. P. 14682. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.1c00253>
46. Алдошин С.М., Санина Н.А. *Фундаментальные науки – медицине: Биофизические медицинские технологии*. М: МАКС Пресс, 2015. 72 с. <https://search.rsl.ru/ru/record/01007915439>
47. Sanina N.A., Emel'yanova N.S., Chekhlov A.N. et al. // *Russ. Chem. Bull.* 2010. V. 59. P. 1126. <https://doi.org/10.1007/s11172-010-0215-z>
48. Kozub G.I., Kondratieva T.A., Shilov G.V. et al. // *Russ. Chem. Bull.* 2023. V. 72. № 3. P. 651. <https://doi.org/10.1007/s11172-023-3829-2>
49. Sanina N.A., Kozub G.I., Zhukova O.S. et al. // *J. Coord. Chem.* 2013. V. 66. № 20. P. 3602. <https://doi.org/10.1080/00958972.2013.848980>
50. Sanina N.A., Kozub G.I., Kondrat'eva T.A. et al. // *J. Coord. Chem.* 2021. V. 74. № 4–6. P. 743. <https://doi.org/10.1080/00958972.2020.1869222>
51. Sanina N.A., Kozub G.I., Kondrat'eva T.A. et al. // *Russ. Chem. Bull.* 2017. V. 66. P. 1706. <https://doi.org/10.1007/s11172-017-1944-z>
52. Kozub G.I., Sanina N.A., Emel'yanova N.S. et al. // *Inorg. Chim. Acta*. 2018. V. 480. P. 132. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.05.015>
53. Sanina N.A., Krivenko A.G., Manzhos R.A. et al. // *New J. Chem.* V. 38. P. 292. <https://doi.org/10.1039/C3NJ00704A>
54. Neshev N.I., Sokolova E.M., Kozub G.I. et al. // *Russ. Chem. Bull.* 2020. V. 69. P. 1987. <https://doi.org/10.1007/s11172-020-2989-y>
55. Stupina T., Balakina A., Kondrat'eva T. et al. // *Sci. Pharm.* 2018. V. 86. № 4. P. 46. <https://doi.org/10.3390/scipharm86040046>
56. Mumyatova V.A., Kozub G.I., Kondrat'eva T.A. et al. // *Russ. Chem. Bull.* 2019. V. 68. № 5. P. 1025. <https://doi.org/10.1007/s11172-019-2514-3>
57. Pokidova O.V., Novikova V.O., Emel'yanova N.S. et al. // *Dalton Trans.* 2023. V. 52. P. 2641. <https://doi.org/10.1039/D2DT04047F>
58. Sanina N.A., Aldoshin S.M., Rudneva T.N. et al. // *Russ. J. Coord. Chem.* 2005. V. 31. № 5. P. 301. <https://doi.org/10.1007/s11173-005-0093-3>
59. Weissberger A., Proskauer E., Riddick J.A. et al. // *Organic Solvents: Phys. Properties and Methods of Purification*. N.Y.: Interscience, 1955. 552 p. <https://searchworks.stanford.edu/view/1072486>
60. Sheldrick G.M. SHELXTL v. 6.14, Structure Determination Software Suite, 2000.
61. Cambridge Structural Database. version 5.43 (November, 2022).
62. Ignarro L.J., Fukuto J.M., Griscavage J.M. et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993. V. 90. P. 8103. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.17.8103>
63. Ford P.C., Miranda K.M. // *Nitric Oxide*. 2020. V. 103 P. 31. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2020.07.004>
64. Awad H.H., Stanbury D.M. // *Int. J. Chem. Kinet.* 1993. V. 25. P. 375. <https://doi.org/10.1002/kin.550250506>
65. Möller M.N., Rios N., Trujillo M. et al. // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. № 40. P. 14776. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.006136>
66. Sanina N.A., Sulimenkov V., Emel'yanova N.S. et al. // *Dalton Trans.* 2022. V. 51. P. 8893. <https://doi.org/10.1039/D2DT01011A>
67. Rhodes K.A., Schweizer H.P. // *Drug Resist Updates*. 2016. V. 28. № 9. P. 82. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2016.07.003>
68. Chan C., Hardin T.C., Smart J.I. // *Future Microbiol.* 2015. V. 10. P. 1325. <https://doi.org/10.2217/fmb.15.53>
69. Srinivasan R., Santhakumari S., Poonguzhali P. et al. // *Front Microbiol.* 2021. V. 12. P. 676458. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.676458>
70. Hall C.W., Mah T-F. // *FEMS Microbiol Rev.* 2017. V. 41. № 3. P. 276. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>