

УДК 547.56+546.185+546.47+543.554.4

## КОМПЛЕКС ЦИНКА(II) С 2-ОКСИ-5-ЭТИЛФЕНИЛФОСФОНОВОЙ КИСЛОТОЙ: СИНТЕЗ, СТРОЕНИЕ, ТОКСИЧНОСТЬ И НАКОПЛЕНИЕ В КЛЕТКАХ HeLa

© 2023 г. И. С. Иванова<sup>a</sup>, Г. С. Цебрикова<sup>b</sup>, \*, А. Б. Илюхин<sup>a</sup>, В. П. Соловьев<sup>b</sup>, М. А. Лапшина<sup>c</sup>, Ю. И. Рогачева<sup>c</sup>, Е. Н. Пятова<sup>a</sup>, В. Е. Баулин<sup>c</sup>, А. Ю. Цивадзе<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Институт общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Ленинский пр-т, 31, Москва, 119991 Россия

<sup>b</sup>Институт физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН, Ленинский пр-т, 31, корп. 4, Москва, 119071 Россия

<sup>c</sup>Институт физиологически активных веществ ФГБУН Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии РАН, Ленинский пр-т, 1, Черноголовка, Московская обл., 142432 Россия

\*e-mail: tsebrikova@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.04.2023 г.

После доработки 03.05.2023 г.

Принята к публикации 05.05.2023 г.

Синтезирован комплекс цинка(II) с 2-окси-5-этилфенилфосфоновой кислотой (H<sub>3</sub>L) состава [Zn(H<sub>2</sub>L)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>][Zn(HL)(H<sub>2</sub>O)] · H<sub>2</sub>O (I), структура которого установлена на основании совокупности данных рентгеноструктурного и элементного анализа, квантово-химических расчетов, ИК- и электронной спектроскопии. Потенциометрическим титрованием определены константы устойчивости комплексов кислоты H<sub>3</sub>L с перхлоратом цинка(II) в воде. Впервые изучены цитотоксические свойства кислоты H<sub>3</sub>L и комплекса I на клетках HeLa (аденокарцинома шейки матки человека). Методом лазерной конфокальной микроскопии получены результаты по накоплению комплекса I в клетках HeLa.

**Ключевые слова:** цинк(II), фосфоновая кислота, PCA, константа устойчивости комплекса металл–лиганд, цитотоксичность

**DOI:** 10.31857/S0044457X23600597, **EDN:** MYBLVM

### ВВЕДЕНИЕ

Синтез и исследование физико-химических и биологических свойств комплексов биоактивных органических лигандов с катионами различных металлов позволяют существенно расширить возможности структурного дизайна лекарственных средств [1–6].

В нормальном протекании процессов в живых организмах важную роль играют такие *d*-элементы, как железо, медь и цинк. Дисбаланс этих металлов запускает процессы старения, способствует развитию атеросклероза, мутагенеза, нейродегенерации, иммунологических нарушений и др. [7–12]. Механизм возникновения таких заболеваний связывают с генерацией активных форм кислорода, вызывающих окислительный стресс с участием ионов железа и меди [13, 14].

Производные 2-оксибензойной (салициловой) кислоты (H<sub>2</sub>Sal) широко применяются в клинической практике как жаропонижающие, анальгетические и противовоспалительные средства. Они могут оказывать терапевтическое влияние на опухоли, такие как рак молочной [15], поджелудоч-

ной [16], предстательной железы, яичников [17], рак легких [18]. Известно, что комплексы цинка(II) с производными салициловой кислоты также обладают противоопухолевой активностью [19].

2-Оксифенилфосфоновые кислоты являются малоизученными фосфорильными аналогами салициловой кислоты, в которых карбоксильная группа заменена фосфоновым фрагментом (рис. 1). Такая замена приводит к появлению других физико-химических и биологических свойств этих кислот по сравнению с салициловой кислотой, что обуславливает наш интерес к изучению как свободных 2-оксифенилфосфоновых кислот, так и их комплексов с биологически активными металлами [20–23].

В настоящей работе синтезирован комплекс цинка(II) с 2-окси-5-этилфенилфосфоновой кислотой (H<sub>3</sub>L) состава [Zn(H<sub>2</sub>L)<sub>2</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>][Zn(HL)(H<sub>2</sub>O)] · H<sub>2</sub>O (I), структура которого установлена на основании данных рентгеноструктурного и элементного анализа, квантово-химических расчетов и ИК-спектроскопии. Методом потенциометрического титрования определены константы устойчивости ком-

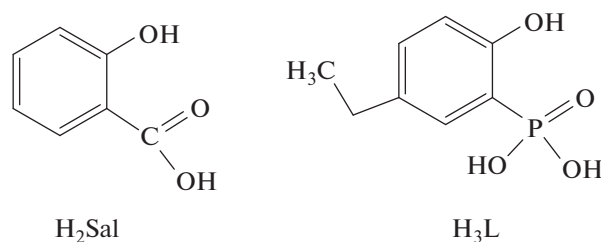


Рис. 1. Структурные формулы салициловой ( $\text{H}_2\text{Sal}$ ) и 2-окси-5-этилфенилфосфоновой кислоты ( $\text{H}_3\text{L}$ ).

плексов кислоты  $\text{H}_3\text{L}$  с перхлоратом цинка(II) в воде. Впервые изучены цитотоксические свойства кислоты  $\text{H}_3\text{L}$  и комплекса I на клетках HeLa (аденокарцинома шейки матки человека) с использованием МТТ-теста. Кроме того, оценка накопления комплекса I в клетках HeLa проведена методом лазерной конфокальной микроскопии.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$  записывали на спектрометре Bruker СХР-200; стандарты – ТМС (внутренний) и 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (внешний). Температуры плавления измеряли на приборе Voetius PHMK 05. Анализ содержания С и Н проводили на С,Н,N-анализаторе Carlo Erba (Strumentazione, Italy). Содержание фосфора и цинка определяли методом атомной эмиссии с индуктивно связанной плазмой на приборе iCAP-6500 Duo (Thermo Scientific, США). ИК-спектры регистрировали на спектрометре Bruker Vertex 70 в диапазоне 4000–400  $\text{см}^{-1}$  (суспензия в вазелиновом масле) и методом НПВО на спектрометре Nexsus, Nicolette.

2-Оксифенил-5-этилфосфоновую кислоту синтезировали согласно [20]. Температура плавления и результаты элементного анализа и спектров ЯМР соответствовали литературным данным. Для изучения комплексообразования использовали гексагидрат перхлората цинка(II) марки “х. ч.”.

Комплекс  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_2][\text{Zn}(\text{HL})(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (I) был получен в виде бесцветного кристалли-

Таблица 1. Условия изучения комплексообразования 2-окси-5-этилфенилфосфоновой кислоты с  $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  в воде при 298 К: интервалы рН и начальных концентраций (ммоль/л) реагентов в растворе

№	рН	$c_{\text{Zn}}^0$	$c_{\text{L}}^0$	$n$
1	3.4–11.3	0.30–0.29	0.63–0.60	57
2	3.3–11.1	0.47–0.45	0.70–0.67	56
3	3.2–11.1	0.32–0.31	0.72–0.69	61
4	2.6–11.3	1.05–0.96	2.26–2.06	51

Примечание:  $n$  – число экспериментальных точек.

ческого осадка при смешивании водных растворов  $\text{H}_3\text{L}$  (0.3 г, 1.5 ммоль) и  $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.3 г, 0.7 ммоль). Комплекс достаточно хорошо растворим в воде, поэтому для его полного осаждения реакцию смесь выдерживали не менее 12 ч при температуре  $+6^\circ\text{C}$ , а затем фильтровали и промывали ледяной водой. Выход составил 0.5 г (88%).

	С	Н	Р	Zn
Найдено, %:	35.98,	4.04,	11.79,	16.34,
	36.15;	4.28;	11.62;	16.24.

Для  $\text{C}_{24}\text{H}_{37}\text{O}_{16}\text{P}_3\text{Zn}_2$

вычислено, %:	35.76;	4.59;	11.57;	16.17.
---------------	--------	-------	--------	--------

Константы устойчивости комплексов 2-окси-5-этилфенилфосфоновой кислоты ( $\text{H}_3\text{L}$ ) с перхлоратом цинка(II) определяли методом потенциометрического титрования с использованием потенциометра ОР-300 (Radelkis) по методике [24].

Растворы кислоты  $\text{H}_3\text{L}$  и соли  $\text{Zn}(\text{ClO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  с начальным объемом 160 мл титровали стандартным 0.1 М раствором NaOH при температуре  $298 \pm 0.1$  К и ионной силе  $I = 0.1$  М KCl. Выполнено четыре титрования в интервале рН от 2.6 до 11.3, которые включали от 51 до 61 точки. Исходные аналитические концентрации кислоты и соли варьировали в интервалах 0.29–1.05 и 0.60–2.26 мМ соответственно (табл. 1). При титровании отношение начальных концентраций реагентов  $c_{\text{L}}^0/c_{\text{Zn}}^0$  варьировалось от 1.5 до 2.2. В четвертом титровании в интервале рН 6.5–9.5 наблюдали образование осадка. Поэтому данные этого титрования в указанной области в расчетах констант комплексообразования не использовали.

Константы устойчивости комплексов 2-окси-5-этилфенилфосфоновой кислоты ( $\text{H}_3\text{L}$ ) с перхлоратом цинка(II) рассчитывали с использованием программы CHEMQUI [25, 26], предназначенной для моделирования равновесий в растворах. В нашем случае потенциометрического титрования неизвестные константы устойчивости комплексов  $\beta_1, \beta_2 \dots$  были искомыми и оптимизируемыми параметрами для минимизации квадратов остатков программой CHEMQUI:

$$\Phi(\beta_1, \beta_2 \dots) = \sum_{i=1}^n (\text{pH}_{\text{exp},i} - \text{pH}_i)^2, \quad (1)$$

где  $n$  – число экспериментальных точек титрования,  $\text{pH}_{\text{exp}}$  и  $\text{pH}$  – экспериментальное и расчетное значения рН при заданной начальной концентрации реагентов. В программе водородный показатель рН является функцией равновесной концентрации катиона водорода:

$$\text{pH} = a + b \lg[\text{H}^+], \quad (2)$$

где  $a$  – возможная систематическая погрешность,  $b$  – коэффициент пропорциональности. Равновесная концентрация  $j$ -го комплекса  $C_j$  как функция его константы устойчивости  $\beta_j$  выражается в форме уравнения Бринкли [27]:

$$C_j = \exp \left( \ln \beta_j + \sum_{k=1}^m v_{jk} \ln C_k \right), \quad (3)$$

где  $\beta_j$  – общая константа устойчивости  $j$ -го комплекса, образующегося из  $m$  реагентов,  $v_{jk}$  – стехиометрический коэффициент для данной равновесной реакции. Кроме того, в программе используются уравнения материального баланса:

$$\sum_{i=1}^s v_{ki} C_i = C_k^0, \quad k = 1, 2, \dots, m, \quad (4)$$

где  $v_{ki}$  – стехиометрический коэффициент  $k$ -го реагента в реакции образования  $i$ -го вещества,  $C_k^0$  – начальная концентрация  $k$ -го реагента,  $s$  – число всех реагентов и комплексов. Уравнения (3) и (4) используются для последующего расчета  $[\text{H}^+]$  и pH. Программа CHEMQUI включает четыре независимых алгоритма: градиентный метод программы EQ, симплекс-алгоритм Нелдера и Мида, метод стохастического поиска и генетический алгоритм [25, 26]. Алгоритмы программы и ее применение для оценки констант устойчивости комплексов в растворах методами калориметрии, потенциометрии, спектрофотометрии (ИК, УФ, UV-vis), ЯМР-спектроскопии и кондуктометрии изложены в обзоре [25]. CHEMQUI находится в свободном доступе на сервере [26].

Цинк(II) образует в воде устойчивые гидроксиды [28], поэтому оценка констант комплексообразования  $\text{Zn}^{2+}$  с кислотой  $\text{H}_3\text{L}$  была выполнена как с учетом реакций гидролиза цинка(II), так и без их учета. В расчетах использовали известные константы  $\lg \beta_n$  для равновесий  $\text{Zn}^{2+} + n\text{H}_2\text{O} = \text{Zn}^{2+}(\text{OH})_n + n\text{H}^+$  ( $n = 1, 2$ ), составляющие в воде при 298 К и ионной силе  $I = 0.1$  М ( $\text{NaNO}_3$ ) соответственно  $-7.89$  и  $-14.92$  [28]. Для расчета констант комплексообразования  $\text{Zn}^{2+}$  с протонированными формами лиганда  $\text{H}_n\text{L}^{(3-n)-}$  ( $n = 0, 1, 2$ ) ранее были определены константы протонирования кислоты из данных ее титрования раствором NaOH, которые составили 11.58, 17.94 и 21.14 соответственно для равновесий  $\text{L}^{3-} + n\text{H}^+ = \text{H}_n\text{L}^{(3-n)-}$  ( $n = 1, 2, 3$ ) при 298 К и ионной силе  $I = 0.1$  М (KCl) [21]. Независимое определение констант протонирования кислоты позволяет более надежно определить константы комплексообразования кислоты с катионом металла [29].

Нами было проанализировано девять моделей равновесий в растворе с образованием от одной до

четырёх химических форм: 1)  $\text{ZnL}$ ; 2)  $\text{ZnL}$ ,  $\text{ZnOH}$ ,  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ ; 3)  $\text{ZnL}$ ,  $\text{ZnL}(\text{OH})$ ; 4)  $\text{ZnL}$ ,  $\text{ZnL}(\text{OH})$ ,  $\text{ZnL}(\text{OH})_2$ ; 5)  $\text{ZnL}$ ,  $\text{ZnL}(\text{OH})$ ,  $\text{ZnOH}$ ,  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ ; 6)  $\text{ZnL}$ ,  $\text{ZnL}_2$ ; 7)  $\text{ZnL}$ ,  $\text{ZnL}_2$ ,  $\text{ZnL}_2(\text{OH})$ ; 8)  $\text{ZnL}$ ,  $\text{ZnL}_2$ ,  $\text{ZnL}(\text{OH})$ ,  $\text{ZnL}_2(\text{OH})$ ; 9)  $\text{ZnL}$ ,  $\text{ZnL}_2$ ,  $\text{ZnHL}$ ,  $\text{ZnL}_2(\text{OH})$ . Здесь для простоты заряды частиц, образованных ионами  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{L}^{3-}$ ,  $\text{H}^+$  и  $\text{OH}^-$ , не указаны. В качестве критериев выбора модели равновесных реакций, вполне соответствующей эксперименту, использовали  $R$ -фактор Гамильтона ( $HRF$ ) и коэффициент детерминации ( $R_{det}^2$ ):

$$HRF = 100 \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (\text{pH}_{exp,i} - \text{pH}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (\text{pH}_{exp,i})^2} \right]^{1/2},$$

$$R_{det}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\text{pH}_{exp,i} - \text{pH}_i)^2}{\sum_{i=1}^n (\text{pH}_{exp,i} - \langle \text{pH}_{exp} \rangle)^2},$$

где  $\langle \text{pH}_{exp} \rangle = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \text{pH}_{exp,i}$ ,  $n$  – число экспериментально измеренных значений pH,  $\text{pH}_{exp,i}$  и  $\text{pH}_i$  – экспериментальное и соответствующее рассчитанное по модели равновесий значение pH для данных начальных концентраций реагентов. Модель равновесия с образованием в растворе комплексов  $\text{ZnL}^-$  и  $\text{ZnL}(\text{OH})^{2-}$  наилучшим образом согласуется с экспериментальными данными. В этой модели учитывались следующие равновесные реакции:  $\text{L}^{3-} + n\text{H}^+ = \text{H}_n\text{L}^{(3-n)-}$  ( $n = 1, 2, 3$ );  $\text{H}_2\text{O} = \text{H}^+ + \text{OH}^-$ ;  $\text{Zn}^{2+} + \text{L}^{3-} = \text{ZnL}^-$ ;  $\text{Zn}^{2+} + \text{L}^{3-} + \text{OH}^- = \text{ZnL}(\text{OH})^{2-}$ . Для 12 оценок констант комплексов с использованием трех титрований и четырех расчетных алгоритмов программы CHEMQUI фактор  $HRF$  изменялся в интервале от 1.668 до 1.843%, а коэффициент  $R_{det}^2$  – от 0.9972 до 0.9979. Средние величины констант комплексообразования  $\lg \beta$  были определены из их  $m = 12$  оценок  $\lg \beta^i$  с учетом весовых вкладов  $\frac{1}{HRF_i}$ , характеризующих степень согласия с экспериментальными данными:

$$\lg \beta = \frac{\sum_{i=1}^m \frac{1}{HRF_i} \lg \beta^i}{\sum_{i=1}^m \frac{1}{HRF_i}}.$$

Экспериментальные данные PCA для соединения I получены на дифрактометре Bruker AXS D8 Venture Photon III C14 IuS 3.0 ( $\lambda(\text{MoK}\alpha)$ , графитовый монохроматор) [30] (табл. 2). Поглощение учтено полуэмпирическим методом по эквивалентам (программа SADABS) [31]. Структура определена комбинацией прямого метода и Фурье-синте-

**Таблица 2.** Основные структурные данные и результаты уточнения структуры I

Параметр	Значение
Формула	$C_{24}H_{37}O_{16}P_3Zn_2$
$M$	805.18
$T$ , К	100(2)
Излучение, $\lambda$ , Å	0.71073
Сингония	Моноклинная
Пр. гр.	$Pc$
$a$ , Å	20.103(4)
$b$ , Å	14.009(3)
$c$ , Å	7.6143(15)
$\beta$ , град	94.50(3)
$V$ , Å <sup>3</sup>	2137.8(8)
$Z$	2
$d_x$ , г/см <sup>3</sup>	1.251
$\mu$ , мм <sup>-1</sup>	1.288
$F(000)$	828
Размер образца, мм	$0.22 \times 0.20 \times 0.02$
интервал $\theta$ , град	2.5–25.3
Пределы $h, k, l$	$-23 \leq h \leq 24$ $-16 \leq k \leq 16$ $-9 \leq l \leq 7$
Число измеренных отражений	11095
Число независимых отражений, $R_{int}$	6141, 0.0903
Полнота до $\theta = 25.242^\circ$ , %	98.5
Max, min пропускание	0.73, 0.20
Число параметров	6141/38/197
$S$	1.387
$R_1, wR_2 [I > 2\sigma(I)]$	0.1481, 0.3480
$R_1, wR_2$ (все данные)	0.1805, 0.3710
$\Delta\rho_{max}/\Delta\rho_{min}$ e/Å <sup>3</sup>	1.569–0.926
Абсолютная конфигурация	0.52(8)

зов. Атомы водорода рассчитаны из геометрических соображений. Структуры уточнены полноматричным анизотропно-изотропным МНК. Все расчеты выполнены по программам SHELXS и SHELXL [32]. “Монокристаллы” I растут в виде тонких сросшихся пластин (как в слюде), разделить которые невозможно. Было проверено более 20 кристаллов, все они оказались сростками, но часть рефлексов для всех образцов индцировали в одной и той же ячейке. Лучший из кристаллов, с которого были получены экспериментальные данные, все равно был образован не менее чем восемью доменами (программа CellNow [33]). Для интегрирования был выбран наибольший домен (~35% индцированных при соотношении сигнал/фон  $\geq 8$  рефлек-

сов), в процессе интегрирования матрицу ориентации фиксировали. Уточнение проводили с учетом centrosymmetric двойникования, 37% рассеивающей мощности “кристалла” разупорядочено. Низкое качество эксперимента позволило перевести в анизотропию лишь атомы Zn и упорядоченные атомы P, что привело к ошибке типа A в checkcif (39 неводородных атомов уточняли в изотропном приближении). Две ошибки типа B (высокий  $wR_2$  и низкая точность в связях C–C) обусловлены строением образца.

Структурные данные и результаты уточнения для соединения I депонированы в Кембриджском банке структурных данных (CCDC № 2244640); deposit@ccdc.cam.ac.uk или <http://www.ccdc.cam.ac.uk>.

Эксперименты по определению цитотоксичности кислоты  $H_3L$  и комплекса I проводили на клетках HeLa (аденокарцинома шейки матки человека), полученных из коллекции клеточных культур позвоночных (Санкт-Петербург, Россия). Клетки HeLa были выращены в среде Игла MEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной сыворотки (HyClone, США), пенициллин (50 ед/мл), стрептомицин (50 мг/мл), в атмосфере 5%  $CO_2$  при температуре 37°C. Клетки рассеивали в 96-луночные планшеты в концентрации  $5 \times 10^4$  клеток/мл. Через 24 ч тестируемые соединения, предварительно растворенные в диметилсульфоксиде (ДМСО), вносили в культуральную среду. Клетки инкубировали при 37°C в увлажненной атмосфере воздуха и 5%  $CO_2$  в течение 48 ч. Затем в инкубационную среду вносили 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ, Sigma-Aldrich) в концентрации 0.5 мг/мл. Окрашивание клеток проводили при 37°C в увлажненной атмосфере воздуха и 5%  $CO_2$  в течение 2 ч. Далее инкубационную среду отбирали и кристаллы образованного МТТ-формаза на растворяли в 100%-ном ДМСО. Интенсивность окраски определяли при длине волны 536 нм с помощью планшетного ридера Cyation 3 (BioTek, США). За 100% принимали интенсивность окраски контрольных клеток, не обработанных тестируемым соединением. Статистический анализ, построение графиков и определение концентрации, вызывающей 50%-ное ингибирование роста популяции клеток ( $IC_{50}$ ), определяли на основе дозозависимых кривых с помощью программного обеспечения OriginPro 8.

Изучение клеточной аккумуляции комплекса I проводили на клетках HeLa. Клетки, выращенные на покровных стеклах размером  $24 \times 24$  мм при плотности клеточной культуры  $15 \times 10^4/2$  мл в шестилуночных планшетах, инкубировали в течение 24 ч с растворенным в ДМСО комплексом I, конечная концентрация которого в инкубационной среде составляла 100 мкМ. В качестве контроля использовали клетки без обработки ком-

плексом. Далее клетки отмывали от остатков среды раствором  $\text{PBS}_{\text{Х1}}$  (фосфатно-солевой буфер) и фиксировали раствором 4%-ного параформальдегида в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем проводили пермеабиллизацию в 0.5%-ном растворе Triton X-100 в  $\text{PBS}_{\text{Х1}}$  в течение 10 мин при комнатной температуре. Далее образцы после промывания в деионизованной воде сушили при комнатной температуре в темноте. Заклеивали стекла по периметру лаком. Изучение накопления комплекса I в клетках проводили с помощью лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 880 (Carl Zeiss, Германия). Изображения получали в инвертированном конфокальном режиме с использованием объектива C Plan-Apochromat 63X/1.4 Oil DIC M27. Для возбуждения флуоресценции комплекса I использовали лазерное облучение с длиной волны 405 нм, сигнал детектировали в диапазоне длин волн 415–536 нм. Все полученные треки были сохранены в формате czi-ном. Полученные изображения были обработаны с помощью программы для анализа изображений ImageJ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее нами был синтезирован комплекс  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ , состав и строение которого установлены на основании данных РСА, элементного анализа и ИК-спектроскопии [21]. В настоящей работе получен комплекс  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_2][\text{Zn}(\text{HL})(\text{H}_2\text{O})] \cdot \text{H}_2\text{O}$  (I), который, в отличие от светло-голубых кристаллов комплекса меди, представляет собой прозрачные слоистые кристаллы.

Структура I образована комплексами  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  (рис. 2а, рис. S1), 1D-цепочками  $[\text{Zn}(\text{HL})(\text{H}_2\text{O})]$  (рис. 2б, рис. S1) и кристаллизационными молекулами  $\text{H}_2\text{O}$ . В октаэдрическом комплексе  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  атомы O молекул  $\text{H}_2\text{O}$  находятся в *цис*-позиции друг к другу, аналогично расположены и атомы O оксифенильных фрагментов, в то время как фосфоновые атомы O – в *транс*-позиции друг к другу. В аналогичных комплексах меди(II) с  $\text{H}_3\text{L}$  [21], 2-оксифенилфосфоновой [23] и 2-окси-5-метоксифенилфосфоновой кислотой [22] атомы O молекул  $\text{H}_2\text{O}$  и атомы O оксифенильных фрагментов находятся в *транс*-позиции; комплексы центросимметричны. В 1D-цепочке  $[\text{Zn}(\text{HL})(\text{H}_2\text{O})]$  мостиковые атомы O оксифенильного фрагмента, молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  и фосфонного фрагмента объединяют соседние атомы Zn. Следует отметить, что цепочка разупорядочена по двум позициям (рис. 3) в соотношении 0.54 : 0.46, а координированные молекулы  $\text{H}_2\text{O}$  в каждой цепочке разупорядочены по двум позициям с заселенностями O(15), O(16), O(15B) и O(16B) 0.27, 0.27, 0.26 и 0.20 соответственно. Низкое качество

экспериментальных данных позволяет обсуждать лишь топологию структурных единиц.

Отнесение колебательных частот донорных групп в ИК-спектре лиганда  $\text{H}_3\text{L}$ , позволяющих судить о его координации, а также комплекса меди  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  приведено в работе [21]. При сохранении общего характера ИК-спектр комплекса I несколько отличается от ИК-спектров  $\text{H}_3\text{L}$  и  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ . Основные отличия в ИК-спектрах комплексов наблюдаются в интервале частот 1285–1070  $\text{см}^{-1}$ , где лежат полосы  $\nu(\text{Ph}-\text{O})$ ,  $\tau(\text{CH}_2)$ ,  $\nu(\text{P}=\text{O})$  и  $\delta_{\text{Ph}}$ . В спектре комплекса цинка в этом спектральном диапазоне присутствуют: полоса средней интенсивности около 1271  $\text{см}^{-1}$ , более интенсивная полоса около 1235  $\text{см}^{-1}$ , менее интенсивная полоса при 1215  $\text{см}^{-1}$  и очень интенсивная широкая полоса с максимумами при 1139, 1103, 1074  $\text{см}^{-1}$ . В спектре  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  в этом спектральном диапазоне наблюдаются две хорошо разрешенные полосы: дублетная полоса средней интенсивности при 1249, 1225  $\text{см}^{-1}$  и интенсивная дублетная полоса при 1115, 1086  $\text{см}^{-1}$ . В диапазоне 900–420  $\text{см}^{-1}$  в основном меняется соотношение интенсивности полос.

Что касается фосфорильной группы, то к  $\nu(\text{P}=\text{O})$  в спектре комплекса I можно отнести узкую полосу выше средней интенсивности при 1235  $\text{см}^{-1}$ . Это несколько выше, чем положение полосы  $\nu(\text{P}=\text{O})$  в спектре свободной  $\text{H}_3\text{L}$  (1230  $\text{см}^{-1}$ ), и свидетельствует о присутствии не участвующего в координации с катионом цинка фосфорильного атома кислорода. В спектре комплекса меди, в котором фосфорильный кислород молекулы  $\text{H}_3\text{L}$  также не участвует в координации с катионом меди, частота  $\nu(\text{P}=\text{O})$  незначительно ( $\sim 6 \text{ см}^{-1}$ ) понижается. Полоса при 1271  $\text{см}^{-1}$  может быть связана с  $\nu(\text{Ph}-\text{O})$  фенольной группы. Интенсивные полосы при 1024 и 937  $\text{см}^{-1}$  в спектре I обусловлены колебаниями  $\delta(\text{РОН})$  и  $\nu(\text{РО})$  фосфонового фрагмента (1017 и 943  $\text{см}^{-1}$  в ИК-спектре  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ).

В диапазоне частот 4000–2000  $\text{см}^{-1}$  в ИК спектре I на фоне широкой интенсивной полосы с максимумом при  $\sim 3000 \text{ см}^{-1}$  фиксируются полосы валентных колебаний молекул воды  $\nu(\text{H}_2\text{O})$ , входящих в состав комплекса, а также  $\nu(\text{C}-\text{H})$ ,  $\nu(\text{OH})_{\text{Ph}}$  и  $\nu(\text{OH})_{\text{P}}$ . Новую по сравнению со спектром  $\text{H}_3\text{L}$  полосу около 3381  $\text{см}^{-1}$  в ИК-спектре комплекса цинка можно отнести к валентным колебаниям координированных молекул воды (3314  $\text{см}^{-1}$  в спектре медного комплекса). Деформационным колебаниям  $\delta(\text{H}_2\text{O})$  соответствует полоса ниже средней интенсивности при 1672  $\text{см}^{-1}$  (широкая полоса при  $\sim 1695 \text{ см}^{-1}$  в спектре комплекса меди). Полоса около 3148  $\text{см}^{-1}$  может быть обусловлена  $\nu(\text{OH})_{\text{Ph}}$  (3201  $\text{см}^{-1}$  в комплексе меди). Валентные колеба-

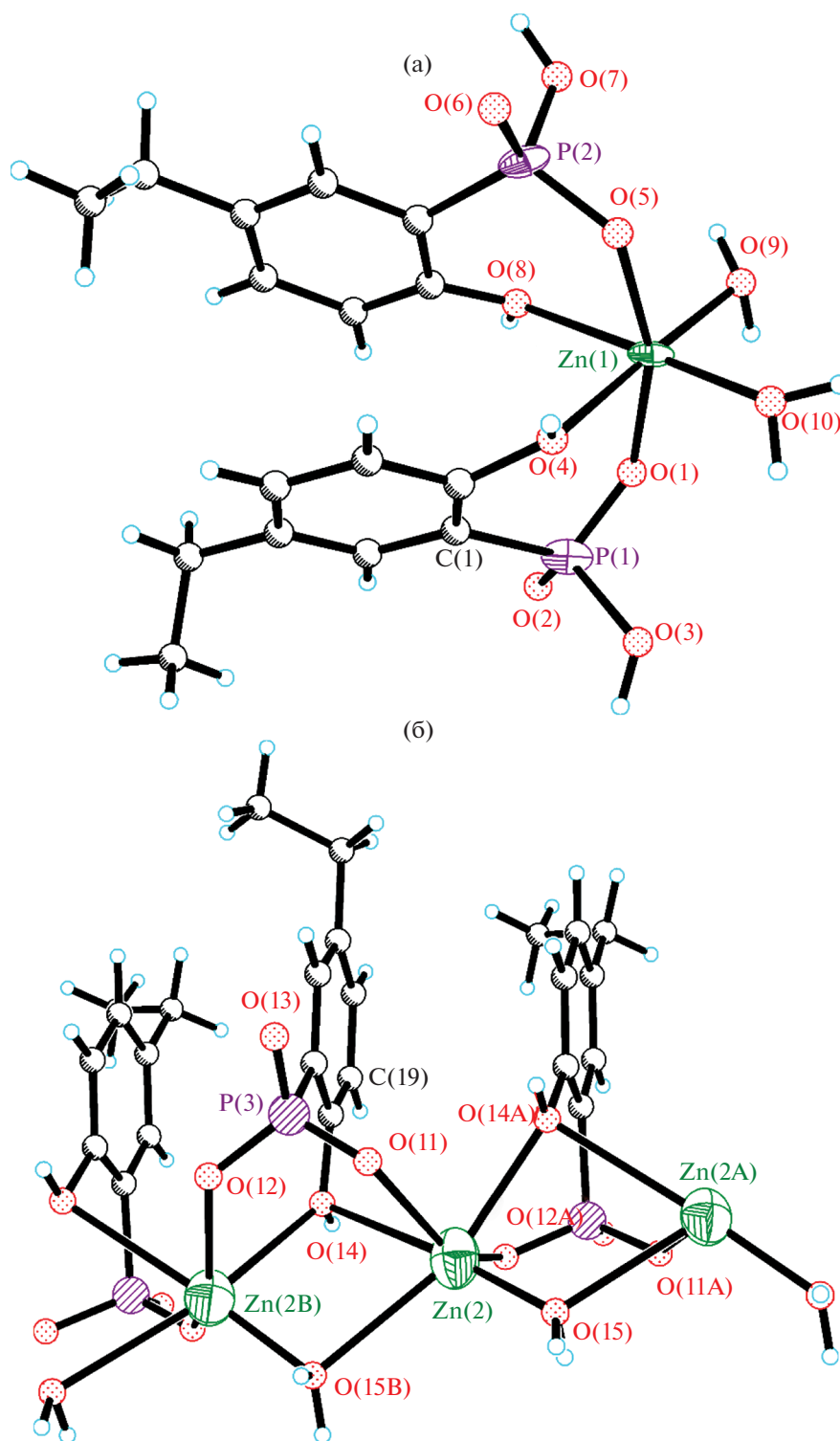


Рис. 2. Строение комплекса (а) и 1D-цепочки (б) в структуре I.

ния OH-групп фосфонового фрагмента  $\nu(\text{OH})_{\text{P}}$  имеют малую интенсивность ( $2570$  и  $2274 \text{ см}^{-1}$  в спектре  $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$ ).

Принимая во внимание общий характер спектров комплексов цинка и меди с  $\text{H}_3\text{L}$ , можно сказать, что при одинаковом способе координации

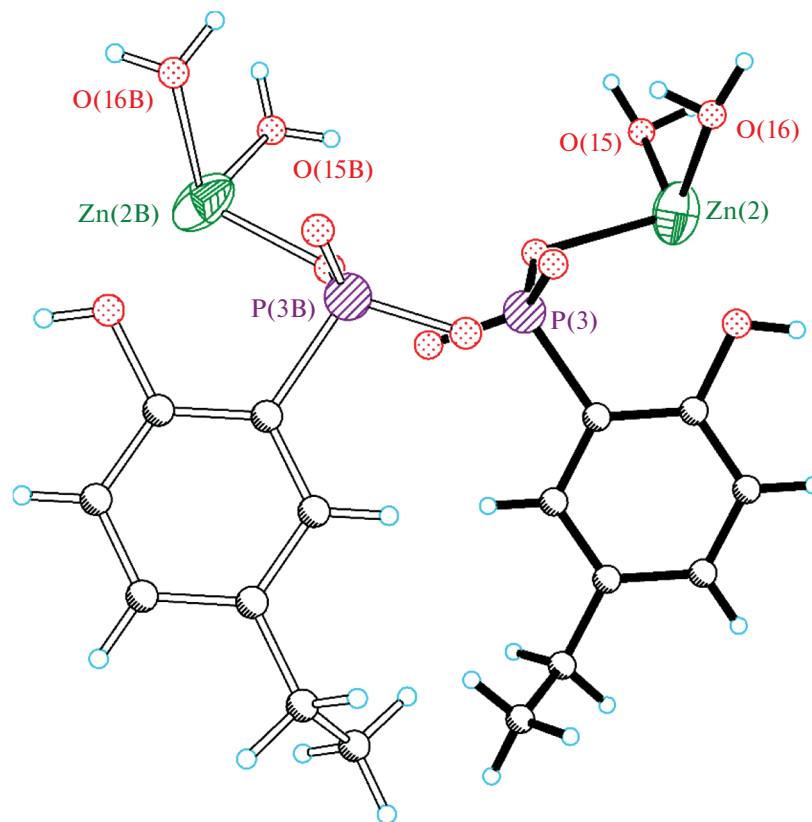


Рис. 3. Взаимное расположение двух позиций разупорядоченной 1D-цепочки в структуре I.

$\text{H}_3\text{L}$  эти комплексы изоструктурными не являются, что согласуется с данными РСА.

Геометрия комплекса цинка(II) с  $\text{H}_3\text{L}$  также была определена по результатам DFT-расчетов с использованием программы Gaussian 06 (функционал B3LYP с базовым набором 6-31+G(d,p)). Согласно расчетам, координационное окружение атома цинка в изолированной части комплекса  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  в целом идентично окружению, определенному методом РСА (рис. 4). Различия в геометрии связаны, по-видимому, с тем, что расчеты проводили в газовой фазе, а в РСА использовали кристаллический образец. В изолированной части комплекса  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{L})_2(\text{H}_2\text{O})_2]$  длины связей  $\text{Zn}-\text{OPh}$  составляют 1.922–1.925 Å,  $\text{Zn}-\text{OPh}$  – 2.229–2.307 Å, а  $\text{Zn}-\text{OH}_2$  – 2.247–2.266 Å.

Константы устойчивости комплексов цинка(II) с 2-окси-5-этилфенилфосфоновой кислотой  $\text{H}_3\text{L}$  (рис. 5, табл. 3) в воде при 298 К и ионной силе 0.1 М КСl определены методом потенциометрического титрования с использованием четырех расчетных алгоритмов программы SNEMEQUI (см. Экспериментальную часть), предназначенной для определения констант устойчивости из экспериментальных данных различных физико-химических методов [25, 26]. В расчетах исполь-

зовали известные константы протонирования  $\lg\beta_m$  кислоты  $\text{H}_3\text{L}$  в воде при 298 К и ионной силе 0.1 М: 11.58, 17.94 и 21.14 соответственно для равновесий  $\text{L}^{3-} + m\text{H}^+ = \text{H}_m\text{L}^{(3-m)-}$  ( $m = 1, 2$  и 3) [21].

Ион  $\text{Zn}^{2+}$  с  $\text{L}^{3-}$  образует в воде простой комплекс  $\text{ZnL}^-$ , который в щелочной среде с ростом pH до 10 практически полностью превращается в комплекс  $\text{ZnL}(\text{OH})^{2-}$ . Максимум связывания 33% иона  $\text{Zn}^{2+}$  в комплекс  $\text{ZnL}^-$  приходится на pH 8.2 при концентрации реагентов  $\text{Zn}^{2+}$  и  $\text{H}_3\text{L}$  около 0.3

Таблица 3. Константы устойчивости комплексов  $\text{Zn}^{2+}$  с 2-окси-5-этилфенилфосфоновой кислотой  $\text{H}_3\text{L}$  в воде при 298 К и ионной силе 0.1 М КСl

<i>i</i>	Равновесие	$\lg\beta_i \pm sd^a$
1	$\text{Zn}^{2+} + \text{L}^{3-} = \text{ZnL}^-$	6.63(13) <sup>б</sup>
2	$\text{Zn}^{2+} + \text{L}^{3-} + \text{OH}^- = \text{Zn}(\text{OH})\text{L}^{2-}$	12.68(36)
3	$\text{ZnL}^- + \text{OH}^- = \text{Zn}(\text{OH})\text{L}^{2-}$	6.06(38)

<sup>a</sup>  $\lg\beta_i$  и  $sd$  – константа устойчивости комплекса и ее стандартное отклонение, вычисленное по результатам нескольких титрований и расчетов (см. Экспериментальную часть).

<sup>б</sup> Величины в скобках – стандартные отклонения в последних знаках после запятой.

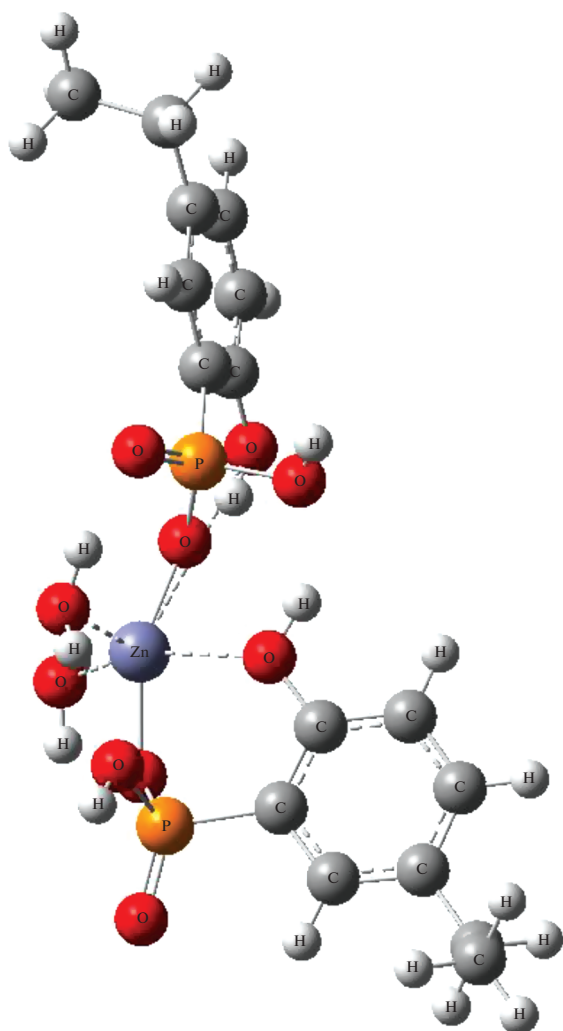


Рис. 4. Пространственное строение изолированной части комплекса  $[Zn(H_2L)_2(H_2O)_2]$  по результатам квантово-химических расчетов.

и 0.7 мМ соответственно (рис. 5). Кислота  $H_3L$  значительно слабее связывает цинк(II) в комплекс  $ZnL^-$  ( $\lg K_{ZnL} = 6.63$ , табл. 3), чем медь(II) в комплекс  $CuL^-$  ( $\lg K_{CuL} = 8.91$  [21]). Тем не менее константа устойчивости комплекса  $ZnL^-$  в случае 2-окси-5-этилфенилфосфоновой кислоты не является низкой: только для половины из 568 комплексов состава  $ZnLig$  самых различных органических лигандов характерны константы устойчивости  $>5.0$  в воде в стандартных условиях при 298 К и ионной силе 0.1 М [34]. В работе [35] показано, что константы устойчивости ионов металлов  $M_i$  и  $M_j$  с органическим лигандом в воде в стандартных условиях связаны простой зависимостью:  $\lg K_j = (r_i/r_j) \cdot \lg K_i$ , где  $r_i$  и  $r_j$  – термодинамические радиусы ионов  $M_i$  и  $M_j$ . Поскольку  $r_{Cu} = 0.826$  и  $r_{Zn} = 1.138$  [35], исходя из значения  $\lg K_{CuL} = 8.91$  для ком-

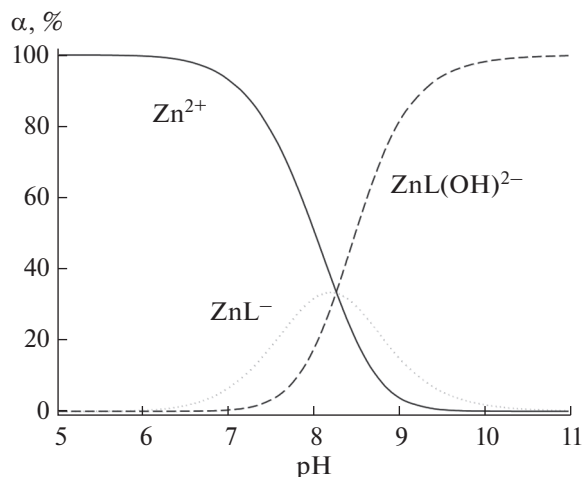


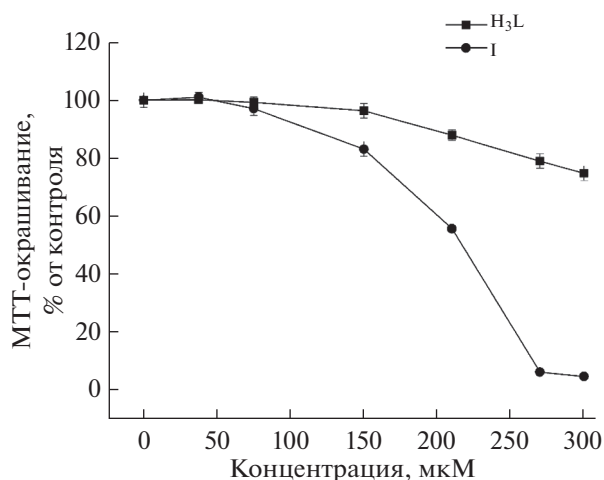
Рис. 5. Диаграмма распределения комплексов  $Zn^{2+}$  с 2-окси-5-этилфенилфосфоновой кислотой в зависимости от рН в воде при 298 К, ионной силе 0.1 М и начальных концентрациях реагентов  $Zn^{2+}$  и  $H_3L$  соответственно 0.31 и 0.71 мМ.  $\alpha$  – Процентная доля равновесных концентраций ионов относительно общей концентрации  $Zn^{2+}$ .

плекса  $CuL^-$  приведенное уравнение дает для комплекса  $ZnL^-$  величину  $\lg K_{ZnL} = 6.47$ , хорошо согласующуюся с экспериментальным значением  $6.63 \pm 0.13$  (табл. 3). Ступенчатая константа присоединения иона  $OH^-$  к комплексу  $ZnL^-$   $\lg K(ZnL^- + OH^-) = 6.06$  существенно выше, чем аналогичная константа  $\lg K(CuL^- + OH^-) = 4.48$  [21] для меди(II). Этот факт косвенно свидетельствует о том, что координационная сфера цинка(II) заполняется донорными центрами кислоты в значительно меньшей степени, чем в случае меди(II).

Наши недавние исследования *in vivo* показали, что 2-окси-5-этилфенилфосфоновая кислота ( $H_3L$ ) обладает высокой анальгетической активностью и представляет интерес в качестве нестероидного противовоспалительного препарата, являясь при этом малотоксичным соединением ( $LD_{50} = 2000$  мг/кг) [20, 21]. Ее комплекс  $[Cu(H_2L)_2(H_2O)_2]$  при такой же малой токсичности проявляет анальгетический эффект значительно выше эффекта свободной кислоты и препарата сравнения – аналгина [21]. Кроме того, вскрытие лабораторных животных не показало ультракороткого воздействия  $H_3L$  и ее комплекса  $[Cu(H_2L)_2(H_2O)_2]$  в дозах, соответствующих  $ED_{50}$ , на желудочно-кишечный тракт, в отличие от салициловой кислоты.

Известно, что всемирная организация здравоохранения и международное медико-биологическое общество рекомендуют использовать альтернативные методы и модели, такие как, например, применение перевиваемых клеточных культур взамен общепринятых тестов на лабораторных животных [36]. Это связано с вопросами этического и





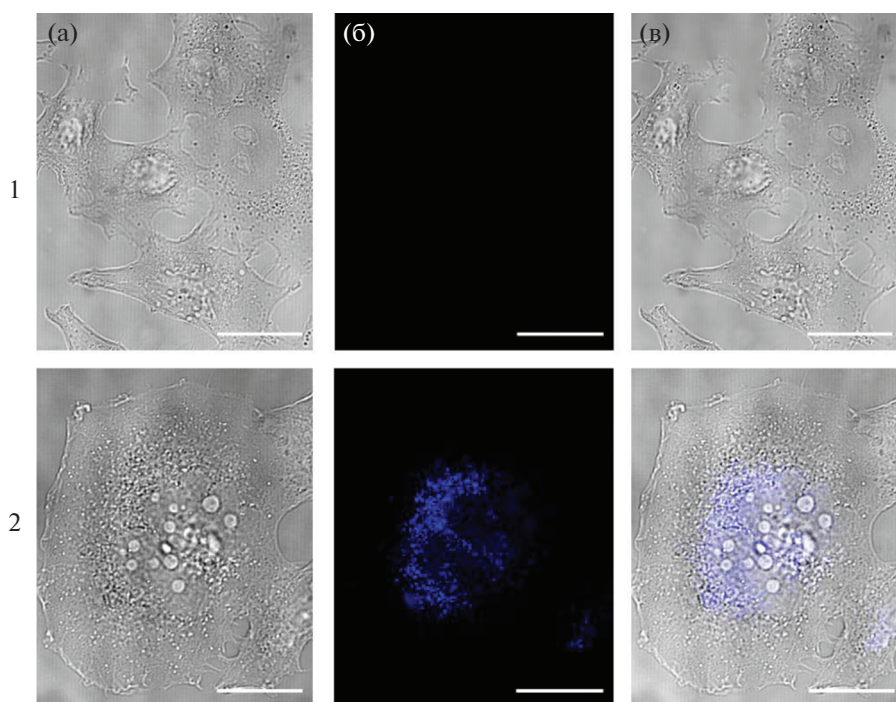
**Рис. 6.** Цитотоксичность кислоты H<sub>3</sub>L и комплекса I в отношении клеток HeLa. Результаты жизнеспособности клеток измерены с помощью анализа восстановления МТТ после 48 ч действия соединения.

экономического использования лабораторных животных, а также с тем, что эксперименты с использованием животных трудоемки, длительны и не всегда воспроизводимы, поэтому дальнейшее изучение биологических свойств производных 2-оксифенилфосфоновой кислоты проводили на клетках аденокарциномы шейки матки человека HeLa. В

работе изучены цитотоксические свойства кислоты H<sub>3</sub>L и комплекса I в отношении клеток HeLa (рис. 6). Установлено, что H<sub>3</sub>L является малотоксичным соединением: в концентрации до 150 мкмоль/л она не оказывает существенного влияния на выживаемость клеток HeLa, что согласуется с результатами исследования острой токсичности этой кислоты, полученными на лабораторных животных [20, 21].

Показано, что кислота H<sub>3</sub>L и комплекс I обладают схожей цитотоксической активностью при малых концентрациях. Однако, в отличие от цитотоксического действия кислоты H<sub>3</sub>L, влияние комплекса I на клетки HeLa значительно снижало их жизнеспособность при концентрациях >150 мкмоль/л. Данный результат подтверждается вычисленными значениями количественного критерия цитотоксической активности IC<sub>50</sub> (концентрация исследуемого соединения, вызывающая 50%-ное ингибирование роста клеточной популяции). Для комплекса I доза IC<sub>50</sub> составила 205.4 ± 5.9 мкмоль/л, для кислоты H<sub>3</sub>L доза IC<sub>50</sub> не определена, так как находится выше пределов ее растворимости (>300 мкмоль/л).

Результаты исследования внутриклеточного проникновения комплекса I на клеточной линии HeLa показаны на рис. 7. Инкубацию клеток с комплексом проводили в течение 24 ч, добавляя в питательную среду растворенный в ДМСО ком-



**Рис. 7.** Конфокальные изображения клеток HeLa при совместной инкубации в течение 24 ч с комплексом I (100 мкМ, панель 2). На панели 1 представлены контрольные клетки, не обработанные соединением. а — фазовый контраст; б — локализация комплекса в клетках; в — совмещение изображений. Шкала — 20 мкм.

плекс I с конечной концентрацией 100 мкмоль/л. Проведение этого исследования стало возможным благодаря спектральным характеристикам комплекса: в спектре флуоресценции ( $\lambda_{\text{ex}} = 288$  нм) раствора комплекса I в ДМСО присутствуют полосы при 364 и 700 нм. По данным флуоресцентной микроскопии (лазерная линия с длиной волны 405 нм) можно сделать вывод, что исследуемый комплекс проникает через клеточную мембрану клеток HeLa (рис. 7, панель 2), в то время как в контрольных образцах (рис. 7, панель 1) при возбуждении лазерной линией при 310–460 нм флуоресценция отсутствует.

Накопление соединений биомедицинского назначения в живых клетках может происходить различными путями и приводить к изменению физиологии и биохимии клеток, вследствие чего могут наблюдаться такие явления, как нарушение окислительно-восстановительного баланса клетки, образование активных форм кислорода, апоптоз. В работе на данном этапе не представилось возможности определить количество и внутриклеточную локализацию комплекса I. Однако понимание механизмов биоаккумуляции данного комплекса важно для изучения его регуляции на клеточном уровне.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Определено строение комплекса цинка(II) с 2-окси-5-этилфенилфосфоновой кислотой ( $\text{H}_3\text{L}$ ), которое существенным образом отличается от строения комплексов меди(II) с производными 2-оксифенилфосфоновой кислоты [21–23]. Методом потенциометрического титрования впервые определены константы устойчивости комплексов  $\text{H}_3\text{L}$  с перхлоратом цинка в воде. Ион  $\text{Zn}^{2+}$  с  $\text{L}^{3-}$  образует простой комплекс  $\text{ZnL}^-$  и комплекс  $\text{ZnL}(\text{OH})^{2-}$ , в то время как для  $\text{Cu}^{2+}$  обнаружено существование комплексов  $\text{CuL}^-$ ,  $\text{CuL}_2^{4-}$ ,  $[\text{Cu}(\text{OH})\text{L}]^{2-}$  и  $[\text{Cu}(\text{OH})\text{L}_2]^{5-}$  как для  $\text{H}_3\text{L}$ , так и для ее аналогов [21–23].

Установлено, что кислота  $\text{H}_3\text{L}$  является малотоксичным соединением *in vitro*, что согласуется с результатами исследования острой токсичности *in vivo* [20, 21]. Низкая токсичность комплекса цинка и его способность к биоаккумуляции являются важным критерием для дальнейшего изучения его биологической активности.

### БЛАГОДАРНОСТЬ

Рентгеноструктурный анализ проводили на оборудовании Центра коллективного пользования Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, биологические исследования выполнены на оборудовании Центра коллективного пользования Института физиологически активных веществ ФГБУН Фе-

дерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии РАН.

### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках государственного задания Института общей и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН, Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН и Института физиологически активных веществ РАН ФГБУН Федерального исследовательского центра проблем химической физики и медицинской химии РАН. Синтез целевых соединений осуществлен при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 21-43-00020, который реализуется совместно с Государственным фондом естественных наук Китая (NSFC), грант партнера № 52061135204). Физико-химические и биологические исследования выполнены при поддержке Российского научного фонда (проект № 22-13-00051).

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zhang C.X., Lippard S.J. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003. V. 7. № 4. P. 481. [https://doi.org/10.1016/s1367-5931\(03\)00081-4](https://doi.org/10.1016/s1367-5931(03)00081-4)
2. Hambley T.W. // *Science*. 2007. V. 318. № 5855. P. 1392. <https://doi.org/10.1126/science.1150504>
3. Barry N.P., Sadler P.J. // *ACS Nano*. 2013. V. 7. № 7. P. 5654. <https://doi.org/10.1021/nn403220e>
4. Patra M., Gasser G. // *ChemBioChem*. 2012. V. 13. № 9. P. 1232. <https://doi.org/10.1002/cbic.201200159>
5. Yu G., Jiang M., Huang F., Chen X. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2021. V. 61. P. 19. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.08.007>
6. Pöthig A., Casini A. // *Theranostics*. 2019. V. 9. № 11. P. 3150. <https://doi.org/10.7150/thno.31828>
7. Prasad A.S., Kucuk O. // *Cancer Metastasis Rev.* 2002. V. 21. № 3–4. P. 291. <https://doi.org/10.1023/A:102121511729>
8. Dhawan D.K., Chadha V.D. // *Indian J. Med. Res.* 2010. V. 132. № 6. P. 676.
9. Chasapis C.T., Ntoupa P.-S.A., Spiliopoulou C.A., Stefanidou M.E. // *Arch. Toxicol.* 2020. V. 94. № 5. P. 1443. <https://doi.org/10.1007/s00204-020-02702-9>
10. Budimir A. // *Acta Pharm.* 2011. V. 61. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.2478/v10007-011-0006-6>
11. Crichton R.R., Dexter D.T., Ward R.J. // *Coord. Chem. Rev.* 2008. V. 252. № 10–11. P. 1189. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.10.019>
12. Crichton R.R., Dexter D.T., Ward R.J. // *J. Neural Transm.* 2011. V. 118. № 3. P. 301. <https://doi.org/10.1007/s00702-010-0470-z>

13. *Tougu V., Palumaa P.* // *Coord. Chem. Rev.* 2012. V. 256. № 19–20. P. 2219.  
<https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.12.008>
14. *Haas K.L., Franz K.J.* // *Chem. Rev.* 2009. V. 109. № 10. P. 4921.  
<https://doi.org/10.1021/cr900134a>
15. *Karalis T.T., Chatzopoulos A., Kodyli A. et al.* // *Matrix Biol. Plus.* 2020. V. 6–7. P. 100031.  
<https://doi.org/10.1016/j.mbplus.2020.100031>
16. *Tran P.O.T., Gleason C.E., Robertson R.P.* // *Diabetes.* 2002. V. 51. № 6. P. 1772.  
<https://doi.org/10.2337/diabetes.51.6.1772>
17. *Gnanaprakasam J.N.R., Lopez-Banuelos L., Vega L.* // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2021. V. 410. P. 115359.  
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2020.115359>
18. *O'Brien A.J., Villani L.A., Broadfield L.A. et al.* // *Biochem. J.* 2015. V. 469. № 2. P. 177.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20150122>
19. *Chen H., Wang D., Fan L. et al.* // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. P. 4545.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-08704-0>
20. *Баулин В.Е., Калашикова И.П., Вихарев Ю.Б. и др.* // *Журн. общ. химии.* 2018. Т. 88. № 9. С. 1438.  
<https://doi.org/10.1134/S0044460X18090044>
21. *Иванова И.С., Цебрикова Г.С., Рогачева Ю.И. и др.* // *Журн. неорган. химии.* 2021. Т. 66. № 12. С. 1723.  
<https://doi.org/10.31857/S0044457X21120060>
22. *Цебрикова Г.С., Рогачева Ю.И., Иванова И.С. и др.* // *Журн. общ. химии.* 2021. Т. 91. № 11. С. 1704.  
<https://doi.org/10.31857/S0044460X2111007X>
23. *Иванова И.С., Цебрикова Г.С., Лапшина М.А. и др.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2022. № 11. С. 2365.
24. *Цебрикова Г.С., Барсамян Р.Т., Соловьев В.П. и др.* // *Изв. АН. Сер. хим.* 2018. № 12. С. 2184.
25. *Solov'ev V.P., Tsivadze A.Y.* // *Prot. Met. Phys. Chem. Surfaces.* 2015. V. 51. № 1. P. 1.  
<https://doi.org/10.1134/S2070205115010153>
26. *Соловьев В.П.* Программа ChemEqui для расчета констант химических равновесий и сопутствующих параметров исходя из экспериментальных результатов физико-химических методов, таких как УФ-, ИК- и ЯМР-спектроскопия, калориметрия, потенциометрия и кондуктометрия. <http://vr-solovlev.ru/programs/> (Дата обращения 1 марта 2022).
27. *Brinkley S.R.* // *J. Chem. Phys.* 1947. V. 15. № 2. P. 107.  
<https://doi.org/10.1063/1.1746420>
28. *Bandyopadhyay S., Das A., Mukherjee G.N. et al.* // *Inorg. Chim. Acta.* 2004. V. 357. P. 3563.  
<https://doi.org/10.1016/j.ica.2004.05.010>
29. *Бек М., Надьнал И.* Исследование комплексообразования новейшими методами. М.: Мир, 1989. С. 225.
30. APEX III and SAINT. Madison (W, USA): Bruker AXS Inc., 2016.
31. *Sheldrick G.M.* SADABS. Göttingen, Germany, 1997.
32. *Sheldrick G.M.* // *Acta Crystallogr., Sect. C.* 2015. V. 71. № 1. P. 3.  
<https://doi.org/10.1107/S2053229614024218>
33. *Sheldrick G.M.* CellNow. University of Göttingen, Germany, 2005.
34. *Solov'ev V., Tsivadze A., Marcou G., Varnek A.* // *Mol. Inf.* 2019. V. 38. № 6. P. 1900002.  
<https://doi.org/10.1002/minf.201900002>
35. *Solov'ev V., Tsivadze A.* // *Comments Inorg. Chem.* 2023. V. 43. № 1. P. 16.  
<https://doi.org/10.1080/02603594.2022.2087637>
36. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских технологиях / Под ред. Каркищенко Н.Н., Грачева С.В. М., 2010. 344 с.