

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования
«РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ ИМЕНИ ПАТРИСА
ЛУМУМБЫ»

На правах рукописи

Марухленко Алла

**ТОКСИКОМЕТРИЧЕСКИЕ, СТЕРИЧЕСКИЕ И
ТЕРМОДИНАМИЧЕСКИЕ ДЕСКРИПТОРЫ КООРДИНАЦИОННЫХ
СОЕДИНЕНИЙ ЦИНКА В ПРОГНОЗИРОВАНИИ ИХ
БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат химических наук, доцент
Морозова Мария Андреевна

Москва - 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	16
1.1 Биохимическая характеристика цинка.....	16
1.1.1 Биологическая роль, гомеостаз и метаболизм цинка.....	16
1.1.2 Цинк-дефицитные состояния и способы их коррекции.....	22
1.1.3 Изотопы цинка и его изотопный эффект.....	26
1.1.4 Антибактериальные свойства катионов цинка и его наночастиц.....	29
1.2 Химия комплексообразования катионов цинка.....	33
1.2.1 Химическая характеристика цинка как d-элемента таблицы Менделеева.....	33
1.2.2 Получение и биологическая активность координационных соединений цинка с аминокислотами и другими фармацевтическими субстанциями.....	35
1.3 Металлорганические соединения цинка как перспективная система доставки ЛС.....	38
1.4 Топологические индексы в оценке и прогнозировании свойств координационных соединений.....	42
1.5 Методы определения свободного и координированного цинка в составе молекул лекарственных средств.....	45
1.5.1 Фармакопейные химические методы качественного и количественного анализа цинка.....	45
1.5.2 Особенности спектральных методов анализа для определения цинка.....	46
ВЫВОДЫ ПО ЛИТЕРАТУРНОМУ ОБЗОРУ	50
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	52

2.1 Прогнозирование физико-химических и биологических свойств координационных соединений цинка с аминокислотами с применением молекулярных дескрипторов.....	52
2.1.1 Методика расчета стерического дескриптора (J) исследуемых молекул.....	52
2.1.2 Методика поиска значений термодинамического дескриптора (logP) исследуемых молекул.....	54
2.1.3 Методика определения токсикометрического дескриптора (^{obs} E _a) исследуемых молекул.....	55
2.2 Исследование ингибирующего действия хелатных соединений цинка на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре бактерий <i>E. coli</i>	60
2.3 Исследование антибактериальной активности молекулы-кандидата в отношении стандартных тест-культур бактерий.....	61
2.4 Исследование влияния молекулы-кандидата на формирование биопленок в культуре патогенных штаммов.....	64
2.5 Методики синтеза метионината цинка.....	66
2.5.1 Синтезированный комплекс Zn(Met) ₂	66
2.5.2 Выделение кристаллизованного комплекса Zn(Met) ₂ SO ₄	67
2.6 Физико-химические и химические методы исследования метионината цинка.....	67
2.6.1 Определение растворимости.....	67
2.6.2 Метод динамического рассеяния света.....	68
2.6.3 Инфракрасная спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (ИК НПВО).....	69
2.6.4 Рентгеновская флуоресцентная спектроскопия.....	69
2.6.5 Термогравиметрический анализ.....	70

2.6.6 Комплексонометрические титрование.....	71
2.6.7 Дифференциальная сканирующая калориметрия.....	71
2.6.8 Поляриметрия.....	72
2.6.9 Рентгеновская порошковая дифрактометрия.....	73
2.6.10 Математическая обработка результатов.....	73
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ...	74
3.1. Прогнозирование физико-химических и биологических свойств координационных соединений цинка с аминокислотами с применением молекулярных дескрипторов.....	74
3.2 Исследование ингибирующего действия хелатных соединений цинка на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре бактерий <i>E. coli</i>	82
3.3 Исследование антибактериальной активности молекулы-кандидата в отношении стандартных тест-культур бактерий.....	86
3.3.1 Результаты определения антибактериальной активности молекулы-кандидата.....	86
3.3.2 Результаты определения минимальных ингибирующих концентраций молекулы-кандидата.....	88
3.4 Исследование влияния молекулы-кандидата на формирование биопленок в культуре патогенных штаммов.....	89
3.5 Синтез и исследование физико-химических и химических свойств метионината цинка (молекулы-кандидата).....	91
3.5.1 Оценка растворимости.....	92
3.5.2 Исследование дисперсного состава растворов.....	93
3.5.3 Спектральный анализ синтезированного и кристаллизованного метионината цинка в ИК-области.....	94
3.5.4 Рентгенофлуоресцентный анализ синтезированного и	

кристаллизованного метионината цинка.....	96
3.5.5 Количественная оценка содержания цинка в синтезированном комплексе: термогравиметрический анализ и трилонометрия.....	97
3.5.6 Дифференциальная сканирующая калориметрия синтезированного и кристаллизованного метионината цинка.....	99
3.5.7 Исследование оптической активности.....	102
3.5.8 Рентгеновская порошковая дифракция синтезированного и кристаллизованного метионината цинка.....	107
3.6 Разработка и валидация методики количественного определения цинка в составе метионината цинка методом РФА.....	108
3.6.1 Специфичность.....	112
3.6.2 Аналитическая область.....	113
3.6.3 Линейность.....	115
3.6.4 Правильность.....	117
3.6.5 Прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность).....	118
3.6.6 Функциональность аналитической методики.....	120
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	122
ВЫВОДЫ	123
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	125
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	127
ПРИЛОЖЕНИЕ	161

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Лекарственные средства, образуя координационные соединения с ионами d-элементов, приобретают новые фармакологические и токсические свойства. Хелатирование изменяет значения pK_a кислотно-основных равновесий, влияет на активность ферментов и профиля ADME, что приводит к альтернативному протеканию химических реакций, и в итоге – к изменению биологической активности [1]. Результаты доклинических и клинических исследований демонстрируют перспективность новых методов лечения на основе координационных комплексов d-элементов [2]. Стратегия координации иона металла – это эффективный инструмент для получения новых антимикробных препаратов. Например, комплексные соединения некоторых элементов с фторхинолонами обладают повышенной активностью в сравнении с исходными молекулами [3]. Соединения хрома и никеля с молекулами лекарственных препаратов (ЛП) группы нестероидных противовоспалительных средств не только сохраняют исходную фармакологическую активность, но и обеспечивают снижение их ulcerогенного действия [4]. Важно отметить возможность использования координационных соединений в целях повышения биодоступности дефицитных элементов, в частности цинка [5,6].

В отличие от многих других эссенциальных микроэлементов цинк не имеет функциональных резервов в организме и дефицит его в пище приводит к резкому отклонению от гомеостатической нормы. Около 17.3% населения всего мира подвержены риску цинк-дефицитных состояний - от 7% в регионах с высоким уровнем доходов до 30% в странах Африки и Южной Азии [7].

Известно, что цинк (II) транспортируется внутрь клетки с участием специфических белков-переносчиков семейства ZIP [8]. Конкурирующие двухзарядные катионы металлов (Cu^{2+} , Ca^{2+} , Fe^{2+}) и некоторые компоненты пищи (фолиевая кислота, фитаты) значительно снижают транспорт Zn^{2+} [9]. Использование хелатных соединений вместо неорганических (сульфата или

оксида цинка) позволяет повысить биодоступность элемента. Хелатирование приводит к делокализации π -электронной плотности в комплексном ионе и снижению полярности центрального атома, тем самым увеличивая возможность пассивного транспорта молекулы [10,11].

Актуальная задача поиска эффективных лигандов может быть решена с применением методов компьютерного молекулярного дизайна, в частности непрямого моделирования посредством подхода количественной корреляции «структура» - «активность» (ККСА). Однако вопрос функциональности топологических дескрипторов (индекса Балабана) в отношении прогнозирования свойств координационных соединений в литературе освещен недостаточно. Корреляции между индексом Балабана, отражающим структуру вещества и биофармацевтическими характеристиками хелатных комплексов ионов металлов с органическими лигандами не очевидны и, в связи с этим, требуют дальнейших исследований [12,13].

В настоящей работе для прогнозирования активности хелатных соединений цинка и биогенных аминокислот был использован комбинированный подход, позволивший выявить взаимосвязь между структурой соединений, описанной топологическими индексами, их физико-химическими свойствами, выраженными константой распределения октанол-вода и, наконец, энергией активации клеточной гибели как параметром биологической активности вещества. Полученные результаты позволили не только выявить наиболее эффективный лиганд – метионин – но и ответить на один из вопросов в отношении направленности действия координационных соединений цинка. Как оказалось, эффективная доставка дефицитного микроэлемента не сопровождается прямым антибиотическим действием хелата на микрофлору кишечника, но ингибирует образование биопленок патогенной флоры.

Степень разработанности темы исследования

Научно-исследовательским коллективом кафедры фармацевтической и токсикологической химии Медицинского института РУДН разработано программное обеспечение «ChemicPen» и «ChemicDescript» для построения

структурных графов и расчета стерических дескрипторов, соответственно [14,15]. Антимикробное действие, в том числе противотуберкулезная активность, хелатных соединений цинка с биогенными аминокислотами была ранее показана на примере цинк-глицината [16]. Для оценки биологической активности фармацевтических субстанций разработан метод биотестирования на основе изучения аррениусовской кинетики гибели организма *Spirostomum ambiguum* [17,18]. В ряде работ показано, что для многих соединений энергия активации ($^{obs}E_a$) медленной стадии процесса гибели клеточного биосенсора находится в корреляции с LD_{50} для тех же субстанций при их пероральном приеме у лабораторных животных [19,20]. Неоднократно поднимался и обсуждался вопрос достоверности получаемых результатов при использовании метода рентгенофлуоресцентной спектроскопии (РФС) для исследования элементного состава биологических объектов со сложной матрицей вспомогательных веществ [21,22]. В настоящей диссертационной работе предложен комбинированный подход для прогнозирования биологической активности хелатных соединений металлов на основе взаимосвязи между стерическими (J), термодинамическими (logP) дескрипторами и показателями биологической активности ($^{obs}E_a$) молекулы, а также разработана и валидирована методика количественного определения цинка в составе его хелатного комплекса с аминокислотой с применением метода РФС.

Цель работы: разработать комбинированный подход для прогнозирования биологической активности и оценки физико-химических свойств координационных соединений цинка на основе взаимосвязи между показателями токсичности ($^{obs}E_a$), стерическими (J) и термодинамическими (logP) дескрипторами молекулы.

Для достижения поставленной цели были сформулированы и решены следующие основные задачи:

1. На примере комплексов цинка с аминокислотами адаптировать существующий алгоритм расчета топологического индекса Балабана для координационных соединений и оценить корректность его применения для

описания структуры и прогнозирования физико-химических и биологических свойств.

2. Экспериментально подтвердить результаты, полученные на стадии прогнозирования, и определить молекулу-кандидата при исследовании ингибирующего действия хелатных соединений цинка на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре бактерий.

3. Исследовать антибактериальную активность молекулы-кандидата в отношении стандартных тест-культур бактерий, а также влияние на процесс формирования биопленок в культуре патогенных штаммов.

4. Подтвердить идентичность структуры и физико-химических свойств хелатного комплекса цинка, кристаллизованного из раствора и полученного в результате синтеза молекулы-кандидата.

5. Разработать и валидировать методику количественного определения цинка в составе его хелатного комплекса с аминокислотой с применением метода рентгенофлуоресцентной спектроскопии.

Научная новизна работы

Впервые в мировой практике исследована оптическая активность водных растворов хелатного комплекса цинка с метионином, а также описано изменение угла вращения плоскости поляризованного света в зависимости от концентрации иона-комплексообразователя в растворе. **Впервые** проведена дифференциальная сканирующая калориметрия синтезированного метионината цинка и обнаружены полиморфные фазовые переходы, аналогичные наблюдаемым в кристаллических структурах диморфов L-метионина. **Впервые** исследовано ингибирующее влияние метионината цинка на формирование биопленок в стандартной тест-культуре *E.coli* и в культуре клеток уропатогенных штаммов. **Впервые** разработана и валидирована методика количественного определения цинка в составе метионината цинка с применением метода рентгенофлуоресцентной спектроскопии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Показано, что комплексный подход для прогнозирования биологической активности координационных соединений металлов на основе ККСА-анализа и биотестирования с использованием клеточного биосенсора позволяет успешно имитировать стадии доклинических исследований при разработке лекарственных препаратов. Предложенный в диссертации комбинированный метод позволил выявить отсутствие антибактериального действия метионината цинка при его использовании в качестве цинксодержащей биологически активной добавки. При этом в работе была продемонстрирована способность метионината цинка ингибировать формирование биопленок в культуре клеток патогенных штаммов, что допускает использование препарата в превентивных целях. Разработанная и валидированная методика определения содержания цинка в метионинате цинка может быть использована как в учебном процессе кафедры фармацевтической и токсикологической химии, так и в практике работы контрольно-аналитических лабораторий.

В соответствии с поставленной целью **объектом исследования** выступал процесс QSAR моделирования физико-химических и биологических свойств хелатных структур.

Предметом исследования являлись стерические, термодинамические и токсикометрические молекулярные дескрипторы и их комбинированное применение для прогнозирования свойств координационных соединений цинка.

Методология и методы исследования

Топологические дескрипторы на основе молекулярного графа химического соединения успешно используются в математическом моделировании для прогноза физико-химических параметров и биологической активности молекул-кандидатов. Традиционные подходы к расчету топологического индекса Балабана (J) основаны на построении матрицы расстояния между ковалентно-связанными атомами соединения, при этом использование стерических дескрипторов для описания молекулярной структуры координационных соединений металлов затруднено. Для учета новой ковалентной связи, возникающей между металлом-

комплексообразователем и лигандом по донорно-акцепторному механизму, требуется адаптация существующего алгоритма расчета топологического индекса J . В основу данной диссертационной работы положен комбинированный ККСА подход, объединивший этапы прогнозирования взаимосвязи между структурой, описанной адаптированным стерическим индексом J , и свойствами, выраженными термодинамическим дескриптором ($\log P$) молекулы, с дальнейшей экспериментальной оценкой биологической активности хелатных соединений металлов ($^{obs}E_a$).

Положения, выносимые на защиту:

1. Топологический индекс Балабана адекватно отражает структуру координационных соединений цинка и может быть использован для прогнозирования их физико-химических и биологических свойств.
2. Хелатные комплексы цинка с метионином не оказывают антибактериального действия, однако способны ингибировать формирование биопленок в культуре клеток уропатогенных штаммов.
3. Получение хелатного комплекса путем его кристаллизации из маточного раствора, содержащего метионин и сульфат цинка, позволяет сохранить параметры структуры, присущие синтезированному аналогу, с одновременной оптимизацией биофармацевтических характеристиках соединения.
4. Валидация методики количественного определения цинка в составе метионината цинка с применением метода рентгенофлуоресцентной спектроскопии.

Степень достоверности полученных результатов.

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием поверенного современного высокотехнологичного оборудования для проведения физического и физико-химического анализа исследуемых субстанций – ИК-спектроскопии, комплексонометрического титрования, рентгенофлуоресцентной спектроскопии, динамического светорассеяния, поляриметрии, термогравиметрического анализа, дифференциальной сканирующей калориметрии и рентгеновской порошковой дифракции. При проведении

микробиологических экспериментов были применены стандартизированные методики, стандартные штаммы бактерий, организованы контрольные измерения. Экспериментальные данные обработаны с помощью оригинального ПО аналитических приборов. Расчеты и статистическая обработка результатов анализа была произведена с использованием ПО OriginPro 2017 (OriginLab, США). Диссертация включает ссылки на 286 отечественные и иностранные работы, соответствующие теме исследования.

Апробация результатов диссертационной работы.

Основные результаты диссертационного исследования были представлены на конференциях: международная научная конференция 9th Semmelweis International Students' Conference 2019/2020 (Будапешт, Венгрия, 3 сентября 2020 г.); V Всероссийская научная конференция «Клинические и теоретические аспекты современной медицины - 2020» (Москва, Россия, 14 ноября 2020 г.); международная научная конференция «XII International scientific conference #SCIENCE4HEALTH2021», (Москва, Россия, 21-22 Мая 2021 г.); V Международная научно-практическая конференция «Биоэлементы», (Оренбург, Россия, 12-13 мая 2021 г.); 5-я Российская конференция по медицинской химии с международным участием «МедХим – Россия 2021» (Волгоград, Россия, 16-19 мая 2022); на научных семинарах кафедры фармацевтической и токсикологической химии медицинского института РУДН.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ: в журналах индексируемых в Scopus – 5, перечень РУДН – 1, а также тезисы конференций – 5.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертационная работа соответствует паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия по следующим областям исследования (п. 1 и п. 3):

1. Исследование и получение биологически активных веществ на основе направленного изменения структуры синтетического и природного

происхождения и выявление связей и закономерностей между строением и свойствами веществ.

3. Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления.

Личный вклад автора состоит в непосредственном участии в проведении научных экспериментов и получении экспериментальных данных; обработке и интерпретации полученных экспериментальных данных; апробации результатов исследования, а также соучастию с другими авторами в подготовке публикаций по выполненной работе.

Структура и объём диссертации.

Полный объём диссертации составляет 173 страницы, в том числе 38 рисунков и 22 таблицы. Библиографический список содержит 286 наименований. Описание представляемого исследования включает введение, 3 главы, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений, список цитируемой литературы и приложение.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации**МЦБ:**

1. Morozova, M.A. Slow quasikinetic changes in water-lactose complexes during storage / M.A. Morozova, A.M. Koldina, T.V. Maksimova, **A.V. Marukhlenko**, I.A. Zlatsky, A.V. Syroeshkin // *International Journal of Applied Pharmaceutics*. – 2021. – V. 13. – N 1. – P. 232–237. DOI: 10.22159/ijap.2021v13i1.39837.
2. **Марухленко, А.В.** Разработка и валидация методики количественного определения цинка в его хелатных комплексах с использованием энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии / **А.В. Марухленко**, Т.В. Максимова, Т.В. Плетенева, М.А. Морозова // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2021. – Т. 10. – N 4. – С. 154–161. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-154-161.
3. **Marukhlenko, A.V.** Chelation of zinc with biogenic amino acids: description of properties using Balaban index, assessment of biological activity on *Spirostomum ambiguum* cellular biosensor, influence on biofilms and direct antibacterial action / **A.V. Marukhlenko**, M.A. Morozova, A.M.J. Mbarga, N.V. Antipova, A.V. Syroeshkin, I.V. Podoprighora, T.V. Maksimova // *Pharmaceutics*. – 2022. – V. 15. – N 8. – P. 979. DOI: 10.3390/ph15080979.
4. Mbarga, A.M.J. Optimization of ethanolic extraction of *Enantia chloranta* bark, phytochemical composition, green synthesis of silver nanoparticles, and antimicrobial activity / Mbarga A.M.J., Podoprighora, I.V., **Marukhlenko, A.V.**, M.A. Morozova, S.V. Goriainov, C. Esparza, D.K.L. Anyutoulou, P. Kezimana, N.W. Kamgang, N.S. Tuturov, R. Manar, L.A. Smolyakova, S. Souadkia, A.N. Senyagin, I. Khelifi, Z.S. Khabadze, A.S. Karnaeva, I.M. Todua, A.P. Pikina, A.A. Gabin, D.T.K. Ndandja, L.A. Kozhevnikova, O.V. Pilshchikova // *Fermentation*. – 2022. – Т. 8. – N 10. – P. 530. DOI: 10.3390/fermentation8100530.
5. **Marukhlenko, A.V.** Comparative Analysis of Physical and Chemical Properties of Differently Obtained Zn—Methionine Chelate with Proved Antibiofilm

Properties (Part II) / **A.V. Marukhlenko**, V.N. Tumasov, L.A. Butusov, G.A. Shandryuk, M.A. Morozova // *Pharmaceutics*. – 2023. – Т. 15. – N 2. – P. 590. DOI: 10.3390/pharmaceutics15020590.

Перечень РУДН:

1. Морозова, М.А. Многомерный анализ спектров рентгеновской флуоресценции как возможный подход для сравнительного изучения элементного состава плодов и семян *Mangifera Indica*, *Actinidia Deliciosa*, *Nigella* sp. / М.А. Морозова, **А.В. Марухленко**, Т.В. Максимова, Дж. Ньямбосе // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2022. – Т. 25. – N 4. – С. 10–14. DOI: 10.29296/25877313-2022-04-02.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Биохимическая характеристика цинка

1.1.1 Биологическая роль, гомеостаз и метаболизм цинка

Цинк - эссенциальный микроэлемент, присутствующий во всех тканях и биологических жидкостях организма человека. Zn занимает второе место по своей распространенности в организме человека после железа. Его общее содержание в организме человека составляет около 2 г (у женщин – 1.5 г, у мужчин – 2.5 г), более 95% из которых приходится на внутриклеточную жидкость [23]. Несмотря на то, что цинк определяется во всех тканях организма, элемент преимущественно концентрируется в скелетных мышцах и костях [23-26]. В плазме большая часть Zn^{2+} представлена в виде координационных соединений с альбумином и альфа-2-макроглобулином.

Цинк играет важную роль в физиологических процессах, выполняя каталитические, структурные и регуляторные функции. Более 300 металлоферментов содержат Zn (II) в своих активных центрах. Удаление Zn^{2+} из структуры холофермента приводит к полной потере его энзимной активности. Цинк является кислотой Льюиса и каталитическая активность во многих ферментах обусловлена его электрон-акцепторными свойствами. Выступая в роли катализатора, он поляризует субстрат и активирует молекулы H_2O , усиливая ее нуклеофильные свойства. Ионы цинка выступают матрицей для объединения субстрата и нуклеофила, тем самым ускоряя ферментативный процесс превращения субстрата в продукт. Zn^{2+} входит в состав карбоангидразы, щелочной фосфатазы, алкогольдегидрогеназы, ДНК- и РНК-полимераз [27,28]. Таким образом, он играет ключевую роль в транскрипции генов, сигнальной трансдукции, метаболизме углеводов, жиров и белков, высвобождении гормонов и механизме клеточного апоптоза [29].

Однако катионы цинка не только регулируют ферментативную активность, но и отвечают за стабильность ряда белков. Структурная роль цинка обусловлена

наличием у многих протеинов, ферментов, гормонов, транскрипционных факторов и факторов роста доменов, которые координируют свободный Zn^{2+} , с образованием цинковых пальцев. Цинкфингерный участок – стабилизированный одним или двумя ионами цинка фрагмент белковой молекулы из последовательности ~20 аминокислот – представляет собой хелат. Координационные связи, как правило, образуются между Zn^{2+} и остатками двух молекул цистеина и двух молекул гистидина. Наличие цинковых пальцев характерно для белков, связывающих ДНК и РНК и участвующих в процессах транскрипции, так как подобные координационные соединения позволяют образовать более короткие связи между молекулами [25]. Данные структурные мотивы встречаются достаточно часто в белках и даже входят в состав капсидов некоторых вирусов, например вируса иммунодефицита человека [30]. Также катионы цинка являются незаменимыми структурными компонентами для внутриклеточного связывания тирозинкиназы с рецепторами Т-клеток (CD4 и CD8a), которые необходимы для развития и активации Т-лимфоцитов [31,32].

Zn^{2+} необходим для пролиферации и дифференцировки клеток, особенно для регуляции синтеза белка и ДНК, а также митотического клеточного деления. Таким образом цинк регулирует нормальное функционирование анаболических процессов, таких как рост, поддержание целостности и регенерации тканей. В ряде работ показано, что катионы цинка могут модулировать распознавание клеточных сигналов, метаболизм вторичных мессенджеров, активность протеинкиназы и протеинфосфатазы, а также в зависимости от концентрации внутриклеточного Zn^{2+} стимулировать или ингибировать активность факторов транскрипции. Так, достаточно хорошо изучено влияние катионов цинка на активность фактора транскрипции MTF-1, который контролирует транскрипцию генов металлотионеина и транспортера цинка ZnT-1 [33]. Структура MTF-1 содержит шесть цинкфингерных участков, которые хелатируют Zn^{2+} при его попадании во внутриклеточное пространство. После образования комплекса с цинком MTF-1 транслоцируется из цитоплазмы в ядро, где связывается с металлочувствительными фрагментами промоторов транспортеров семейств

металлотионеина (МТ) и белков-переносчиков (ZnТ) и индуцирует их экспрессию [34,35]. В ряде исследований показано, что при назначении пациентам цинкдефицитной диеты с повышенным содержанием фитатов, концентрация металлотионеина в эритроцитах снижается [36]. После отмены диеты и назначения пищевых добавок с цинком, концентрация РНК-мессенджера МТ в эритроцитах наоборот повышается [37].

Кроме того, цинк обладает иммуностимулирующей активностью. Катионы Zn выполняют роль хемоаттрактантов для некоторых иммунных клеток: дефицит Zn^{2+} приводит к снижению хемотаксиса гранулоцитов и, наоборот, его высокие концентрации индуцируют хемотаксис *in vitro* [38-40]. Дефицит Zn^{2+} снижает показатели фагоцитарной активности, в то время как его избыток оказывает противоположный эффект [41]. Более того, *in vitro* катионы цинка способствуют адгезии моноцитов к эндотелиальным клеткам и выработки провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины IL-1 β , IL-6 и фактор некроза опухоли α (TNF- α), их же недостаток отрицательно влияет только на выработку IL-6 и TNF- α [42]. Известно, что дефицит Zn^{2+} вызывает атрофию тимуса и последующую Т-клеточную лимфопению. У мышей недостаток металла во время созревания Т-клеток приводит к 50%-ному сокращению количества эффекторных Т-клеток от числа недифференцированных предшественников Т-лимфоцитов ввиду их повышенного апоптоза [43]. Недостаток цинка также влияет на развитие и функциональную активность В-клеток, однако в меньшей степени [44]. Zn^{2+} также подавляет выработку фактора некроза опухоли, который участвует в патофизиологии кахексии и истощения при синдроме приобретенного иммунодефицита человека [45]. Кроме того, катионы цинка снижают выработку воспалительных цитокинов, уменьшают выраженность оксидативного стресса и предотвращают проявление метаболических и физиологических нарушений целостности эндотелия сосудов [46-48]. Цинк играет важную роль в мужской фертильности. Дефицит элемента препятствует сперматогенезу и является причиной аномалий сперматозоидов, а также оказывает негативное влияние на концентрацию тестостерона в сыворотке крови [49].

Рассмотрим особенности метаболизма цинка в живом организме. Рекомендуемая суточная доза цинка для взрослого человека составляет 8-12 мг в зависимости от пола и возраста [25]. Наибольшее количество Zn содержится в продуктах животного происхождения – морепродукты, мясо, рыба, молоко (10-50 мг/кг в сыром виде); продукты растительного происхождения отличаются низким содержанием элемента (<5 мг/кг в сыром виде) [50]. Кроме того, бобы, орехи, крупы и злаки богаты фитатами (IP6), которые снижают биодоступность цинка и других металлов из пищи. Соли фитиновой (мио-инозитгексафосфорной) кислоты содержатся в эндосперме семени и являются основным источником энергии для его роста (Рисунок 1) [51]. Ее соли составляют до 90% органически связанного фосфора в семенах [52].

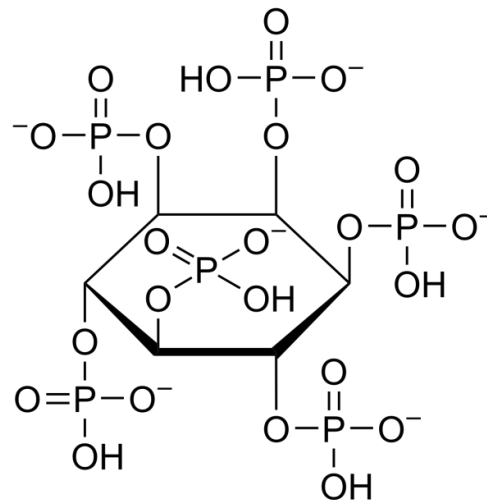


Рисунок 1. Структурная формула фитиновой (мио-инозитгексафосфорной) кислоты.

Абсорбция. Всасывание катионов цинка происходит в просвете двенадцатиперстной кишки и проксимального отдела тощей кишки с путем активного транспорта с участием насыщаемых специфических транспортеров энтероцитов [53]. К тому же, известно, что кинетика абсорбции цинка в просвете кишечника является насыщаемой, а скорость всасывания увеличивается с уменьшением его концентрации в пище. Отмечено, что время прохождения пищи по ЖКТ влияет на его степень всасывания: при синдроме мальабсорбции всасывание цинка в системный кровоток снижается [25].

За последнее десятилетие ученым удалось выявить белки-переносчики различных металлов и описать молекулярные механизмы транспорта цинка в организме человека и животных [55-57].

Выделяют два основных вида специфических белков-переносчиков цинка: семейство Zrt- и Irt-подобных белков (ZIP), которые расположены на внешней плазматической мембране и во внутриклеточных органеллах и отвечают за транспортировку Zn^{2+} как из внеклеточного пространства, так и из внутриклеточных компартментов в цитозоль для увеличения концентрации цитоплазматического цинка, и семейство транспортеров цинка (ZnT), которые, наоборот, уменьшают содержание цитоплазматического Zn^{2+} путем транспортировки цинка либо из клетки во внеклеточное пространство, либо во внутриклеточные органеллы, такие как аппарат Гольджи или цинкосомы, благодаря чему поддерживается гомеостаз цинка в цитоплазме и во внутриклеточных компартментах, соответственно [40,57]. В процессе абсорбции цинка в тонком кишечнике преимущественно принимает участие ZIP4-транспортер. Мутации в гене SLC39A4 приводят к изменениям пространственной структуры белка-переносчика, что, в свою очередь, отражается на его хелатирующей способности: биодоступность цинка снижается примерно в 10 раз. Энтеропатический акродермит - редкое аутосомно-рецессивное генетическое заболевание, при отсутствии должного лечения может привести к смерти пациента [58]. Высвобождение Zn^{2+} из энтероцитов двенадцатиперстной и толстой кишки в системный кровоток происходит при участии ZnT1-транспортера [59].

Химический состав и среда содержимого желудочно-кишечного тракта существенно влияет на растворимость соединений цинка и эффективность его всасывания. Известно, что некоторые металлы могут конкурировать со свободными ионами цинка в процессе связывания с ZIP-белками и снижать биодоступность последнего. Так, известно, что Fe^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , как и Zn^{2+} , транспортируются во внутриклеточное пространство с помощью ZIP8 и ZIP14 белков-переносчиков [60,61]. Молекулярные механизмы конкурентного транспорта Cu^{2+} , Ca^{2+} и Zn^{2+} достоверно не изучены, однако группой ученых

установлено ингибирование абсорбции Zn^{2+} при одновременном введении одинаковых концентраций солей $ZnCl_2$, $CaCl_2$ и $CuCl_2$ испытуемым мышам. Полученные результаты позволяют предположить, что данные элементы также конкурируют за связывание со специфическими белковыми транспортерами [9]. Ингибировать процесс всасывания цинка также могут фитиновая и фолиевая кислоты (Рисунок 1). Фитиновая кислота содержит шесть остатков ортофосфорной кислоты и является полидентатным лигандом. При попадании в желудочно-кишечный тракт с растительной пищей она хелатирует металлы с образованием устойчивых нерастворимых комплексных соединений, которые не разрушаются в организме человека ввиду отсутствия необходимых ферментов и элиминируются в неизменном виде [24,62]. К тому же, в просвете тонкого кишечника фитаты связывают цинк, как экзогенного, так и эндогенного происхождения [25]. В ряде работ отмечено, что фитиновая кислота преимущественно хелатирует «легкие» изотопы цинка (^{64}Zn) [63,64].

Распределение. После всасывания в системный кровоток основной пул цинка распределяется по органам и тканям, а затем транспортируется с током крови в печень. В системном кровотоке Zn^{2+} , как правило, хелатируется белками крови - альбумином, α_2 -макроглобулином (A2M) и трансферрином. Незначительная доля Zn^{2+} не попадает в системный кровоток, а связывается с металлотионеином (MT) и удерживается в клетках энтероцитов.

Выведение. Цинк преимущественно выводится из организма человека с желчью в концентрации около 4 мкг/мл [65]. Часть секретируемого Zn^{2+} реабсорбируется в кишечнике, транспортируются потоком крови с желчными кислотами повторно к печени, участвуя в энтерогепатической циркуляции. Таким образом, элиминация цинка путем желудочно-кишечного тракта составляет не более 2-4 мкг/сут. В среднем выводится через почки с мочой около 0.5 мкг/сут [24].

Гомеостаз

Поддержание постоянных концентраций цинка во внутриклеточном пространстве и плазме крови достигается благодаря работе белков-транспортеров

семейств ZIP, ZnT и MT. Гомеостатическая регуляция метаболизма цинка достигается главным образом за счет баланса процессов всасывания и секреции Zn. Она происходит одновременно на нескольких этапах метаболизма: абсорбция Zn^{2+} в тонком кишечнике, его распределение и удерживание в клетках, элиминация из желудочно-кишечного тракта и с мочой, при этом первый этап играет наиболее важную роль в поддержании равновесия [66]. Отмечено, что при снижении содержания цинка в рационе питания, эффективность всасывания металла увеличивается до 100%, а константы его скорости почечной и кишечной элиминации снижаются на 74 и 96%, соответственно [67]. Однако такие адаптивные механизмы регуляции гомеостаза носят временный характер. Напротив, при увеличении содержания цинка в употребляемых продуктах MT хелатируют его избыток в энтероцитах и клетках печени, тем самым снижая концентрацию Zn^{2+} в кровеносном русле. К тому же некоторая доля свободного металла интенсивно элиминируется почками с мочой [24].

1.1.2 Цинк-дефицитные состояния и способы их коррекции

В отличие от многих других микроэлементов, цинк не имеет функциональных резервов или депо в организме, поэтому снижение его поступления с пищей приводит к дефициту, а в последствии к функциональным, биохимическим и метаболическим изменениям. При снижении поступления в организм цинка экзогенного происхождения, активируются гомеостатические механизмы, поддерживающие уровень эндогенного цинка в плазме в пределах физиологического диапазона. Однако при выраженном дефиците элемента, их компенсаторные возможности постепенно снижаются, начинается проявление клинических симптомов, тяжесть которых увеличивается пропорционально степени дефицита цинка. Цинк-дефицитные состояния различаются по степени тяжести от легкой, при которой наблюдаются неспецифические клинические симптомы, до тяжелой, характеризующейся явными признаками: нарушение регенерации тканей, развитие дерматитов, расстройства ЖКТ, замедление роста у детей, нарушение функций иммунной системы [24,68,69]. Кроме того,

хронический недостаток цинка приводит к появлению или усугублению неврологических и психических расстройств, таких как депрессия и шизофрения, а также нейродегенеративных заболеваний, например болезни Альцгеймера [70-72]. Выделяют четыре основные причины возникновения цинк-дефицитных состояний:

1. Недостаточное поступление Zn^{2+} с пищей.
2. Сниженная абсорбция Zn^{2+} в просвете ЖКТ.
3. Увеличенные потери Zn^{2+} в ЖКТ.
4. Повышенные потребности организма в Zn^{2+} .

Недостаточное потребление цинка с пищей является довольно распространенным явлением, особенно в странах Африки к югу от Сахары и в Южной Азии. По оценкам, 17.3% населения всего мира подвержены риску недостаточного потребления цинка. Его распространенность колеблется от 7.5% в регионах с высоким уровнем доходов до 30% в странах Африки и Южной Азии [7]. К группам населения, подвергающимся наибольшему риску дефицита цинка в промышленно развитых странах, относятся дети дошкольного возраста, пожилые люди, беременные и кормящие грудью женщины, а также вегетарианцы и веганы, которые практически не употребляют мясо и имеют в рационе большое количество бобовых и цельных злаков, содержащих фитаты [23,68,73,74].

Дефицит цинка достаточно часто встречается у людей с воспалительными заболеваниями кишечника (язвенный колит, болезнь Крона, диарея) или перенесших резекцию органов желудочно-кишечного тракта ввиду сниженного всасывания в просвете тонкого кишечника и/или увеличенными потерями в ЖКТ [75,76]. Энтеропатический акродермит также нарушает всасывание цинка в желудочно-кишечном тракте, при отсутствии должного лечения может привести к смерти пациента [58]. Чрезмерное употребление алкоголя также негативно сказывается на уровне цинка в организме. Этанол препятствует всасыванию Zn^{2+} энтероцитами кишечника и увеличивает его выведение с мочой [77-79]. Воспалительные процессы в организме человека, длительный прием тиазидных диуретиков, ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента или блокаторов

ангиотензина II приводят к повышенному диурезу и активной элиминации катионов цинка почками. Кроме того, хронический оксидативный стресс, возникающий при системных заболеваниях, может способствовать дефициту питательных микроэлементов, увеличивая потребность в антиоксидантах, включая Zn, Se и витамины A, C и E [80].

Объективным способом коррекции цинк-дефицитных состояний является увеличение в рационе питания продуктов, богатых цинком. Наибольшее содержание цинка отмечено в красном мясе, рыбе и морепродуктах [26]. Прием биологических активных добавок, содержащих цинк, также представляет собой эффективный способ восстановления физиологического уровня элемента в организме. Фармацевтический рынок богат различными видами цинк-содержащих БАД: пищевые добавки, содержащие только Zn^{2+} в виде соли или хелатного соединения, добавки, содержащие цинк и несколько других ингредиентов, а также поливитаминные препараты. Цинк может встречаться в препаратах в виде неорганических солей (сульфат или хлорид цинка) или комплексных соединений катиона цинка с органическими лигандами – глюконовой, уксусной, лимонной, молочной кислотами, аминокислотами [81]. Использование хелатных соединений вместо неорганических (солей и оксида цинка) позволяет снизить токсичность и повысить биодоступность микроэлемента. Абсорбция Zn^{2+} из БАД, содержащих цитрат цинка или глюконат цинка, составляет около 61%, всасывание металла из его оксида ниже и составляет всего 50% [82]. Одновременный прием пищевых добавок, содержащих Zn^{2+} и железо в форме Fe^{3+} в концентрации 25 мг и более, может снизить как абсорбцию цинка, так и его концентрацию в плазме крови [83,84]. Однако мультивитаминные препараты, содержащие одновременно железо и цинк, не влияют на всасывание последнего.

Не стоит забывать о потенциальной возможности отравления соединениями цинка при их избыточном употреблении. Так, чрезмерное его поступление в организм (>50 мг/сут) может привести к расстройствам его физиологических функций: появлению головокружений, головных болей, диареи, рвоты и потери

аппетита [23,26]. Кроме того, хронический избыток цинка способствует нарушению процесса абсорбции меди, ингибирует развитие иммунной реакции в ответ на появление чужеродных веществ в организме, а также снижает концентрацию холестерина и ЛПВП в плазме крови [25,85]. Известно, что чрезмерный прием цинксодержащих БАД (~150 мг/сут) препятствует процессу всасывания экзогенного Mg^{2+} и нарушает его баланс в живых организмах [86].

К тому же, для неорганических соединений цинка (хлорида и сульфата цинка) характерна большая токсичность, чем для его хелатов. Установленные полумлетальные дозы (LD_{50}) субстанций цинка для мышей и крыс при различных способах введения представлены в Таблице 1.

Таблица 1. Среднелетальные дозы (LD_{50}) соединений цинка для мышей и крыс при различных способах введения [87,88].

Название соединения	Животное	Путь введения	LD_{50}, мг/кг
Цинка оксид	<i>мышь</i>	перорально	7950
	<i>крыса</i>	перорально	>8437
		внутрибрюшинно	240
Цинка хлорид	<i>мышь</i>	перорально	329
		внутрибрюшинно	24
		внутривенно	9.09
	<i>крыса</i>	перорально	350
		внутрибрюшинно	58
		внутривенно	3.69
Цинка сульфат	<i>мышь</i>	перорально	245
		внутривенно	23.3
	<i>крыса</i>	перорально	1710
		внутрибрюшинно	196
		внутривенно	69.9
Цинка ацетат	<i>мышь</i>	внутрибрюшинно	57
	<i>крыса</i>	перорально	2510
Цинка глюконат-глицинат	<i>крыса</i>	перорально	1950

Высокие значения среднелетальных доз ZnO для животных при внесосудистом введении обусловлены тем, что данное соединение практически нерастворимо в воде. Поэтому при пероральном поступлении оксид цинка практически не всасывается в системный кровоток и в неизменном виде элиминирован из организма, не оказывая при этом выраженного токсического действия.

1.1.3 Изотопы цинка и его изотопный эффект

Цинк имеет пять стабильных изотопов (^{64}Zn , ^{66}Zn , ^{67}Zn , ^{68}Zn и ^{70}Zn), а также двадцать пять радиоизотопов, наиболее длительный период полураспада имеют ^{65}Zn (около 244 дней) и ^{72}Zn (46.5 часа), остальные радионуклиды цинка имеют период полураспада <14 часов (Таблица 2).

Таблица 2. Стабильные и наиболее долгоживущие радиоактивные изотопы цинка и их распространённость в природе [89].

Изотоп	Период полураспада	Спин и четность ядра	Содержание в природе, %
^{64}Zn	стабильный	0+	49.17
^{65}Zn	243.66 сут	5/2-	–
^{66}Zn	стабильный	0+	27.73
^{67}Zn	стабильный	5/2-	4.04
^{68}Zn	стабильный	0+	18.45
^{70}Zn	стабильный	0+	0.61
^{72}Zn	46.5 ч	0+	–

В медицине стабильные изотопы цинка (кроме распространенного ^{64}Zn) используются прежде всего в радиофармации. Изотопы ^{66}Zn , ^{67}Zn и ^{68}Zn являются источниками получения радиофармацевтических препаратов, содержащих радиоактивные изотопы галлия (^{66}Ga , ^{67}Ga и ^{68}Ga) и фосфора (^{32}P), предназначенных для диагностики злокачественных новообразований мягких тканей методом позитронно-эмиссионной томографии [90-93]. Также стабильные

изотопы ^{67}Zn , ^{68}Zn и ^{70}Zn используют в исследованиях для изучения ADME показателей катионов цинка: локация абсорбции и сравнение биодоступности Zn^{2+} при различных способах его введения, специфические и неспецифические белковые транспортеры Zn^{2+} , способы элиминации из организма человека, изменение фармакокинетических показателей в зависимости от пола, возраста и сопутствующих заболеваний [94-96]. Так, изотопы ^{67}Zn и ^{70}Zn использовали в рамках рандомизированного двойного слепого исследования биодоступности Zn^{2+} из цитрата цинка в сравнении с глюконатом, сульфатом и ацетатом цинка, которые широко используются на фармацевтическом рынке в качестве биологически активных добавок (БАД) для коррекции цинк-дефицитных состояний. Фракционная абсорбция металла из цитрата цинка (61.3%) не отличалась от таковой из глюконата цинка (60.9%); биодоступность Zn^{2+} из малорастворимого оксида цинка оказалась значительно ниже и составила 49.9% [82].

Кроме того, ряд научных исследований посвящен изучению изотопного состава биологических жидкостей и тканей, где соотношение изотопов цинка рассматривается как потенциальный биомаркер развития патологических состояний организма. Так, в одной из работ ученые сравнивали соотношение изотопов $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ в здоровых тканях молочной железы у здоровых пациентов и пациентов с диагностированным раком молочной железы. Отмечено, что здоровые ткани пациентов, болеющих раком молочной железы, содержат больше «легкого» изотопа цинка (^{64}Zn): соотношение $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ уменьшается на 0.3-0.5‰ в сравнении с показателями здоровой группы пациентов. В свою очередь, соотношение $^{66}\text{Zn}/^{64}\text{Zn}$ в опухолевых тканях в среднем снижается на 0.9‰ [97]. Аналогичные результаты были получены группами ученых, исследовавших изотопный состав мочи пациентов с диагностированными опухолями печени, толстой кишки, поджелудочной, предстательной и молочной желез в сравнении со здоровыми контрольными группами [98,99].

Отдельное внимание в литературе уделяется изотопному эффекту стабильного магнитного ^{67}Zn .

Эффект магнитных изотопов впервые обоснован научной группой Бучаченко А.Л. на примере изучения магния: активность ферментов аденозинтрифосфатазы, креатинкиназы и глицерофосфаткиназы, в которых Mg^{2+} представлен магнитным изотопом ^{25}Mg (ядерный спин – $5/2$), в 2-4 раза превосходит активность ферментов, в которых Mg^{2+} представлен бесспиновыми, немагнитными изотопами ^{24}Mg или ^{26}Mg . Это открытие послужило основой для формирования нового научного направления – изучения магнитных изотопных эффектов (МИЭ) [100]. МИЭ – кинетическое явление, основанное на зависимости скорости реакции (или константы скорости реакции) от ядерного спина и ядерного магнитного момента изотопов в составе используемых реагентов. Данный эффект возникает в виду влияния магнитного момента ядер на динамику синглет-триплетных переходов в радикальных парах [101]. Среди стабильных изотопов цинка только ^{67}Zn является магнитным изотопом (ядерный спин – $5/2$) (Таблица 2). После исследования магнитного изотопного эффекта ^{25}Mg стало известно, что реакция синтеза аденозинтрифосфата катализируется не только Mg^{2+} , но и Ca^{2+} и Zn^{2+} , к тому же введение магнитных ядер ^{43}Ca и ^{67}Zn также сопровождается увеличением выхода синтеза АТФ в 2–4 раза по сравнению с немагнитными ядрами [102]. Кроме того, было изучено влияние магнитного ^{67}Zn и немагнитных ^{64}Zn , ^{68}Zn изотопов цинка на АТФ-гидролазную активность субфрагмента-1 миозина. Скорость гидролиза аденозинтрифосфата в присутствии магнитного изотопа цинка ^{67}Zn оказалась на 50-70% выше по сравнению со скоростью гидролиза АТФ катионами цинка, представленными немагнитными ядрами. При этом различия в скорости данной реакции между изотопами ^{64}Zn и ^{68}Zn не были выявлены. Таким образом, в проведенном эксперименте при участии ^{67}Zn было детектировано ускорение ферментативного гидролиза АТФ, иллюстрирующее магнитный изотопный эффект цинка [103]. Интересно, что МИЭ можно также наблюдать на клеточном уровне организации. Так, добавление магнитного изотопа ^{67}Zn в питательную среду бактерий *E. coli* способствует повышению скорости ее роста и колониеобразующей способности. Наблюдаемые явления объясняются суммарным положительным влиянием магнитного момента ядра цинка и слабого

внешнего магнитного поля на повышение синтеза аденозинтрифосфата (источника энергии) и активизацию внутриклеточных процессов, в которых участвуют катионы цинка (пролиферация клеток и белковый синтез), что приводит к увеличению популяции бактериальных клеток [104].

Описанные явления послужили толчком к поиску перспективных способов использования МИЭ ^{67}Zn в медицине. Известно, что раковое заболевание характеризуется беспредельным и неконтролируемым делением патологических клеток, поэтому при терапии онкозаболеваний особое внимание уделяется пролиферативным явлениям – апоптозу и некрозу опухолевых клеток. Катионы цинка не только участвуют в пролиферации и дифференциации нормальных клеток, но и могут индуцировать апоптоз патологических клеток [33]. Так, на примере лейкемических клеток было изучена возможность применения препаратов, содержащих магнитный изотоп цинка на наночастицах порфирифуллерена (^{67}Zn -НЧ), в лечении острых лейкозов (В-ОЛЛ и ОМЛ). Магнитный изотопный эффект не наблюдался в отношении лимфоцитов здоровых пациентов: здоровые клетки не реагировали на введение как Zn-НЧ (немагнитных изотопов цинка на наночастицах порфирифуллерена), так и ^{67}Zn -НЧ. В свою очередь, бластные клетки пациентов с острым В-клеточным лейкозом и бластные клетки пациентов с острым миелоидным лейкозом гибли под действием ^{67}Zn -НЧ при существенно меньших концентрациях препарата по сравнению с Zn-НЧ. Величины МИЭ для обоих типов клеток составили 3.5 и 1.5 единицы, соответственно. Таким образом, препарат, содержащий магнитные ядра ^{67}Zn -НЧ, обладал большей цитотоксичностью по отношению к опухолевым клеткам [105].

1.1.4 Антибактериальные свойства катионов цинка и его наночастиц

Многие переходные металлы, включая Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , играют ключевую роль в физиологических процессах не только организма животных и человека, но и бактерий, выполняя каталитические и структурные функции [106]. Известно, что катионы цинка необходимы для роста и функционирования многих микроорганизмов и, к тому же, определяют их

вирулентность [107-109]. В рамках данного раздела нам показалось интересным не только рассмотреть прямое противомикробное действие ряда химических соединений цинка в отношении культур бактерий и их биопленок, но и естественную иммунную реакцию организма (в отношении гомеостаза Zn^{2+}) в ответ на появление патогена.

Ранее в разделе 1.1.1 была рассмотрена иммуностимулирующая активность цинка и его эссенциальность для функционирования врожденного и адаптивного иммунитета при вторжении чужеродных агентов. Интересно отметить, что при появлении патогенных бактерий в макроорганизме в первую очередь инициируется процесс гомеостатической регуляции метаболизма цинка: увеличивается экспрессия белковых транспортеров класса ZIP, которые начинают активно переносить Zn^{2+} во внутриклеточное пространство, снижая уровень свободного цинка в крови и тканях [110,111]. Кроме того, макроорганизм активно секретирует цинксвязывающие белки псориазин, кальпротектин и калгранулин С, которые не только хелатируют свободный Zn^{2+} , но и способны к выведению его из бактериальной клетки [112-114]. Таким образом, происходит не только перераспределение катионов металла в иммунные клетки, но и ингибирование процесса усвоения Zn^{2+} микроорганизмами из плазмы крови, что в дальнейшем негативно сказывается на их росте и функционировании, угнетая последующее развитие инфекционного процесса [115,116]. Так, например, катионы цинка входят в аллостерический центр ферментов семейства цинкзависимых микробных металлопротеиназ, которые разрушают все типы белков межклеточного матрикса и способствуют патогенезу инфицирования. Усвоенный бактериями Zn (II) нейтрализует активные формы кислорода и замедляет процессы окисления, наблюдаемые во время воспалительной реакции, что повышает резистентность микроорганизмов к применяемой антибактериальной терапии и развившейся иммунной реакции организма человека [117,118]. Таким образом, между макро- и микроорганизмом возникает конкуренция за катионы цинка. Ингибирование всасывания Zn^{2+} бактериальными клетками - одна из потенциальных мишеней действия новых противомикробных препаратов [119].

В свою очередь, высокие концентрации цинка оказывают пагубное влияние на рост бактериальных культур. Отмечено, что 5% суспензия оксида цинка *in vitro* ингибирует прикрепление клеток *Staphylococcus aureus* к покровным стеклам после инкубации образцов плазмы инфицированных кроликов в течение 24 часов. Добавление же 5% суспензии ZnO к цефдиниру, левофлоксацину или хинокитиолу (β -туйяплицин) оказывало синергетическое антибактериальное действие в отношении культуры *S. aureus*. К примеру, минимальная ингибирующая концентрация (МИК) комбинации 0.2% раствора хинокитиола и 5% суспензии ZnO составила 1 мкг/мл против 16-32 мкг/мл исходного 0.2% раствора хинокитиола [120]. В ряде работ продемонстрировано выраженное антибактериальное действие сульфата и хлорида цинка в отношении культур *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* [121,122]. Отмечено, что грамположительные микроорганизмы, более чувствительны к катионам цинка, чем грамотрицательные [123]. Например, в одном из исследований антибактериальной активности сульфата цинка были определены минимальные ингибирующие концентрации Zn^{2+} для аэробных бактерий, выделенных из инфицированных тканей человека. Так, значение МИК катионов цинка в отношении Грам (+) микроорганизмов (*Streptococcus* группы А, В, С и G, *Staphylococcus aureus*) варьировалась в диапазоне от 0.5 до 4 ммоль/л, а в отношении Грам (-) микроорганизмов (*Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa* и др.) - в интервале от 8 до 32 ммоль/л [124]. Избыточные концентрации Zn^{2+} изменяют ряд биохимических процессов в клетке и тем самым оказывают токсическое действие на бактериальные культуры *in vitro* и *in vivo*. Как правило, катионы цинка импортируются в клетки микроорганизмов с помощью АВС-транспортеров, которые обладают высокой афинностью к Zn(II). Однако при высоких концентрациях Zn^{2+} во внеклеточном пространстве включаются и второстепенные механизмы транспорта Zn(II): Nramp (макрофагальный протеин, ассоциированный с естественной устойчивостью), МТ (металлотioneины), CorA (или МІТ, транспортер двухвалентных ионов металлов) и другие

неспецифические белковые переносчики, обладающие низкой аффинностью к катионам цинка. Данные белковые транспортеры характеризуются широкой субстратной специфичностью и импортируют во внутриклеточное пространство такие катионы металлов, как Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} [125]. Так как катионы цинка и меди занимают первое место в ряду Ирвинга-Уильямса, они способны конкурировать за сайты связывания активных центров белков-переносчиков [125,126]. Высокие концентрации Zn^{2+} во внеклеточном пространстве препятствуют поглощению микроорганизмами других эссенциальных металлов и, тем самым, опосредуют прямое антибактериальное действие [127,128]. Например, в культуре *Streptococcus pneumoniae* избыток катионов цинка нарушает поглощение Mn^{2+} путем необратимого связывания с внеклеточным Mn(II)-связывающим белком PsaA. Недостаток Mn^{2+} вызывает расстройство ряда биохимических процессов, которые развивают повышенную гиперчувствительность *S. pneumoniae* к оксидативному стрессу и последующую гибель культуры [129,130]. Катионы цинка также могут связываться с участками белковых молекул, которые, как правило, не содержат ионы металлов, и тем самым ингибировать ключевые ферменты в бактериальных клетках [131-133].

Неорганические соединения цинка (соли и оксиды) характеризуются высокой токсичностью и низкой биодоступностью для макроорганизма [82]. Использование хелатных соединений позволяет решить данные проблемы, а кроме того, в некоторых случаях усилить терапевтический эффект лекарственных средств, выступающих в роли хелаторов. Так, комплексные соединения цинка с фторхинолонами обладают повышенной противомикробной активностью в отношении некоторых культур в сравнении с исходными молекулами [134-140]. Антимикробное действие, в том числе противотуберкулезная активность, хелатных соединений цинка с биогенными аминокислотами была ранее показана на примере цинк-глицината [16].

Некорректное проведение антибактериальной терапии привело к появлению большого количества штаммов микроорганизмов резистентных к антибиотикам. Одним из перспективных направлений поиска новых противомикробных средств

является разработка и изучение наночастиц (NPs) различных металлов: золота, серебра, меди, никеля и, в том числе, цинка [141]. Благодаря малому размеру частиц и высокой площади поверхности NPs металлов проявляют сильную антибактериальную активность, воздействуя на множество биомолекул микроорганизмов и нарушая формирование ими клеточных ассоциатов [142,143]. Наночастицы оксида цинка отличаются большей стабильностью, выраженным противомикробным действием при низких концентрациях и меньшей токсичностью для организма человека по сравнению с его неорганическими соединениями [144-146]. NPs-ZnO обладают широким спектром действия: их антибактериальная активность описана в отношении культур бактерий *E. coli*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *E. faecalis*, *B. subtilis* [144,147-149]. Противомикробное действие NPs-ZnO обусловлено выработкой активных форм кислорода (супероксидных анионов (O_2^-), гидроксильных радикалов (HO_2^-) и пероксида водорода (H_2O_2)) которые сначала разрушают фосфолипидный бислой клеточной стенки и нарушают целостность мембраны, а затем необратимо повреждают клеточные компартменты: ДНК, белки и липиды [150-153].

1.2 Химия комплексообразования катионов цинка

1.2.1 Химическая характеристика цинка как d-элемента таблицы Менделеева

Цинк является химическим элементом 12 группы (по устаревшей классификации – побочной подгруппы второй группы, ПБ), 4 периода периодической системы Д.И. Менделеева. Его атомный номер равен 30, относительная атомная масса – 65.38, электронная конфигурация - $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 3d^{10} 4s^2$. В нормальных условиях является хрупким металлом голубовато-серебристого цвета, на воздухе окисляется, покрывается тонкой оксидной пленкой и тускнеет. Цинк – сильный восстановитель, его стандартный электродный потенциал – 0.7628 В. Он является амфотерным металлом: в биологических средах он может существовать как в виде аква- (H_2O), так и в виде

гидроксо- (-ОН) металлокомплексов при значениях рН, ближе к нейтральным [27]. В химических соединениях цинк двухвалентен, а его степень окисления равна +2. Поскольку d-орбитали атома Zn полностью заполнены электронами, катионы цинка не участвуют в окислительно-восстановительных реакциях, однако обладают электроноакцепторными свойствами, так как могут принимать неподеленную пару электронов [154]. Благодаря своей окислительно-восстановительной стабильности и электрофильным свойствам, Zn^{2+} как кислота Льюиса катализирует многие биохимические процессы (протеолиз, гидратацию диоксида углерода и т.д.), в том числе стабилизирует вторичную, третичную и четвертичную конформацию белков [155,156]. Биохимическую универсальность цинка объясняют стереохимической адаптивностью его координационной сферы, благодаря чему хелатные соединения цинка могут принимать различные геометрические конфигурации в пространстве. Координационное число (КЧ) Zn^{2+} может варьироваться от двух до восьми, однако в биологических средах чаще всего встречаются его комплексные соединения, в которых КЧ = 4, 5, 6 [27]. Геометрические конфигурации таких комплексов представлены на Рисунке 2.

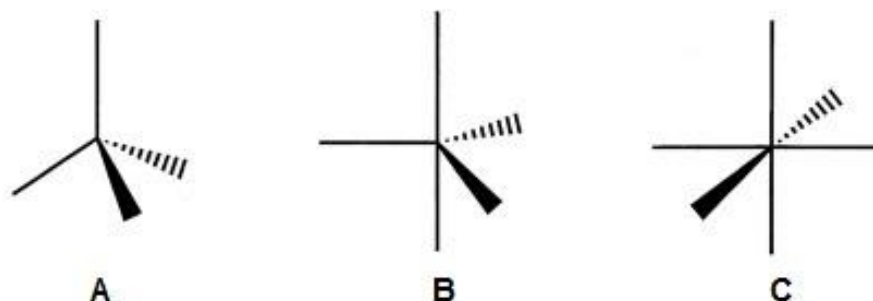


Рисунок 2. Пространственное строение координационных соединений цинка, наиболее часто встречающихся в биологических средах: А – тетраэдрическая структура (КЧ=4), В – тригонально-бипирамидальная структура (КЧ=5), С – октаэдрическая структура (КЧ=6) [154].

1.2.2 Получение и биологическая активность координационных соединений цинка с аминокислотами и другими фармацевтическими субстанциями

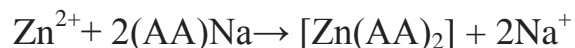
В литературе широко освещены простые методики синтеза и выделения хелатных комплексов цинка на примере аминокислот.

В основе одного из методов лежит реакция взаимодействия между аминокислотой (АК) и суспензией гидроксида цинка в водной среде в молярном соотношении 2 к 1:



Полученную смесь непрерывно перемешивают в течение часа. Выпавшие кристаллы отфильтровывают, промывают дистиллированной водой и затем высушивают.

Второй часто описываемый метод заключается в добавлении небольших порций неорганической соли цинка к водному раствору натриевой соли соответствующей аминокислоты в молярном соотношении 1:2 при температуре среды около 60°C:



Полученную реакцию смесь непрерывно перемешивают при температуре 55-60°C в течение 20-25 минут. Затем раствор охлаждают до 10°C, выпавшие кристаллы отфильтровывают и промывают дистиллированной водой.

Синтезированный хелатный комплекс цинка высушивают при комнатной температуре ($t = 20\text{-}25^\circ\text{C}$) до получения сухого остатка с постоянной массой. Некоторые из методик предполагают сушку полученных кристаллов при температуре не более 50°C в сушильном шкафу в течение 2 часов [157-159].

Введение d-элементов в структуры фармацевтических субстанций позволяет получить хелатные соединения с новыми фармакокинетическими и биологическими свойствами, отличными от свойств исходных молекул лигандов [5]. Повышенная биоактивность координационных соединений металлов объясняется концепцией клеточной проницаемости и теорией хелатирования [140]. В ряде работ доказано, что хелатирование уменьшает полярность иона

металла благодаря частичному разделению его положительного заряда с электронодонорными группами лиганда (атомами N, O), а также делокализации π -электронной плотности по всей системе хелатных колец [10,160]. В результате, липофильные свойства центрального атома металла увеличиваются, способствуя беспрепятственному прохождению комплекса через липоидный слой мембраны. Таким образом, хелатные соединения металлов с лекарственными средствами эффективнее проникают в клетки и проявляют большую биологическую активность, чем сами исходные соединения [134].

Комплексообразование с ионами металлов может влиять на фармакокинетические показатели лекарственных средств, изменяя значение pK_a , процесс всасывания в желудочно-кишечном тракте и связывания с белками плазмы (альбумином и глобулином), модифицируя распределение и элиминирование молекул из живого организма. Например, одновременный прием стрептомицина и соединений Fe^{3+} приводит к повышению скорости клубочковой фильтрации у пациентов с хронической почечной недостаточностью [161]. Кроме того, координация лекарственных соединений с ионами металлов может снижать токсичность лигандов. Так, комплексообразование индометацина с катионами хрома и никеля позволяет сохранить анальгетические и антипиретические свойства исходной молекулы, а также уменьшить проявление ulcerогенного действия при приеме данного нестероидного противовоспалительного препарата [4]. Применение в качестве ЛС координационных соединений может повышать активность метаболических ферментов, что особо актуально при назначении пациенту антибактериальной или противоопухолевой терапии, которые характеризуются высокой токсичностью по отношению к макроорганизмам. Например, применение 6-меркаптопурина в виде комплекса с d элементом положительно сказывается на ферментативной активности тиопуридин-S-метилтрансферазы, а продукт координации изониазида повышает метаболическую активность N-ацетилтрансферазы [162,163].

Координационные соединения лекарственных средств с металлами могут как потенцировать биологическую активность исходных молекул, так и придавать

структурам новые фармакологические свойства. Например, хелатные соединения цинка с α -аминокислотами и их производными со структурой $Zn(N_2O_2)$ демонстрируют инсулин-миметическую активность *in vitro* [164]. Координационные соединения $Zn(II)$ с валином и дитиокарбаматом обладают выраженным противотуберкулезным и противоопухолевым действием *in vitro* и могут быть использованы при лечении туберкулеза и рака молочной железы [165]. Вследствие сформировавшейся множественной лекарственной устойчивости микроорганизмов процесс комплексообразования в последние десятилетия преимущественно используется для получения новых разнообразных антибактериальных препаратов, обладающих измененными физико-химическими и биохимическими свойствами [166]. Например, серия комплексов Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} и Zn^{2+} с бидентатными основаниями Шиффа проявляет выраженную антибактериальную и противогрибковую активность по сравнению с исходными лигандами [167]. Координационные соединения производных стерически затрудненных *o*-дифенолов и *o*-аминофенолов с ионами $Cu(II)$, $Co(II)$, $Ni(II)$ и $Zn(II)$ обладают одновременно высокой противомикробной и противовирусной активностью, а также низкой токсичностью [168]. Повышенную антибактериальную активность демонстрирует новый водорастворимый цинк-глюкозо-цитратный комплекс по сравнению с простыми молекулами лигандов [169]. Хелатные комплексы железа (III) и цинка (II), содержащие изонитрозоацетофенон и различные L-аминокислоты, также отличаются высокой антибактериальной, противогрибковой и противоопухолевой активностью [10]. Продукты реакции комплексообразования противомикробных препаратов с катионами металлов позволяют потенцировать их антибактериальные свойства [134,140,170]. Так, координация норфлоксацина с $Mn(II)$, $Co(II)$ или $Zn(II)$ значительно повышает антибактериальную активность фторхинолона в отношении Грам (-) штаммов микроорганизмов [3]. При введении катионов цинка в структуру ксилитола минимальная ингибирующая концентрация координационного соединения в отношении культуры *P. aeruginosa* возрастает в

два раза: с 128 мкг/мл свободного ксилитола до 64 мкг/мл цинк-ксилитового комплекса, соответственно [171].

1.3 Металлорганические соединения цинка как перспективная система доставки ЛС

Благодаря быстрому развитию нанотехнологий было создано большое количество различных наноплатформ для контролируемого высвобождения лекарственных средств с целью улучшения их терапевтической эффективности и минимизации побочных эффектов [172]. Для доставки лекарственных молекул могут использоваться вещества как органического (липосомы, полимеры, дендримеры, циклодекстрин и др.), так и неорганического происхождения (графен, оксид железа и т.д.) [173-177]. Органические соединения отличаются низкой токсичностью, способностью к биоразложению и химическим модификациям, однако контролировать процесс высвобождения ЛВ из них достаточно сложно [178]. Неорганическим наноносителям, напротив, можно задать данные параметры, но в то же время встает вопрос их токсичности [179]. С развитием координационной химии и благодаря уже имеющимся знаниям о пористых кристаллах, сфомировалось новое направление поиска лекарственных форм с модифицированным высвобождением – изучение металлорганических соединений.

Пористые кристаллические материалы – это твердые вещества, которые характеризуются наличием правильной высокоупорядоченной стабильной кристаллической решетки, обладают обратимой способностью к полиморфным переходам, а также имеют по всей своей структуре полости, каналы и поры фиксированного объема. Классическими примерами пористых кристаллов являются алюмосиликаты, алюмофосфаты, металлоцианаты, клартраты, которые нашли широкое применение в качестве адсорбентов и мембран для промышленного разделения и очистки химических соединений [180-182]. Металлорганические соединения (МОС) или же металлорганические каркасные структуры (МОКС) – одна из разновидностей кристаллических пористых

материалов, используемых в биомедицине в качестве системы доставки лекарств [183]. Их структуры состоят из «жестких» неорганических элементов (ионов переходных или парамагнитных металлов V^{3+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Zn^{2+} , Zr^{3+} и т.д.), называемых *коннекторами*, связанных координационной связью с «гибкими» органическими лигандами, или же *линкерами*, содержащими электронодонорные группы (атомы O, N) [184]. Коннекторы расположены в узлах кристаллической решетки и обуславливают ее геометрическую стабильность и регулярную упорядоченность. Линкеры, в свою очередь, соединяют узлы и обеспечивают подвижность и гибкость структуры [185]. Одновременное присутствие в каркасе как «жестких», так и «гибких» фрагментов, придает их структурам лабильность, т.е. возможность регулирования диаметра пор, благодаря чему они могут принимать разнообразные по размеру молекулы [186]. Применение металлоорганических каркасных структур в биомедицине связано с их уникальными свойствами: большим объемом пор и возможностью их адаптации под лекарственное вещество, высокой площадью поверхности, универсальной функциональностью, высокой лекарственной нагрузкой, относительно низкой токсичностью и высокой эффективностью использования [183,187]. Например, МОКС Zn^{2+} с 2-метилимидазолом и инкапсулированным цефтазидимом позволяет получить модифицированный лекарственный препарат пролонгированного действия для терапии внутриклеточных инфекций [188]. При одновременной доставке цисплатина и миРНК в составе МОС Zr^{4+} с аминокислотой к лекарственно-устойчивым раковым клеткам яичника отмечается повышение эффективности химиотерапии *in vitro* на один порядок [189]. Большое разнообразие МОС привело к формированию нового перспективного направления исследований – кластерной химии, которая занимается изучением свойств металлоорганических каркасных соединений, разработкой и модификацией методик их синтеза, а также поиском новых способов их применения [190].

Аминокислоты – класс органических соединений, молекулы которых одновременно содержат аминогруппы ($-NH_2$) и карбоксильные группы ($-COOH$).

Атомы N и O обладают электронодонорными свойствами и участвуют в формировании ковалентной полярной связи по донорно-акцепторному механизму с различными катионами металлов с образованием координационных структур. Большое разнообразие дополнительных функциональных групп в боковых цепях аминокислот, их малая молекулярная масса, низкая токсичность, а также широкая распространенность в природе обусловили большой интерес к ним в качестве потенциальных органических лигандов для получения металлорганических соединений [191]. Например, самосборка L-метионина с Cu и Ag приводит к образованию биметаллической гомохиральной координационной сети с обратимыми сорбционными свойствами в отношении молекулы-гостя [187]. Однако при применении металлорганических соединений в качестве систем доставки лекарств необходимо учитывать не только потенциальную эффективность такой лекарственной формы, но и ее биосовместимость. Многие МОС доставляют лекарственные вещества посредством саморазрушения собственного каркаса в условиях *in vivo* с последующим выделением в среду соединений неорганической и органической природы. Такие процессы могут сопровождаться выщелачиванием токсичных катионов металлов из их структуры [192,193]. Поэтому в роли коннекторов рекомендуется использовать эссенциальные катионы металлов, обладающие наименьшей токсичностью, а именно: Zn^{2+} , Fe^{3+} и Ca^{2+} [194,195].

Благодаря большому разнообразию функциональных групп, аминокислоты обладают высокой хелатирующей способностью к ионам металлов. Наличие хиральных центров ограничивает их возможность образовывать трехмерные сети, однако они легко образуют одномерные (стержнеобразные или цепочечные) и двумерные (плоскоподобные) структуры с уникальными свойствами [196,197]. Так, одна молекула L-тирозина образует пять координационных связей с четырьмя Me^{n+} : первый и второй катионы металла связываются с фенольным атомом кислорода боковой цепи молекулы, третий - связывается с атомом азота аминогруппы и атомом кислорода карбоксильной группы, четвертый - с атомом кислорода карбонильной группы (Рисунок 3А). Образуется металлорганическое

соединение с октаэдрическим и тетраэдрическим расположением лигандов в пространстве, обладающее выраженными магнитными свойствами и характеризующееся высокой стабильностью структуры (Рисунок 3В). Так, термическая устойчивость МОС L-тирозина с Co^{2+} варьируется в диапазоне от 270 до 550°C [198].

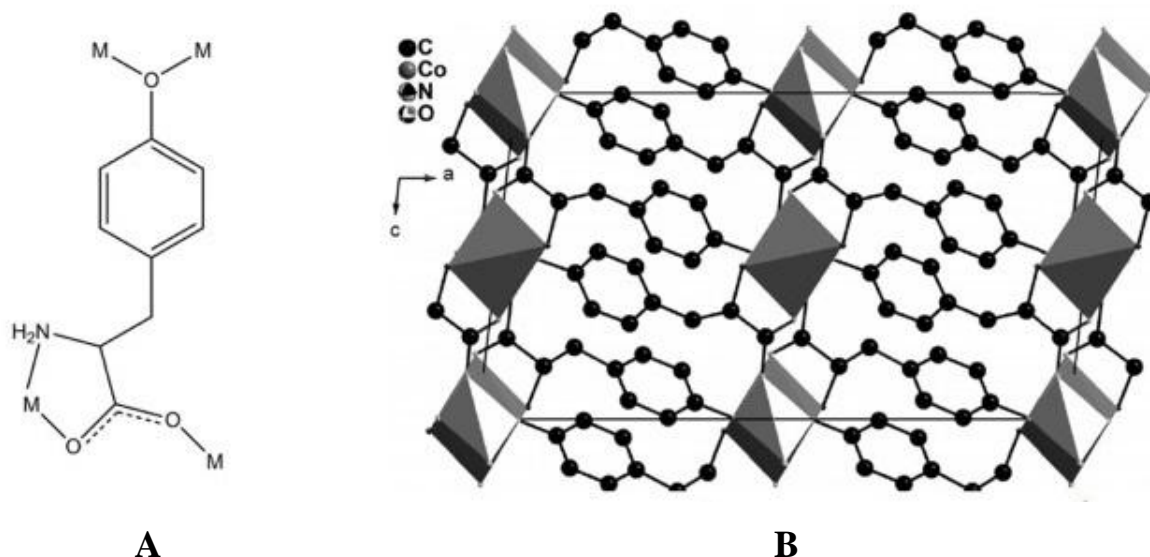


Рисунок 3. Структурная ячейка металлорганических каркасных соединений L-тирозина с ионами металлов (А), координация L-тирозина с Co^{2+} в пространстве в МОС L-tyrCo (В) [198].

Использование одного или одновременно двух энантиомеров аминокислот позволяет получить металлорганический каркас с порами клеточного типа, нашедших широкое применение в хиральном зондировании и разделении оптически активных соединений. D- и L-аланин используются для хелатирования Ni^{2+} и синтеза МОС цеотипа с октаэдрической кристаллической решеткой $[\text{NiO}_4\text{N}_2]$. В случае с катионами Zn^{2+} и D- и L-энантиомерами цистеина отмечено формирование МОКС с таким же пространственным расположением лигандов $[\text{ZnO}_4\text{N}_2]$. Однако данные структуры оказались более стабильными благодаря дополнительным межмолекулярным дисульфидным связям между двумя соседними молекулами аминокислот [199]. На основе L-гистидина было синтезировано гомохиральное МОС бис(L-гистидин) моногидрат никеля(II) для энантиоселективной адсорбции (S)-2-бутанола из его рацемической смеси [200].

Плоско-квадратные МОКС L-изолейцината меди используются в качестве адсорбентов химических соединений *in vitro*, а также стабильной формы доставки лекарственных средств *in vivo* [201]. Кроме того, простые молекулы аминокислот также используются в качестве молекул-предшественников для получения вторичных органических лигандов для синтеза металлоорганических каркасных соединений, отличающихся большей стабильностью, низкой токсичностью и лучшей биосовместимостью [202,203].

1.4 Топологические индексы в оценке и прогнозировании свойств координационных соединений

Одним из наиболее перспективных направлений компьютерного молекулярного дизайна новых фармацевтически активных субстанций является метод непрямого моделирования, который заключается в поиске взаимосвязей между структурой химических соединений и их физико-химическими и биологическими свойствами. В основе подходов количественной корреляции «структура-свойство» (ККСС) или количественной корреляции «структура-активность» (ККСА) лежит использование молекулярных дескрипторов, которые позволяют описать химическую структуру анализируемых соединений с помощью построения математических моделей. В зависимости от способа представления структуры исследуемой молекулы в пространстве различают одномерные (1D), двумерные (2D) или трехмерные (3D) молекулярные дескрипторы. 2D-дескрипторы нашли широкое применение в ККСА-анализе благодаря сочетанию простоты расчета и способности различать близкие по составу и строению химические соединения [204].

Топологические (стерические) дескрипторы – один из видов двумерных молекулярных дескрипторов, которые описывают внутримолекулярные связи между атомами молекулы, а также содержат информацию о ее размере, форме, разветвлении, наличии в структуре гетероатомов и кратных связей. Для расчета стерических индексов исследуемую молекулу представляют в виде абстрактной математической структуры (молекулярного графа), которую анализируют

методами теории графов. Молекулярный граф – связный неориентированный двумерный граф, отображающий структурную формулу химического соединения, в котором вершины графа соответствуют атомам молекулы, а связи между ними представляют собой ребра. Существует более 100 разновидностей топологических индексов (ТИ), которые классифицируют в зависимости от графической формы представления связей в топологической матрице. В ККСА анализе для описания химических структур наиболее часто используют стерические дескрипторы, основанные на матрице расстояния (индекс Винера (W), индекс Балабана (J), индекс Хосои (Z)) и матрице связности (индекс Рандича (χ)) [205].

Индекс Балабана (J) или индекс связности по сумме усредненных расстояний был предложен Александру Балабаном более 30 лет назад, однако по-прежнему является эффективным инструментом для прогнозирования физико-химических и биологических свойств химических соединений [206]. Сравнительный анализ использования индекса Винера и индекса Балабана для описания молекул структурных изомеров алканов, содержащих от 6 до 9 атомов углерода в углеводородной цепи, выявил у J гораздо более высокую дискриминирующую способность в отношении близких по составу и строению соединений [207]. Индекс Балабана также используется в ККСА анализе для прогнозирования биологической активности перспективных лекарственных соединений, обладающих антибактериальными, противовирусными и противоопухолевыми свойствами [208-211]. Кроме того, топологический индекс J применяется в комбинации с другими стерическими и термодинамическими дескрипторами для поиска новых биологически активных соединений широкого спектра действия. Например, множественный регрессионный анализ позволил выявить сильную корреляцию ($R^2=0.988$) между значениями минимальной ингибирующей концентрации производных 8-гидроксихинолина в отношении культуры *Staphylococcus aureus* и молекулярными дескрипторами, описывающими их химическую структуру [212]. Результаты многопараметрического регрессионного анализа взаимосвязи значений pK_a серии сульфаниламидных препаратов, как

показателя их супрамолекулярной комплексообразующей способности, и ряда молекулярных дескрипторов показали, что наибольшая дискриминирующая способность характерна для классического варианта топологического индекса J в сравнении с его модификациями - J_z , J_m , J_v , J_c и J_p [213].

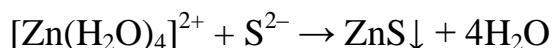
Благодаря простоте, удобству и эффективности использования, топологические дескрипторы нашли широкое применение для прогнозирования физико-химических и биологических свойств органических молекул. Однако их использование для оценки стабильности координационных соединений весьма ограничено, так как многие исследователи считают теорию химических графов «слишком примитивной» для описания свойств хелатных комплексов. Сложности применения топологических индексов связаны с тем, что молекулярный граф металлорганических соединений недостаточно изучен [13]. Однако некоторые регрессионные модели довольно хорошо описывают взаимодействия между боковыми цепями и центральным атомом, наблюдаемые в хелатных комплексах металлов с аминокислотами. Для оценки констант устойчивости координационных соединений Cu^{2+} и Ni^{2+} с органическими лигандами (аминами, аминокислотами и пептидами) авторы модифицировали молекулярные графы представления хелатных колец и использовали индекс валентной молекулярной связности Рандича (${}^3\chi^v$) [214]. Позднее данная группа исследователей подтвердила функциональность топологического индекса ${}^3\chi^v$ для прогнозирования стабильности хелатных соединений аминокислот с многими двухвалентными металлами из ряда Ирвинга-Вильямса: Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , and Ni^{2+} [215]. Кроме того, в ряде работ продемонстрировано применение дескрипторов связности (индекса Рандича (χ), индекса Загеба (M) и его модификаций) для описания структуры металлорганических каркасных структур [216,217].

1.5 Методы определения свободного и координированного цинка в составе молекул лекарственных средств

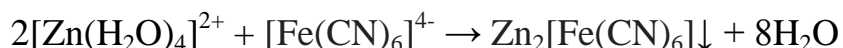
1.5.1 Фармакопейные химические методы качественного и количественного анализа цинка

Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания предусматривает два химических метода идентификации катионов цинка.

Первый метод основан на получении нерастворимого осадка сульфида цинка. К 2 мл нейтрального раствора соли цинка, содержащего около 5-20 мг Zn^{2+} , прибавляют 0.5 мл 2 % раствора сульфида натрия. Отмечают образование белого осадка, нерастворимого в 30% уксусной кислоте, однако легко растворимого в разведенной 8.3% хлористоводородной кислоте [218]:



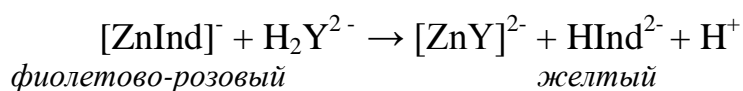
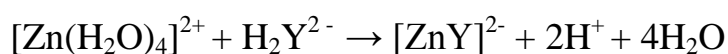
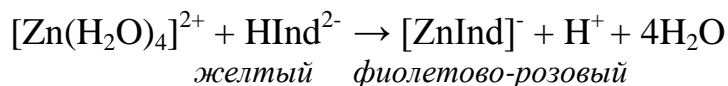
Второй метод заключается в образовании нерастворимого кристаллического осадка гексацианоферрата (II) цинка. К 2 мл раствора соли цинка, содержащего около 5-20 мг Zn^{2+} , добавляют 0.5 мл 5 % раствора ферроцианида калия, фиксируют образование белого осадка, нерастворимого в разведенной 8.3% хлористоводородной кислоте [218]:



Количественное определение соединений цинка проводят методом титриметрического анализа – прямой комплексометрией. Данный метод основан на свойстве катионов металлов образовывать с раствором динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА, H_2Y^{2-}) устойчивые, бесцветные, водорастворимые комплексные соединения в стехиометрическом соотношении $Me^{n+} : ЭДТА - 1:1$. Для визуального определения конечной точки титрования используются металлоиндикаторы ($HInd^{2-}$) – полидентантные органические кислоты, обладающие способностью изменять свою окраску при образовании координационных соединений с катионами металлов. При этом константа устойчивости металлоиндикаторного комплекса должна быть на

четыре порядка ниже константы устойчивости хелатного комплекса катиона металла с титрантом [219].

Согласно ОФС, точную навеску субстанции, содержащей 0.06 – 0.08 г цинка, растворяют в 100 мл дистиллированной воды, прибавляют 5 мл аммиачного буферного раствора (рН 10.0), 0.05 г ксиленолового оранжевого (индикатор), 5.0 г гексаметилентетрамина и оттитровывают 0.05 М раствором натрия эдетата до желтого окрашивания



Гексаметилентетрамин добавляют в раствор для титрования для связывания выделяющихся протонов H^+ , чтобы исключить смещение значения рН раствора.

1 мл 0.05 М раствора натрия эдетата соответствует 3.269 мг Zn^{2+} .

Монографии на субстанции могут содержать отличающиеся методики комплексонометрического определения цинка, например в ФС «Цинка сульфат гептагидрат» в качестве индикатора при комплексонометрии рекомендуется эриохром черный Т.

1.5.2 Особенности спектральных методов анализа для определения цинка

Определение цинка в молекулах лекарственных веществ также проводят с использованием физико-химических методов анализа: атомно-абсорбционного, атомно-эмиссионного и рентгенофлуоресцентного спектрального анализа.

Атомно-абсорбционная спектрометрия (ААС) применяется для качественного и количественного определения химических элементов в лекарственных средствах. Данный метод основан на измерении величины абсорбции резонансного излучения свободными атомами элемента, находящимися в газовом состоянии, при определенной длине волны, соответствующей исследуемому элементу. Поглощая электромагнитное

излучение с определенной энергией, внешние электроны атома переходят на более высокие энергетические уровни, вызывая переход атомов элемента из своего основного состояния в возбужденное. Взаимодействию излучения с атомами элементов предшествует процесс атомизации пробы – перевод образца из жидкого состояния в атомный пар. Атомизацию соединений проводят преимущественно пламенным или электротермическим способами: для этого раствор распыляют в пламени или испаряют сухой остаток раствора в электрической печи в диапазоне температур 2000-3000⁰С. В данном температурном интервале не более 1% атомов вещества находятся в возбужденном состоянии, остальные же атомы присутствуют в своем основном состоянии, поэтому не могут влиять на величину абсорбции излучения. Спектры поглощения атомов, полученные в рабочих температурных диапазонах, просты и содержат небольшое количество резонансных линий, что обуславливает высокую селективность атомно-абсорбционной спектрометрии в качественном и количественном определении фармацевтических субстанций. Прямая линейная зависимость между величиной абсорбции резонансного излучения и концентрацией исследуемого элемента, согласно закону Бугера-Ламберта-Бера, позволяет использовать ААС в количественном анализе лекарственных средств. Определение проводят путем сравнения величины поглощения испытуемого раствора и стандартного раствора с известными концентрациями определяемого элемента методом калибровочной кривой или методом стандартных добавок. [220,221].

Атомно-эмиссионная спектрометрия (АЭС) – метод элементного анализа, основанный на измерении интенсивности электромагнитного излучения, испускаемого термически возбужденными атомами или одноатомными ионами в газовой фазе. При термическом возбуждении атома наблюдаются явления, описанные ранее: внешние электроны переходят с основного уровня на уровни с более высокой энергией. Данный процесс является обратимым и при переходе валентных электронов с возбужденного уровня на нижние энергетические уровни отмечается испускание электромагнитного излучения определенной длины

волны, соответствующей исследуемому элементу. Согласно основному закону светопоглощения интенсивность резонансных линий эмиссионного спектра прямо пропорциональна количеству возбужденных атомов определяемого элемента в химическом соединении. Поэтому атомно-эмиссионная спектроскопия может использоваться как в качественном, так и количественном определении лекарственных средств: идентификацию элемента проводят по положению резонансной линии в спектре, а его количество оценивают по значению ее интенсивности. В АЭС применяют следующие основные типы атомизаторов проб: пламя, электрическая дуга, электрическая искра и индуктивно связанная плазма. Анализируемые соединения могут поступать на анализ не только в жидком состоянии, но и в твердом виде; а диапазон рабочих температур варьироваться от 1500 до 12000⁰С [222]. Несмотря на высокую избирательность и чувствительность (0.1 мкг/л - 0.1 мг/л), низкие пределы обнаружения (1-100 нг/л), данные спектральные методы отличаются достаточно высокой стоимостью как оборудования, так и дополнительных комплектующих и расходных материалов (источники излучения, графитовые печи для электротермической атомизации, стандартные образцы), что ограничивает их использование для проведения рутинного многоэлементного анализ проб лекарственных средств.

Рентгенофлуоресцентная спектроскопия (РФС) – спектральный метод, применяемый для качественного и количественного элементного анализа химических соединений. В основе метода лежит измерение характеристического флуоресцентного излучения, которое возникает в результате облучения анализируемой пробы рентгеновским электромагнитным излучением. РФС позволяет детектировать большинство химических элементов периодической системы Д. И. Менделеева: от берилия (${}_{4}\text{Be}$) до урана (${}_{92}\text{U}$) в концентрационном диапазоне от 0.1 ppm до 100%. Анализируемая проба вещества облучается фотонами первичного рентгеновского излучения, которое «выбивает» электроны из близлежащих к ядру орбиталей атома. Электрон с вышестоящего энергетического уровня занимает вакантное место на нижнем уровне, а атомы переходят в возбужденное состояние, однако через доли секунд возвращаются к

своему стабильному состоянию. Такой переход электронов сопровождается испусканием фотона с возникновением характеристической флуоресценции. Длина волны сгенерированного вторичного рентгеновского излучения – индивидуальная характеристика каждого элемента, а интенсивность флуоресценции прямо пропорциональна количеству атомов в исследуемом соединении.

Рентгенофлуоресцентный анализ в большинстве случаев используется для качественного элементного анализа соединений. В соответствии с директивой международной конференции по гармонизации (International Council for Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline for Elemental Impurities Q3D(R1), 2019) энергодисперсионная рентгенофлуоресцентная спектрометрия (РФС) применима для скрининга лекарственных препаратов на наличие примесей тяжелых металлов [223]. Несмотря на высокую точность, относительную экономичность метода и возможность проведения измерений без разрушения образца при минимальной пробоподготовке, РФС редко применяется для количественного анализа фармацевтических субстанций ввиду необходимости использования стандартов или же разработки и валидации методик количественного определения для устранения матричных эффектов. Государственная фармакопея регламентирует применение РФС в количественном анализе ЛС при условии предварительного установления для матрицы данного состава точной зависимости между интенсивностью линии флуоресценции и концентрацией элемента в стандартном образце [224].

ВЫВОДЫ ПО ЛИТЕРАТУРНОМУ ОБЗОРУ

Цинк является эссенциальным микроэлементом: он присутствует во всех тканях и биологических жидкостях организма человека и играет ключевую роль в физиологических процессах, выполняя каталитические, структурные и регуляторные функции. В отличие от многих других жизненно важных микроэлементов Zn не имеет функциональных резервов в организме и дефицит его в пище приводит к резкому отклонению показателей от физиологической нормы. Прием цинксодержащих биологически активных добавок является эффективным способом восполнения его недостатка в организме. Использование хелатных соединений вместо неорганических (солей и оксида цинка) позволяет снизить токсичность и повысить биодоступность микроэлемента. Кроме того, интересно изучение изотопной чистоты цинксодержащих лекарственных препаратов благодаря описанному магнитному изотопному эффекту Zn, который проявляется в изменении скорости протекания ряда биохимических процессов при введении стабильного ^{67}Zn в состав используемых реагентов в исследованиях *in vitro*.

Цинк (II), как и многие другие переходные металлы, играет ключевую роль в физиологических процессах не только эукариотов, но и прокариотов. Катионы цинка необходимы для роста и функционирования многих микроорганизмов и, к тому же, определяют их вирулентность. Однако его избыточные концентрации изменяют ряд биохимических процессов в клетке и тем самым оказывают токсическое действие на бактериальные культуры *in vitro* и *in vivo*. Неорганические соединения цинка (соли и оксиды) характеризуются высокой токсичностью и низкой биодоступностью для макроорганизма. Использование же хелатных соединений позволяет решить данные проблемы, а кроме того, в некоторых случаях усилить терапевтический эффект лекарственных средств, выступающих в роли хелаторов.

Благодаря наличию правильной высокоупорядоченной стабильной кристаллической решетки с регулируемым объемом полостей

металлорганические соединения нашли широкое применение в биомедицине в качестве лекарственных форм с модифицированным высвобождением действующего вещества. Большое разнообразие дополнительных функциональных групп в боковых цепях аминокислот, их малая молекулярная масса, низкая токсичность, а также широкая распространенность в природе обусловили большой интерес к ним в качестве потенциальных органических лигандов для получения МОС. Как правило, доставка лекарственного вещества сопровождается саморазрушением каркасной структуры металлорганического соединения в условиях *in vivo* с последующим выделением в среду катионов металлов и органических лигандов. Поэтому использование эссенциальных микроэлементов, в частности цинка, в роли коннекторов позволяет также решить проблему дефицита данных элементов в организме пациента.

Актуальная задача поиска эффективных органических лигандов для получения хелатных комплексов с металлами могла бы быть решена с применением методов компьютерного молекулярного дизайна, в частности непрямого моделирования посредством подхода количественной корреляции «структура» - «активность». Однако вопрос функциональности топологических дескрипторов (индекса Балабана) в отношении прогнозирования свойств координационных соединений в литературе освещен недостаточно. Корреляция между индексом J , отражающим структуру вещества и биофармацевтическими характеристиками хелатных комплексов ионов металлов с органическими лигандами не очевидны и, в связи с этим, требуют дальнейших исследований.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Прогнозирование физико-химических и биологических свойств координационных соединений цинка с аминокислотами с применением молекулярных дескрипторов

Для описания и прогнозирования биологической активности и оценки физико-химических свойств координационных соединений d-элементов был использован комбинированный подход на основе взаимосвязи между показателями токсичности ($^{obs}E_a$), стерическими (J) и термодинамическими (logP) дескрипторами молекулы. Объектами исследования были выбраны 10 аминокислот: заменимые (глицин, аланин) и незаменимые (валин, лейцин, изолейцин, метионин, треонин, лизин, триптофан и фенилаланин), а также их хелатные соединения с Zn в соотношении $Zn^{2+} : \text{аминокислота (АК)} = 1 : 2$ ($Zn(АК)_2$).

2.1.1. Методика расчета стерического дескриптора (J) исследуемых молекул

Для описания и прогнозирования свойств исследуемых соединений в качестве стерического дескриптора был выбран индекс Балабана (J), основанный на матрице расстояния между атомами соединения [225]. Данный индекс характеризуется высокой дискриминирующей способностью в отношении органических молекул [12] и рассчитывается как средняя сумма расстояний связанности по формуле:

$$J = \frac{m}{(\mu+1)} \sum (S_i S_j)^{-0.5} = \frac{m}{(\mu+1)} \sum \frac{1}{\sqrt{S_i S_j}}, \quad (1)$$

где $S_i S_j$ – сумма расстояний для i-той и j-той вершин, суммирование ведется по всем смежным вершинам, μ – цикломатическое число графа, которое соответствует наименьшему числу ребер, удаление которых приводит к графу без циклов

$$\mu = m - n + q = m - n + 1, \quad (2)$$

где m – число ребер (связей), n – число вершин, q – компонент связности графа, в работах Балабана $q = 1$.

Молекулярные графы для выбранных аминокислот были построены с использованием ПО «ChemicPen» [15]. Топологический дескриптор Балабана (J), вычисляемый по матрице топологических расстояний между атомами, рассчитывали в программе «ChemicDescript» [14]. Однако данное программное обеспечение невозможно использовать для расчета топологических дескрипторов комплексных соединений металлов с лигандами, в которых ковалентная полярная связь Zn-N образована по донорно-акцепторному механизму. Для хелатных соединений цинка с аминокислотами значения индекса Балабана рассчитывали вручную путем построения топологических матриц расстояний (Таблица 3).

Таблица 3. Топологическая матрица расстояния для цинк глицината для расчета индекса Балабана (J).

N atom i/j	1 N	2 C	3 C	4 O	5 O	6 Zn	7 N	8 C	9 C	10 O	11 O	ΣS_{ij}
1 N	0,143	0,857	1,857	2,232	0,321	0,171	0,342	1,199	1,071	1,446	0,321	9,96
2 C	0,857	0	1	1,375	1,75	1,028	1,199	2,056	1,928	2,303	1,178	14,674
3 C	1,857	1	0	0,375	0,75	0,9	1,071	1,928	1,8	2,175	1,05	12,906
4 O	2,232	1,375	0,375	0,25	1,125	1,275	1,446	2,303	2,175	2,55	1,425	16,531
5 O	0,321	1,75	0,75	1,125	0,25	0,15	0,321	1,178	1,05	1,425	0,3	8,62
6 Zn	0,171	1,028	0,9	1,275	0,15	0,8	0,171	1,028	0,9	1,275	0,15	7,848
7 N	0,342	1,199	1,071	1,446	0,321	0,171	0,143	0,857	1,857	2,232	0,321	9,96
8 C	1,199	2,056	1,928	2,303	1,178	1,028	0,857	0	1	1,375	1,75	14,674
9 C	1,071	1,928	1,8	2,175	1,05	0,9	1,857	1	0	0,375	0,75	12,906
10 O	1,446	2,303	2,175	2,55	1,425	1,275	2,232	1,375	0,375	0,25	1,125	16,531
11 O	0,321	1,178	1,05	1,425	0,3	0,15	0,321	1,75	0,75	1,125	0,25	8,62

Для заполнения топологической матрицы использовали следующие величины:

- Значения D_{ii} диагональных элементов топологической матрицы расстояния:

$$D_{ii} = 1 - 6/Z_i, \quad (3)$$

где Z_i – число всех электронов в атоме i .

Например, $D_{ii}(\text{Zn} - \text{Zn}) = 1 - 6/30 = 0.8$.

- Значения параметра P_{ij} для связей различных атомов, используемых при расчете недиагональных элементов топологической матрицы расстояния:

$$P_{ij} = 36/b_r Z_i Z_j, \quad (4)$$

где Z_i и Z_j – число всех электронов в атомах i и j соответственно; b_r – кратность связи между атомами i и j .

Например, $P_{ij}(\text{Zn} - \text{O}) = 36/1 \times 30 \times 8 = 0.15$; $P_{ij}(\text{Zn} - \text{N}) = 36/1 \times 30 \times 7 = 0.171$.

Подобные расчёты были проведены для всех хелатных соединений цинка с аминокислотами, полученные матрицы расстояний представлены в Приложении А.

2.1.2 Методика поиска значений термодинамического дескриптора ($\log P$) исследуемых молекул

Логарифм коэффициента распределения ($\log P$) – один из основных параметров, который используется для оценки липофильности химических соединений и, соответственно, определяет их фармакокинетические свойства [226]. Поэтому для выражения и оценки биологической активности исследуемых комплексов цинка в качестве термодинамического дескриптора был использован коэффициент распределения n -октанол/вода, который количественно выражается как логарифм константы распределения n -октанол-вода ($\log P$):

$$\log P = \log \left(\frac{[C]_{\text{octanol}}}{[C]_{\text{water}}} \right), \quad (5)$$

Значения показателя липофильности для выбранных аминокислот были найдены в общедоступных базах данных химических соединений и фармацевтических субстанций: Pubchem (National Institutes of Health/Национальный институт здоровья, USA/США) и Drugbank (Canadian Institutes of Health Research/Канадские институты исследования в области здравоохранения, Canada/Канада). Для цинк-хелатных соединений значения $\log P$

были рассчитаны с последующим усреднением с использованием ПО Molinspiration v2018.10 и ALOGPS 2.1 [227,228].

2.1.3 Методика определения токсикометрического дескриптора ($^{obs}E_a$) исследуемых молекул

В качестве показателя токсичности исследуемых молекул использовали экспериментально полученные значения кажущейся энергии активации лиганд-индуцированной клеточной гибели изолированной клетки организма *Spirostomum ambigua* ($^{obs}E_a$) [17]. В ряде работ показано, что для многих соединений энергия активации медленной стадии процесса гибели клеточного биосенсора находится в корреляции с LD₅₀ для тех же веществ при пероральном приеме у лабораторных животных [19].

В качестве тест-объекта использовали клеточный биосенсор класса Простейших – *Spirostomum ambiguum*. Преимущество данной модели заключается в том, что чувствительность эукариотической клетки позволяет интерпретировать получаемые результаты токсичности в отношении многоклеточных организмов.

Экспериментальная установка включала термостатируемый 5-луночный планшет (Lauda Alpha A6) и бинокляр МБС-10. Для дополнительного освещения использовали маломощные лампы дневного света.

Инфузория характеризуется лентовидной уплощенной формой тела (1-3 мм в длину), культивируется в лаборатории при температуре 20-24⁰С. При благоприятных условиях в маломинерализованной среде клетки не погибают в течение периода, превышающего их клеточный цикл (около 20 ч), и свободно передвигаются в толще раствора с попеременным сжатием и растяжением клетки. *Spirostomum ambiguum* чувствительна к изменениям состава среды: при добавлении в среду различных ксенобиотиков клетка начинает сокращаться по своей длине в 2-3 раза. При внесении инфузории в среду, содержащую химические вещества, она погибает в течение интервала времени, являющегося функцией как концентрации, так и температуры [17,19].

Критерием подбора рабочей концентрации служило время жизни клеточной модели – подходящим для наблюдений считали временной промежуток в 5-7 минут в условиях минимальной исследуемой температуры.

Для подбора рабочих концентраций растворов и расчета равновесных концентраций образовавшихся комплексов были использованы значения констант устойчивости комплексов (β_1 , β_2) [229]. Константы устойчивости комплексов являются обратными величинами к константе нестойкости и характеризуют прочность образовавшегося комплексного иона. Таким образом, β_1 – константа устойчивости комплексного иона, образовавшегося на первой стадии комплексообразования, в результате реакции 1 моля металла-комплексообразователя и 1 моля лиганда, β_2 – константа устойчивости комплексного иона, образовавшегося на второй стадии комплексообразования, в результате реакции 1 моля металла-комплексообразователя и 2 моля лиганда и т.д. Примеры реакции комплексообразования и расчета констант устойчивости комплексов приведены ниже:

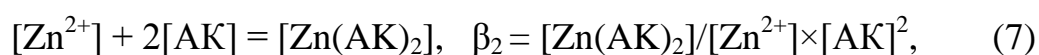
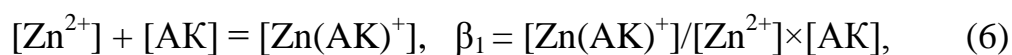


Таблица 4. Константы устойчивости цинк-хелатных комплексов [229].

Аминокислота	$\log\beta_1$	$\log\beta_2$
Gly	4.90	9.01
Ala	4.57	8.56
Met	4.22	6.93
Val	4.44	8.24

Зная константы устойчивости комплексных соединений и равновесные концентрации свободного лиганда, можно рассчитать равновесную концентрацию продукта реакции $[\text{Zn}(\text{AK})_2]$, т.е. образовавшегося хелатного соединения цинка. Для подбора рабочих концентраций растворов при определении токсикометрического дескриптора координационных соединений были рассмотрены два варианта соотношения комплексообразователь - лиганд: 1:2 и

1:20 моль. Для упрощения расчетов принимается следующее допущение: равновесная концентрация свободного лиганда приравнивается к его исходной концентрации, если лиганд находится в избытке по отношению к иону металла ($[AK] = C(AK)$). Расчеты равновесной концентрации образующегося хелатного комплекса цинка представлены на примере образования метионината цинка.

Уравнение материального баланса для раствора, содержащего ионы Zn^{2+} и избыток Met имеет следующий вид:

$$C(Zn^{2+}) = [Zn^{2+}] + [Zn(Met)^+] + [Zn(Met)_2], \quad (8)$$

Выразив концентрации всех частиц через константы устойчивости β_1 , β_2 , получили уравнение, в котором неизвестной величиной осталась только равновесная концентрация $[Zn(Met)_2]$.

$$C(Zn^{2+}) = \frac{[Zn(Met)_2]}{\beta_2 \times [Met]^2} + \frac{[Zn(Met)_2] \times \beta_1}{\beta_2 \times [Met]} + [Zn(Met)_2] = [Zn(Met)_2] \times \left(\frac{1}{\beta_2 \times [Met]^2} + \frac{\beta_1}{\beta_2 \times [Met]} + 1, \quad (9) \right.$$

$$[Zn(Met)_2] = \frac{C(Zn^{2+})}{\frac{1}{\beta_2 \times [Met]^2} + \frac{\beta_1}{\beta_2 \times [Met]} + 1}, \quad (10)$$

В расчетах за исходную концентрацию металла-комплексообразователя ($C(Zn^{2+})$) принимали 1 ммоль/л, за исходные концентрации лиганда – 2 ммоль/л или 20 ммоль/л, соответственно. Полученные равновесные концентрации цинк-хелатных комплексов представлены в Таблице 5.

Таким образом, полученные расчеты равновесных концентраций цинк-хелатных соединений демонстрируют, что концентрация продуктов комплексообразования стремится к 1 ммоль/л при условии использования значительного избытка лиганда. В дальнейшей экспериментальной работе для смещения направления реакции комплексообразования в правую сторону использовали металл и лиганд в стехиометрическом соотношении $Zn : AK = 1 : 20$.

Таблица 5. Равновесные концентрации цинк-хелатных комплексов.

Zn : АК	Константы устойчивости комплексов, β	C(Zn²⁺), C(AК), ммоль/л	[Zn(AК)₂], ммоль/л	C(Zn²⁺), C(AК), ммоль/л	[Zn(AК)₂], ммоль/л
Zn : Met	$\beta_1 = 1.66 \times 10^4$ $\beta_2 = 8.51 \times 10^6$	C(Zn ²⁺) = 1 C(AК) = 2	[Zn(Met) ₂] = 0.4987	C(Zn ²⁺) = 1 C(AК) = 20	[Zn(Met) ₂] = 0.9109
Zn : Ala	$\beta_1 = 3.72 \times 10^4$ $\beta_2 = 3.63 \times 10^8$		[Zn(Ala) ₂] = 0.9507		[Zn(Ala) ₂] = 0.9949
Zn : Val	$\beta_1 = 2.75 \times 10^4$ $\beta_2 = 1.74 \times 10^8$		[Zn(Val) ₂] = 0.9255		[Zn(Val) ₂] = 0.9921
Zn : Gly	$\beta_1 = 7.94 \times 10^4$ $\beta_2 = 1.02 \times 10^9$		[Zn(Gly) ₂] = 0.9623		[Zn(Gly) ₂] = 0.9961

В настоящей диссертационной работе были использованы следующие реактивы: глицин ангидрид (99.0%, Alfa Aesar, Германия), L-аланин (99.0%, Alfa Aesar, Великобритания), L-метионин (ч., AppliChem, Испания), L-валин (99.0%, Alfa Aesar, Великобритания), L-фенилаланин (98.5-101.0%, Acros Organics, Испания), цинка сульфат моногидрат (99.0%, Acros Organics, Испания), натрия гидроксид, спирт этиловый (ч., Россия). Вода бидистиллированная, прошедшая очистку на установке Milli-Q производителя Merck Millipore, США, была использована в качестве растворителя для приготовления водных растворов.

Рабочая концентрация растворов аминокислот для определения токсикометрического дескриптора составила 150 ммоль/л. В ряде исследований показано, что кажущаяся энергия активации (^{obs}E_a) лиганд-индуцированных клеточных переходов для аминокислот не зависит от концентрации растворов в диапазоне от 60 до 250 ммоль/л [17,230]. Использование в работе столь высоких концентраций обусловлено тем, что клеточный биосенсор имеет высокое сродство к органическим лигандам, которые принимают участие во многих метаболических процессах и могут служить естественной средой обитания для простейших. Экспериментально установленная концентрация комплексообразователя и лиганда, обеспечивающая необходимую

продолжительность жизни клетки, составила 2 ммоль/л и 40 ммоль/л для Zn^{2+} и АК, соответственно. Полученные растворы доводили 8.5 % раствором NaOH до нейтрального значения pH, чтобы избежать влияния кислотности среды на биосенсор. При подготовке растворов исследуемых образцов использовали поверенное лабораторное оборудование - весы аналитические лабораторные AS 220.x2 (Radwag, Польша), pH-метр базовый лабораторный PB-11 (Sartorius, Германия).

Методика эксперимента. Исследование проводили в температурном диапазоне 26-30°C (с шагом в 2°C). В каждую из лунок планшета вносили по 250 мкл исследуемого раствора и отсаживали по одной инфузории. Для каждого раствора испытуемого образца проводили по 5 повторных измерений. Время жизни клеток рассчитывали как интервал от момента введения *Sp. ambiguum* в раствор до момента гибели клетки. Гибель констатировали по обездвиживанию клетки с отсутствием сократительной реакции на механическое раздражение или по нарушению целостности клеточной стенки с выходом содержимого клетки в раствор субстанции [231].

Для оценки показателя токсичности химических соединений зависимость времени жизни *Sp. ambiguum* от температуры анализировали в аррениусовских координатах. Уравнение Аррениуса имеет следующий вид:

$$k = A \times e^{-E_a/RT}, \quad (11)$$

где k – константа скорости процесса, A – предэкспоненциальный множитель, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура по шкале Кельвина.

Для расчета энергии активации лиганд-индуцированного клеточного перехода ($^{obs}E_a$) приведенное уравнение логарифмировали:

$$\ln k = \ln A - E_a/R \times 1/T \quad (12)$$

или

$$\ln(1/t_{ж}) = \ln A - E_a/R \times 1/T, \quad (13)$$

Кажущуюся энергию активации гибели инфузории ($^{obs}E_a$) при воздействии токсиканта рассчитывали по тангенсу угла наклона полученной прямой к оси абсцисс: $tg\beta = -^{obs}E_a/R$ [18].

2.2 Исследование ингибирующего действия хелатных соединений цинка на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре бактерий

E. coli

Ингибирующее влияние на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре клеток *E. coli BL 21* было исследовано для пяти аминокислотных координационных комплексов цинка – с Gly, Ala, Met, Val, Phe [232,233]. Образование биопленок в культуре *E. coli* оценивали по количеству и размерам частиц дисперсной фазы методом малоуглового лазерного светорассеяния. Размерные спектры частиц (численное распределение частиц и распределение площади поверхности частиц от их размера) были зарегистрированы с помощью лазерного измерителя дисперсии "Кластер-1" – ИДЛ-1 (разработка Института коллоидной химии и химии воды, Украина и Российского университета дружбы народов, Россия) [234].

Методика эксперимента. 0.25 мл водного раствора координационного комплекса цинка с аминокислотой в концентрации 8 ммоль/л фильтровали через мембранный фильтр (Merck Millipore, $d=0.22$ мкм), а затем вносили в 2 мл культуральной среды Lysogeny Broth (LB). Таким образом, концентрация $Zn(AK)_2$ в культуральной среде составляла 1 ммоль/л. В качестве положительного контроля выступала питательная среда LB. Культуральная среда LB (лизогенная среда) была приготовлена по следующей методике: 10 г триптона (Pronadisa, Испания), 5 г дрожжевого экстракта (Helicon, Россия), 10 г натрия хлорида растворяли в 800 мл высокоочищенной воды, а затем объем раствора доводили до 1 л тем же растворителем. Контрольные и испытуемые образцы были приготовлены в трех повторах.

В исследуемые и контрольные растворы вносили 10 мкл ночной культуры *E. coli BL 21* (выдерживали от 18 до 24 ч при температуре 37°C и 100 об/мин), а

затем инкубировали при температуре 37°C в течение 12 часов при постоянном перемешивании 100 об/мин. После ночной инкубации тестовые и контрольные растворы были разведены стерильной культуральной средой LB в 1.5 и 12 раз соответственно для достижения оптической плотности раствора не превышающей 0.8. Полученные результаты представлены в виде размерных спектров частиц - численного распределение частиц и распределение площади поверхности частиц от их размера.

2.3 Исследование антибактериальной активности молекулы-кандидата в отношении стандартных тест-культур бактерий

Антибактериальная активность метионината цинка (молекулы-кандидата) была оценена методом диффузии в агар в отношении двух стандартных штаммов Гр «+» и Гр «-» бактерий: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* ATCC 25922, соответственно. Культуры бактерий были предоставлены кафедрой микробиологии им. В.С. Киктенко Российского университета дружбы народов. Все культуральные среды, используемые в исследованиях (сердечно-мозговой бульон: ВНИВ; агар Мюллера-Хинтона: МНА; бульон Сабуро с декстрозой: SDB), были произведены HiMedia™ Laboratories Pvt. Ltd., Индия.

Приготовление испытуемого раствора метионината цинка. Критерием подбора максимальной концентрации испытуемого раствора служили данные о предельной растворимости метионина в воде (от 10 до 30 мл воды на 1,0 г метионина). Исследуемый водный раствор метионината цинка в концентрации 10.24 ммоль/л (3.7048 мг/мл) был получен при смешивании водных растворов 10.24 ммоль/л ZnSO₄ и 204.80 ммоль/л Met (в соотношении 1 : 20). В качестве контролей использовали водный раствор Met (204.80 ммоль/л), водный раствор ZnSO₄ (10.24 ммоль/л), воду очищенную и стандартный раствор канамицина сульфата (1024 мкг/мл). Стерилизацию приготовленных растворов осуществляли методом микрофильтрации через мембранный фильтр (Merck Millipore, d=0.22 мкм).

Приготовление инокулята бактерий. Для получения инокулята взвесь бактерий вносили в 10 мл бульона ВНІВ и культивировали в течение 24 часов при температуре 37°C. После инкубации раствор центрифугировали (10000 об/мин, 4°C, 10 мин) с последующим удалением надосадочной жидкости. Осажденные клетки бактерий дважды промывали стерильным физиологическим раствором, а затем ресуспендировали в 5 мл стерильного физиологического раствора для достижения концентрации бактерий в растворе, эквивалентной 0.5 единицам по шкале МакФарланда ($\sim 10^8$ КОЕ/мл). Для измерения показателя мутности клеточной суспензии использовали денситометр Макфарланда DEN-1 (Grant-bio).

Определение антибактериальной активности молекулы-кандидата. Исследование антимикробной активности испытуемого раствора метионината цинка проводили методом диффузии в агар. 15 мл стерильного агара Мюллера-Хинтона вносили в чашки Петри, после этого 100 мкл инокулята бактерий распределяли микробиологическим шпателем по всей площади плотной культуральной среды. В толще агара просверлили стерильным сверлом 10 лунок емкостью 20 мкл, в полученные лунки вносили 20 мкл испытуемого $Zn(Met)_2$ или контрольного растворов (каждый раствор в двух повторях). Чашки Петри с культуральной средой инкубировали при 37°C в течение 24 часов, а затем измеряли диаметры зон угнетения роста микроорганизмов.

Определение минимальных ингибирующих концентраций (МИК) молекулы-кандидата. Исследование проводили с использованием стерильного 96-луночного микропланшета с U-образным дном методом двухкратного последовательного разведения исследуемого раствора метионината цинка в жидкой питательной среде [235]. Лунки каждой из колонок микропланшета были заполнены раствором $Zn(Met)_2$ с одним определенным штаммом стандартного микроорганизма. 100 мкл бульона ВНІВ вносили во все лунки микропланшета. В первый ряд планшета вносили 100 мкл исследуемого раствора метионината цинка (10.24 ммоль/л) и перемешивали с культуральной средой 3-5 раз. Из лунки первого ряда отбирали аликвоту объемом 100 мкл и переносили в лунку второго ряда и перемешивали с культуральной средой 3-5 раз и т.д. Из лунки последнего

ряда после перемешивания аликвоту объемом 100 мкл удаляли из микропланшета (Рисунок 4). Таким образом, были получены следующие концентрации испытуемого раствора метионината цинка: 5.12; 2.56; 1.28; 0.64; 0.32; 0.16; 0.08; 0.04 ммоль/л.

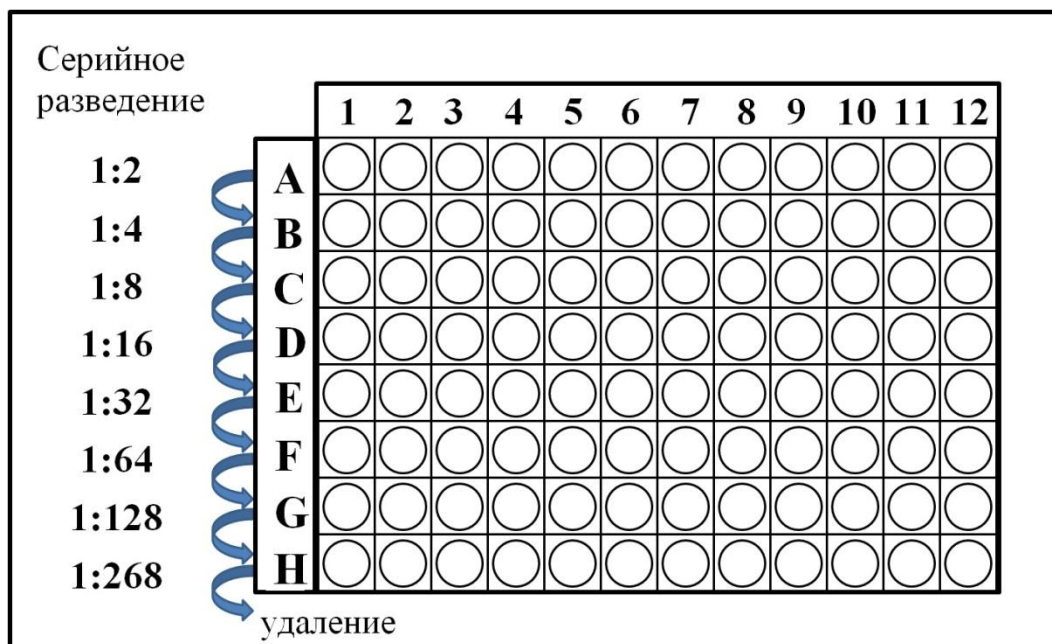


Рисунок 4. Методика двухкратного последовательного разведения исследуемого раствора метионината цинка в жидкой питательной среде.

В каждую тестовую лунку добавляли 10 мкл соответствующего инокулята бактерий. Положительным контролем служила питательная среда ВНВ, отрицательным контролем - питательная среда ВНВ без добавления инокулята бактерий. После этого микропланшет накрывали крышкой и инкубировали при 37°C в течение 24 часов. После термостатирования определяли МИК (самую низкую концентрацию испытуемого раствора метионината цинка, которая подавляла видимый рост бактерий в среде), а также толерантность микроорганизма к исследуемому комплексу (% роста культуры от положительного контроля) по значениям оптической плотности раствора при $\lambda=550$ нм:

$$\text{Толерантность микроорганизма (\%)} = \frac{(A_x - A_{\text{фон}})}{(A_0 - A_{\text{фон}})} \times 100, \quad (14)$$

где A_0 – интенсивность абсорбции положительного контрольного раствора, $A_{\text{фон}}$ – интенсивность абсорбции отрицательного контрольного раствора, A_x – интенсивность абсорбции исследуемого раствора.

2.4 Исследование влияния молекулы-кандидата на формирование биопленок в культуре патогенных штаммов

Для исследования влияния $Zn(Met)_2$ на формирование биопленок использовали 8 штаммов патогенных культур (Гр «+»: *Staphylococcus aureus* 1449, *Streptococcus agalactiae* 3984, *Conyobacterium spp* 1638, *Staphylococcus simulans* 5882; Гр «-»: *Escherichia coli* M17, *Citrobacter freundii* 426, *Enterococcus cloacae* 6392, *Acinetobacter baumannii* 5841), выделенных из мочи пациентов с диагностированной инфекцией мочевыделительной системы, а также указанные выше стандартные штаммы *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* ATCC 25922. Чувствительность выделенных патогенных штаммов бактерий к антибиотикам определяли с использованием модифицированного дискового метода Кирби–Бауэра, затем рассчитывали индекс множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) каждого микроорганизма [236]. Культуры бактерий были предоставлены кафедрой микробиологии им. В.С. Киктенко Российского университета дружбы народов.

Методика приготовления испытуемого раствора метионината цинка, инокулята бактерий, а также использованные культуральные среды описаны выше в разделе 2.3.

Исследование влияния молекулы-кандидата на формирование биопленок в культуре патогенных штаммов. Влияние метионината цинка на образование клеточных ассоциатов бактерий было изучено методом микротитрования с использованием 96-луночного микропланшета [235,237]. Культуральную среду ВНІВ смешивали с испытуемым раствором метионината цинка в различных объемных соотношениях для достижения пяти рабочих концентраций: 0.512; 1.240; 2.560; 3.840 и 5.120 ммоль/л. 200 мкл полученного раствора вносили в стерильный 96-луночный микропланшет. В тестовые лунки

инокулировали 10 мкл ночной культуры бактерий (от 18 до 24 ч при 37°C и 100 об/мин). В качестве положительного контроля использовали среду ВНІВ, в качестве отрицательного – рабочие концентрации раствора $Zn(Met)_2$ без добавления инокулята бактерий. Влияние испытуемого и контрольных растворов на формирование биопленок в культуре стандартных и патогенных штаммов оценивали в четырех повторах.

После инкубирования микропланшетов при 37°C в течение 48 часов компоненты питательной среды удалили из лунок, лунки планшета дважды промыли водой очищенной, а затем планшеты просушили при 40°C в течение 5-10 мин. Оставшиеся на поверхности лунок биопленки, сформированные бактериями, окрашивали 200 мкл 1% водного раствора кристаллического фиолетового в течение 5-10 мин. После удаления красителя лунки заполнили 200 мкл этилового спирта 99%, и поместили планшет в спектрофотометр (ИФА-анализатор) для определения оптической плотности раствора при $\lambda=550$ нм (Рисунок 5).

$c(Zn(Met)_2)$, ммоль/л	0	0.512	1.240	2.560	3.840	5.120	5.120	3.840	2.560	1.240	0.512	0	$c(Zn(Met)_2)$, ммоль/л
Staphylococcus aureus 1449	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	Streptococcus agalactiae 3984
Escherichia coli M17	■	■	■	■	■	■	○	○	○	○	○	○	Отрицательный контроль ($A_{фон}$)
Положительный контроль (A_0)													

Рисунок 5. Схема определения влияния раствора метионината цинка на формирование биопленок: 96-луночный микропланшет заполненный 99% раствором этанола после растворения биопленок, подкрашенных раствором кристаллического фиолетового.

Степень ингибирования формирования биопленок (%) рассчитывали по полученным значениям абсорбции (A_{550}):

$$\text{Степень ингибирования (\%)} = \frac{(A_0 - A_{\text{фон}}) - (A_x - A_{\text{фон}})}{(A_0 - A_{\text{фон}})} \times 100, \quad (15)$$

где A_0 – интенсивность абсорбции положительного контрольного раствора, $A_{\text{фон}}$ - интенсивность абсорбции отрицательного контрольного раствора, A_x - интенсивность абсорбции исследуемого раствора.

2.5 Методики синтеза метионината цинка

В научной литературе представлено достаточно большое количество различных способов получения комплексных соединений d-элементов с аминокислотами [157-159,238]. В данной диссертационной работе были использованы две различные методики получения хелатного соединения цинка с метионином.

2.5.1 Синтезированный комплекс $\text{Zn}(\text{Met})_2$

Для синтеза цинка метионината была использована методика, которая не отличается сложным техническим исполнением, но характеризуется высоким процентом выхода продукта синтеза [157,223]. К суспензии L-метионина (2 моль) в воде прибавляли гидроксид натрия (2 моль), перемешивали в течение 10 минут до полного растворения метионина и нагревали смесь до 60°C . К гомогенному раствору порциями добавляли моногидрат сульфата цинка (1 моль), выдерживали при перемешивании в течение 20 минут при температуре $60-65^\circ\text{C}$ [159]. Далее реакционную смесь охлаждали до 10°C , выпавшие кристаллы отфильтровывали и промывали водой до отрицательной реакции фильтрата на сульфаты (по реакции осаждения с хлоридом бария) и свободный метионин (нингидриновая проба). Осадок дополнительно промывали этиловым спиртом и высушивали до постоянной массы при 105°C в сушильном шкафу с принудительной конвекцией (Binder RF 53, Германия) [239].

2.5.1 Выделение кристаллизованного комплекса $Zn(Met)_2SO_4$

Кристаллизованный сульфат метионината цинка получали в результате реакции комплексообразования при смешивании водных растворов $ZnSO_4$ и Met. Равновесную концентрацию продукта оценивали при различных соотношениях металл-лиганд на основе данных констант стабильности аминокислотных комплексов цинка (Раздел 2.1.3) [229]. Заведомо избыточное количество лиганда ($Zn : Met = 1 : 20$) сдвигает реакцию комплексообразования в сторону получения комплекса $Zn(Met)_2$. Однако в таком случае избыток аминокислоты остается в системе при испарении растворителя и кристаллизации осадка. В дальнейшей экспериментальной работе металл и лиганд использовали в стехиометрическом соотношении $Zn : Met = 1 : 2$, чтобы исключить описанный эффект. Концентрация комплексообразующего агента и лиганда составляла 67 ммоль/л и 134 ммоль/л для Zn^{2+} и Met, соответственно. Полученный раствор доводили до значения pH изоэлектрической точки метионина ($pI = 5.74$) с добавлением 8.5% NaOH, чтобы исключить осаждение $Zn(OH)_2$ при нейтральных значениях pH.

Кристаллизованный комплекс метионината цинка выделяли путем испарения растворителя из маточной среды при комнатной температуре ($t = 20-25^{\circ}C$) до получения сухого остатка с постоянной массой. При приготовлении исследуемых растворов использовали лабораторное оборудование - аналитические лабораторные весы AS 220.x2 (Radwag, Польша), pH-метр базовый PB-11 (Sartorius, Германия). Вероятный состав полученных кристаллов - $Zn(Met)_2SO_4$.

2.6 Физико-химические и химические методы исследования метионината цинка

2.6.1 Определение растворимости

Оценку растворимости образцов в воде проводили в соответствии с градацией методики Государственной фармакопеи РФ по условному соотношению объема растворителя, приходящегося на 1.0 г субстанции [240].

Исследуемое соединение предварительно растирали в тонкий порошок в фарфоровой ступке. Затем к точной навеске порошка прибавляли отмеренное количество воды очищенной и непрерывно встряхивали в течение 10 мин при $20 \pm 2^\circ\text{C}$. В научной периодике не представлены данные о растворимости метионината цинка, поэтому определение проводилось по методике, предназначенной для веществ с неизвестной растворимостью. Вещество считалось растворившимся, если в растворе при наблюдении в проходящем свете не наблюдались частицы вещества.

2.6.2 Метод динамического рассеяния света

Для исследования дисперсного состава растворов образцов, полученных в результате теста на *растворимость*, применяли метод динамического рассеяния света (ДРС) с использованием Zetasizer Nano ZSP (Malvern Panalytical, Великобритания). Метод фотонной корреляционной спектроскопии (квазиупругого рассеяния света, Dynamic Light Scattering, DLS) основан на анализе броуновского движения частиц дисперсной фазы в дисперсионной среде, что приводит к флуктуациям локальной концентрации частиц, локальным неоднородностям показателя преломления и флуктуациям интенсивности рассеянного света. [241]. Анализ корреляционной функции флуктуации интенсивности рассеянного света позволяет получить распределение частиц дисперсной фазы по их размерам.

Для проведения дисперсного анализа анализируемых образцов использовали одноразовые полистирольные кюветы, в которые вносили 1 мл исследуемого раствора. Для каждого образца рассчитано среднее значение размера частиц дисперсной фазы по результатам трех повторных измерений, включавших по 12 прогонов. Значение показателя преломления водных растворов метионината цинка составило 1.3365. Результаты дисперсного анализа растворов представлены в виде размерных спектров зависимости доли присутствующей фракции частиц (относительный вклад в общую интенсивность рассеяния, %) от их диаметра (нм).

2.6.3 Инфракрасная спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (ИК НПВО)

Для описания структуры и анализа колебательных спектров синтезированного и кристаллизованного комплекса в спектральном диапазоне от 4000 до 750 см^{-1} проводили с помощью ИК Фурье-спектрометра Cary 630 (Agilent, США) с приставкой НПВО с алмазным кристаллом. Разрешение составило менее 2 см^{-1} , точность волнового числа – 0.05 см^{-1} , воспроизводимость волнового числа – 0.005 см^{-1} . Толщина поглощающего слоя – 1.5 нм (зажимное устройство гарантирует установку оптимального и воспроизводимого давления). Управление прибором, измерения и обработка осуществлялась с помощью программного обеспечения Agilent MicroLab Expert. Для подтверждения наличия колебаний характеристических связей в синтезированном и кристаллизованном комплексах L-метионин и метионинат натрия были выбраны в качестве контролей и исследованы при тех же условиях измерения. Метионинат натрия был получен по следующей методике: к суспензии L-метионина (2 моль) в воде прибавляли гидроксид натрия (2 моль), перемешивали в течение 10 минут до полного растворения метионина и нагревали смесь до 60⁰С. Далее метионинат натрия выделяли путем выпаривания растворителя из маточной среды при 105⁰С в сушильном шкафу с принудительной конвекцией (Binder RF 53, Германия) до получения сухого остатка с постоянной массой. Результаты спектрального анализа представлены в виде зависимости пропускания электромагнитного излучения в инфракрасной области (Т, %) от волнового числа (ν , см^{-1}).

2.6.4. Рентгеновская флуоресцентная спектроскопия

Контроль присутствия цинка в полученных образцах проводили методом рентгенофлуоресцентного анализа (РФА). Энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр EDX-7000 (Shimadzu, Япония), оснащенный программным обеспечением PCEDX-Navi (Shimadzu, Япония), использовался в исследовании в качестве неразрушающего метода определения

содержания цинка в синтезируемом комплексе метионината цинка. Диапазон измеряемых элементов составил $^{11}\text{Na} - ^{92}\text{U}$; генератором рентгеновского излучения является трубка с Rh-анодом, охлаждаемая воздухом; напряжение 4–50 кВ, ток 1–1000 мкА; облучаемая область – коллиматор диаметром 10 мм, размер камеры анализа - 300 мм x 275 мм x 100 мм. В качестве детектора используется кремниевый дрейфовый детектор (SDD), метод подсчета – цифровой счетный фильтр; в работу прибора заложена автоматическая смена фильтров, излучающих длины волн соответствующих элементов. Спектр рентгеновской флуоресценции для каждого измерения регистрировали при одних и тех же настройках прибора: майларовая пленка, ширина коллиматора - 10 мм, время экспозиции - 100 сек, атмосфера - воздух; количество повторных измерений для одного образца $n = 3$. Интенсивность сигнала флуоресценции измеряли при K_{α} и K_{β} линиях цинка (8.632 и 9.572 кэВ, соответственно). Качественный анализ проб проводили по наличию пиков характеристической флуоресценции элементов при соответствующих значениях энергий излучений на РФС-спектрах. Количественное содержание анализируемого элемента определяли по значению интенсивности рентгеновской флуоресценции методом градуировочного графика с использованием стандартных образцов. Результаты, полученные с использованием метода РФА, представлены в значениях интенсивности флуоресценции, выраженных в cps/мкА (cps - интенсивность линии в стандартных единицах (отсчет в секунду), мкА - сила тока).

2.6.5 Термогравиметрический анализ

Термогравиметрический анализ (ТГА) использовали для определения содержания цинка (%) в синтезированном координационном комплексе $\text{Zn}(\text{Met})_2$. Исследование проводили с использованием Thermal Analysis System TGA/DSC 3⁺ (Mettler Toledo, Швейцария), образец массой 10 мг помещали в алюминиевый тигель объемом 150 мкл. Измерения проводили в среде атмосферы кислорода, скорость нагрева – $10 \text{ K} \cdot \text{мин}^{-1}$, диапазон температур 298 – 1273 К. Результаты термогравиметрического анализа представлены в виде графика зависимости

изменения массы образца от температуры.

2.6.6 Комплексометрическое титрование

Государственная фармакопея РФ 14 издания для фармацевтических субстанций, содержащих катионы цинка, предусматривает проведение количественного их анализа методом комплексометрии [219,242].

Титрант, 0.05 М раствор трилона Б, был предварительно приготовлен в лаборатории следующим образом: содержание фиксаналя количественно перенесли в коническую колбу объемом 1 л, содержащую 400 мл воды очищенной температурой 70-80⁰С. После полного растворения перенесенного вещества раствор охладили до 20⁰С и количественно перенесли в мерную колбу. Объем раствора титранта довели до метки тем же растворителем и тщательно перемешали. Точную навеску около 200 мг синтезированного комплекса растворяли в воде очищенной объемом 100 мл при добавлении 5 мл аммиачного буферного раствора (рН 10.0) и титровали 0.05 М раствором натрия эдетата в присутствии эриохрома черного Т до синего окрашивания (n = 3). По количеству затраченного титранта рассчитывали содержание цинка в синтезированном хелатном комплексе.

Метод комплексометрического титрования также был использован в работе как валидированный арбитражный метод при разработке РФА методики определения содержания цинка в синтезированном комплексе.

2.6.7. Дифференциальная сканирующая калориметрия

Метод дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК) применяется для изучения термодинамических процессов фазовых переходов, в том числе полиморфных превращений, на основе измерения выделенного или поглощенного теплового потока (Вт/г) в зависимости от температуры нагрева образца (К). Метод ДСК применили для исследования явления полиморфизма в синтезированном $Zn(Met)_2$ и кристаллизованном $Zn(Met)_2SO_4$ комплексах с использованием Thermal

Analysis System DSC 3⁺ (Mettler Toledo, Швейцария) с системой охлаждения на жидком азоте, сенсор - HSS9⁺. В качестве контроля использовали субстанцию L-метионина. Измерения проводили последовательно в режиме нагрев – охлаждение – повторный нагрев в диапазоне температур (-223)–463–(-223)–463 К, в атмосфере N₂ (50.0 мл/мин), в алюминиевом тигле (V=40 мкл).

2.6.8 Поляриметрия

Оптическая активность была исследована для обоих видов хелатного комплекса цинка с метионином. Для синтезированного комплекса метионината цинка были приготовлены два раствора: 0.5% раствор в HCl (pH = -1) и 0.5% раствор в NaOH (pH = 12). В качестве контроля использовали 2% растворы метионина, приготовленные в таких же условиях: pH -1 и 12, соответственно.

Для изучения оптической активности цинка метионината в нейтральных и слабокислых водных растворах были приготовлены образцы с различными соотношениями Zn²⁺ : Met = 1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1 при условиях: 1) C(Met) = const = 2% (134 ммоль/л), при постепенном увеличении концентрации цинка; 2) pH = pI(Met) = 5.74. В качестве контроля использовали 2% водный раствор Met, приготовленный при тех же условиях.

Оптическую активность определяли с использованием поляриметра Atago POL-1/2 (Atago Co., LTD, Япония) при длине волны $\lambda = 589.3$ нм, длина оптического пути - 100 мм. Точность измерения $\pm 0.002^\circ$, разрешение – 0.0001° . Для контроля температуры (T=20 \pm 0.5⁰C) использовали электронный термостат с элементом Пельтье. Угол оптического вращения измеряли в течение 1 мин в 5 повторах.

Удельное вращение рассчитывали по формуле:

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha \times 100}{l \times c}, \quad (16)$$

где α — измеренный угол оптического вращения при 20 °C (°); C — концентрация исследуемого раствора (%); l — толщина оптического слоя (длина кюветы) (дм).

2.6.9 Рентгеновская порошковая дифрактометрия

Метод рентгеновской порошковой дифракции основан на анализе дифрактограммы, полученной при облучении исследуемого образца рентгеновскими лучами. При прохождении монохроматического рентгеновского излучения через поликристаллический образец (порошок) происходит их множественное рассеяние. Отраженные разными микрокристаллами вторичные рентгеновские лучи разной интенсивности позволяют проанализировать межплоскостные расстояния в кристалле и идентифицировать исследуемое вещество. Картины рентгеновской дифракции синтезированного $\text{Zn}(\text{Met})_2$ и кристаллизованного $\text{Zn}(\text{Met})_2\text{SO}_4$ комплексов были получены с помощью дифрактометра Bruker d8 advance с использованием излучения 1.541 \AA (Cu-K_α) при комнатной температуре в интервале значений углов 2θ $5-80^\circ$. В качестве контроля использовали субстанцию L-метионина. Все исследуемые образцы были нормированы по весу.

2.6.10 Математическая обработка результатов

Расчеты, обработка результатов анализа и построение калибровочных моделей проводились с использованием ПО Microsoft Office Excel, OriginPro 2017 (OriginLab, США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. Прогнозирование физико-химических и биологических свойств координационных соединений цинка с аминокислотами с применением молекулярных дескрипторов

Комбинация стерического, термодинамического и токсикометрического дескрипторов была использована для описания и прогнозирования свойств молекул десяти биогенных АК и их хелатных комплексов с цинком.

Адаптация алгоритма расчета индекса Балабана (J) для хелатных соединений заключалась в том, что при построении графов координационных соединений связи центрального атома с лигандами рассматривали как равнозначные варианты ковалентной полярной связи: связь Zn-O, образованная по обменному механизму, и связь Zn-N, образованная по донорно-акцепторному механизму (Рисунок 6).

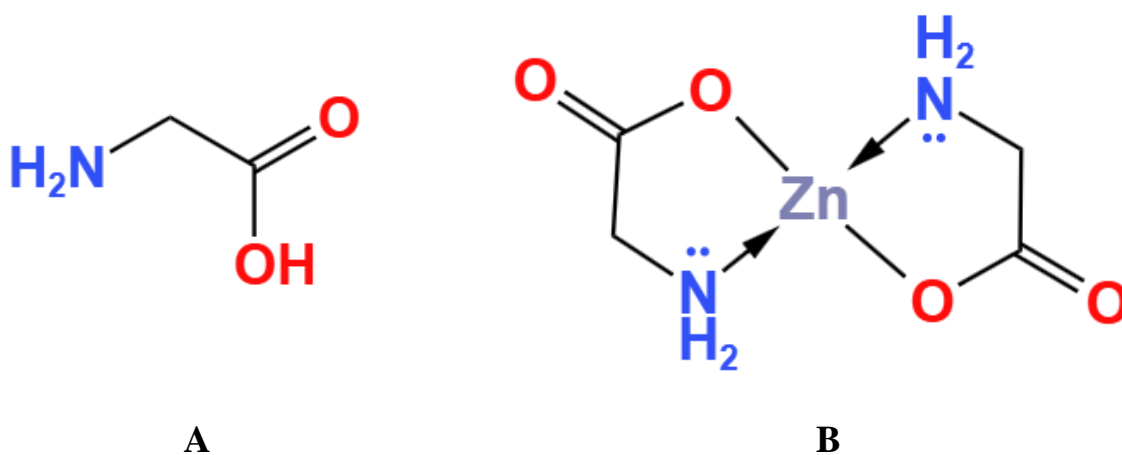


Рисунок 6. Молекулярные графы глицина (А) и его цинк-хелатного соединения – цинк глицината (В).

Полученные значения J и logP для исследуемых аминокислот и их цинк хелатных соединений представлены в Таблице 6.

Таблица 6. Значения индекса Балабана и коэффициента липофильности для исследуемых аминокислот и их цинк хелатных соединений.

Название	АК		Zn(АК) ₂	
	J	logP	J	logP
Gly	3.1974	-3.21	4.4268	-4.01
Ala	3.5523	-2.85	4.0092	-3.35
Val	3.8267	-2.26	3.3345	-1.79
Leu	3.6362	-1.52	2.9205	-0.73
Ile	3.8679	-1.72	3.0964	-0.79
Met	3.8694	-1.87	3.0553	-2.44
Thr	3.9231	-2.94	3.3977	-4.45
Lys	3.3287	-3.05	2.5290	-4.29
Trp	2.2250	-1.06	1.4497	-0.13
Phe	2.6425	-1.38	1.9064	-0.43

Необходимо отметить, что рассчитанное с использованием ПО Molinspiration v2018.10 и ALOGPS 2.1 значение logP для молекулы сульфата цинка составило – -4.16. Таким образом, полученные результаты подтверждают, что координация комплексообразователя лигандами приводит к уменьшению полярности иона металла благодаря перераспределению его положительного заряда между электродонорными группами лиганда, а также делокализации p-электронов по всей системе хелатных колец. Процесс хелатирования за счет снижения полярности центрального иона позволяет получить более липофильное металлосодержащее соединение, которое будет эффективнее проходить через клеточную мембрану и распределяться по тканям организма. Кроме того, образование координационных соединений с металлами способствует не только улучшению фармакокинетических показателей исходного лекарственного соединения, но и снижению его токсичности, получению препаратов с модифицированным высвобождением действующего вещества [134,140].

Для исследуемой выборки аминокислот и их хелатных соединений с цинком был построен график зависимости «структура» - «свойство», где по оси абсцисс откладывали значения топологического дескриптора (J), а на ординате соответствующие структурам значения липофильности (logP) (Рисунок 7).

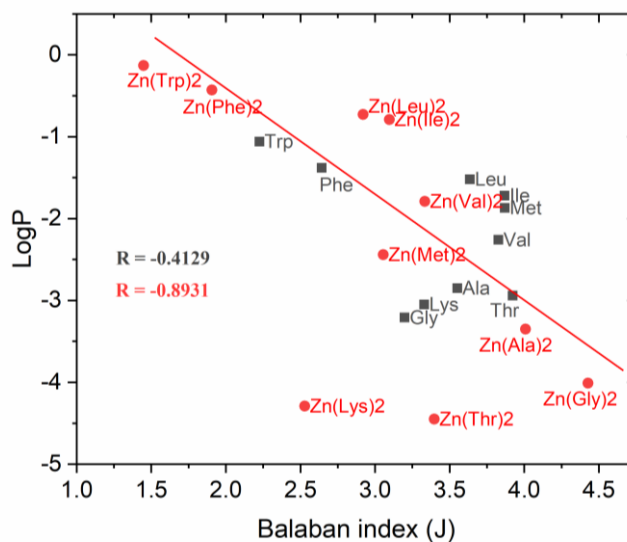


Рисунок 7. Зависимость структура (J) – свойство (logP) для исследуемой выборки биогенных аминокислот и их хелатных комплексов с цинком.

Дискриминирующая способность индекса Балабана в отношении отобранных десяти аминокислот оказалась низкой для различия их между собой по значениям липофильности. Однако введение катиона цинка в их структуру с образованием хелатных соединений изменило характер распределения значений: на графике для Zn(AK)₂ обнаружена линия тренда, близкая к линейной зависимости, за исключением Zn(Lys)₂ и Zn(Thr)₂. Последние два соединения выбиваются из общей закономерности, обозначенной выше – их полярность в результате реакции комплексообразования превысила контрольное значение logP, соответствующее молекуле сульфата цинка -4.16.

Согласно теории Ханша, для обеспечения возможности связывания с молекулами-мишенями новое полученное вещество должно обладать умеренной липофильностью - не быть высокогидрофильным и не проявлять исключительно липофильных свойств [243]. Это связано с тем, что молекулы ЛВ должны свободно циркулировать в кровотоке и, следовательно, быть растворимыми в

воде, а также проникать через клеточные мембраны, соответственно - быть растворимыми в жирах. Взаимосвязь между значением $\log P$ и некоторыми биологическими реакциями часто является обратной параболической, когда максимум биологического ответа наблюдается при некотором среднем оптимальном значении $\log P$ [244]. Из набора анализируемых соединений указанным критериям в большей степени соответствовал цинка метионинат, со значением $\log P = -2.44$.

В качестве третьего, токсикометрического дескриптора, использовали экспериментально полученные значения кажущейся энергии активации лиганд-индуцированной клеточной гибели изолированной клетки организма *Spirostomum ambiguum* ($^{obs}E_a$) [19]. Для проведения эксперимента из исследуемого пула аминокислот были выбраны пять — Phe, Val, Met, Ala, Gly, для которых после реакции комплексообразования значения J оказались наиболее близки к линии тренда (Рисунок 7), а коэффициент распределения октанол-вода отличался наибольшей вариабельностью.

Полученные величины кажущейся энергии активации аминокислот оказались соотносимы с рассчитанными ранее значениями липофильности веществ: фенилаланин характеризуется наибольшей энергией активации (120 ± 6 кДж/моль, $n=5$), в то время как глицин имеет минимальное значение в исследуемой выборке (73.8 ± 15.5 кДж/моль, $n=5$) (Рисунок 8).

Несмотря на то, что стандартные отклонения результатов биологического эксперимента не позволяют расценивать отличия между аминокислотами, как достоверные, прослеживается прямая зависимость между значением $\log P$ (термодинамическим дескриптором) аминокислоты и ее показателем токсичности $^{obs}E_a$ (токсикометрическим дескриптором): чем гидрофильнее молекула, тем большее воздействие она оказывает на клеточный биосенсор (Рисунок 9).

На основании полученных данных можно сделать заключение о преимущественном энергозависимом транспорте аминокислот внутрь организма *Sp. ambiguum* посредством специфических переносчиков [9].

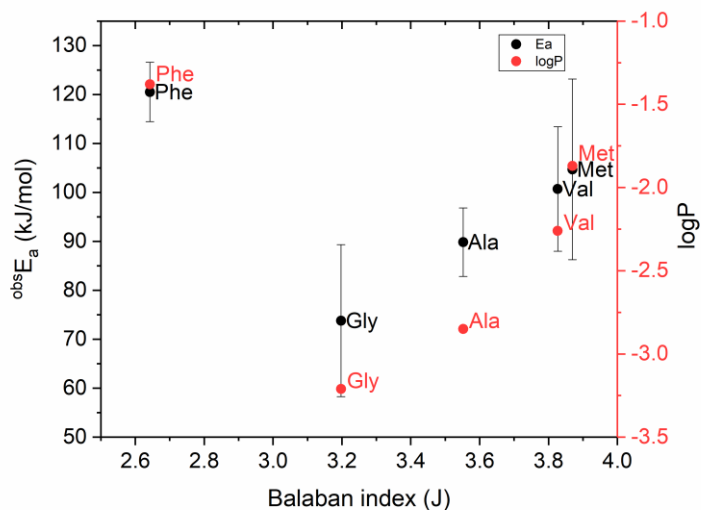


Рисунок 8. Зависимость структура (J) – свойство ($^{obs}E_a$, logP) для исследуемой выборки биогенных аминокислот.

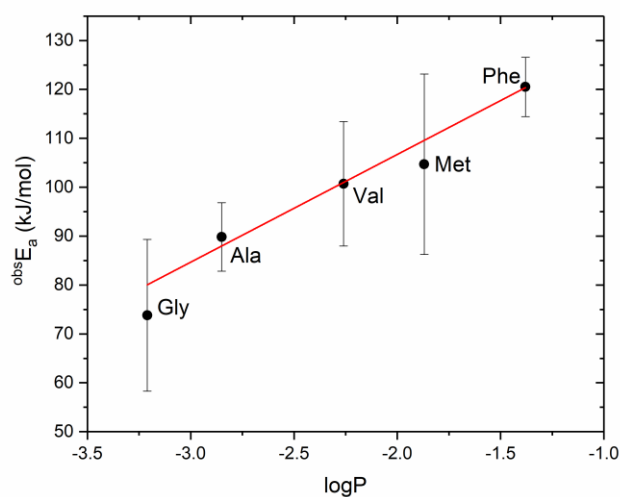
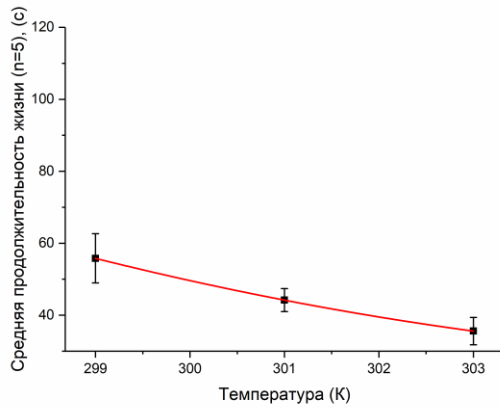


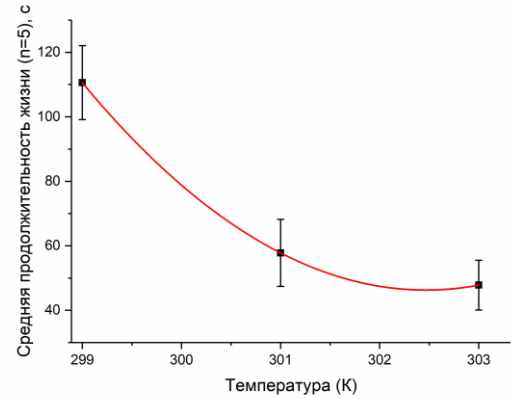
Рисунок 9. Зависимость показатель токсичности ($^{obs}E_a$) – липофильность (logP) для исследуемой выборки биогенных аминокислот.

Для постановки эксперимента и выбора рабочих концентраций исследуемых растворов цинк-хелатных соединений были рассчитаны равновесные концентрации продуктов реакции и определена продолжительность жизни клеточного биосенсора при двух вариантах стехиометрических соотношений комплексообразователь – лиганд: 1:2 и 1: 20 ммоль/л (Рисунок 10 А и В).



$[\text{Zn}(\text{Val})_2] = 0.9255 \text{ ммоль/л}$, но $[\text{Zn}^{2+}] \neq 0$

A



$[\text{Zn}(\text{Val})_2] = 0.9921 \text{ ммоль/л}$, $[\text{Zn}^{2+}] \rightarrow 0$

B

Рисунок 10. Зависимость средней продолжительности жизни клеточного биосенсора *Sp. ambigua* от температуры в прямых координатах при инкубации инфузории в растворе цинк валината, полученного при смешивании водных растворов ZnSO_4 и Val в соотношении 1: 2 (**A**) ($C(\text{ZnSO}_4) = 1 \text{ ммоль/л}$, $C(\text{Val}) = 2 \text{ ммоль/л}$) и 1: 20 (**B**) ($C(\text{ZnSO}_4) = 1 \text{ ммоль/л}$, $C(\text{Val}) = 20 \text{ ммоль/л}$).

Полученные экспериментальные результаты демонстрируют, что при соотношении металл-лиганд 1 ммоль к 2 ммоль (Рисунок 10 А) отсутствует зависимость скорости гибели *Sp. ambigua* от температуры: стандартные отклонения не позволяют различить результаты средней продолжительности жизни инфузории при разных температурах среды. При соотношении цинк-аминокислота 1 к 20 ммоль (Рисунок 10 В) наблюдается экспоненциальная зависимость скорости гибели клеточного биосенсора от температуры среды. К тому же, расчеты равновесных концентраций цинк-хелатных соединений демонстрируют, что концентрация продуктов комплексообразования стремится к 1 ммоль/л при условии использования значительного избытка лиганда (Раздел 2.1.3). Поэтому для определения значений токсикометрического дескриптора координационных соединений цинка с аминокислотами использовали металл и лиганд в стехиометрическом соотношении 1:20, соответственно. Введение иона металла в раствор аминокислоты привело к увеличению скорости гибели инфузории при ее инкубировании в испытуемой среде. Данные о средней

продолжительности жизни *Sp. ambigua* в растворах аминокислоты и ее хелатного соединения с цинком при одинаковом значении температуры приведены в Таблице 7.

Таблица 7. Средняя продолжительность жизни клеточного биосенсора *Sp. ambigua* ($\bar{t}_{ж} \pm SD$, n=5) в растворах валина, сульфата цинка и валината цинка при температуре 299 К.

	C(Val) = 150 ммоль/л	C(ZnSO ₄) = 1 ммоль/л	C(Zn(Val) ₂) = 1 ммоль/л
$\bar{t}_{ж} \pm SD$, с	1216 ± 320	61 ± 6	111 ± 12

Полученные результаты свидетельствуют о том, что процесс хелатирования иона металла лигандами приводит к уменьшению полярности комплексообразователя и снижению его токсичности, а также позволяет получить новое соединение с измененной биологической активностью. Экспериментально установленная концентрация Zn²⁺ и аминокислоты, обеспечивающая оптимальную продолжительность жизни инфузории (до 5 минут при 299 К), составила 2 ммоль/л и 40 ммоль/л, соответственно.

При координации цинком исследуемых аминокислот зависимость «структура (J) – свойство (^{obs}E_a)» приобрела вид, близкий к линейной, как и в случае зависимости «структура (J) – свойство (logP)» (Рисунок 11). Так, результат биологического эксперимента, с одной стороны, демонстрирует строгую взаимосвязь энергии активации, как интегрального параметра биологической активности, с таким физико-химическим параметром соединения как липофильность, а, с другой стороны, указывает на корректность использования адаптированного индекса Балабана для описания и прогноза свойств хелатных структур.

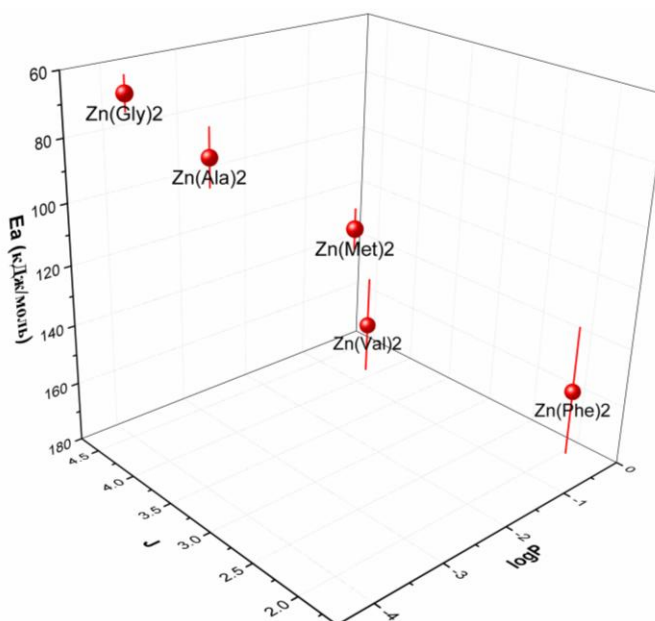
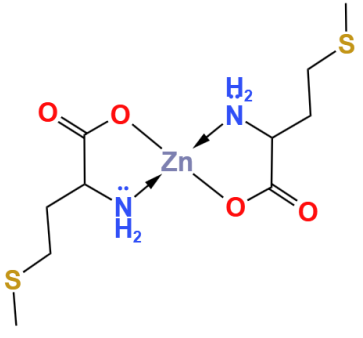


Рисунок 11. Взаимосвязь стерического, физико-химического и токсикометрического дескрипторов молекул координационных комплексов цинка с биогенными аминокислотами.

ККСА подход с комбинацией трех видов дескрипторов позволил наиболее точным образом установить и отобрать перспективное соединение из группы хелатных комплексов цинка с аминокислотами (метионинат цинка), обладающее более высокой биологической активностью, чем глицинат цинка, антибактериальный эффект которого был доказан ранее [140,170,245,246]. К тому же, выделенная молекула-кандидат была проанализирована на соответствие критериям прототипа активного лекарственного средства с помощью правила Липинского («правила пяти») [247,248]. Данное эмпирическое правило позволяет сузить спектр поиска новых молекул и определить, отвечает ли выбранное химическое соединение физическим, химическим и пространственно-структурным требованиям активного фармацевтического ингредиента. Полученные результаты приведены в Таблице 8.

Таблица 8. Результат анализа соответствия молекулы-кандидата критериям правила Липинского.

Критерий	Результат анализа	Структурная формула молекулы-кандидата
Не более 5 донорных водородных связей	Соответствует (2 центра)	 <p>Метионинат цинка</p>
Не более 10 акцепторных водородных связей	Соответствует (6 центров)	
Молекулярная масса соединения < 500 г/моль	Соответствует (Mr = 361.42 г/моль)	
Коэффициент распределения октанол-вода ($\log P$) ≤ 5	Соответствует ($\log P = -2.44$)	

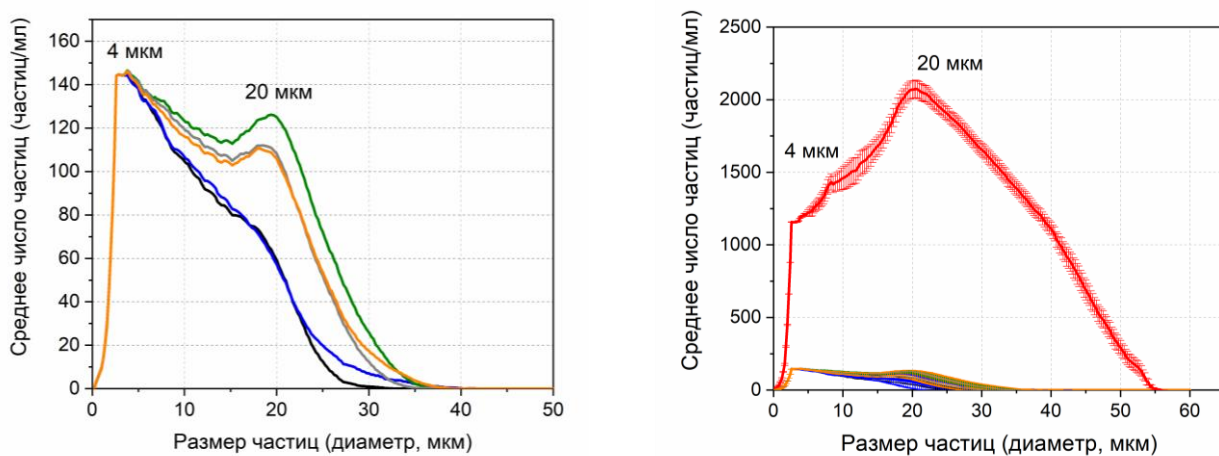
Выделенная молекула-кандидат соответствует критериям правила Липинского.

3.2. Исследование ингибирующего действия хелатных соединений цинка на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре бактерий *E.coli*

Бактерии многих видов способны образовывать надклеточные формы (биопленки) – структурно-функциональное сообщество микроорганизмов, образованное на поверхности раздела фаз, заключенных в синтезированный ими матрикс из внеклеточных полимерных веществ [249]. Образовавшиеся многоклеточные ассоциации бактериальных клеток имеют измененный фенотип по сравнению с одиночными, планктонными клетками, что дает им определенные преимущества в устойчивости перед колониями [250]. Способность микроорганизмов образовывать полицеллюлярные формы рассматривается как фактор их патогенности. Известно, что образование биопленок на поверхности медицинского оборудования (имплантатов, катетеров, протезов и т.д.) приводит к возникновению множества хронических инфекций ввиду формирования

клеточных ассоциатов на различных органах и тканях в организме человека [251,252]. Патогенные бактерии, формируя биопленки, снижают биодоступность антибиотиков и способствуют горизонтальному переносу генов вирулентности, что приводит к развитию организмов с множественной лекарственной устойчивостью [253].

В настоящем разделе исследования изучали влияние хелатных комплексов цинка с аминокислотами $Zn(AA)_2$ на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре бактерий *E. coli BL 21* [254]. Присутствие многоклеточных форм исследуемых бактерий, культивируемых в стандартных условиях в жидкой питательной среде, детектировали с помощью лазерного измерителя дисперсии “Кластер-1”— ИДЛ-1 [234]. Принцип работы данного устройства основан на явлении малоуглового лазерного рассеяния света, при этом прибор предоставляет данные о распределении клеток по количеству и размерам, что, в свою очередь, позволяет охарактеризовать морфофункциональное состояние бактериальной популяции [250]. Результаты численного распределения бактериальных клеток в культуре *E. coli BL 21* в исследуемых образцах $Zn(AA)_2$ и контроле приведены на Рисунке 12.



А

В

Рисунок 12. Сравнительное исследование хелатных комплексов $Zn(AA)_2$ по их ингибирующему влиянию на образование биопленок ($n=3$), красный – положительный контроль, черный – раствор $Zn(Ala)_2$, синий - раствор $Zn(Met)_2$, зеленый - раствор $Zn(Val)_2$, серый - раствор $Zn(Gly)_2$, оранжевый - раствор

Zn(Phe)₂ (A), среднее численное распределение частиц по размерам в контрольном (красный) и исследуемых растворах комплексов аминокислот с цинком ($\bar{X} \pm SD$, n=3) (B).

Дисперсный анализ позволил обнаружить жизненные формы размером от 0.4 до 60 мкм во всех исследуемых образцах, при двадцатикратном численном преимуществе клеток в контрольном образце (Рисунок 12 B). В контрольном образце максимум численного распределения клеток приходится на фракцию размером 20 мкм, что указывает на наличие клеточных ассоциатов в растворе. Фракции меньших размеров, соответствующие одиночным клеткам, и фракции больших размеров, характерных для крупных агломератов, также присутствуют в контрольном растворе.

В исследуемых растворах цинка с валином, глицином и фенилаланином преобладают фракции частиц с размерами 4 мкм и 19 мкм (Рисунок 12 A). Однако в растворах комплексов цинка с метионином и аланином наблюдалась иная картина: при численном сохранении фракции одиночных клеток размером 4 мкм отмечено преимущественное влияние на образование клеточных агломератов — на графике отсутствует выраженный максимум при 19 мкм, наблюдается только пологое плечо (Рисунок 12 A).

При анализе распределения средней общей площади поверхности клеточных форм в зависимости от их размера в диапазоне от 0.4 мкм до 60 мкм в контрольном растворе обнаружены четыре размерные группы с максимальными значениями площади поверхности – при 5, 20, 30 и 37 мкм (13). Последние три максимума указывают на образование и присутствие клеточных ассоциатов различного размера в контрольном растворе [255]. В растворе цинка метионината был обнаружен пологий максимум, соответствующий группе клеточных форм с наибольшей площадью поверхности размером 8.6 мкм. Отсутствие каких-либо максимумов в размерном диапазоне частиц от 20 мкм до 60 мкм свидетельствует об ингибирующем влиянии метионината цинка на процесс образования биопленки в исследуемом растворе.

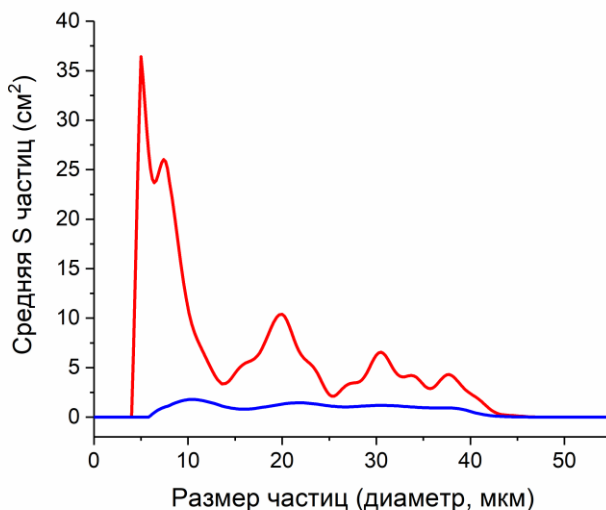


Рисунок 13. Сравнительное исследование средней общей площади поверхности частиц контрольного и испытуемого раствора метионината цинка в зависимости от их размера частиц ($n=3$), красный – положительный контроль, синий - раствор $Zn(Met)_2$.

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что все исследуемые комплексы цинка с аминокислотами обладают антибактериальной активностью и способны ингибировать процесс образования клеточных ассоциатов, что в целом согласуется с литературными данными [158,256].

Таким образом, при инкубации хелатных соединений цинка с бактериальной культурой было показано их влияние на направление равновесного процесса клеточных переходов при образовании клеточных агломератов — равновесие сместилось влево с преобладанием одноклеточных бактерий (Рисунок 14). В то же время отсутствие дисперсных частиц размером менее 6 мкм в растворе метионината цинка, показанном на Рисунке 13, может указывать на то, что при введении хелатных соединений цинка равновесие необратимо смещается в направлении гибели бактериальных клеток.

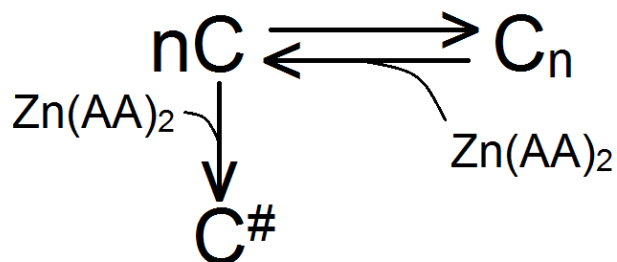


Рисунок 14. Схема клеточных переходов культуры бактерии при введении хелатного комплекса цинка, C – одиночная клетка, C_n - клеточные ассоциаты бактериальной культуры (биопленки), $C^\#$ - мертвые бактериальные клетки.

На основании характера численного распределения частиц в зависимости от их размера можно сделать вывод, что среди всех исследуемых хелатных соединений комплексы цинка с Met и Ala оказали наибольшее влияние на задержку бактериального роста культуры *E.coli*. Полученные экспериментальные данные и результаты ККСА моделирования, с учетом липофильности и установленной токсичности, ограничили выбор молекулы-кандидата метионинатом цинка. Предварительные результаты изучения его способности угнетать развитие биопленок (Рисунок 13), позволили приступить к оценке антибактериального действия метионината цинка на культурах стандартных и патогенных штаммов бактерий.

3.3 Исследование антибактериальной активности молекулы-кандидата в отношении стандартных тест-культур бактерий

3.3.1 Результаты определения антибактериальной активности молекулы-кандидата

Антимикробную активность метионината цинка оценивали методом диффузии в агар в отношении двух стандартных штаммов Гр «+» и Гр «-» бактерий: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* ATCC 25922, соответственно. Как и предполагалось, стандартный раствор канамицина

сульфата (1024 мкг/мл) продемонстрировал антибактериальную активность в отношении обоих штаммов микроорганизмов: диаметр зоны угнетения роста *S. aureus* ATCC 6538 составил 24 мм, *E. coli* ATCC 25922 – 28 мм (Рисунок 15).

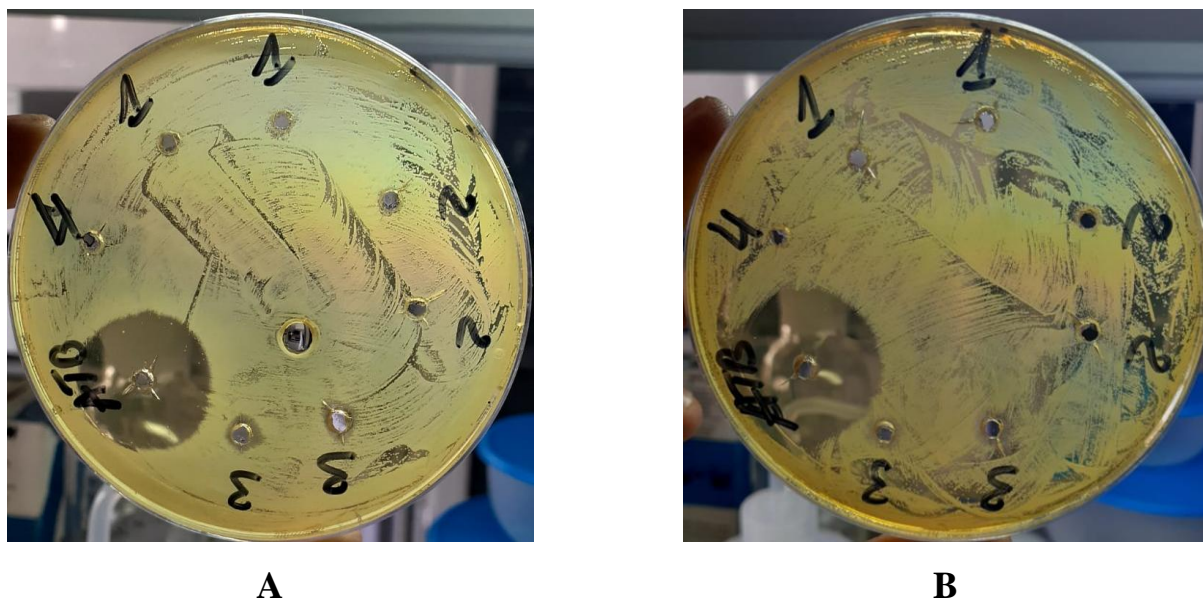


Рисунок 15. Антибактериальная активность испытуемого и контрольных растворов в отношении *S. aureus* ATCC 6538 (А) и *E. coli* ATCC 25922 (В): 204.80 ммоль/л водного раствора Met (1), 10.24 ммоль/л водного раствора $Zn(Met)_2$ (2), 10.24 ммоль/л водного раствора $ZnSO_4$ (3), вода очищенная (4), 1024 мкг/мл стандартного раствора канамицина сульфата (АТВ).

Контрольный раствор цинка сульфата в концентрации 10.24 ммоль/л продемонстрировал слабую антибактериальную активность – диаметр зоны задержки роста обоих стандартных штаммов составил 6.5 мм. В свою очередь, остальные контрольные образцы и исследуемый раствор метионината цинка в концентрации 10.24 ммоль/л показали отрицательные результаты (зоны ингибирования роста тест-культур бактерий отсутствуют).

3.3.2 Результаты определения минимальных ингибирующих концентраций молекулы-кандидата

Минимальные ингибирующие концентрации для водного раствора метионината цинка в концентрации 10.24 ммоль/л (3.7048 мг/мл) оценивали в отношении двух стандартных штаммов Гр «+» и Гр «-» бактерий (*S. aureus* ATCC 6538 и *E. coli* ATCC 25922) методом двукратного последовательного разведения. Полученные результаты позволили сделать окончательный вывод об отсутствии антибактериальных свойств молекулы-кандидата: в максимальной исследуемой концентрации хелатный комплекс цинка с метионином не подавляет рост стандартной культуры *E. coli* ATCC 25922. МИК $Zn(Met)_2$ в отношении *S. aureus* ATCC 6538 составила 0.463 мг/мл, что коррелирует с литературными данными [158]. Влияние метионината цинка на рост стандартных бактериальных культур показано на Рисунке 16. При работе в максимальной испытуемой концентрации $Zn(Met)_2$ отмечено ингибирование роста исследуемых микроорганизмов в диапазоне от 90 до 98%, при этом хелатное соединение продемонстрировало более выраженное антимикробное действие в отношении Гр «+» штамма бактерий. Аналогичные результаты получены несколькими группами ученых: грамотрицательные культуры бактерий характеризуются более высокими значениями толерантности к координационным соединениям аминокислот с металлами, чем грамположительные культуры [10,257,258]. Данные различия в чувствительности Гр «+» и Гр «-» микроорганизмов к исследуемым комплексам могут быть обусловлены различным строением их клеточных мембран: Гр «-» бактерии имеют более сложную клеточную стенку, состоящую из тонкого слоя пептидогликана и внешней мембраны, содержащей липополисахариды, в то же время Гр «+» бактерии защищены стенкой, состоящей преимущественно только из макромолекул пептидогликана [140,158].

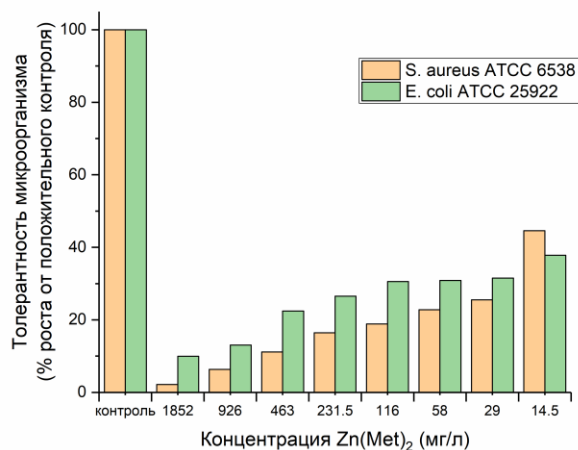


Рисунок 16. Антибактериальная активность метионината цинка в отношении бактериальных культур *S. aureus ATCC 6538* и *E. coli ATCC 25922*.

3.4 Исследование влияния молекулы-кандидата на формирование биопленок в культуре патогенных штаммов

Поиск антимикробных агентов, влияющих на жизнеспособность бактерий в биопленках, является перспективным направлением фармацевтических исследований за последние несколько десятилетий, поскольку формирование клеточных ассоциатов значительно снижает эффективность антибактериальной терапии инфекционных заболеваний [259,260].

В данном исследовании было отмечено, что Zn(Met)₂ ингибировал формирование клеточных ассоциатов у 8 штаммов бактерий (три Гр «+» штамма, три Гр «-» штамма и две стандартные культуры бактерий). Штаммы бактерий *Conybacterium spp 1638* и *Citrobacter freundii 426* были исключены из эксперимента, поскольку они не продемонстрировали способность образовывать биопленки и, следовательно, чувствительность к исследуемому образцу.

Как показано на Рисунке 17, все испытуемые растворы Zn(Met)₂ продемонстрировали активность в отношении процесса формирования биопленок – степень ингибирования увеличивается от 9.71 до 100% с ростом концентрации анализируемого комплекса. Результаты исследования демонстрируют селективность действия метионината цинка в отношении испытуемых культур.

Так, степень ингибирования образования биопленок штаммами бактерий *Streptococcus agalactiae* 3984, *Acinetobacter baumannii* 5841 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 при концентрации $Zn(Met)_2$ 3.84 ммоль/л составила > 80%, в то же время, данный показатель в культуре *Escherichia coli* ATCC 25922 при той же концентрации метионината цинка был равен 100%. Степень ингибирования формирования клеточных ассоциатов штаммами *Enterococcus cloacae* 6392 и *Escherichia coli* M17 составила менее 50% при максимальной исследуемой концентрации.

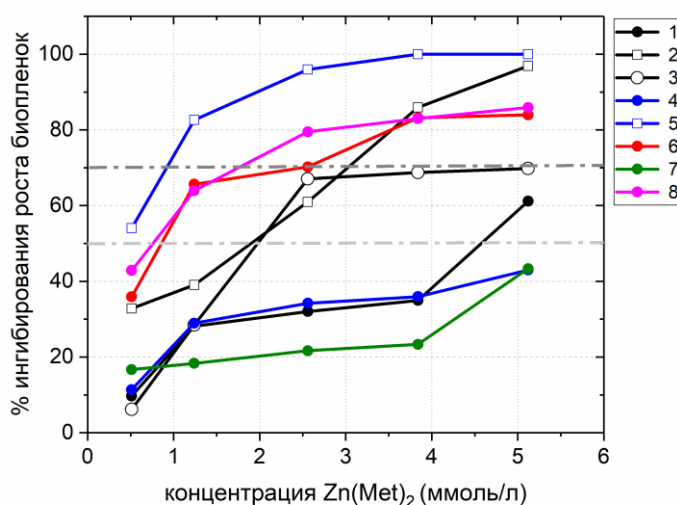


Рисунок 17. Ингибирующее влияние метионината цинка на формирование биопленок в культуре штаммов бактерий: *Staphylococcus aureus* 1449 (1), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (2), *Staphylococcus simulans* 5882 (3), *Escherichia coli* M17 (4), *Escherichia coli* ATCC 25922 (5), *Streptococcus agalactiae* 3984 (6), *Enterococcus cloacae* 6392 (7), *Acinetobacter baumannii* 5841 (8).

Полученные результаты показали, что высокая степень активности $Zn(Met)_2$ в отношении процесса формирования биопленок (степень ингибирования более 70%) была выявлена для штаммов бактерий: *Acinetobacter baumannii* 5841, *Streptococcus agalactiae* 3984, *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, умеренная активность исследуемого комплекса (от 50 до 70% ингибирования) была выявлена в отношении культур *Staphylococcus aureus* 1449 и

Staphylococcus simulans 5882, и, наконец, слабо выраженная активность (до 50%) – штаммы бактерий *Enterococcus cloacae* 6392 и *Escherichia coli* M17.

Высокие значения степени ингибирования биопленок (>70%) в культурах *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* ATCC 25922 могут быть обусловлены тем, что они являются стандартными Гр «+» и Гр «-» тест-штаммами для исследования антибактериальной активности лекарственных соединений без сформированной антибиотикорезистентности. *Escherichia coli* M17 – представитель нормального микробиоценоза кишечника человека. К тому же, данный штамм бактерий является продуцентом монокомпонентного пробиотика, содержащего лиофилизированную биомассу живых непатогенных и нетоксичных активных штаммов *E. coli*, и используется в качестве основного или вспомогательного лекарственного препарата при терапии заболеваний желудочно-кишечного тракта [261-263]. Низкие показатели степени ингибирования (<45%) свидетельствуют о том, что метионинат цинка не будет влиять на образование биопленок культурой *Escherichia coli* M17 на стенках кишечника, а, следовательно, нарушать нормальную микрофлору организма человека при систематическом приеме в качестве цинксодержащей биодобавки.

3.5 Синтез и исследование физико-химических и химических свойств метионината цинка (молекулы-кандидата)

Используя приведенные выше методики (Раздел 2.5) получили два соединения состава $Zn(Met)_2$ и $Zn(Met)_2SO_4$. Выход синтезированного продукта составил 70.3%, выход продукта после процесса кристаллизации не оценивали. Внешний вид полученных кристаллов хелатных соединений представлен на Рисунке 18: синтезированный метионинат цинка $Zn(Met)_2$ представляет собой белый кристаллический порошок, кристаллизованный метионинат цинка $Zn(Met)_2SO_4$ – бесцветные или белые игольчатые кристаллы. Предполагаемые структурные формулы обоих соединений приведены на Рисунке 19.

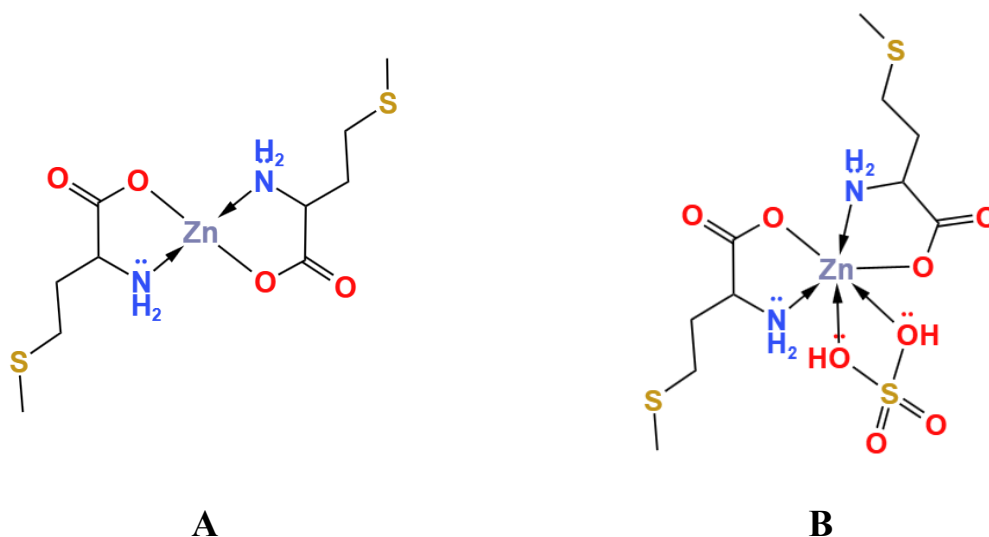


A



B

Рисунок 18. Внешний вид синтезированного метионината цинка $Zn(Met)_2$ (A) и кристаллизованного метионината цинка $Zn(Met)_2SO_4$ (B).



A

B

Рисунок 19. Гипотетические структурные формулы синтезированного метионината цинка $Zn(Met)_2$ (A) и кристаллизованного метионината цинка $Zn(Met)_2SO_4$ (B).

3.5.1 Оценка растворимости

Экспериментально было установлено, что синтезированный комплекс $Zn(Met)_2$ практически нерастворим в воде (на 1.0 г субстанции приходится более 10000 мл растворителя), кристаллизованный комплекс $Zn(Met)_2SO_4$ мало растворим в воде (на 1.0 г субстанции расходуется от 100 до 1000 мл растворителя).

3.5.2 Исследование дисперсного состава растворов

Полученные в результате определения *растворимости* образцов растворы были исследованы методом динамического лазерного рассеяния света для определения гидродинамического радиуса присутствующих частиц. Анализ корреляционной функции флуктуации интенсивности рассеянного света позволил охарактеризовать образовавшиеся дисперсные системы в растворах.

В нейтральном растворе синтезированного метионината цинка $Zn(Met)_2$ были детектированы частицы размером от 340 до 712 нм с максимумом при 460 нм. В то же время раствор кристаллизованного метионината цинка $Zn(Met)_2SO_4$ продемонстрировал бимодальное распределение частиц в диапазоне от 35 до 712 нм с максимумами при 79 и 396 нм (Рисунок 20). Картина объемного распределения частиц полностью повторяла результат, выраженный в единицах интенсивности.

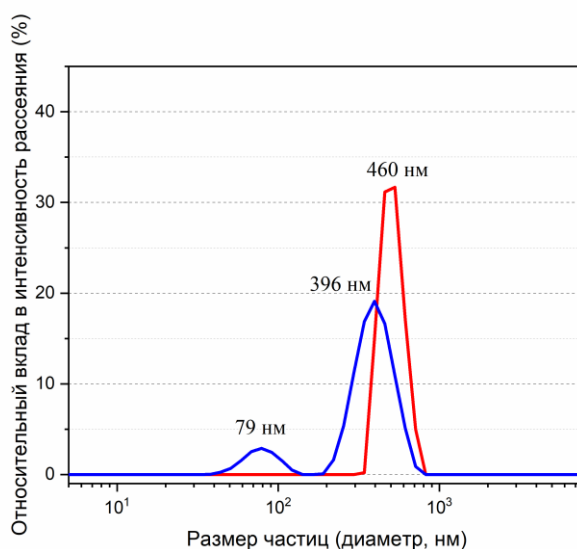


Рисунок 20. Дисперсный анализ растворов синтезированного $Zn(Met)_2$ (красный) и кристаллизованного $Zn(Met)_2SO_4$ (синий) комплексов ($n = 3$).

В результате растворения кристаллизованного метионината цинка в водном растворе отмечается присутствие фракции наночастиц, способной преодолевать клеточные мембраны как путем активного, так и пассивного транспорта. Полученные результаты оценки растворимости и дисперсного состава субстанций позволяют предположить, что кристаллизованное соединение по сравнению с

синтезированным $Zn(Met)_2$ может иметь более высокие показатели ADME и не требует дополнительных систем доставки в органы-мишени при пероральном применении. Вероятнее всего, улучшение растворимости в воде связано с присутствием сульфат-анионов в составе кристаллизованного метионината цинка [264].

3.5.3 Спектральный анализ синтезированного и кристаллизованного метионината цинка в ИК-области

Согласно литературным данным, для комплексов двухвалентных катионов металлов с метионином характерен O, N тип связывания без участия в комплексообразовании метилсульфидной группы [265]. Сравнение полученных ИК-спектров L-метионина, метионината натрия и синтезированного комплекса $Zn(Met)_2$ подтверждает предложенное строение (Рисунок 21). На ИК-спектре комплекса наблюдаются две полосы координированной аминогруппы ($3339, 3252 \text{ см}^{-1}$) с расщеплением между ними $\Delta\nu \approx 87 \text{ см}^{-1}$, последнее согласуется с представлениями о донорно-акцепторной связи между металлом и атомом азота аминогруппы [157]. На спектре синтезированного метионината цинка, как и метионината натрия, сохраняется полоса колебаний группы CH_3S- при 1327 см^{-1} , т.е. атом серы не участвует в координации цинка. На спектрах $NaMet$ and $Zn(Met)_2$ отсутствует полоса поглощения при 1503 см^{-1} , что свидетельствует об участии карбоксильной группы в образовании ковалентной полярной связи между O и Zn. Отсутствие значимых полос поглощения в области частот выше 3450 см^{-1} свидетельствует об отсутствии связи O-H, а, следовательно, молекул как кристаллизационной, так и адсорбированной воды.

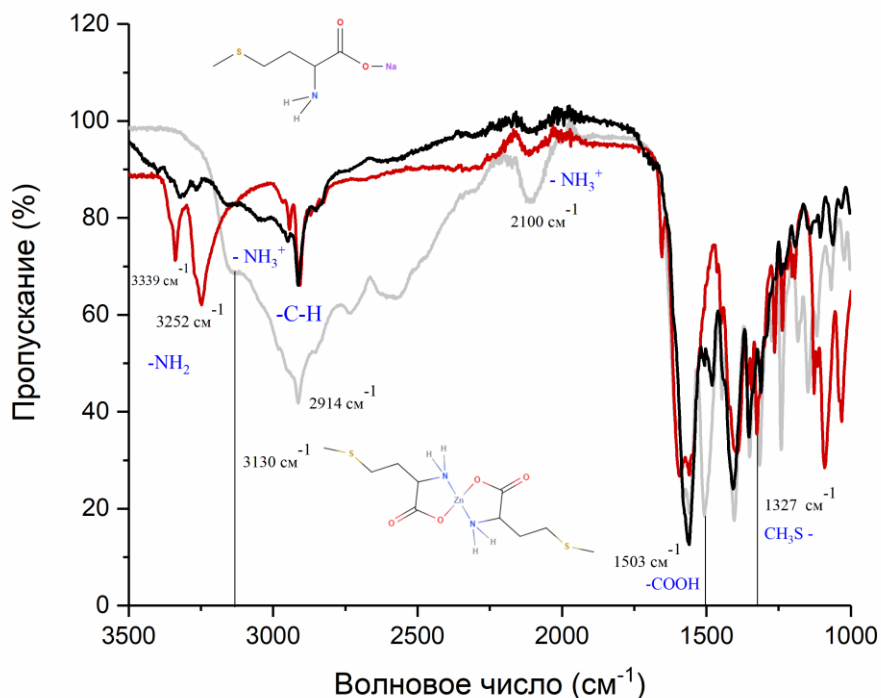


Рисунок 21. ИК-спектры НПВО L-метионина (серый), метионината натрия (черный) и синтезированного комплекса цинка метионината $Zn(\text{Met})_2$ (красный).

ИК-спектр метионина, метионината натрия и кристаллизованного комплекса метионината цинка приведены на Рисунке 22 А. На спектре кристаллизованного комплекса также сохраняется полоса колебаний группы $\text{CH}_3\text{S-}$ при 1327 см^{-1} , к тому же отсутствует полоса поглощения при 1503 см^{-1} , характерная для карбоксильной группы ($-\text{COOH}$). Однако на ИК-спектре кристаллизованного комплекса очень слабо выражены две полосы координированной аминогруппы ($3339, 3252 \text{ см}^{-1}$), в большей степени заметные на разностном спектре (Рисунок 22 В). Таким образом, на полученном ИК спектре ярко выражено формирование ковалентно-полярной связи O-Zn между металлом и остатком аминокислоты, а колебания донорно-акцепторной связи $\text{N}\rightarrow\text{Zn}$ выражены гораздо слабее.

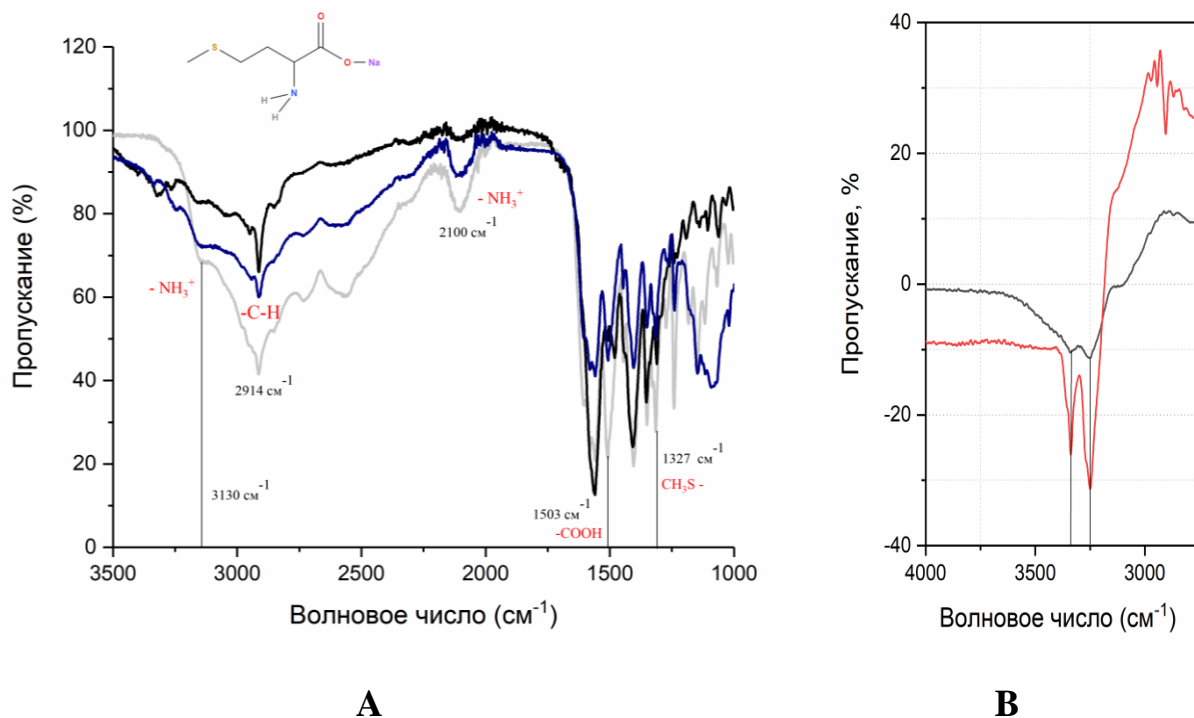


Рисунок 22. ИК-спектры НПВО L-метионина (серый), метионината натрия (черный) и кристаллизованного комплекса цинка метионината $Zn(\text{Met})_2\text{SO}_4$ (синий) (А), разностный ИК-спектр синтезированного (красный) и кристаллизованного (черный) комплексов и метионина (В).

На спектре метионина присутствуют полосы поглощения при 3130 и 2100 см⁻¹, что указывает на протонирование аминогруппы. Подобные колебания отмечены и на спектре кристаллизованного метионината цинка $Zn(\text{Met})_2\text{SO}_4$, что может свидетельствовать о присутствии свободного метионина в образце, т.е. образования комплекса в стехиометрическом соотношении $Zn : \text{Met} \neq 1 : 2$. Кроме того, отсутствие значимых полос поглощения в области частот выше 3450 см⁻¹ свидетельствует об отсутствии колебаний связи О-Н, а, следовательно, молекул кристаллизационной воды.

3.5.4 Рентгенофлуоресцентный анализ синтезированного и кристаллизованного метионината цинка

Рентгенофлуоресцентный анализ был использован для качественной оценки содержания цинка в синтезируемом и кристаллизованном комплексе метионината

цинка. Присутствие цинка в исследуемых образцах было доказано по наличию характеристического пика на РФС-спектрах при K_{α} и K_{β} линиях цинка (8.632 и 9.572 keV, соответственно) (Рисунок 23).

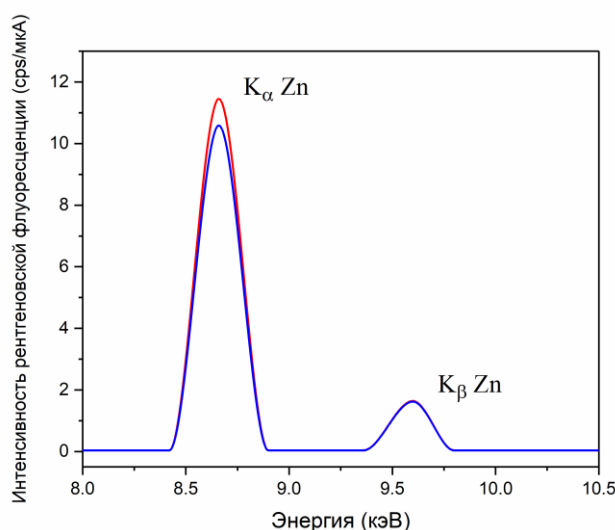


Рисунок 23. РФС-спектр синтезированного $Zn(Met)_2$ (красный) и кристаллизованного $Zn(Met)_2SO_4$ (синий) комплексов при характеристической энергии флуоресценции цинка - K_{α} линия цинка 8.632 кэВ и K_{β} линия цинка 9.572 кэВ.

3.5.5 Количественная оценка содержания цинка в синтезированном комплексе: термогравиметрический анализ и трилонометрия

Анализ полученных кривых ТГА и ДТГ позволил детектировать потерю в массе образца $Zn(Met)_2$ на 0.35% при нагреве его до 489К. Изменение в массе обусловлено потерей соединения неизвестного происхождения и не связано с испарением воды [157]. Начало процесса термодеструкции рассчитано по положению точки пересечения касательных на кривой потери массы (ТГА), окончание процесса – по отсутствию изменений в массе образца и выхода кривой на плато. Разложение синтезированного комплекса $Zn(Met)_2$ было зарегистрировано в диапазоне температур от 581 до 1073 К (Рисунок 24). Максимумы на кривых ДТГ соответствуют этапам потери массы образца вследствие различных процессов его термодеструкции.

На диаграмме ТГА/ДТГ наблюдаются две различные потери массы с максимальными скоростями разложения при 598 и 820 К. Потери массы на первом и втором этапах составили около 63.10% и 12.62% соответственно. Первая стадия разложения, детектированная в диапазоне от 573 до 673 К, может быть связана с потерей карбоксильной группы - декарбоксилирование синтезированного комплекса с улетучиванием CO_2 . Вторая стадия в диапазоне от 783 до 1073 К обусловлена потерей комплексом групп $-\text{NH}_2$ и $\text{CH}_3\text{S}-$ [157,266]. Согласно результатам термогравиметрического анализа содержание цинка в синтезированном хелатном комплексе составляет 19.23%, в то время как расчетное содержание Zn для комплекса, описанного формулой $\text{Zn}(\text{Met})_2$, составляет 18.07%.

Комплексонометрическое титрование синтезированного метионината цинка после его растворения в аммиачном буферном растворе (pH 10) показало, что среднее содержание цинка составляет 18.23% ($n = 3$, RSD = 1.18%).

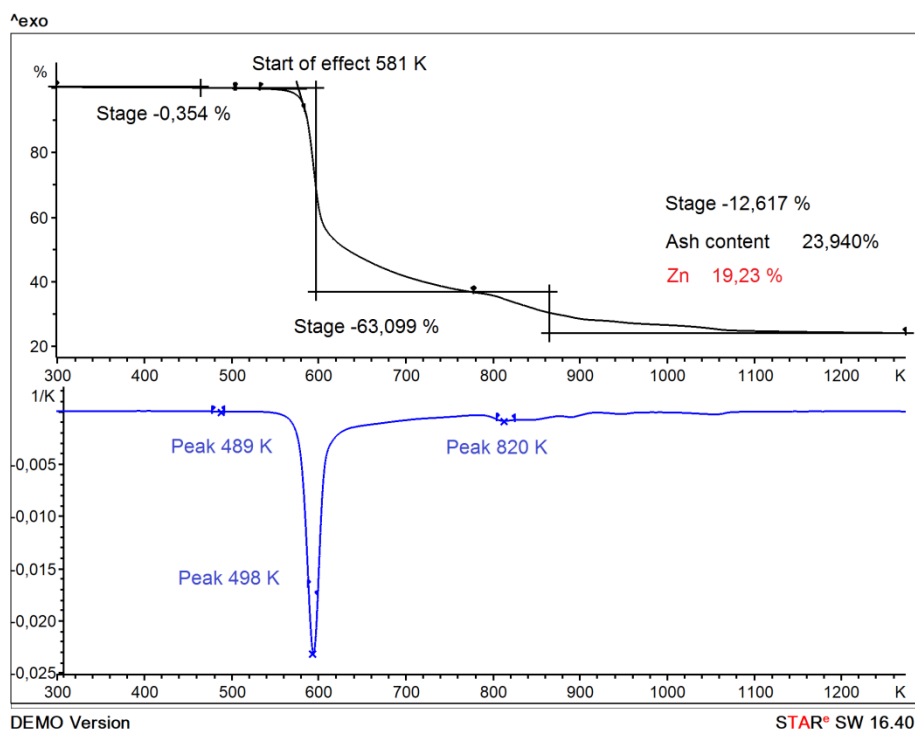


Рисунок 24. Кривые ТГА (черный) и ДТГ (синий) синтезированного комплекса $\text{Zn}(\text{Met})_2$, полученные нагреванием образца в среде атмосферы кислорода в диапазоне температур от 298 до 1273 К.

Результаты комплексонометрического титрования и термогравиметрического анализа свидетельствуют о нарушении стехиометрического соотношения цинка к метионину в синтезированном комплексе 1 : 2. Полученные результаты коррелируют с литературными данными, представляющими структуру метионината цинка таким образом, что один атом цинка связан с более чем двумя молекулами метионина, при этом каждая молекула метионина связана с более чем одним атомом цинка (Рисунок 25) [267].

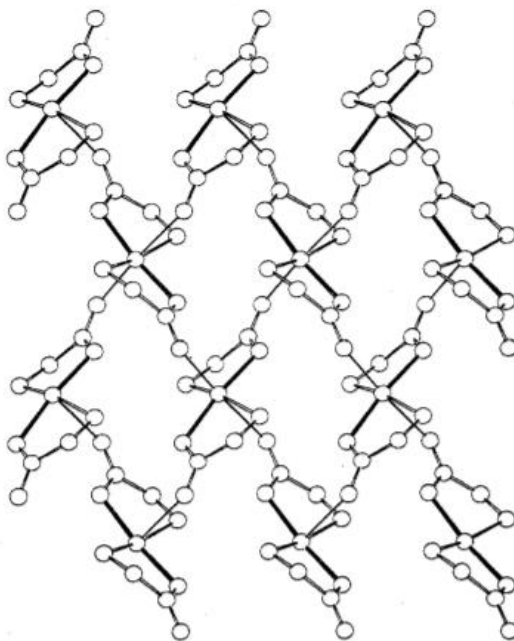


Рисунок 25. Полимерная октаэдрическая структура $Zn(Met)_2$: каждый атом Zn связан с двумя атомами азота ($-NH_2$) двух молекул аминокислоты (две короткие связи), с двумя атомами кислорода ($-OH$) двух молекул аминокислоты (две короткие связи) и с двумя карбонильными атомами кислорода двух других молекул метионина [267].

3.5.6 Дифференциальная сканирующая калориметрия синтезированного и кристаллизованного метионината цинка

Полученная кривая ДСК для порошка L-метионина приведена на Рисунке 27 (черный). Порошок L-метионина продемонстрировал типичную эндотермическую трансформацию при нагревании в диапазоне температур от 283 до 321 К с максимумом при 309 К. Известно, что для субстанций L- и DL-метионина

характерно явление полиморфизма. В ряде работ описаны три возможные кристаллические формы метионина: α , β и γ , а также процессы полиморфных переходов форм между ними [268-270].

Кристаллические структуры диморфов метионина не отличаются системой водородных связей, связывающих молекулы в двойных слоях. Как в α -, так и в β - полиморфных формах метионина атомы C₁, C₂, C₃, C₄ и S образуют почти плоскую зигзагообразную цепочку. В составе α -формы метионина за счет свободного вращения тиометильной группы -S-CH₃ атом C₅ лежит вне плоскости молекулы, тогда как для β -формы метионина он располагается в плоскости (Рисунок 26) [268,271].

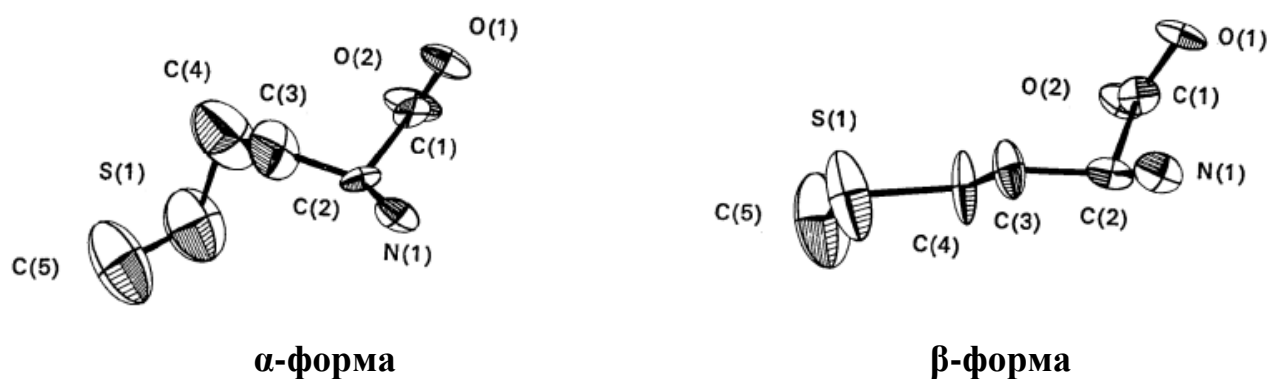


Рисунок 26. Кристаллические структуры α - и β - полиморфных форм L-метионина [268].

Диморфизм метионина обусловлен свободным вращением концевой группы -S-CH₃, которое приводит к двум различным способам достижения стабильной конфигурации бислоев с водородными связями, соединенных слабыми Ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями [268,269,271,272]. Известно, что термодинамическая точка перехода $\alpha \leftrightarrow \beta$ полиморфных форм метионина находится между 274 и 323 К. При этом кристаллы преобразуются послойно, без полного расслоения или разрушения, с фронтом перехода, который распространяется перпендикулярно слоям [269].

Согласно полученным результатам на кривых ДСК детектирована термодинамическая точка перехода $\beta \rightarrow \alpha$ формы L-Met, которая соответствует описанным данным (Рисунок 27). Переход полиморфных форм является

обратимым и воспроизводимым в течение повторяющихся циклов для одного и того же образца: после охлаждения и повторного нагрева было отмечено сохранение эндотермического пика при тех же температурах.

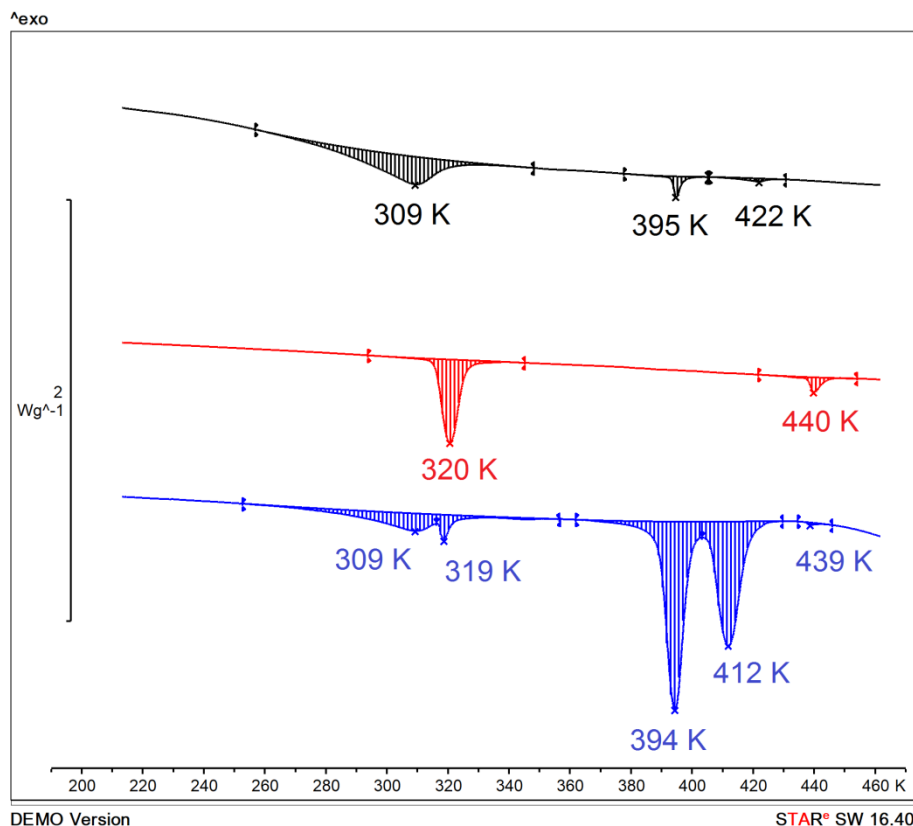


Рисунок 27. ДСК термограммы L-метионина (черный), синтезированного $Zn(Met)_2$ (красный) и кристаллизованного $Zn(Met)_2SO_4$ (синий) комплексов, полученных при первом нагревании образцов.

ДСК термограммы синтезированного и кристаллизованного метионинатов цинка также представлены на Рисунке 27 (красный и синий, соответственно). На термограмме для кристаллов синтезированного метионината цинка $Zn(Met)_2$ отмечено смещение термодинамической точки перехода ($\beta \rightarrow \alpha$): эндотермический пик зафиксирован в температурном диапазоне от 316 до 328 K с максимумом при 320 K. Полученные результаты подтверждают образование координационного соединения метионина, в то же время, свидетельствуют о возможном сохранении полиморфизма в структуре хелатного продукта $Zn(Met)_2$. На термограмме кристаллизованного комплекса $Zn(Met)_2SO_4$ отмечены два эндотермических пика

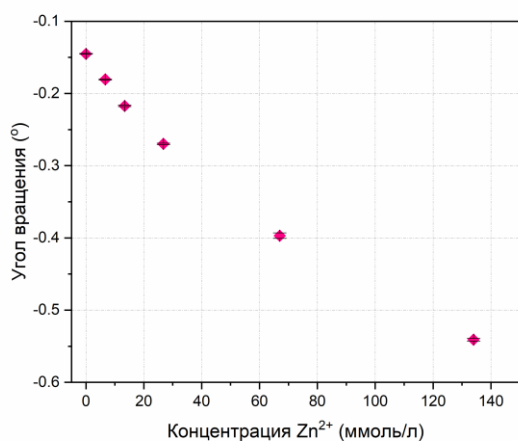
в температурном диапазоне от 283 до 327 К с максимумами при 309 К и 318 К, что свидетельствует о смешанной природе соединения. Максимум при 318 К свидетельствует о протекании реакции комплексообразования между Zn^{2+} и Met с образованием хелатного соединения цинка в одной из возможных полиморфных форм. Пик при 309 К подтверждает присутствие избытка свободного L-Met в β -форме в кристаллах $Zn(Met)_2SO_4$ после реакции комплексообразования и последующего удаления растворителя. Эндотермический переход при 394 К, который наблюдается на ДСК кривой L-метионина, также сохраняется на термограмме кристаллизованного комплекса, хотя имеет более выраженный максимум. Интересно отметить появление нового полиморфного перехода при 411 К, который не характерен ни для одного из описанных ранее соединений - вероятно, данный переход обусловлен образованием комплекса, содержащего сульфатные группы.

3.5.7 Исследование оптической активности

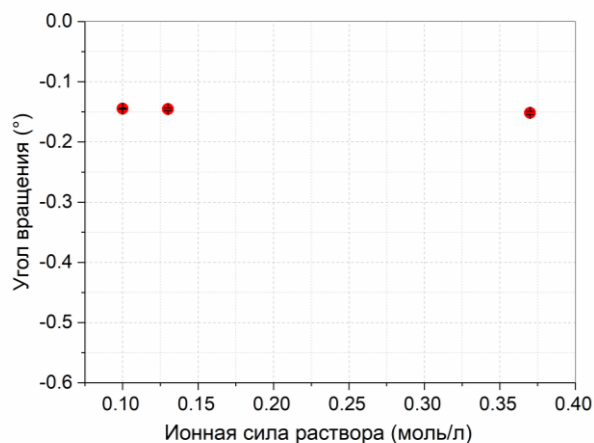
Исследования оптической активности водных растворов $Zn(Met)_2SO_4$ проводили при $pH = pI(Met) = 5.74$.

При смешивании растворов Zn^{2+} и Met в различных соотношениях оценка концентрации конечного комплексного продукта в полученном растворе представляется сложной задачей, поэтому результаты поляриметрического анализа представлены в виде зависимости угла вращения плоскости поляризованного света от концентрации Zn^{2+} в растворе. Контрольный раствор $ZnSO_4$ с концентрацией 6.7 ммоль/л, как и ожидалось, не проявляет оптической активности ($\alpha = 0.00^\circ \pm 0.00$, $n = 5$). При смешивании растворов, содержащих Zn^{2+} и Met в мольных соотношениях 1:20, 1:10, 1:5, 1:2, 1:1 отмечено, что оптическая активность полученных растворов отличается от оптической активности раствора метионина (Рисунок 28 А). Обнаружено формирование обратной экспоненциальной зависимости между значениями оптической активности полученных растворов и концентрацией ионов цинка в них: с увеличением концентрации Zn^{2+} уменьшается угол вращения плоскости поляризованного света.

Ионная сила растворов, как и ожидалось, незначительно возрастала с увеличением концентрации цинка, с 0.1 моль/л в растворе метионина с рН = 5.74 до 0.64 моль/л в растворе метионината цинка с максимальным содержанием металла и скорректированным значением рН. Для исследования влияния ионной силы на угол оптического вращения растворов были приготовлены контрольные растворы при следующих условиях: 1) $C(\text{Met}) = \text{const} = 2\%$ (134 ммоль/л); 2) $\text{pH} = \text{pI}(\text{Met}) = 5.74$; 3) $I(\text{контроля}) = I(\text{исследуемого раствора})$, полученного при смешивании Zn^{2+} и Met в мольных соотношениях 1:20 и 1:2 ($I = 0.13$ и 0.37 , соответственно); 4) ионную силу раствора увеличивали путем введения в раствор сильного электролита, который не способен образовывать координационные соединения с лигандами – натрия хлорида. Полученные результаты показали, что ионная сила не оказывает существенного влияния на угол вращения плоскости поляризованного света в растворе (Рисунок 28 В). С ростом концентрации катиона металла изменения в дисперсном составе растворов, связанные с возможным образованием коллоидных частиц $\text{Zn}(\text{OH})_2$, также не установлены.



А



В

Рисунок 28. Оптическая активность растворов метионина (134 ммоль/л) и цинка сульфата при протекании реакции комплексообразования при рН 5,74 в условиях повышения концентрации комплексообразователя ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n=5$) (**А**), изменение угла оптического вращения раствора с увеличением ионной силы в нем ($\bar{X} \pm \text{SD}$, $n=5$) (**В**).

В научной периодике описано явление формирования новой оси хиральности в хелатных соединениях аминокислот с металлами (Ni, Co, Cu, Pt и др.) за счет образования связей Me-O и Me-N: два аминокислотных остатка координируются с металлом с образованием *транс*- или *цис*- плоско-квадратной структуры с двумя хелатными кольцами [273-276]. Полученные нами в эксперименте значения оптической активности хелатного комплекса метионина с цинком подтверждают описанное в литературе явление: при увеличении концентрации катионов Zn^{2+} в растворе метионина возрастает доля координированных аминокислот и, соответственно, количество образованных новых осей хиральности. Однако, при смешивании растворов Zn^{2+} и Met в мольных соотношениях $> 1:1$ изменений оптического вращения полученных растворов не наблюдается. Данное явление можно объяснить формированием предельного количества координационных связей между свободной аминокислотой и катионами металла в мольном соотношении 1:1 с образованием максимально возможного количества новых осей хиральности. Последующее добавление избыточного количества Zn^{2+} (> 134 ммоль/л) не изменяет оптической активности раствора ввиду отсутствия в нем свободных лигандов.

При попытке измерить оптическую активность тех же образцов в нейтральной среде (pH=7.00) удалось получить результаты только для раствора с соотношением $Zn^{2+} : Met$ 1:20, для всех прочих комбинаций с более высоким содержанием хелатообразователя, начиная с раствора 1:10, наблюдалось выпадение аморфного осадка $Zn(OH)_2$. Полученные результаты свидетельствуют о смещении равновесия в сторону протекания конкурентного процесса осаждения в растворах (Рисунок 29).



Рисунок 29. Конкурентные процессы в водных растворах, содержащих Zn^{2+} и Met в различных молярных соотношениях, $pH=pI_{met}$.

Ключевым фактором, вероятно, является повышение равновесной концентрации $[Zn^{2+}]$ при постоянной концентрации лиганда $[Met]$ и постоянном

значении $\text{pH}=7.00$, отсюда $[\text{Zn}^{2+}] \times [\text{OH}^-]^2 > K_{\text{sp}} > \beta_2$. Логично, что в случае протекания комплексообразования в изоэлектрической точке ($\text{pH}=5.74$) наблюдается обратная картина: $K_{\text{sp}} < \beta_2$ - во-первых, из-за снижения концентрации гидроксид-анионов, а во-вторых по причине того, что при $\text{pH}=\text{pI}$ аминокислота присутствует в растворе в виде цвиттер-иона, а это, вероятно, облегчает процесс хелатирования металла (Рисунок 30). К тому же, экспериментально установлено, что для обеспечения плавного протекания реакции комплексообразования и получения продукта с минимальным содержанием раздражающих ионов, синтез хелатных соединений металлов с аминокислотами рекомендуется проводить при значениях pH среды – от 4.50 до 6.50 [277].

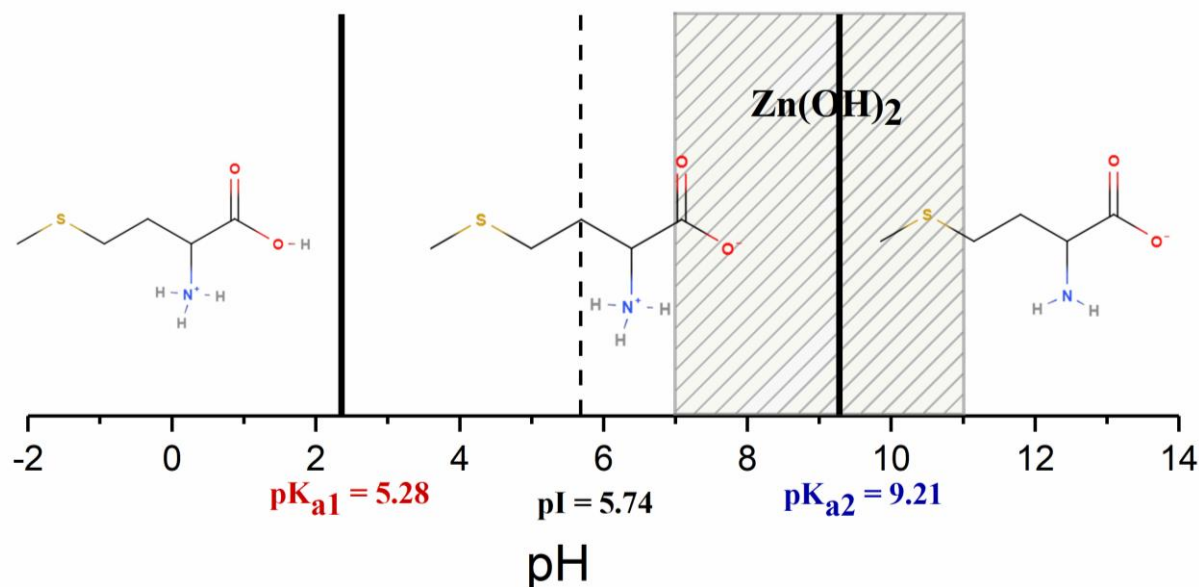


Рисунок 30. pH диаграмма метионина.

Синтезированный хелатный комплекс цинка с метионином $\text{Zn}(\text{Met})_2$ практически нерастворим в воде, поэтому его оптическая активность была исследована в водных растворах при $\text{pH} -1$ и 12 . В качестве контроля использовали 2% растворы метионина, приготовленные в аналогичных условиях. Для сравнения оптической активности исследуемых растворов в Таблице 9. приведены полученные результаты в единицах удельного вращения $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$.

Таблица 9. Удельное вращение водных растворов $Zn(Met)_2$ и Met при различных значениях pH.

pH	$[\alpha]^{20}_D \pm SD$	
	$Zn(Met)_2$	Met
-1	$+14.00 \pm 0.31$	$+23.24 \pm 0.06$
12	-2.64 ± 0.29	$+2.19 \pm 0.03$

Демонстрируются различия в оптической активности свободной аминокислоты и ее хелатного комплекса с цинком: значения удельного вращения растворов $Zn(Met)_2$ ниже вне зависимости от pH среды. К тому же щелочной раствор метионината цинка вращает плоскость плоско поляризованного света влево. Различия в значениях удельного вращения образцов и контроля подтверждают факт формирования в процессе синтеза хелатной структуры комплекса с новой осью хиральности, не разрушающейся под действием сильноокислой и сильнощелочной среды. Интересно отметить, что при измерении оптического вращения образца, полученного при смешении растворов сульфата цинка и метионина в соотношении 1 к 20, в условиях pH = -1 и pH = 14 не обнаружены достоверные отличия измеряемого показателя от величины оптического вращения чистой аминокислоты. Что позволяет сделать вывод об отсутствии в растворе структур, обладающих дополнительными осями хиральности, т.е. связывание атома цинка и молекулы аминокислоты в анионной или катионной форме не сопровождается формированием хелатной структуры.

Интересно отметить, в растворе, полученном при смешивании цинка сульфата и метионина в соотношении 1 к 2 обнаружены частицы размером около 70 нм, относительный вклад в интенсивность рассеяния которых составил не более 30%. Но сильный и стабильный сигнал был зарегистрирован в щелочном растворе метионина цинка $Zn(Met)_2$, что указывает на присутствие фракции наночастиц размером около 50 нм. Таким образом, при растворении метионината цинка в щелочной среде сохраняется хелатная структура соединения с

формированием цинксодержащих наночастиц [194]. В то же время, в щелочной среде формирование комплекса $Zn(Met)_2SO_4$ при смешивании растворов метионина и сульфата цинка протекает незначительно.

3.5.8 Рентгеновская порошковая дифракция синтезированного и кристаллизованного метионината цинка

Результаты РПД для синтезированного и кристаллизованного комплексов метионина цинка приведены на Рисунке 31. В качестве контроля был использован порошок перекристаллизованного L-метионина. Кристаллы L-метионина в виде тонких удлиненных пластинок были получены путем испарения растворителя из его водного раствора при комнатной температуре ($t = 20-25^{\circ}C$) до получения сухого остатка с постоянной массой. На дифрактограмме L-Met наблюдаются характерные пики при значении 2θ 6.159° , 11.621° , 22.986° , 29.441° и 35.454° (Рисунок 31).

Кристаллическая структура синтезированного комплекса соответствует комплексу нано-Zn(II)-Meth 1:2, представленном в базе Кембриджского центра кристаллографических данных (CCDC), с характерными пиками при 2θ 11.449° , 17.025° , and 20.369 [278]. В то же время кристаллизованный комплекс $Zn(Met)_2SO_4$ имеет характерные пики в 2θ при 11.979° , 17.778° , 23.341° , 26.308° , 27.2856° , 29.241° . Таким образом, полученная дифракционная картина для кристаллизованного комплекса аналогична рентгенограмме синтезированного соединения с возможными отличиями из-за присутствия сульфатов в его структуре.

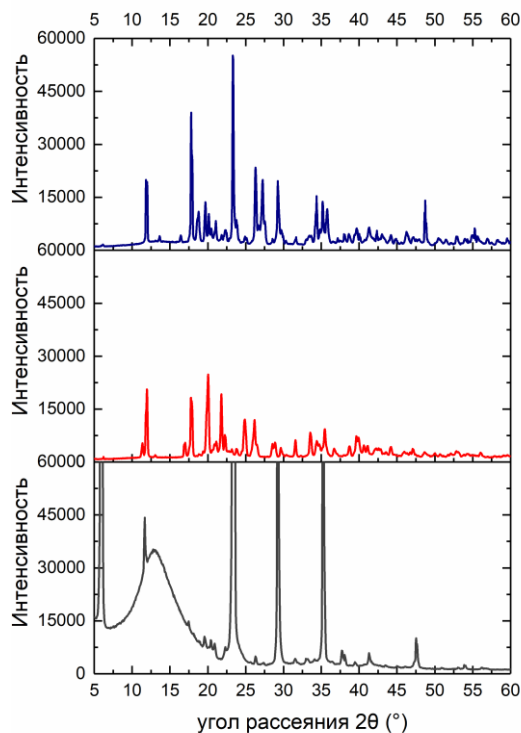


Рисунок 31. Спектры рентгеновской порошковой дифракции синтезированного $Zn(Met)_2$ (красный), кристаллизованного $Zn(Met)_2SO_4$ (синий) комплексов и перекристаллизованного L-метионина (серый).

3.6 Разработка и валидация методики количественного определения цинка в составе метионината цинка методом РФА

Производство, процесс стандартизации и контроль качества различных биологически активных и витаминно-минеральных добавок, содержащих в составе хелатированный цинк, требуют применения валидированных количественных методик оценки. Золотым стандартом элементного неорганического анализа, традиционно применяемого в фармации, считают метод атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС ИСП) и атомно абсорбционную спектроскопию (ААС) [279-281]. Трудоемкая и дорогая пробоподготовка – неотъемлемая часть ААС и АЭС – один из факторов, ограничивающих применение этих чувствительных, селективных и точных методов [282]. В соответствии с директивой международной конференции по гармонизации (International Council for Harmonization of Technical Requirements for

Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Guideline for Elemental Impurities Q3D(R1), 2019) энергодисперсионная рентгенофлуоресцентная спектрометрия (РФС) применима для скрининга лекарственных препаратов на наличие примесей тяжелых металлов. Этот простой и относительно экономичный метод анализа является фармакопейным и дает возможность получения стабильных во времени калибровок для количественного анализа металлсодержащих ЛС и БАД [224,283].

Государственная фармакопея регламентирует применение РФС в количественном анализе ЛС при условии предварительного установления для матрицы данного состава точной зависимости между интенсивностью линии флуоресценции и концентрацией элемента в стандартном образце [224]. В соответствии с этими указаниями, калибровочные образцы смеси субстанций моногидрата сульфата цинка и метионина в мольных соотношениях 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 были проанализированы методом РФА. Для разработки методики количественной оценки содержания цинка в синтезированном комплексе метионината цинка использовали энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр EDX-7000 (Shimadzu, Япония), технические характеристики и условия измерения описаны выше в разделе 2.6.4. Интенсивность сигнала рентгеновской флуоресценции измеряли при K_{α} линии цинка (8.632 кэВ). В работе использовали комплексонометрическое титрование, выполненное в соответствии с методикой государственной фармакопеи, как валидированный арбитражный метод для определения содержания цинка (%) в калибровочных стандартах и синтезированном комплексе $Zn(Met)_2$. Проведенные измерения позволили построить калибровочную модель (Рисунок 32), отражающую линейный характер зависимости между сигналом флуоресценции и количеством цинка в сухих смесях субстанций метионина и сульфата цинка ($R = 0.9904$). С применением данной модели определили содержание цинка в синтезированном комплексе метионината цинка - $Zn(Met)_2$. Однако полученный результат оказался завышенным: найденные по графику значения содержания цинка в комплексах отличались от действительного в среднем на 37% (Рисунок 32).

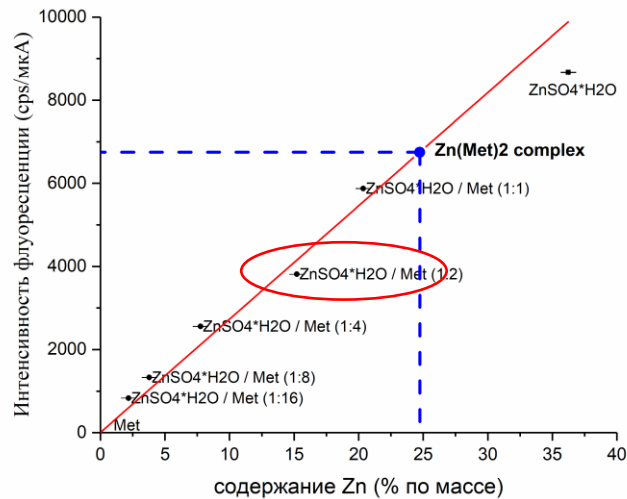


Рисунок 32. Зависимость интенсивности сигнала рентгеновской флуоресценции ($Zn K_{\alpha}$) от содержания цинка в образцах сухих смесей цинка сульфата моногидрата и метионина в мольном соотношении 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16.

Очевидно, что координация атома цинка двумя молекулами метионина за счет образования связей Zn-O и Zn-N, приводит к значительным, непропорциональным содержанию металла, изменениям сигнала рентгеновской флуоресценции (Рисунок 33).

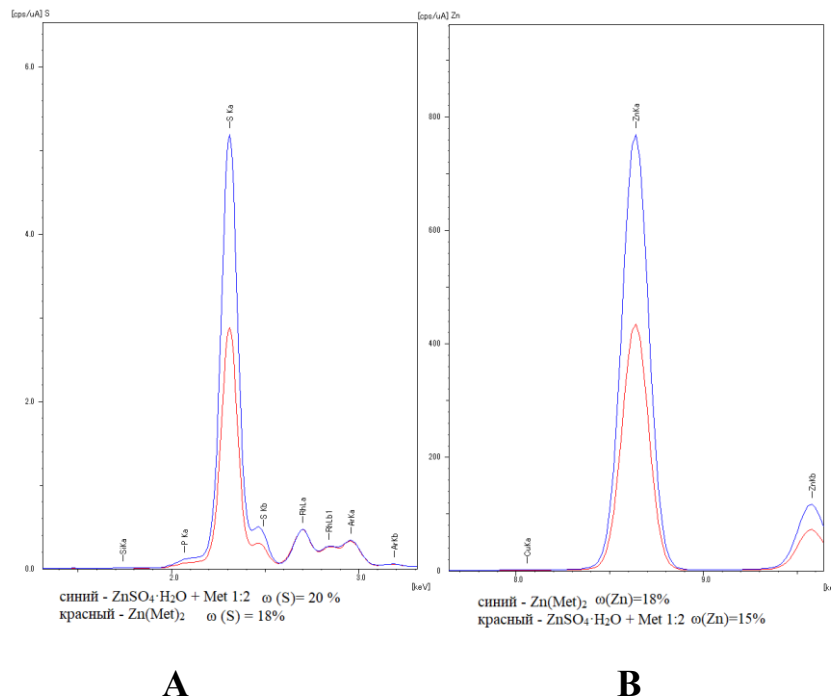


Рисунок 33. Иллюстрация матричного эффекта – усиление флуоресценции при координации атома цинка в составе хелатной структуры - спектр

рентгеновской флуоресценции образца метионината цинка и смеси цинка сульфата моногидрата с метионином в молярном соотношении 1:2 – линия K_{α} серы (2.308 кэВ) (**A**), линия K_{α} цинка (8.632 кэВ) (**B**).

Наблюдаемый матричный эффект не позволяет без дополнительной коррекции использовать калибровочную модель, построенную с использованием стандартных образцов смеси цинка сульфата моногидрата и метионина, для точной оценки содержания цинка в хелатном соединении [284]. Основные концепции математической коррекции матричных эффектов в рентгенофлуоресцентном анализе широко описаны в научной литературе, однако отличаются сложностью [285]. С другой стороны, влияние матричного эффекта может быть нивелировано при помощи надлежащей пробоподготовки. В соответствии с указаниями государственной фармакопеи, одним из способов уменьшения эффектов поглощения и возбуждения, искривляющих калибровочные графики, является разбавление анализируемой пробы прозрачным для рентгеновских лучей веществом, в том числе водой.

Подготовленные стандартные водные растворы, содержащие цинка сульфат и метионин в соотношении 1:2 при концентрации цинка 0.5; 1; 2; 3; 4; 5; 10; 25; 50 и 100 ммоль/л, были исследованы методом РФА. По данным спектров рентгеновской флуоресценции и полученным результатам комплексонометрии этих же растворов вновь построили калибровочный график - зависимость интенсивности сигнала флуоресценции при K_{α} линии цинка от концентрации цинка в растворе, коэффициент корреляции 0.9996 (Рисунок 34).

Полученная калибровочная модель легла в основу спектральной методики количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов, в частности метионината цинка, и была оценена по следующим валидационным параметрам: специфичность, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность [286].

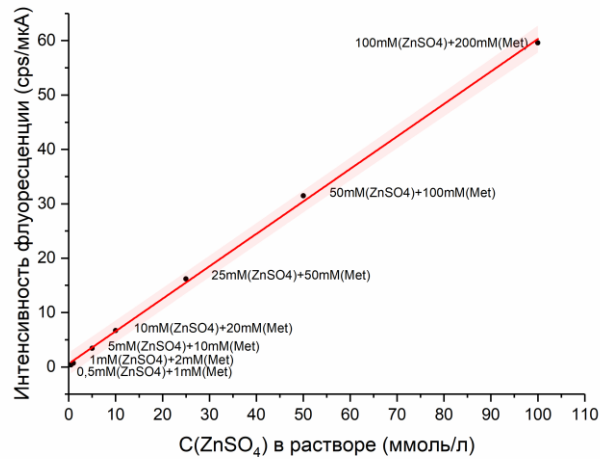
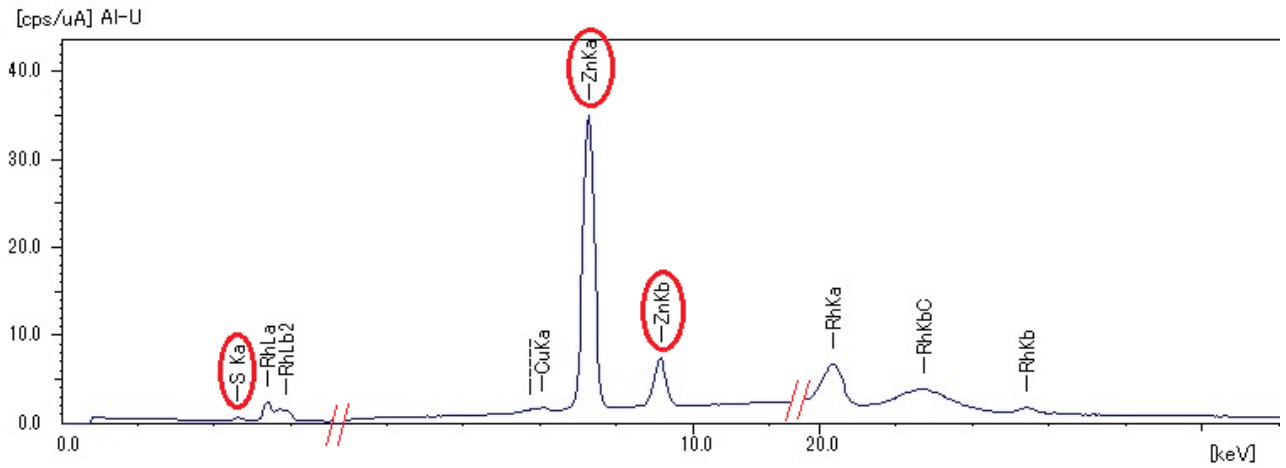


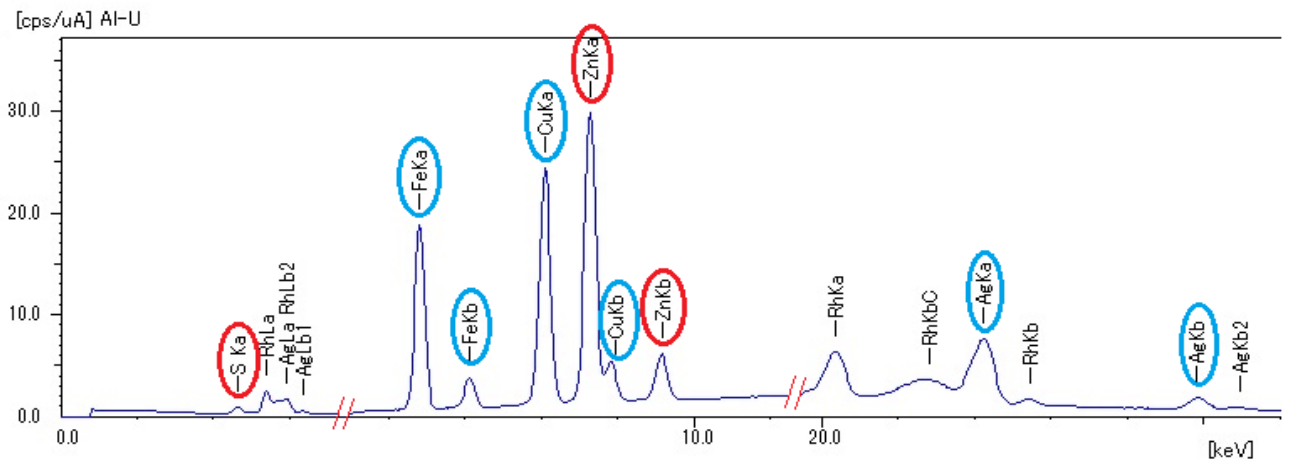
Рисунок 34. Зависимость интенсивности сигнала флуоресценции ($Zn K_{\alpha}$) от концентрации цинка в водных растворах, содержащих сульфат цинка и метионин в соотношении 1:2, концентрация цинка от 0.5 до 100 ммоль/л (розовая область – 95% прогнозируемый интервал линейной зависимости).

3.6.1 Специфичность

Специфичность методики оценивали по стабильности сигнала характерной рентгеновской флуоресценции цинка в присутствии других металлов – железа, серебра и меди [224]. К исходному раствору, содержащему цинка сульфат и метионин в соотношении 1:2 с концентрацией цинка 25 ммоль/л, добавили модельную примесную смесь – раствор, содержащий сульфат меди, нитрат серебра и сульфат железа (III), концентрация каждого из металлов составила 25 ммоль/л. После чего провели рентгенофлуоресцентный анализ исходного раствора и раствора с добавленными примесями. Полученные спектры рентгеновской флуоресценции представлены на Рисунке 35 А и В. Линии характеристической флуоресценции добавленных элементов (Ag – 22.105 кэВ, Fe – 6.400 кэВ, Cu – 8.042 кэВ) не перекрывают линии цинка, интенсивность сигнала флуоресценции цинка сохраняется на том же уровне, как и в отсутствии примесных элементов.



A



B

Рисунок 35. Спектр рентгеновской флуоресценции водного раствора, содержащего 25 ммоль/л сульфата цинка и 50 ммоль/л метионина (**A**); спектр рентгеновской флуоресценции водного раствора, содержащего 25 ммоль/л сульфата цинка и 50 ммоль/л метионина, с добавлением модельной примесной смеси - 25 ммоль/л AgNO_3 , 25 ммоль/л CuSO_4 и 25 ммоль/л $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (**B**).

3.6.2 Аналитическая область

Согласно ГФ, аналитическая область методики должна быть применима в интервале от 80 до 120% от номинального значения определяемой аналитической характеристики [286]. Однако, представленная ранее калибровочная модель (Рисунок 34) охватывает очень широкий концентрационный диапазон (0.5 – 100 ммоль/л Zn^{2+}), не соответствующий установленным требованиям. В указанном

интервале концентраций были выделены 3 фрагмента (0.5–5; 5-25 и 25-100 ммоль/л Zn^{2+}), каждый из которых рассматривали как отдельную калибровочную модель со своими валидационными параметрами линейности, правильности и прецизионности.

Аналитическую область оценивали для каждого из трех диапазонов концентраций по результатам измерений ($n=3$) крайних значений и дальнейшему сравнению соответственно рассчитанных дисперсий (V) (Таблица 10).

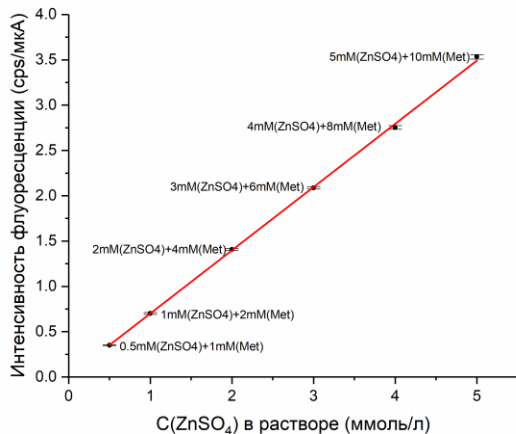
Таблица 10. Результаты оценки параметра «аналитическая область» методики РФА для количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов.

Калибровочная модель	Аналитическая область, ммоль/л Zn^{2+}	$C(Zn^{2+})$, ммоль/л	Интенсивность флуоресценции при $Zn K_{\alpha}$, cps/мкА	Дисперсия результатов, V	$F_{расч}$ ($P=0,99; f_1$ и $f_2=2$)
1	0.5 - 5	0.5	0.3548	1.48×10^{-5}	40.95
			0.3500		
			0.3472		
		5	3.5052	6.05×10^{-4}	
			3.5477		
			3.5479		
2	5 – 25	5	3.5052	6.05×10^{-4}	9.08
			3.5477		
			3.5479		
		25	16.9549	5.49×10^{-3}	
			16.927		
			16.8149		
3	25 - 100	25	16.9549	5.49×10^{-3}	47.69
			16.927		
			16.8149		
		100	58.8491	2.62×10^{-1}	
			59.3611		
			58.3377		

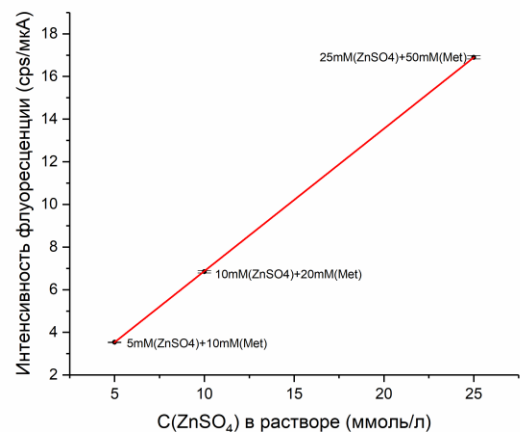
Для всех трех калибровочных моделей рассчитанное значение критерия Фишера оказалось меньше табличного ($F_{\text{табл}} = 99$), что позволило сделать вывод об однородности дисперсий результатов измерений при низкой и высокой концентрации каждого из диапазонов, и, следовательно, подтвердить выполнение параметра «аналитическая область».

3.6.3 Линейность

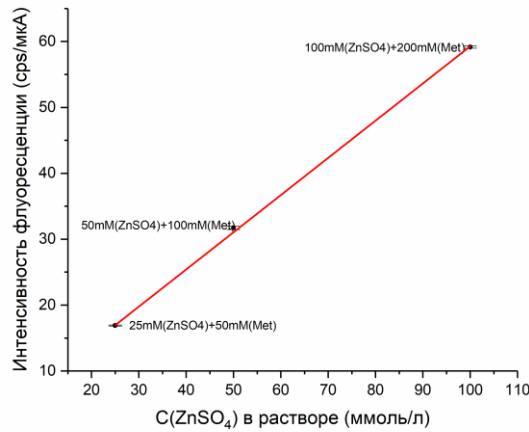
Линейность аналитической методики оценивали по наличию линейной зависимости интенсивности сигнала рентгеновской флуоресценции при линии $Zn K_{\alpha}$ от концентрации Zn^{2+} в стандартных растворах в пределах аналитической области каждой из калибровочных моделей (Рисунок 36 А, В и С). Для построенных градуировочных кривых были рассчитаны коэффициенты a и b уравнения линейной зависимости вида $y=b \cdot x+a$ и определен коэффициент корреляции (R) (Таблица 11). Полученные результаты подтверждают выполнение характеристики «линейность» для всех трех аналитических областей предложенной методики.



А



В



С

Рисунок 36. Калибровочная модель 1 – Зависимость интенсивности сигнала флуоресценции ($Zn K_{\alpha}$) от концентрации цинка в водных растворах, содержащих сульфат цинка и метионин в соотношении 1:2, концентрация цинка от 0.5 до 5 ммоль/л (А); калибровочная модель 2 – Зависимость интенсивности сигнала флуоресценции ($Zn K_{\alpha}$) от концентрации цинка в водных растворах, содержащих сульфат цинка и метионин в соотношении 1:2, концентрация цинка от 5 до 25 ммоль/л (В); калибровочная модель 3 – Зависимость интенсивности сигнала флуоресценции ($Zn K_{\alpha}$) от концентрации цинка в водных растворах, содержащих сульфат цинка и метионин в соотношении 1:2, концентрация цинка от 25 до 100 ммоль/л (С).

Таблица 11. Результаты оценки параметра «линейность» для методики РФА для количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов.

Калибровочная модель	Аналитическая область, ммоль/л Zn^{2+}	R	b	a
1	0.5 - 5	0.9999	0.6992	0
2	5 – 25	1	0.6781	0
3	25 - 100	0.9999	0.6038	0

3.6.4 Правильность

Правильность методики характеризуется отклонением среднего результата определений, выполненных с ее использованием, от значения, принимаемого за истинное [286]. В качестве валидированной методики количественного определения содержания Zn^{2+} стандартных растворах использовали арбитражный метод комплексометрического титрования, выполненного в соответствии с методикой государственной фармакопеи [219,242]. Водные растворы, содержащие сульфат цинка и метионин в соотношении 1:2 на трех уровнях концентраций (нижний, средний и верхний) исследовали для каждой аналитической области. Спектры рентгеновской флуоресценции были записаны в трех повторах, а затем проведено титрование. Полученные результаты показали, что среднее значение ошибки определения во всех трех аналитических областях не превысило три процента (Таблица 12).

Таблица 12. Результаты оценки правильности методики РФС для количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов для трех аналитических областей – 0.5–5; 5-25 и 25-100 ммоль/л Zn^{2+} .

Содержание Zn^{2+} , ммоль/л	$\bar{C}(ZnSO_4) \pm \Delta\bar{C}$, ммоль/л ($P=0.99$ и $n=3$)		Отклонение от действительного значения для каждого уровня концентрации, %
	Трилометрия	РФА	
1	1.06±0.11	1.00±0.08	5.66
3	3.01±0.07	2.99±0.10	0.66
5	5.07±0.27	5.06±0.20	0.20
Среднее значение отклонения от действительного значения для калибровочной модели, %			2.17

Продолжение таблицы 12

Содержание Zn^{2+} , ммоль/л	$\bar{C}(ZnSO_4) \pm \Delta\bar{C}$, ммоль/л ($P=0.99$ и $n=3$)		Отклонение от действительного значения для каждого уровня концентрации, %
	Трилометрия	РФА	
5	5.07±0.27	5.01±0.21	1.18
10	10.43±1.44	9.96±0.50	4.51
25	25.30±1.72	25.02±0.63	1.11
Среднее значение отклонения от действительного значения для калибровочной модели, %			2.27
25	25.30±1.72	24.94±0.75	1.42
50	50.80±2.29	52.59±2.87	3.52
100	102.77±2.89	101.57±6.46	1.17
Среднее значение отклонения от действительного значения для калибровочной модели, %			2.04

3.6.5 Прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность)

Прецизионность (сходимость и внутрилабораторная прецизионность) методики РФА оценивали по результатам трех определений водных растворов, содержащих сульфат цинка и метионин в соотношении 1:2, для каждого из трех уровней определяемых концентраций (нижнего, среднего и верхнего), лежащих в пределах данной аналитической области.

Сходимость (повторяемость) результатов оценивали по данным, полученным в одинаковых условиях в пределах короткого промежутка времени: один и тот же исполнитель, одна и та же кювета, один и тот же исследуемый раствор. Сходимость результатов аналитической методики представлена на Рисунке 37. Относительное стандартное отклонение (RSD) результатов измерений для всех

концентраций растворов составило не более 2%. На графике продемонстрировано, что с увеличением концентрации раствора величина RSD снижается и достигает предельного постоянного значения. Первая точка на графике соответствует концентрации цинка в растворе 0.1 ммоль/л, значение RSD для нее превышает критическое значение в 2% и составляет 2.48%. Таким образом, в результате работы установлен предел количественного определения данной методики – 0.5 ммоль/л.

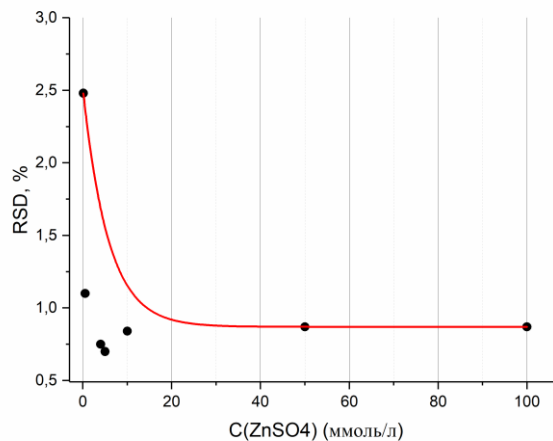


Рисунок 37. Зависимость величины относительного стандартного отклонения (RSD, %) от концентрации Zn^{2+} в растворе (оценка сходимости).

Промежуточную (внутрилабораторную) прецизионность оценивали по результатам, полученным в разные дни, разными исполнителями, при использовании разных кювет. Результаты оценки внутрилабораторной прецизионности методики представлены в Таблице 13.

Таким образом, в ходе проведенного исследования было показано, что валидационные характеристики разработанной методики РФА для количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов выполняются и соответствуют нормативным требованиям. Методика дает правильные и воспроизводимые результаты в концентрационном диапазоне содержания Zn^{2+} от 3 до 100 ммоль/л.

Таблице 13. Результаты внутрилабораторной (промежуточной) прецизионности методики РФС для количественного определения цинка в водных растворах его хелатных комплексов.

C(ZnSO₄), ммоль/л	Относительное стандартное отклонения (RSD), %
0.5	3.26
1	1.51
5	1.46
10	1.76
25	0.54
50	1.74
100	1.34

3.6.6 Функциональность аналитической методики

Функциональность созданной методики количественного определения Zn^{2+} методом рентгенофлуоресцентной спектроскопии проверили на примере водного раствора синтезированного метионината цинка $Zn(Met)_2$ с известной концентрацией металла - 50 ммоль/л, для растворения комплекса использовали аммиачный буферный раствор (pH=10.0). Спектр рентгеновской флуоресценции полученного раствора записывали при тех же условиях измерения. По значению интенсивности флуоресценции при линии K_{α} Zn с использованием калибровочной модели в диапазоне концентраций от 25 до 100 ммоль/л установили концентрацию металла в растворе (Рисунок 38).

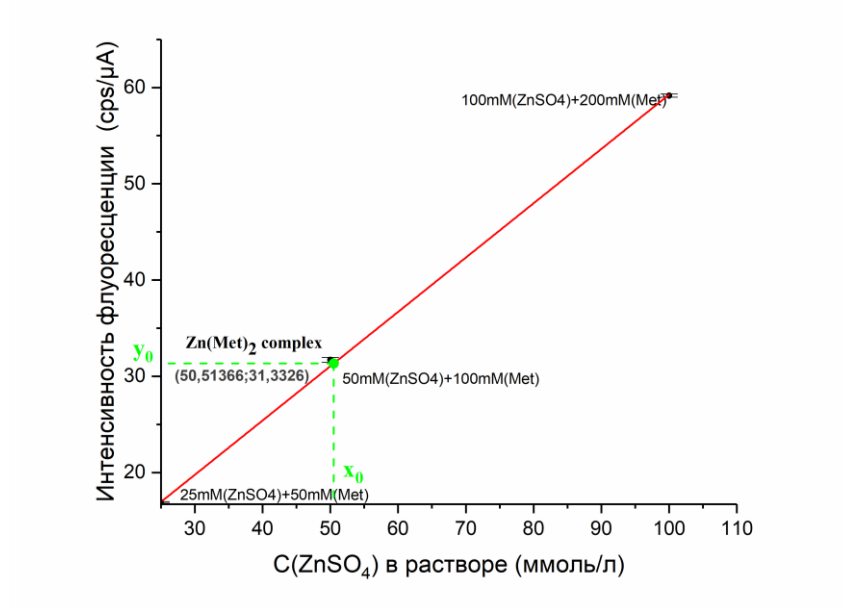


Рисунок 38. Определение концентрации цинка в растворе $Zn(Met)_2$ complex по калибровочной модели в диапазоне концентраций от 25 до 100 ммоль/л Zn^{2+} .

Концентрация цинка в водном растворе $Zn(Met)_2$, определенная по калибровочной модели, составила 50.51 ммоль/л, ошибка определения – 1.02%. Полученные результаты подтверждают отсутствие матричного эффекта и, следовательно, функциональность разработанной методики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе предложен комплексный подход для прогнозирования биологической активности и оценки физико-химических свойств координационных соединений цинка на основе взаимосвязи между показателями токсичности ($^{obs}E_a$), стерическими (J) и термодинамическими (logP) дескрипторами молекулы. Продемонстрирована взаимосвязь энергии активации, как интегрального параметра биологической активности, с таким физико-химическим параметром соединения как липофильность. Полученные в работе с клеточным биосенсором результаты указывают на корректность использования адаптированного индекса Балабана для описания и прогноза свойств хелатных структур. Успешность моделирования была продемонстрирована в скрининговом микробиологическом исследовании, позволившем окончательно установить молекулу-кандидата с максимальным фармакологическим эффектом и умеренной прогнозируемой токсичностью. Метионинат цинка, применяемый в качестве цинксодержащей биодобавки, безопасен для биома кишечника, при этом угнетает развитие полицеллюлярных агломератов патогенных штаммов. Предложены подходы к оценке показателей качества перспективной субстанции метионината цинка, полученной различными способами. Для практического использования субстанций-кандидатов надлежащего качества разработана и валидирована методика определения цинка в обоих хелатных соединениях методом рентгенофлуоресцентного анализа.

ВЫВОДЫ

1. Разработан комбинированный подход для прогнозирования биологической активности и оценки физико-химических свойств координационных соединений цинка на основе взаимосвязи между показателями токсичности ($^{obs}E_a$), стерическими (J) и термодинамическими (logP) дескрипторами молекулы.

2. На примере комплексов цинка с аминокислотами адаптирован существующий алгоритм расчета топологического индекса Балабана для координационных соединений (диагональный элемент матрицы расстояния для Zn – 0.8; недиагональные – 0.15 для Zn-O и 0.171 для Zn-N); оценена корректность его применения при описании структуры и прогнозировании физико-химических и биологических свойств хелатных соединений цинка с аминокислотами.

3. По результатам комбинированного подхода ККСА - прогнозирования и исследования ингибирующего действия хелатных соединений цинка на процесс образования биопленок в стандартной тест-культуре бактерий определена молекула-кандидат – метионинат цинка.

4. Продемонстрировано отсутствие антибактериальной активности метионината цинка в отношении стандартных тест-культур бактерий *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 и *Escherichia coli* ATCC 25922, однако выявлено его влияние на формирование биопленок в культуре патогенных штаммов: *Staphylococcus aureus* 1449 (максимальная степень ингибирования 61 %), *Staphylococcus simulans* 5882 (70 %), *Escherichia coli* M17 (43 %), *Streptococcus agalactiae* 3984 (84 %), *Enterococcus cloacae* 6392 (43 %), *Acinetobacter baumannii* 5841 (86 %).

5. Получены два типа хелатных комплексов цинка с метионином – $Zn(Met)_2$ и $Zn(Met)_2SO_4$, методами ИК-спектроскопии и рентгеновской дифракции доказана их структурная схожесть, а также по данным эндотермических фазовых переходов при 320 К установлена их полимерная природа. Показано

формирование оптически активных цинксодержащих наночастиц в водных растворах обеих субстанций.

6. Разработана и валидирована (специфичность, аналитическая область (0.5–5; 5–25; 25–100 ммоль/л), линейность (0.9999; 1; 0.9999), правильность ($\delta < 3\%$), прецизионность ($RSD < 2\%$)) методика количественного определения цинка в составе его хелатного комплекса с метионином методом рентгенофлуоресцентной спектроскопии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

BHIB – Brain Heart Infusion Broth, сердечно-мозговой бульон

DLS – Dynamic light scattering, динамическое светорассеяние

J – индекс Балабана

LB – Lysogeny Broth, лизогенная питательная среда

LD₅₀ – средняя летальная доза токсического вещества, которая вызывает гибель половины членов испытываемой популяции (полулетальная доза)

MHA – Mueller Hinton Agar, агар Мюллера-Хинтона

MT – Metallothionein, металлотioneин, семейство цистеин-обогащенных белков, связывающих катионы двухвалентных металлов

SDB – Sabouraud Dextrose Broth, бульон Сабуро с декстрозой

ZIP – Zrt- and Irt-like proteins, семейство специфических белков-транспортеров катионов двухвалентных металлов

ZnT – Zinc transporter, семейство специфических белков-транспортеров катионов цинка

ААС – атомно-абсорбционная спектрометрия

АЭС – атомно-эмиссионная спектрометрия

АК – аминокислота

БАД – биологически активная добавка

В-ОЛЛ – В-клеточный острый лимфобластный лейкоз

Гр «+» бактерии – грамположительные бактерии

Гр «-» бактерии – грамотрицательные бактерии

ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации

ДРС – динамическое рассеяние света

ДСК – дифференциальная сканирующая калориметрия

ДТА – дифференциальный термический анализ

ИК-спектроскопия – инфракрасная спектроскопия

ИФА – иммуноферментный анализ

ККСА – количественной корреляции «структура-активность»

ККСС – количественной корреляции «структура-свойство»

КОЕ – колониобразующая единица

КЧ – координационное число

ЛВ – лекарственное вещество

МИК – минимальная ингибирующая концентрация

МИЭ – магнитный изотопный эффект

МОКС – металлоорганические каркасные структуры

МОС – металлоорганические соединения

НПВО – нарушенное полное внутреннее отражение

НЧ – наночастицы

ОЛЛ – острый лимфобластный лейкоз

РПД – рентгеновская порошковая дифракция

РФА – рентгенофлуоресцентный анализ

РФС – рентгеновская флуоресцентная спектроскопия

ТГА – термогравиметрический анализ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moriiwa, Y. Analysis of Complexation Interactions between Metal Ions and Drugs under Pseudo-physiological pH Conditions by a High-throughput Screening Method Using a Solid-phase Extraction Cartridge / Y. Moriiwa, N. Suzuki, A. Shoji, A. Yanagida // *Anal. Sci.* – 2020. – V. 36. – N 6. – P. 709-715. DOI: 10.2116/analsci.19P413.
2. Boros, E. Classification of Metal-based Drugs According to Their Mechanisms of Action / E. Boros, P.J. Dyson, G. Gasser // *Chem.* – 2020. – V. 6. – N 1. – P. 41-60. DOI: 10.1016/j.chempr.2019.10.013.
3. Nunes, W.D.G. Thermal, spectroscopic and antimicrobial activity characterization of some norfloxacin complexes / W.D.G. Nunes, A.L.C.S. do Nascimento, A. Moura, C. Gaglieri, G.B. Vallim, L.C. Nascimento, R.A. Mendes, M. Ionashiro, F.J. Caires // *J. Therm. Anal. Calorim.* – 2018. – V. 132. – P. 1077–1088.
4. Sukul, A. Comparative physicochemical, anti-inflammatory, and analgesic activity assay of synthesized chromium and nickel complexes of indomethacin / A. Sukul, S. Haque, K.S. Poddar, M.S. Hossain, K.K. Niloy, S.K. Saha // *Cogent Chem.* – 2017. – V. 3. – 1302312.
5. Jurca, T. Metal Complexes of Pharmaceutical Substances / T. Jurca, E. Marian, L.G. Vicas, M. Muresan, L. Fritea // *Spectroscopic Analyses—Developments and Applications* / E. Sharmin, F. Zafar, Eds. – London: IntechOpen, 2017. DOI: 10.5772/65390.
6. Ali, H.A. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of zinc(II) ibuprofen complexes with nitrogen-based ligands / H.A. Ali, S.N. Omar, M.D. Darawsheh, H. Fares // *J. Coord. Chem.* – 2016. – V. 69 – P. 1110–1122. DOI: 10.1080/00958972.2016.1149819.
7. Wessells, K.R. Estimating the global prevalence of zinc deficiency: Results based on zinc availability in national food supplies and the prevalence of stunting / K.R. Wessells, K.H. Brown // *PLoS ONE.* – 2012. – V. 7. – N 11. – P. 1-11.

8. Kambe, T. Zinc transporters and their functional integration in mammalian cells. T. Kambe, K.M. Taylor, D. Fu // *J. Biol. Chem.* – 2021. – V. 296. – P. 100320. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.100320.
9. Sauer, A.K. Characterization of zinc amino acid complexes for zinc delivery in vitro using Caco-2 cells and enterocytes from hiPSC / A.K. Sauer, S. Pfaender, S. Hagemeyer, L. Tarana, A.K. Mattes, F. Briel, S. Küry, T.M. Boeckers, A.M. Grabrucker // *Biometals.* – 2017. – V. 30. – P. 643–661. DOI: 10.1007/s10534-017-0033-y.
10. Rahmouni, N.T. New mixed amino acids complexes of iron(III) and zinc(II) with isonitrosoacetophenone: Synthesis, spectral characterization, DFT study and anticancer activity / N.T. Rahmouni, N.H. Bensiradj, S.A. Megatli, S. Djebbar, O.B. Baitich // *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* – 2019. – V. 213. – P. 235–248.
11. Kavanagh, O. Investigating Structural Property Relationships to Enable Repurposing of Pharmaceuticals as Zinc Ionophores / O. Kavanagh, R. Elmes, F. O'Sullivan, J. Farragher, S. Robinson, G. Walker // *Pharmaceutics.* – 2021. – V. 13. – N 12. – 2032. DOI: 10.3390/pharmaceutics13122032.
12. Zhou, B. Bounds on the Balaban index / B. Zhou, N. Trinajstić // *Croat. Chem. Acta.* – 2008. – V. 81. – P. 319-323.
13. Raos, N. Estimation of stability constants of coordination compounds using models based on topological indices / N. Raos, A. Milicević // *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* – 2009. – V. 60. – N 1. – P. 123-8. DOI: 10.2478/10004-1254-60-2009-1923.
14. Попов В.И. ChemicDescript. Свидетельство об официальной регистрации программы для ЭВМ № 2003612305. РОСПАТЕНТ РФ, 2003.
15. Попов В.И. ChemicPen. Свидетельство об официальной регистрации программ для ЭВМ № 2005612073. РОСПАТЕНТ РФ, 2005.
16. Балышев, А.В. Обоснование противотуберкулезного действия нового Zn^{2+} -содержащего препарата (микроэлементные профили, клеточный иммунитет, неспецифическая резистентность) / А.В. Балышев, Т.В. Гребенникова, А.В. Сыроешкин // *Микроэлементы в медицине.* – 2004. – Т. 5. – N 4. – С. 6–8.

17. Быканова, С.Н. Использование клеточного биосенсора *Spirostomum ambigua* для характеристики биологической активности компонентов фармацевтических препаратов / С.Н. Быканова, О.С. Суздалева, О.Б. Серегина, А.А. Ковалева, И.А. Комиссарова // Исследовано в России. – 2003. – N 98. – С. 1114-1129.
18. Levitskaya, O.V. Arrhenius kinetics as a bioactivity assessment criterion for drug substances and excipients / O.V. Levitskaya, A.V. Syroeshkin, T.V. Pleteneva // *Pharmaceutical Chemistry Journal*. – 2016. – V. 49. – N. 11. – P. 779-781. DOI: 10.1007/s11094-016-1370-9.
19. Goncharuk V.V. Quasichemical Description of the Cell Death Kinetics of Cellular Biosensor *Spirostomum Ambigua* for Testing the Biological Activity of Aqueous Solutions / V.V. Goncharuk, A.V. Syroeshkin, I.A. Zlatskiy, E.V. Uspenskaya, A.V. Orekhova, O.V. Levitskaya, V.I. Dobrovolskiy, T.V. Pleteneva // *Journal of Water Chemistry and Technology*. – 2017. – V. 39. – N. 2. – P. 97–102.
20. Сыроешкин, А.В. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ККСА-МОДЕЛИРОВАНИЕ КАННАБИНОИДОВ-АНАЛЬГЕТИКОВ И НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ СРЕДСТВ / А.В. Сыроешкин, Д.А. Галкина, Т.В. Плетенева, М.А. Морозова, О.В. Левицкая // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2021. – N 12. – С. 18-23. DOI: 10.29296/25877313-2021-12-03.
21. Костыгина, М.Н. Определение содержания цинка в биологически активной добавке методом рентгенофлуоресцентного анализа / М.Н. Костыгина, А.В. Сыроешкин, Т.В. Максимова, Т.В. Плетенева // *Здоровье и образование в XXI веке*. – 2017. – Т. 19. – N 7. – С. 156-159.
22. Сыроешкин, А.В. Создание обогащенных цинком лекарственных и пищевых растений / А.В. Сыроешкин, М.П. Макарова, Т.В. Максимова, Т.В. Плетенева // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. – 2019. – Т. 22. – N 5. – С. 42–47. DOI: 10.29296/25877313-2019-05-08.

23. Ryu, M.-S. Zinc / M.-S. Ryu, T.B. Aydemir // Present Knowledge in Nutrition / B.P. Marriott, D.F. Birt, V.A. Stallings, A.A. Yates, Eds. – 11th ed. – Cambridge, Massachusetts: Wiley-Blackwell, 2020. – P. 393-408.
24. Livingstone, C. Zinc: Physiology, Deficiency, and Parenteral Nutrition / C. Livingstone // Nutrition in Clinical Practice. – 2015. – V. 30. – N 3. – P. 371-82. DOI:10.1177/0884533615570376.
25. Institute of Medicine. Zinc // Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. – Washington (DC): National Academies Press (US), 2001. – P. 442-501. DOI: 10.17226/10026.
26. King, J.C. Zinc / J.C. King, R.J. Cousins // Modern Nutrition in Health and Disease / A.C. Ross, B. Caballero, R.J. Cousins, K.L. Tucker, T.R. Ziegler, Eds. – 11th ed. – Baltimore (MD): Lippincott Williams & Wilkins, 2014. – P. 189-205.
27. Vallee, B.L. The biochemical basis of zinc physiology / B.L. Vallee, K.H. Falchuk // *Physiol. Rev.* – 1993. – V. 31. – P. 532-546.
28. O'Dell, B.L. Role of zinc in plasma membrane function / B.L. O'Dell // *J. Nutr.* – 2000. – V. 130. – P. 1432S-1436S.
29. Truong-Tran, A.Q. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene directed cell death / A.Q. Truong-Tran, L.H. Ho, F. Chai, P.D. Walewski // *J. Nutr.* – 2000. – V. 130. – P. 1459S-1466S.
30. Berg, J.M. The galvanization of biology: A growing appreciation for the roles of zinc / J.M. Berg, Y. Shi // *Science.* – 1996. – V. 271. – P. 1081–1085.
31. Huse, M. A Zn²⁺ ion links the cytoplasmic tail of CD4 and the N-terminal region of Lck / M. Huse, M.J. Eck, S.C Harrison // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 18729–18733.
32. Lin, R.S. Zinc is essential for binding of p56(lck) to CD4 and CD8alpha / R.S. Lin, C. Rodriguez, A. Veillette, H.F. Lodish // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – P. 32878–32882.

33. Beyersmann, D. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells / D. Beyersmann, H. Haase // *Biometals*. – 2001. – V. 14. – N 3-4. – P. 331-41. DOI: 10.1023/a:1012905406548.
34. Smirnova, I.V. Zinc and cadmium can promote rapid nuclear translocation of metal response element-binding transcription factor-1 / I.V. Smirnova, D.C. Bittel, R. Ravindra, H. Jiang, G.K. Andrews // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 9377–9384.
35. Langmade, S.J. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene / S.J. Langmade, E. Ravindra, P.J. Daniels, G.K. Andrews // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – P. 34803–34809.
36. Chesters, J.K. Zinc / J.K. Chesters // *Handbook of Nutritionally Essential Mineral Elements* / B.L. O'Dell, R.A. Sunde, Eds. – New York: Marcel Dekker, 1997. – P. 185–230.
37. Sullivan, V.K. Metallothionein expression is increased in monocytes and erythrocytes of young men during zinc supplementation / V.K. Sullivan, F.R. Burnett, R.J. Cousins // *J. Nutr.* – 1998. – V. 128. – P. 707–713.
38. Ibs, K.H. Zinc-altered immune function / K.H. Ibs, L. Rink // *J. Nutr.* – 2003. – V. 133. – P. 1452S–6S.
39. Hujanen, E.S. Polymorphonuclear leukocyte chemotaxis induced by zinc, copper and nickel in vitro / E.S. Hujanen, S.T. Seppa, K. Virtanen // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1995. – V. 1245. – P. 145–52.
40. Maywald, M. Zinc in Human Health and Infectious Diseases / M. Maywald, L. Rink // *Biomolecules*. – 2022. – V. 12. – N 12. – 1748. DOI: 10.3390/biom12121748.
41. Sheikh, A. Zinc influences innate immune responses in children with enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced diarrhea / A. Sheikh, S. Shamsuzzaman, S.M. Ahmad, D. Nasrin, S. Nahar, M.M. Alam, A. Al Tarique, Y.A. Begum, S.S. Qadri, M.I. Chowdhury, A. Saha, C.P. Larson, F. Qadri // *J. Nutr.* – 2010. – 140. – 5. – P. 1049-56. DOI: 10.3945/jn.109.111492.

42. Chavakis, T. Molecular mechanisms of zinc-dependent leukocyte adhesion involving the urokinase receptor and beta2-integrins / T. Chavakis, A.E. May, K.T. Preissner, S.M. Kanse // *Blood*. – 1999. – V. 93. – P. 2976–83.
43. King, L.E. Chronic zinc deficiency in mice disrupted T cell lymphopoiesis and erythropoiesis while B cell lymphopoiesis and myelopoiesis were maintained / L.E. King, J.W. Frenzel, J.J. Mann, P.J. Fraker // *J. Am. Coll. Nutr.* – 2005. – V. 24. – P. 494–502.
44. Stefanidou, M. Zinc: a multipurpose trace 594 element / M. Stefanidou, C. Maravelias, A. Dona, C. Spiliopoulou // *Arch. Toxicol.* – 2006. – V. 80. – P. 1–9.
45. Baum, M.K. Zinc status in human immunodeficiency virus infection / M.K. Baum, G. Shor-Posner, A. Campa // *J. Nutr.* – 2000. – V. 130(5S Suppl). – P. 1421S-3S. DOI: 10.1093/jn/130.5.1421S.
46. Bonaventura, P. Zinc and its role in immunity and inflammation / P. Bonaventura, G. Benedetti, F. Albarède, P. Miossec // *Autoimmunity Reviews*. – 2015. – V. 14. – N 4. – P. 277–285. DOI:10.1016/j.autrev.2014.11.008.
47. Prasad, A.S. Zinc is an Antioxidant and Anti-Inflammatory Agent: Its Role in Human Health / A.S. Prasad // *Front. Nutr.* – 2014. – V. 1. – N 14. – P. 1-10. DOI: 10.3389/fnut.2014.00014.
48. Hennig, B. Antiatherogenic properties of zinc: Implications in endothelial cell metabolism / B. Hennig, M. Toborek, C.J. McClain // *Nutrition*. – 1996. – V. 12. – N 10. – P. 711–7. DOI: 10.1016/s0899-9007(96)00125-6.
49. Fallah, A. Zinc is an Essential Element for Male Fertility: A Review of Zn Roles in Men's Health, Germination, Sperm Quality, and Fertilization / A. Fallah, A. Mohammad-Hasani, A.H. Colagar // *J. Reprod. Infertil.* – 2018. – V. 19. – N 2. – P. 69-81.
50. U.S. Department of Agriculture. FoodData Central [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://fdc.nal.usda.gov/>.
51. Urbano, G. The role of phytic acid in legumes: antinutrient or beneficial function? / G. Urbano, M. López-Jurado, P. Aranda, C. Vidal-Valverde, E. Tenorio, J.

- Porre // *Journal of Physiology and Biochemistry*. – 2000. – V. 56. – N 3. – P. 283–294. DOI: 10.1007/bf03179796 10.1007/BF03179796
52. Oberleas, D. Treatment of zinc deficiency without zinc fortification / D. Oberleas, B.F. Harland // *J. Zhejiang. Univ. Sci. B*. – 2008. – V. 9. – N 3. – P. 192-6. DOI: 10.1631/jzus.B0710632.
53. Krebs, N.F. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract / N.F. Krebs // *J. Nutr.* – 2000. – V. 130. – P. 1374S–1377S. DOI: 10.1093/jn/130.5.1374S.
54. Taylor, K.M. The LIV-1 Subfamily of Zinc Transporters: From Origins to Present Day Discoveries / K.M. Taylor // *Int. J. Mol. Sci.* – 2023. – V. 24. – N 2. – 1255. DOI: 10.3390/ijms24021255.
55. Hara, T. Zinc transporters as potential therapeutic targets: An updated review / T. Hara, E. Yoshigai, T. Ohashi, T. Fukada // *J. Pharmacol. Sci.* – 2022. – V. 148. – N 2. – P. 221-228. DOI: 10.1016/j.jphs.2021.11.007.
56. Huang, T. Zinc Homeostasis in Bone: Zinc Transporters and Bone Diseases / T. Huang, G. Yan, M. Guan // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – N 4. – 1236. DOI: 10.3390/ijms21041236.
57. Kambe, T. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases / T. Kambe, A. Hashimoto, S. Fujimoto // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2014. – V. 71. – P. 3281–3295. DOI: 10.1007/s00018-014-1617-0.
58. Cousins, R.J. Integrative aspects of zinc transporters / R.J. Cousins, R.J. McMahon // *J. Nutr.* – 2000. – V. 130. – N 5. – P. 1384–1387.
59. Cousins, R.J. Gastrointestinal factors influencing zinc absorption and homeostasis / R.J. Cousins // *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* – 2010. – V. 80. – N 4–5. – P. 243–248.
60. Wang, C.Y. ZIP8 is an iron and zinc transporter whose cell-surface expression is up-regulated by cellular iron loading / C.Y. Wang, S. Jenkitkasemwong, S. Duarte, B.K. Sparkman, A. Shawki, B. Mackenzie, M.D. Knutson // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287. – N 41. – P. 34032-43. DOI: 10.1074/jbc.M112.367284.

61. Coffey, R. The plasma membrane metal-ion transporter ZIP14 contributes to nontransferrin-bound iron uptake by human beta-cells / R. Coffey, M.D. Knutson // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2017. – V. 312. – N 2. – P. C169-C175.
62. Lynch, R.J.M. Chapter 4: Microelements: Part I: Zn, Sn, Cu, Fe and I / R.J.M. Lynch, R.M. Duckworth // *Monogr. Oral Sci.* – 2020. – V. 28. – P. 32-47. DOI: 10.1159/000499007.
63. Jaouen, K. Iron, copper and zinc isotopic fractionation up mammal trophic chains / K. Jaouen, M.-L. Pons, V. Balter // *Earth and Planetary Science Letters.* – 2013. – V. 374. – P. 164-172. DOI: 10.1016/j.epsl.2013.05.037.
64. Jaouen, K. Zinc isotope ratios of bones and teeth as new dietary indicators: results from a modern food web (Koobi Fora, Kenya) / K. Jaouen, M. Beasley, M. Schoeninger, J.-J. Hublin, M.P. Richards // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – 26281. DOI: 10.1038/srep26281.
65. Lech, T. Zinc in post-mortem body tissues and fluids / T. Lech, J.K. Sadlik // *Biol. Trace Elem. Res.* – 2011. – V. 142. – P. 11-17.
66. Hambidge, M. Interrelationships of key variables of human zinc homeostasis: relevance to dietary zinc requirements / M. Hambidge, N.F. Krebs // *Ann. Rev. Nutr.* – 2001. – V. 21. – P. 429-452.
67. King, J.C. Effect of acute zinc depletion on zinc homeostasis and plasma zinc kinetics in men / J.C. King, D.M. Shames, N.M. Lowe, L.R. Woodhouse, B. Sutherland, S.A. Abrams, J.R. Turnlund, M.J. Jackson // *Am. J. Clin. Nutr.* – 2001. – V. 74. – N 1. – P. 116-24. DOI: 10.1093/ajcn/74.1.116.
68. Gibson, R.S. Indicators of zinc status at the population level: a review of the evidence / R.S. Gibson, S.Y. Hess, C. Hotz, K.H. Brown // *Br. J. Nutr.* – 2008. – V. 99. – P. S14–S23. DOI: 10.1017/S0007114508006818.
69. Prasad, A.S. Discovery of human zinc deficiency: its impact on human health and disease / A.S. Prasad // *Adv. Nutr.* – 2013. – V. 4. – N 2. – P. 176–190. DOI: 10.3945/an.112.003210.

70. Bush, A.I. Copper, zinc, and the metallobiology of Alzheimer disease / A.I. Bush // *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* – 2003. – V. 17. – N 3. – P. 147-50. DOI: 10.1097/00002093-200307000-00005.

71. Avan, A. Zinc and Copper in Alzheimer's Disease / A. Avan, T.U. Hoogenraad // *J. Alzheimers Dis.* – 2015. – V. 46. – N 1. – P. 89-92. DOI: 10.3233/JAD-150186.

72. Клименко, Л.Л. Металло-лигандный гомеостаз в этиопатогенезе болезни Альцгеймера (обзор) / Л.Л. Клименко, А.В. Скальный, А.А. Турна, А.И. Деев, М.Н. Буданова, И.С. Баскаков, Е.А. Никонорова // *Микроэлементы в медицине.* – 2016. – Т. 17. – N 4. – С. 3-10. DOI: 10.19112/2413-6174-2016-17-4-3-10 2016.

73. Bailey, R.L. Estimation of total usual dietary intakes of pregnant women in the United States / R.L. Bailey, S.G. Pac, V.L. Fulgoni 3rd, K.C. Reidy, P.M. Catalano // *JAMA Netw. Open.* – 2019. – V. 2. – e195967.

74. Bzikowska-Jura, A. Investigation of iron and zinc concentrations in human milk in correlation to maternal factors: an observational pilot study in Poland / A. Bzikowska-Jura, P. Sobieraj, M. Michalska-Kacymirow, A. Wesolowska // *Nutrients.* – 2021. – V. 13. – P. 303.

75. Siva, S. Zinc deficiency is associated with poor clinical outcomes in patients with inflammatory bowel disease / S. Siva, D.T. Rubin, G. Gulotta, K. Wroblewski, J. Pekow // *Inflamm. Bowel Dis.* – 2017. – V. 23. – P. 152-7.

76. Ehrlich, S. Micronutrient Deficiencies in Children With Inflammatory Bowel Diseases / S. Ehrlich, A.G. Mark, F. Rinawi, R. Shamir, A. Assa // *Nutr. Clin. Pract.* – 2020. – V. 35. – P. 315-22.

77. Skalny, A.V. Zinc deficiency as a mediator of toxic effects of alcohol abuse / A.V. Skalny, M.G. Skalnaya, A.R. Grabeklis, A.A. Skalnaya, A.A. Tinkov // *Eur. J. Nutr.* – 2018. – V. 57. – P. 2313-22.

78. Kang, Y.J. Zinc prevention and treatment of alcoholic liver disease / Y.J. Kang, Z. Zhou // *Mol. Aspects Med.* – 2005. – V. 26. – P. 391-404.

79. McClain, C. Role of zinc in the development/progression of alcoholic liver disease / C. McClain, V. Vatsalya, M. Cave // *Curr. Treat. Options Gastroenterol.* – 2017. – V. 15. – P. 285-95.
80. Sappey, C. Vitamin, trace element and peroxide status in HIV seropositive patients: asymptomatic patients present a severe beta-carotene deficiency / C. Sappey, P. Leclercq, C. Coudray, P. Faure, M. Micoud, A. Favier // *Clin. Chim. Acta.* – 1994. – V. 230. – N 1. – P. 35-42. DOI: 10.1016/0009-8981(94)90086-8.
81. Brnic, M. Zinc Absorption by Adults Is Similar from Intrinsically Labeled Zinc-Biofortified Rice and from Rice Fortified with Labeled Zinc Sulfate / M. Brnic, R. Wegmuller, A. Melse-Boonstra, T. Stomph, C. Zeder, F.M. Tay, R.F. Hurrell // *J. Nutr.* – 2016. – V. 146. – N 1. – P. 76-80. DOI: 10.3945/jn.115.213421.
82. Wegmüller, R. Zinc absorption by young adults from supplemental zinc citrate is comparable with that from zinc gluconate and higher than from zinc oxide / R. Wegmuller, F. Tay, C. Zeder, M. Brnic, R.F. Hurrell // *J. Nutr.* – 2014. – V. 144. – N 2. – P. 132-6. DOI: 10.3945/jn.113.181487.
83. Whittaker, P. Iron and zinc interactions in humans / P. Whittaker // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1998. – V. 68. – P. 442s-6s.
84. Arredondo, M. Inhibition of iron and copper uptake by iron, copper and zinc / M. Arredondo, R. Martinez, M.T. Nunez, M. Ruz, M. Olivares // *Biol. Res.* – 2006. – V. 39. – P. 95-102.
85. Plum, L.M. The essential toxin: impact of zinc on human health / L.M. Plum, L. Rink, H. Haase // *Int. J. Environ. Res. Public Health.* – 2010. – V. 7. – P. 1342-65.
86. Spencer, H. Inhibitory effects of zinc on magnesium balance and magnesium absorption in man / H. Spencer, C. Norris, D. Williams // *J. Am. Coll. Nutr.* – 1994. – V. 13. – P. 479-84.
87. PubChem [Электронный ресурс]. – Bethesda (MD): National Center for Biotechnological Information. – Режим доступа: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>.
88. Salgueiro, M.J. Bioavailability, biodistribution, and toxicity of BioZn-AAS(1): a new zinc source. comparative studies in rats / M.J. Salgueiro, M.B.

Zubillaga, A.E. Lysionek, M.I. Sarabia, R.A. Caro, T. De Paoli, A. Hager, E. Ettl, R. Weill, J.R. Boccio // *Nutrition*. – 2000. – V. 16. – N 9. – P. 762-6. DOI: 10.1016/s0899-9007(00)00379-8.

89. Kondev, F.G. The Nubase2020 evaluation of nuclear properties / F.G. Kondev, M. Wang, W.J. Huang, S. Naimi, G. Audi // *Chinese Physics C*. – 2021. – V. 45. – N 3. – P. 030001-1—030001-180. DOI:10.1088/1674-1137/abddae.

90. Dittrich, R.P. Gallium Scan [Электронный ресурс] / R.P. Dittrich, O. De Jesus. – StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2022. – Режим доступа: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567748/>.

91. Tatari, M. A theoretical study for the production of ^{32}P radioisotope using neutrons from the $^{68}\text{Zn}(p,n)^{68}\text{Ga}$ reaction in a medical cyclotron / M. Tatari, Z. Dehghan Manshadi, H. Naik // *Appl. Radiat. Isot.* – 2022. – V. 188. – 110347. DOI: 10.1016/j.apradiso.2022.110347.

92. Lewis, M.R. Production and purification of gallium-66 for preparation of tumor-targeting radiopharmaceuticals / M.R. Lewis, D.E. Reichert, R. Laforest, W.H. Margenau, R.E. Shefer, R.E. Klinkowstein, B.J. Hughey, M.J. Welch // *Nucl. Med. Biol.* – 2002. – V. 29. – N 6. – P. 701-6. DOI: 10.1016/s0969-8051(02)00330-x.

93. Ashhar, Z. Cyclotron Production of Gallium-68 Radiopharmaceuticals Using the $^{68}\text{Zn}(p,n)^{68}\text{Ga}$ Reaction and Their Regulatory Aspects / Z. Ashhar, M.F. Ahmad Fadzil, M.F. Othman, N.A. Yusof, M.A. Abdul Onny, N. Mat Ail, S.F. Abd Rahman // *Pharmaceutics*. – 2022. – V. 15. – N 1. – 70. DOI: 10.3390/pharmaceutics15010070.

94. Friel, J.K. The analysis of stable isotopes in urine to determine the fractional absorption of zinc / J.K. Friel, V.L. Jr Naake, L.V. Miller, P.V. Fennessey, K.M. Hambidge // *Am. J. Clin. Nutr.* – 1992. – V. 55. – N 2. – P. 473-7. DOI: 10.1093/ajcn/55.2.473.

95. Patterson, K.Y. Stable isotopes of minerals as metabolic tracers in human nutrition research / K.Y. Patterson, C. Veillon // *Exp. Biol. Med. (Maywood)*. – 2001. – V. 226. – N 4. – P. 271-82. DOI: 10.1177/153537020122600403.

96. Yang, L. Studies on zinc bioavailability from a representative diet in Chinese urban women of childbearing age using a double label stable isotope technique / L. Yang, X. Yang, J. Piao, Y. Tian, P. Li, Y. Wang, J. Wang // *J. Trace Elem. Med. Biol.* – 2005. – V. 19. – N 2-3. – P. 159-64. DOI: 10.1016/j.jtemb.2005.09.001.

97. Larner, F. Zinc isotopic compositions of breast cancer tissue / F. Larner, L.N. Woodley, S. Shousha, A. Moyes, E. Humphreys-Williams, S. Strekopytov, A.N. Halliday, M. Rehkämper, R.C. Coombes // *Metallomics.* – 2015. – V. 7. – N 1. – P. 112-7. DOI: 10.1039/c4mt00260a.

98. Schilling, K. Zinc stable isotopes in urine as diagnostic for cancer of secretory organs / K. Schilling, R.E.T. Moore, K.V. Sullivan, M.S. Capper, M. Rehkämper, K. Goddard, C. Ion, R.C. Coombes, L. Vesty-Edwards, A.D. Lamb, A.N. Halliday, F. Larner // *Metallomics.* – 2021. – V. 13. – N 5. – mfab020. DOI: 10.1093/mtomcs/mfab020.

99. Albarede, F. Medical applications of Cu, Zn, and S isotope effects / F. Albarede, P. Télouk, V. Balter, V.P. Bondanese, E. Albalat, P. Oger, P. Bonaventura, P. Miossec, T. Fujii // *Metallomics.* – 2016. – V. 8. – N 10. – P. 1056-1070. DOI: 10.1039/c5mt00316d.

100. Бучаченко, А.Л. Магнитный изотопный эффект магния – ключ к механохимии фосфорилирующих ферментов как молекулярных машин / А.Л. Бучаченко, Д.А. Кузнецов // *Молекулярная биология.* – 2006. – V. 40. – N 1. – P. 12-19.

101. Buchachenko, A.L. Magnetic Isotope Effect: Nuclear Spin Control of Chemical Reactions / A.L. Buchachenko // *The Journal of Physical Chemistry A.* – 2001. – V. 105. – N 44. – P. 9995–10011. DOI: 10.1021/jp011261d.

102. Buchachenko, A.L. Calcium induced ATP synthesis: Isotope effect, magnetic parameters and mechanism / A.L. Buchachenko, D.A. Kuznetsov, N.N. Breslavskaya, L.N. Shchegoleva, S.E. Arkhangelsky // *Chemical Physics Letters.* – 2011. – V. 505. – N 4-6. – P. 130-134. DOI: 10.1016/j.cplett.2011.02.036.

103. Кольтовер, В.К. Магнитно-изотопные эффекты магния и цинка в ферментативных реакциях гидролиза АТФ, катализируемых молекулярными

моторами / В.К. Кольтовер, Р.Д. Лабынцева, В.К. Карандашев // БИОФИЗИКА. – 2020. – Т. 65. – N 3. – С. 493–503.

104. Летуца, У.Г. Магниточувствительность бактерий *E. coli* в присутствии изотопов цинка / У.Г. Летуца, Д.М. Шайлина // Доклады академии наук. – 2018. – Т. 479. – N 5. – С. 585–588.

105. Орлова, М.А. Магнитный изотопный эффект, как инструмент модулирования апоптоза в лейкемических клетках / М.А. Орлова, А.А. Полозников, А.П. Орлов // Вестник Московского университета. Серия 2. Химия. – 2014. – Т. 55. – N 3. – С. 187-192.

106. Vallee, B.L. Active zinc binding sites of zinc metalloenzymes / B.L. Vallee, D.S. Auld // Matrix Suppl. – 1992. – V. 1. – N 5. – P. 19.

107. Phan, T.-N. Physiologic actions of zinc related to inhibition of acid and alkali production by oral streptococci in suspensions and biofilms / T.-N. Phan, T. Buckner, J. Sheng, J.D. Baldeck, R.E. Marquis // Oral Microbiology and Immunology. – 2004. – V. 19. – P. 31-38. DOI: 10.1046/j.0902-0055.2003.00109.x.

108. Weston, B.F. The metal homeostasis protein, Lsp, of *Streptococcus pyogenes* is necessary for acquisition of zinc and virulence / B.F. Weston, A. Brenot, M.G. Caparon // Infect. Immun. – 2009. – V. 77. – N 7. – P. 2840-8. DOI: 10.1128/IAI.01299-08.

109. Stafford, S.L. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper / S.L. Stafford, N.J. Bokil, M.E. Achard, R. Kapetanovic, M.A. Schembri, A.G. McEwan, M.J. Sweet // Biosci. Rep. – 2013. – V. 33. – N 4. – e00049. DOI: 10.1042/BSR20130014.

110. Graham, A.I. Severe zinc depletion of *Escherichia coli*: roles for high affinity zinc binding by ZinT, zinc transport and zinc-independent proteins / A.I. Graham, S. Hunt, S.L. Stokes, N. Bramall, J. Bunch, A.G. Cox, C.W. McLeod, R.K. Poole // J. Biol. Chem. – 2009. – V. 284. – N 27. – P. 18377-89. DOI: 10.1074/jbc.M109.001503.

111. Juttukonda, L.J. Manganese and nutritional immunity / L.J. Juttukonda, E.P. Skaar // Molecular, Genetic, and Nutritional Aspects of Major and Trace Minerals /

J. Collins Ed. – Cambridge (MA): Academic Press, 2017. – P. 377–387. DOI: 10.1016/B978-0-12-802168-2.00031-2.

112. Moroz, O.V. Structure of the human S100A12-copper complex: implications for host-parasite defence / O.V. Moroz, A.A. Antson, S.J. Grist, N.J. Maitland, G.G. Dodson, K.S. Wilson, E. Lukanidin, I.B. Bronstein // *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* – 2003. – V. 59. – N Pt 5. – P. 859-67. DOI: 10.1107/s0907444903004700.

113. Gläser, R. Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection / R. Gläser, J. Harder, H. Lange, J. Bartels, J.M. Schröder // *Nat. Immunol.* – 2005. – V. 6. – P. 57–64. DOI: 10.1038/ni114.

114. Hattori, F. The antimicrobial protein S100A7/psoriasin enhances the expression of keratinocyte differentiation markers and strengthens the skin's tight junction barrier / F. Hattori, C. Kiatsurayanon, K. Okumura, H. Ogawa, S. Ikeda, K. Okamoto, F. Niyonsaba // *Br. J. Dermatol.* – 2014. – V. 171. – N 4. – P. 742-53. DOI: 10.1111/bjd.13125.

115. Kehl-Fie, T.E. Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc / T.E. Kehl-Fie, E.P. Skaar // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 2010. – V. 14. – P. 218–224. DOI: 10.1016/j.cbpa.2009.11.008.

116. Ying, S. Dual zinc transporter systems in *Vibrio cholerae* promote competitive advantages over gut microbiome / S. Ying, F. Fan, O. Jensen, Z. Zhong, J. Zhu // *Infect. Immun.* – 2015. – V. 83. – P. 3902–3908. DOI: 10.1128/IAI.00447-15.

117. Rahman, M.T. Metallothionein: a potential link in the regulation of zinc in nutritional immunity / M.T. Rahman, M.M. Karim // *Biol. Trace Element Res.* – 2017. – V. 182. – P. 1–13. DOI: 10.1007/s12011-017-1061-8.

118. Wang, S. Strategies for Zinc Uptake in *Pseudomonas aeruginosa* at the Host–Pathogen Interface / S. Wang, J. Cheng, Y. Niu, P. Li, X. Zhang, J. Lin // *Frontiers in Microbiology.* – 2021. – V. 12. – 741873. DOI=10.3389/fmicb.2021.741873.

119. Cuajungco, M.P. Zinc: multidimensional effects on living organisms / M.P. Cuajungco, M.S. Ramirez, M.E. Tolmasky // *Biomedicines*. – 2021. – V. 9. – 208. DOI: 10.3390/biomedicines9020208.

120. Akiyama, H. Effects of zinc oxide on the attachment of *Staphylococcus aureus* strains / H. Akiyama, O. Yamasaki, H. Kanzaki, J. Tada, J. Arata // *J. Dermatol. Sci.* – 1998. – V. 17. – P. 67–74.

121. Чекнев, С.Б. Торможение роста бактерий в культурах *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa* в присутствии катионов меди и цинка / С.Б. Чекнев, Е.И. Вострова, М.А. Аapresова, Л.С. Писковская, А.В. Востров // *Журн. микробиол.* – 2015. – N 2. – С. 9—17.

122. Чекнев, С.Б. Торможение роста бактерий в культурах *Streptococcus pyogenes* и *Streptococcus agalactiae* в присутствии катионов меди и цинка / С.Б. Чекнев, Е.И. Вострова, М.Л. Сарычева, С.В. Кисиль, В.В. Анисимов, А.В. Востров // *Журн. микробиол.* – 2017. – N 3. – С. 26-35.

123. Söderberg, T.A. Antibacterial effect of zinc oxide in vitro / T.A. Söderberg, B. Sunzel, S. Holm, T. Elmros, G. Hallmans, S. Sjöberg // *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand. Surg.* – 1990. – V. 24. – N 3. – P. 193-7. DOI: 10.3109/02844319009041278.

124. Lansdown, A.B. Zinc in wound healing: theoretical, experimental, and clinical aspects / A.B. Lansdown, U. Mirastschijski, N. Stubbs, E. Scanlon, M.S. Agren // *Wound Repair Regen.* – 2007. – V. 15. – N 1. – P. 2-16. DOI: 10.1111/j.1524-475X.2006.00179.x.

125. Blencowe, D.K. Zn(II) metabolism in prokaryotes / D.K. Blencowe, A.P. Morby // *FEMS Microbiol. Rev.* – 2003. – V. 27. – N 2-3. – P. 291-311. DOI: 10.1016/S0168-6445(03)00041-X.

126. Krishnan, K.C. Metal-mediated modulation of streptococcal cysteine protease activity and its biological implications / K.C. Krishnan, S. Mukundan, J.A.L. Figueroa, J.A. Caruso, M. Kotb // *Infect. Immunity.* – 2014. – V. 82. – N 7. – P. 2992-3001.

127. Rosado, J.L. Zinc and copper: proposed fortification levels and recommended zinc compounds / J.L. Rosado // *J. Nutrition.* – 2003. – V. 133 (Suppl.). – – 2985-2989.

128. Djoko, K.Y. The Role of Copper and Zinc Toxicity in Innate Immune Defense against Bacterial Pathogens / K.Y. Djoko, C.L. Ong, M.J. Walker, A.G. McEwan // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V. 290. – N 31. – P. 18954-61. DOI: 10.1074/jbc.R115.647099.

129. McDevitt, C.A. A molecular mechanism for bacterial susceptibility to zinc / C.A. McDevitt, A.D. Ogunniyi, E. Valkov, M.C. Lawrence, B. Kobe, A.G. McEwan, J.C. Paton // *PLoS Pathog.* – 2011. – V. 7. – N 11. – e1002357. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002357.

130. Eijkelkamp, B.A. Extracellular zinc competitively inhibits manganese uptake and compromises oxidative stress management in *Streptococcus pneumoniae* / B.A. Eijkelkamp, J.R. Morey, M.P. Ween, C.L. Ong, A.G. McEwan, J.C. Paton, C.A. McDevitt // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – N 2. – e89427. DOI: 10.1371/journal.pone.0089427.

131. Maret, W. Inhibitory zinc sites in enzymes / W. Maret // *Biometals.* – 2013. – V. 26. – P. 197–204.

132. Scheie, A.A. The effect of mineral-derived zinc ions on in vitro glucose metabolism of *Streptococcus mutans* NCTC 10449 / A.A. Scheie, E.I.F. Pearce // *Caries Res.* – 1994. – V. 28. – P. 329–334.

133. Dineley, K.E. Zinc inhibition of cellular energy production: implications for mitochondria and neurodegeneration / K.E. Dineley, T.V. Votyakova, I.J. Reynolds // *J. Neurochem.* – 2003. – V. 85. – P. 563–570.

134. Chohan, Z.H. Metal binding and antibacterial activity of ciprofloxacin complexes / Z.H. Chohan, C.T. Supuran, A. Scozzafava // *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* – 2005. – V. 20. – N 3. – P. 303-7. DOI: 10.1080/14756360310001624948.

135. Uivarosi, V. Metal complexes of quinolone antibiotics and their applications: an update / V. Uivarosi // *Molecules.* – 2013. – V. 18. – N 9. – P. 11153-97. DOI: 10.3390/molecules180911153.

136. Chohan, Z.H. Metal-based antibacterial and antifungal agents: synthesis, characterization, and in vitro biological evaluation of Co(II), Cu(II), Ni(II), and Zn(II) complexes with amino acid-derived compounds / Z.H. Chohan, M. Arif, M.A. Akhtar, C.T. Supuran // *Bioinorg. Chem. Appl.* – 2006. – V. 2006. – 83131. DOI: 10.1155/BCA/2006/83131.
137. Li, L. Antibacterial activity and cytotoxicity of l-phenylalanine-oxidized starch-coordinated zinc (II) / L. Li, H. Wang, C. Jin, M. Chen, S. Jiang, J. Cheng, S. Jiang // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2019. – V. 123. – P. 133-139. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.11.057.
138. Dhayabaran, V.V. Influence of Amino Acid-Nucleobase Hybrid Ligand in Binding and Biological Activity of Co(II) and Zn(II) Complexes / V.V. Dhayabaran, T.D. Prakash // *J. Fluoresc.* – 2016. – V. 26. – N 5. – P. 1825-37. DOI: 10.1007/s10895-016-1874-4.
139. Giovagnoli, S. Synthesis, characterization and in vitro extracellular and intracellular activity against Mycobacterium tuberculosis infection of new second-line antitubercular drug-palladium complexes / S. Giovagnoli, M.L. Marenzoni, M. Nocchetti, C. Santi, P. Blasi, A. Schoubben, M. Ricci // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2014. – V. 66. – N 1. – P. 106-21. DOI: 10.1111/jphp.12162.
140. Sakr, S.H. Synthesis, Spectroscopic, and Biological Studies of Mixed Ligand Complexes of Gemifloxacin and Glycine with Zn(II), Sn(II), and Ce(III) / S.H. Sakr, H.S. Elshafie, I. Camele, S.A. Sadeek // *Molecules.* – 2018. – V. 23. – N 5. – 1182. DOI: 10.3390/molecules23051182.
141. Yuan, P. Metal nanoparticles for diagnosis and therapy of bacterial infection / P. Yuan, X. Ding, Y.Y. Yang, Q.H. Xu // *Adv. Healthc. Mater.* – 2018. – V. 7. – 1701392.
142. Tufail, M.S. Silver nanoparticles and their applications-A comprehensive review / M.S. Tufail, I. Liaqat // *Pure Appl. Biol.* – 2021. – V. 11. – P. 315-330.
143. Slavin, Y.N. Metal nanoparticles: Understanding the mechanisms behind antibacterial activity / Y.N. Slavin, J. Asnis, U.O. Häfeli, H.J. Bach // *Nanobiotechnology.* – 2017. – V. 15. – P. 1-20.

144. Brayner, R. Toxicological Impact Studies Based on Escherichia coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium / R. Brayner, R. Ferrari-Iliou, N. Brivois, S. Djediat, M.F. Benedetti, F. Fiévet // Nano Lett. – 2006. – V. 6. – N 4. – P. 866–870.

145. Sawai, J. Quantitative evaluation of antibacterial activities of metallic oxide powders (ZnO, MgO and CaO) by conductimetric assay / J. Sawai // Journal of Microbiological Methods. – 2003. – V. 54. – P. 177–182.

146. Zhang, L. Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids) / L. Zhang, Y. Jiang, Y. Ding, M. Povey, D. York // J. Nanopart. Res. – 2007. – V. 9. – P. 479–489. DOI: 10.1007/s11051-006-9150-1.

147. Jones, N. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms / N. Jones, B. Ray, K.T. Ranjit, A.C. Manna // FEMS Microbiol. Lett. – 2008. – V. 279. – P. 71–76. DOI:10.1111/j.1574-6968.2007.01012.x.

148. Emami-Karvani, Z. Antibacterial activity of ZnO nanoparticle on Gram-positive and Gram-negative bacteria / Z. Emami-Karvani, P. Chehrazi // African Journal of Microbiology Research. – 2011. – V. 5. – N 12. – P. 1368-1373. DOI: 10.5897/AJMR10.159.

149. Raghupathi, K.R. Size-Dependent Bacterial Growth Inhibition and Mechanism of Antibacterial Activity of Zinc Oxide Nanoparticles / K.R. Raghupathi, R.T. Koodali, A.C Manna // Langmuir. – 2011. – V. 27. – N 7. – P. 4020–4028. DOI: 10.1021/la104825u.

150. Liaqat, I. In vitro Antimicrobial Activity of Biogenically Synthesized Nickel and Zinc Nanoparticles against Selected Pathogenic Bacterial Strains / I. Liaqat, Z. Shaanzeh, A. Bibi, U. Zafar, S. Naseem, R. Ali, S. Andleeb, G. Saleem, I. Liaqat, M. Afzaal // J. Oleo Sci. – 2022. – V. 71. – N 8. – P. 1181-1188. DOI: 10.5650/jos.ess22068.

151. Padmavathy, N. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study / N. Padmavathy, R. Vijayaraghavan // Sci. Technol. Adv. Mater. – 2016. – V. 9. – 035004.

152. Applerot, G. ZnO nanoparticle-coated surfaces inhibit bacterial biofilm formation and increase antibiotic susceptibility / G. Applerot, J. Lellouche, N. Perkas, Y. Nitzan, A. Gedanken, E. Banin // *RSC Adv.* – 2012. – V. 2. – N 6. – P. 2314–2321. DOI: 10.1039/c2ra00602b.

153. Sawai, J. Hydrogen peroxide as an antibacterial factor in zinc oxide powder slurry / J. Sawai, S. Shoji, H. Igarashi, A. Hashimoto, T. Kokugan, M. Shimizu, H. Kojima // *J. Ferment Bioeng.* – 1998. – V. 86. – N 5. – P. 521–522. DOI: 10.1016/S0922-338X(98)80165-7 1.

154. McCall, K.A. Function and mechanism of zinc metalloenzymes / K.A. McCall, C.-C. Huang, C.A. Fierke // *J. Nutr.* – 2000. – V. 130. – N 5. – P. 1437S–1446S. DOI: 10.1038/sj.ijo.0801233.

155. Butler, A. Acquisition and utilization of transition metal ions by marine organisms / A. Butler // *Science.* – 1998. – V. 281. – P. 207–210. DOI: 10.1126/science.281.5374.207.

156. Gonzalez, M.R. Pseudomonas aeruginosa zinc homeostasis: key issues for an opportunistic pathogen / M.R. Gonzalez, V. Ducret, S. Leoni, K. Perron // *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* – 2018. – V. 1862. – P. 722–733. DOI: 10.1016/j.bbagr.2018.01.018

157. Mamun, M.A. Synthesis and spectroscopic, magnetic and cyclic voltammetric characterization of some metal complexes of methionine: $[(C_5H_{10}NO_2S)_2M^{II}]$; $M^{II} = Mn(II), Co(II), Ni(II), Cu(II), Zn(II), Cd(II)$ and $Hg(II)$ / M.A. Mamun, O. Ahmed, P.K. Bakshi, M.Q. Ehsan // *Journal of Saudi Chemical Society.* – 2010. – V. 14. – P. 23–31.

158. Abendrot, M. Zinc(II) complexes with amino acids for potential use in dermatology: synthesis, crystal structures, and antibacterial activity / M. Abendrot, L. Chęcińska, J. Kusz, K. Lisowska, K. Zawadzka, A. Felczak, U. Kalinowska-Lis // *Molecules.* – 2020. – V. 25. – P. 951. DOI: 10.3390/molecules25040951.

159. Кадырова, Р.Г. Синтез медных и цинковых солей метионина и глицина / Р.Г. Кадырова, Г.Ф. Кабиров, Р.Р. Муллахметов // *Ученые записки*

Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2013. – N 213. – С. 109-115.

160. Smith, R.N. Selection of a reference partitioning system for drug design work / R.N. Smith, C. Hansch, M.M. Ames // *J. Pharm. Sci.* – 1975. – V. 64. – P. 599–606.

161. Sarkar, K. Some drugs in action: Metal ions do influence the activity! / K. Sarkar, K. Sen // *IJPSR.* – 2015. – V. 6. – P. 1–13.

162. Wang, J. Cooperative binding of an anticancer drug in a guest–host–protein assembly / J. Wang, Y. Huang, Z. Tao, S.F. Xue, Q.J. Zhu // *Supramolecular Chemistry.* – 2012. – V. 24. – P. 658-664.

163. Frigati, L.J. The impact of isoniazid preventive therapy and antiretroviral therapy on tuberculosis in children infected with HIV in a high tuberculosis incidence setting / L.J. Frigati, K. Kranzer, M.F. Cotton, H.S. Schaaf, C.J. Lombard, H.J. Zar // *Thorax.* – 2011. – V. 66. – P. 496-501.

164. Yoshikawa, Y. New insulinomimetic zinc(II) complexes of alphaamino acids and their derivatives with Zn(N₂O₂) coordination mode / Y. Yoshikawa, E. Ueda, Y. Suzuki, N. Yanagihara, H. Sakurai, Y. Kojima // *Chem. Pharm. Bull.* – 2001. – V. 49. – P. 652–654.

165. Kartina, D. In vitro antibacterial and anticancer activity of Zn(II)Valinedithiocarbamate complexes / D. Kartina, A.W. Wahab, A. Ahmad, R. Irfandi, I. Raya // *J. Phys. Conf. Ser.* – 2019. – V. 1341. – 032042.

166. Borthagaray, G. Essential transition metal ion complexation as a strategy to improve the antimicrobial activity of organic drugs / G. Borthagaray, M. Mondelli, M.H. Torre // *Essential J. Infect. Dis. Epidemiol.* – 2016. – V. 2. – P. 2–14.

167. Singh, K. Metal-based biologically active compounds: Synthesis, spectral, and antimicrobial studies of cobalt, nickel, copper, and zinc complexes of triazole-derived schiff bases / K. Singh, Y. Kumar, P. Puri, C. Sharma, K.R. Aneja // *Bioinorg. Chem. Appl.* – 2011. – V. 2011. – 901716.

168. Loginova, N.V. Redox-active antimicrobial metal complexes with sterically hindered o-diphenol and o-aminophenol derivatives / N.V. Loginova, T.V.

Kovalchuk, G.I. Polozov, N.P. Osipovich, A.A. Chernyavskaya, V.L. Sorokin, O.I. Shadyro // *Biometals: Molecular Structures, Binding Properties* / G. Blanc, D. Moreau, Eds. – Hauppauge, New York: Nova Science Publisher; 2010. – P. 59–90.

169. Zhang, Y. A novel zinc complex with antibacterial and antioxidant activity / Y. Zhang, X. Li, J. Li, M.Z.H. Khan, F. Ma, X. Liu // *BMC Chem.* – 2021. – V. 15. – N 1. – P. 17. DOI: 10.1186/s13065-021-00745-2.

170. Elshafie, H.S. Biological Investigations and Spectroscopic Studies of New Moxifloxacin/Glycine-Metal Complexes / H.S. Elshafie, S.H. Sakr, S.A. Sadeek, I. Camele // *Chem. Biodiversity.* – 2019. – V. 16. – e1800633. DOI: 10.1002/cbdv.201800633.

171. Santi, E. Antimicrobial evaluation of new metallic complexes with xylitol active against *P. aeruginosa* and *C. albicans*: MIC determination, post-agent effect and Zn-uptake / E. Santi, G. Facchin, R. Faccio, R.P. Barroso, A.J. Costa-Filho, G. Borthagaray, M.H. Torre // *J. Inorg Biochem.* – 2016. – V. 155. – P. 67-75. DOI: 10.1016/j.jinorgbio.2015.11.014.

172. Li, Z. Stimuli-responsive drug-delivery systems based on supramolecular nanovalves / Z. Li, N. Song, Y.-W. Yang // *Matter.* – 2019. – V. 1. – N 2. – P. 345-368. DOI: 10.1016/j.matt.2019.05.019.

173. Li, Y. Nitroimidazole derivative incorporated liposomes for hypoxia-triggered drug delivery and enhanced therapeutic efficacy in patient-derived tumor xenografts / Y. Li, A. Lu, M. Long, L. Cui, Z. Chen, L. Zhu // *Acta Biomater.* – 2019. – V. 83. – P. 334-348. DOI: 10.1016/j.actbio.2018.10.029.

174. Chauhan, A.S. Dendrimers for drug delivery / A.S. Chauhan // *Molecules.* – 2018. – V. 23. – N 4. – P. 938. DOI: 10.3390/molecules23040938.

175. Jacob, S. Cyclodextrin complexes: perspective from drug delivery and formulation / S. Jacob, A.B. Nair // *Drug Dev. Res.* – 2018. – V. 79. – N 5. – P. 201-217. DOI: 10.1002/ddr.21452.

176. Xue, Z. Graphene quantum dot assisted translocation of drugs into a cell membrane / Z. Xue, Q. Sun, L. Zhang, Z. Kang, L. Liang, Q. Wang, J.W. Shen // *Nanoscale.* – 2019. – V. 11. – N 10. – P. 4503-4514. DOI: 10.1039/c8nr10091h.

177. El-Boubbou, K. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: preparation, conjugation and delivery / K. El-Boubbou // *Nanomedicine*. – 2018. – V. 13. – N 8. – P. 929-952. DOI: 10.2217/nnm-2017-0320.
178. Bai, Y. Photo- and pH- dual-responsive beta-cyclodextrin-based supramolecular prodrug complex self-assemblies for programmed drug delivery / Y. Bai, C.P. Liu, X. Song, L. Zhuo, H. Bu, W. Tian // *Chem. Asian J.* – 2018. – V. 13. – N 24. – P. 3903-3911. DOI: 10.1002/asia.201801366.
179. Pardo, J. Cancer targeting and drug delivery using carbon-based quantum dots and nanotubes / J. Pardo, Z. Peng, R.M. Leblanc // *Molecules*. – 2018. – V. 23. – N 2. – P. 378. DOI: 10.3390/molecules23020378.
180. Wang, B. Colossal cages in zeolitic imidazolate frameworks as selective carbon dioxide reservoirs / B. Wang, A.P. Côté, H. Furukawa, M. O'Keeffe, O.M. Yaghi // *Nature*. – 2008. – V. 453. – P. 207-211. DOI: 10.1038/nature06900.
181. Carreon, M.A. Porous crystals as membranes / M.A. Carreon // *Science*. – 2020. – V. 367. – P. 624-625. DOI: 10.1126/science.aba4997.
182. Hmadeh, M. New porous crystals of extended metal-catecholates / M. Hmadeh, Z. Lu, Z. Liu, F. Gándara, H. Furukawa, S. Wan, V. Augustyn, R. Chang, L. Liao, F. Zhou, E. Perre, V. Ozolins, K. Suenaga, X. Duan, B. Dunn, Y. Yamamoto, O. Terasaki, O.M. Yaghi // *Chem. Mater.* – 2012. – V. 24. – P. 3511-3513. DOI: 10.1021/cm301194a.
183. Wang, Y. Metal-organic frameworks for stimuli-responsive drug delivery / Y. Wang, J. Yan, N. Wen, H. Xiong, S. Cai, Q. He, Y. Hu, D. Peng, Z. Liu, Y. Liu // *Biomaterials*. – 2020. – V. 230. – P. 119619. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2019.119619.
184. Zhou, H.C. Introduction to metal-organic frameworks / H.C. Zhou, J.R. Long, O.M. Yaghi // *Chem. Rev.* – 2012. – V. 112. – P. 673-674. DOI: 10.1021/cr300014x.
185. Chapman, K.W. Pressure-induced amorphization and porosity modification in a metal-organic framework / K.W. Chapman, G.J. Halder, P.J. Chupas // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – V. 131. – P. 17546-17547. DOI: 10.1021/ja908415z.

186. Chen, Y. Tuning the Atrazine Binding Sites in an Indium-Based Flexible Metal-Organic Framework / Y. Chen, X. Zhang, H. Chen, R.J. Drout, Z. Chen, M.R. Mian, R.R. Maldonado, K. Ma, X. Wang, Q. Xia, Z. Li, T. Islamoglu, R.Q. Snurr, O.K. Farha // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2020. – V. 12. – P. 44762-44768.

187. Luo, T.T. Deliberate design of a 3D homochiral Cu(II)/l-met/Ag(I) coordination network based on the distinct soft-hard recognition principle / T.T. Luo, L.Y. Hsu, C.C. Su, C.H. Ueng, T.C. Tsai, K.L. Lu // *Inorg. Chem.* – 2007. – V. 46. – N 5. – P. 1532-4. DOI: 10.1021/ic062132k.

188. Sava Gallis, D.F. Antibacterial Countermeasures via Metal-Organic Framework-Supported Sustained Therapeutic Release / D.F. Sava Gallis, K.S. Butler, J.O. Agola, C.J. Pearce, A.A. McBride // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* – 2019. – V. 11. – N 8. – P. 7782-7791. DOI: 10.1021/acsami.8b21698.

189. Chunbai, H. Nanoscale Metal–Organic Frameworks for the Co-Delivery of Cisplatin and Pooled siRNAs to Enhance Therapeutic Efficacy in Drug-Resistant Ovarian Cancer Cells / H. Chunbai, L. Kuangda, L. Demin, L. Wenbin // *Journal of the American Chemical Society.* – 2014. – V. 136. – N 14. – P. 5181-5184. DOI: 10.1021/ja4098862.

190. Karami, A. Recent Advances in Metal-Organic Frameworks as Anticancer Drug Delivery Systems: A Review / A. Karami, O. Mohamed, A. Ahmed, G.A. Hussein, R. Sabouni // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2021. – V. 21. – N 18. – P. 2487-2504. DOI: 10.2174/1871520621666210119093844.

191. Subramaniam, V. Structure co-ordination of solitary amino acids as ligands in metal-organic frameworks (MOFs): A comprehensive review / V. Subramaniam, P.V. Ravi, M. Pichumani // *Journal of Molecular Structure.* – 2022. – V. 1251. – 131931. DOI: 10.1016/j.molstruc.2021.131931.

192. Yin, X. Highly efficient flexible perovskite solar cells using solution-derived NiO x hole contacts / X. Yin, P. Chen, M. Que, Y. Xing, W. Que, C. Niu, J. Shao // *ACS Nano.* – 2016. – V. 10. – P. 3630–3636.

193. Rana, K. A graphene-based transparent electrode for use in flexible optoelectronic devices / K. Rana, J. Singh, J.H. Ahn // *J. Mat. Chem. C.* – 2014. – V. 2. – P. 2646–2656.
194. Bahrani, S. Zinc-based metal-organic frameworks as nontoxic and biodegradable platforms for biomedical applications: review study / S. Bahrani, S.A. Hashemi, S.M. Mousavi, R. Azhdari // *Drug Metab. Rev.* – 2019. – V. 51. – N 3. – P. 356-377. DOI: 10.1080/03602532.2019.1632887.
195. Chen, Y. Zinc-based metal organic framework with antibacterial and anti-inflammatory properties for promoting wound healing / Y. Chen, J. Cai, D. Liu, S. Liu, D. Lei, L. Zheng, Q. Wei, M. Gao // *Regen. Biomater.* – 2022. – V. 9. – rbac019. DOI: 10.1093/rb/rbac019. PMID: 35493287; PMCID: PMC9046580
196. Marshall, R.J. Amino acids as highly efficient modulators for single crystals of zirconium and hafnium metal-organic frameworks / R.J. Marshall, C.L. Hobday, C.F. Murphie, S.L. Griffin, C.A. Morrison, S.A. Moggach, R.S. Forgan // *J. Mater. Chem. A.* – 2016. – V. 4. – P. 6955-6963. DOI: 10.1039/c5ta10401g.
197. Anderson, S.L. Nucleobase pairing and photodimerization in a biologically derived metal-organic framework nanoreactor / S.L. Anderson, P.G. Boyd, A. Gładysiak, T.N. Nguyen, R.G. Palgrave, D. Kubicki, L. Emsley, D. Bradshaw, M.J. Rosseinsky, B. Smit, K.C. Stylianou // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10. – P. 1-8. DOI: 10.1038/s41467-019-09486-2.
198. Zhou, B. Co II/Zn II-(L-tyrosine) magnetic metal-organic frameworks / B. Zhou, N.J.O. Silva, F.N. Shi, F. Palacio, L. Mafra, J. Rocha // *Eur. J. Inorg. Chem.* – 2012. – P. 5259-5268. DOI: 10.1002/ejic.201200169.
199. Ferrer, P. Synthesis and crystal structure of the novel metal organic framework $Zn(C_3H_5NO_2S)_2$ / P. Ferrer, I. Da Silva, J. Rubio-Zuazo, G.R. Castro // *Powder Diffr.* – 2014. – V. 29. – P. 366–370. DOI: 10.1017/S0885715614000554.
200. Ramos, C.P.L. Hydrothermal synthesis, crystal structures, and enantioselective adsorption property of bis(L-histidinato)nickel(II) monohydrate / C.P.L. Ramos, M.T. Conato // *AIP Conf. Proc.* – 2018. – V. 1958. – 020017. DOI: 10.1063/1.5034548 1-8.

201. Sattar, T. Hydrothermally Synthesized Copper Isoleucinate (Bio-MOF-30), Evaluated by Single Crystal XRD Analysis and Drugs Storage Property / T. Sattar, M. Athar // *Int. J. Anal. Tech.* – 2017. – V. 3. – P. 1-5. DOI: 10.15226/2577-7831/3/1/00110.
202. Xie, Y. Rational design of MOFs constructed from modified aromatic amino acids / Y. Xie, Z. Yu, X. Huang, Z. Wang, L. Niu, M. Teng, J. Li // *Chemistry.* – 2007. – V. 13. – N 33. – P. 9399-405. DOI: 10.1002/chem.200700543.
203. Ge, Y. Homochiral Metal-Organic Frameworks of Lead(II) and Cadmium(II) Constructed by Amino Acid-Functionalized Isophthalic Acids: Synthesis, Structure Diversity, and Optical Properties / Y. Ge, B. Teng, L. Lv, R. Chen, B. Wu // *Cryst. Growth Des.* – 2020. – V. 20. – P. 486-497. DOI: 10.1021/acs.cgd.9b01442.
204. Chandrasekaran, B. Computer-Aided Prediction of Pharmacokinetic (ADMET) Properties / B. Chandrasekaran, S.N. Abed, O. Al-Attaqchi, K. Kuche, R.K. Tekade // *Dosage Form Design Parameters. Volume II Advances in Pharmaceutical Product Development and Research.* – 2018. – P. 731-755. DOI: 10.1016/B978-0-12-814421-3.00021-X.
205. Knor, M. Mathematical aspects of Balaban index / M. Knor, R. Škrekovski, A. Tepeh // *MATCH Communications in Mathematical and in Computer Chemistry.* – 2018. – V. 79. – N 3. – P. 685-716.
206. Balaban, A.T. Topological indices based on topological distances in molecular graphs / A.T. Balaban // *Pure Appl. Chem.* – 1983. – V. 55. – P. 199–206.
207. Balaban, A.T. A comparison between various topological indices, particularly between the index J and Wiener index W / A. T. Balaban // *Topology in Chemistry* / D.H. Rouvray, R.B. King, Eds. – Chichester: Woodhead Publishing, 2002. pp. – P. 89–112. DOI: 10.1533/9780857099617.89.
208. Završnik, D. QSAR and QSPR study of derivatives 4-arylamino coumarin / D. Završnik, S. Muratović, S. Spirtović // *Bosn. J. Basic Med. Sci.* – 2003. – V. 3. – N 3. – P. 59-63. DOI: 10.17305/bjbms.2003.3531.
209. Yadav, S. 4-[1-(Substituted aryl/alkyl carbonyl)-benzimidazol-2-yl]-benzenesulfonic acids: synthesis, antimicrobial activity, QSAR studies, and antiviral

evaluation / S. Yadav, P. Kumar, E. De Clercq, J. Balzarini, C. Pannecouque, S.K. Dewan, B. Narasimhan // *Eur. J. Med. Chem.* – 2010. – V. 45. – N 12. – P. 5985-97. DOI: 10.1016/j.ejmech.2010.09.065.

210. Naik, P.K. Development of predictive quantitative structure-activity relationship models of epipodophyllotoxin derivatives / P.K. Naik, A. Dubey, R. Kumar // *J. Biomol. Screen.* – 2010. – V. 15. – N 10. – P. 1194-203. DOI: 10.1177/1087057110380743.

211. Fernandes, J.P. QSAR modeling of a set of pyrazinoate esters as antituberculosis prodrugs / J.P. Fernandes, K.F. Pasqualoto, V.M. Felli, E.I. Ferreira, C.A. Brandt / *Arch. Pharm. (Weinheim)*. – 2010. – V. 343. – N 2. – P. 91-7. DOI: 10.1002/ardp.200900216.

212. Pavlov, A. Drug Design by Regression Analyses of Newly Synthesized Derivatives of 8-Quinololinol / A. Pavlov, N. Takuchev, N. Georgieva // *Biotechnology & Biotechnological Equipment*. – 2012. – V. 26 (sup1). – P. 164-169. DOI: 10.5504/50YRTIMB.2011.0030.

213. Balaban, A.T. Study on supramolecular complexing ability vis-à-vis estimation of pKa of substituted sulfonamides: Dominating role of Balaban index (J) / A.T. Balaban, P.V. Khadikar, C.T. Supuran, A. Thakur, M. Thakur // *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. – 2005. – V. 15. – N 17. – P. 3966-3973. DOI: 10.1016/j.bmcl.2005.05.136.

214. Miličević, A. Estimation of stability constants of copper(II) and nickel(II) chelates with dipeptides by using topological indices / A. Miličević, N. Raos // *Polyhedron*. – 2008. – V. 27. – N 2. – P. 887-892. DOI: 10.1016/j.poly.2007.11.017.

215. Miličević, A. Irving-Williams order in the framework of connectivity index ${}^3\chi_v$ enables simultaneous prediction of stability constants of bivalent transition metal complexes / A. Miličević, G. Branica, N. Raos // *Molecules*. – 2011. – V. 16. – N 2. – P. 1103-12. DOI: 10.3390/molecules16021103.

216. Xu, P. On Topological Descriptors of Certain Metal-Organic Frameworks / P. Xu, M. Azeem, M.M. Izhar, S.M. Shah, M.A. Binyamin, A. Aslam // *Journal of Chemistry*. – 2020. – V. 2020. – 8819008. DOI: 10.1155/2020/8819008.

217. Nadeem, M.F. Topological aspects of metal-organic structure with the help of underlying networks / M.F. Nadeem, M.I., H.M.A. Siddiqui, M. Azeem, A. Khalil, Y. Ali // *Arabian Journal of Chemistry*. – 2021. – V. 14. – N 6. – 103157. DOI: 10.1016/j.arabjc.2021.103157.

218. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.2.0001.15 «Общие реакции на подлинность». [Электронное издание]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

219. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.3.0015.15 «Комплексометрическое титрование». [Электронное издание]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

220. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.1.1.0005.15 «Атомно-абсорбционная спектрометрия». [Электронное издание]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

221. Бейзель, Н.Ф. Атомно-абсорбционная спектрометрия : Учебное пособие. – Новосибирск : Новосиб. гос. университет, 2008. – 72 с.

222. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.1.1.0004.15 «Атомно-эмиссионная спектрометрия». [Электронное издание]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

223. Марухленко, А.В. Разработка и валидация методики количественного определения цинка в его хелатных комплексах с использованием энергодисперсионной рентгенофлуоресцентной спектроскопии / А.В. Марухленко, Т.В. Максимова, Т.В. Плетенева, М.А. Морозова // *Разработка и регистрация лекарственных средств*. – 2021. – Т. 10. – N 4. – С. 154-161. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-154-161.

224. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.1.1.0010.15. «Рентгеновская флуоресцентная спектрометрия». [Электронное издание]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea>.

225. Balaban, A.T. Highly discriminating distance-based topological index / A.T. Balaban // *Chem. Phys. Lett.* – 1982. – V. 89. – P. 399–404. DOI: 10.1016/0009-2614(82)80009-2.

226. Kujawski, J. The log P parameter as a molecular descriptor in the computer-aided drug design – an overview / J. Kujawski, H. Popielarska, A. Myka, B. Drabińska, M. Bernard // CMST. – 2012. – V. 18. – P. 81-88. DOI: 10.12921/cmst.2012.18.02.81-88.

227. Hadda, T.B. Petra/Osiris/Molinspiration and molecular docking analyses of 3-hydroxy-indolin-2-one derivatives as potential antiviral agents / T.B. Hadda, V. Rastija, F. AlMalki, A. Titi, R. Touzani, Y.N. Mabkhot, S. Khalid, A. Zarrouk, B.S. Siddiqui // Curr. Comput.-Aided. Drug Des. – 2021. – V. 17. – P. 123–133.

228. Tetko, I.V. Virtual computational chemistry laboratory – design and description / I.V. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, V.A. Palyulin, E.V. Radchenko, N.S. Zefirov, A.S. Makarenko, V.Y. Tanchuk, V.V. Prokopenko // J. Comput. Aided Mol. Des. – 2005. – V. 19. – N 6. – P. 453-63. DOI: 10.1007/s10822-005-8694-y.

229. Hallman, P.S. The computed distribution of copper (II) and zinc (II) ions among seventeen amino acids present in human blood plasma / P.S. Hallman, D.D. Perrin, A.E. Watt // Biochem. J. – 1971. – 121. – P. 549-555.

230. Сыроешкин, А.В. Кинетическое описание взаимодействия клетки с низкомолекулярными лигандами / А.В. Сыроешкин, О.В. Суздалева, Л.П. Кискина, В.А. Долгополова, С.Н. Быканова, Т.В. Плетенева // Вестник РУДН. – 2001. – N 3. – С. 25-32.

231. Nalecz-Jawecki, G. Spirotox test – Spirostomum ambiguum acute toxicity test / G.Nalecz-Jawecki // Small-Scale freshwater toxicity test / C. Blaise, JF. Férar, Eds. – Dordrecht: Springer, 2005. – P. 299 – 322. DOI: 10.1007/1-4020-3120-3_9.

232. Ashby, M.J. Effect of antibiotics on non-growing planktonic cells and biofilms of Escherichia coli / M.J. Ashby, J.E. Neale, S.J. Knott, I.A. Critchley // J. Antimicrob. Chemother. – 1994. – V. 33. – N 3. – P. 443-52. DOI: 10.1093/jac/33.3.443.

233. Буянова, Н.И. Полицеллюлярные формы Escherichia coli / Н.И. Буянова, С.Л. Соколова, Е.В. Успенская, В.П. Щипков, А.В. Сыроешкин // Здоровье и образование в XXI веке. – 2008. – Т. 10. – N 4. – С. 647-48.

234. Syroeshkin, A.V. Laser diffraction for standardization of heterogeneous pharmaceutical preparations / A.V. Syroeshkin, P.I. Popov, T.V. Grebennikova // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2005. – N 37. – P. 927-30.

235. Song, Y.J. Anti-Biofilm Activity of Grapefruit Seed Extract against Staphylococcus aureus and Escherichia coli / Y.J. Song, H.H. Yu, Y.J. Kim, N.-K. Lee H.-D. Paik // J. Microbiol. Biotechnol. – 2019. – V. 29. – N 8. – P. 1177–1183. DOI: 10.4014/jmb.1905.05022.

236. Mbarga M.J.A. Prolonged Exposure to Antimicrobials Induces Changes in Susceptibility to Antibiotics, Biofilm Formation and Pathogenicity in Staphylococcus aureus / M.J.A. Mbarga, I.V. Podoprighora, E.G. Volina, A.K.L. Davares, M.S. Das, I.N. Sharova // Journal of Pharmaceutical Research International. – 2021. – V. 33. – N 34B. –P. 140-151. DOI: 10.9734/jpri/2021/v33i34B31856.

237. O'Toole, G.A. Microtiter dish biofilm formation assay / G.A. O'Toole // J. Vis. Exp. – 2011. – V. 47. – 2437. DOI: 10.3791/2437.

238. Бобоев, М.У. Процессы образования координационных соединений цинка с изолейцином и триптофаном: дис. ... канд. хим. наук: 02.00.04 / Бобоев Мухаммадисо Убайдуллоевич. – Душанбе, 2019. – 125 с.

239. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.1.0010.15 «Потеря в массе при высушивании». [Электронное издание]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

240. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.2.1.0005.15. «Растворимость». [Электронное издание]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

241. Успенская, Е.В. Методы лазерного светорассеяния в контроле качества водных растворов фармацевтических субстанций и вспомогательных веществ: дис. ... д-ра фарм. наук: 14.04.02 / Успенская Елена Валерьевна. – М., 2018. –113 с.

242. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 3. ФС.2.2.0036.18 «Цинка сульфат гептагидрат». [Электронное издание]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

243. Hansch, C. Chem-Bioinformatics and QSAR: A Review of QSAR Lacking Positive Hydrophobic Terms / C. Hansch, A. Kurup, R. Garg, H. Gao // *Chem. Rev.* – 2001. – V. 101. – P. 619–672.
244. Jhanwar, B. QSAR—Hansch analysis and related approaches in drug design / B. Jhanwar, V. Sharma, R.K. Singla, B. Shrivastava // *Pharmacologyonline.* – 2011. – V. 1. – P. 306–344.
245. Gudasi, K.B. Synthesis, characterization of copper(II), cobalt(II), nickel(II), zinc(II) and cadmium(II) complexes of [7-hydroxy-4-methyl-8-coumarinyl]glycine and a comparative study of their microbial activities / K.B. Gudasi, M.S. Patil, R.S. Vadavi // *Eur. J. Med. Chem.* – 2008. – V. 43. – P. 2436–2441.
246. Rao, N.S. Studies on the synthesis, characterisation and antimicrobial activity of new Co(II), Ni(II) and Zn(II) complexes of Schiff base derived from ninhydrin and glycine / N.S. Rao, M.G. Reddy // *Biol. Metals.* – 1990. – V. 3. – P. 19–23.
247. Walters, W.P. Recognizing molecules with drug-like properties / W.P. Walters, Ajay, M.A. Murcko // *Curr. Opin. Chem. Biol.* – 1999. – V. 3. – N 4. – P. 384–7. DOI: 10.1016/s1367-5931(99)80058-1.
248. Lipinski, C.A. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings / C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – V. 46. – N 1-3. – P. 3-26. DOI: 10.1016/s0169-409x(00)00129-0.
249. Houdt, R.V. Role of bacterial cell surface structures in Escherichia coli biofilm formation / R.V. Houdt, C.W. Michiels // *Res. Microbiol.* – 2005. – V. 156. – N 5-6. – P. 626-33. DOI: 10.1016/j.resmic.2005.02.005.
250. Syroyeshkin, A.V. Role of plasmids in the formation of E. Coli polycellular forms / A.V. Syroyeshkin, N.I. Buyanova, S.L. Sokolova, E.V. Uspenskaya, V.P. Shchipkov // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2011. – V. 150. – P. 440–442.
251. Hall-Stoodley, L. Bacterial biofilms: From the natural environment to infectious diseases / L. Hall-Stoodley, J.W. Costerton, P. Stoodley // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2004. – V. 2. – P. 95– 108.

252. Donlan, R.M. Biofilms on central venous catheters: Is eradication possible? / R.M. Donlan // *Curr. Top Microbiol. Immunol.* – 2008. – V. 322. – P. 133–161.
253. Katongole, P. Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda / P. Katongole, F. Nalubega, N.C. Florence, B. Asimwe, I. Andia // *BMC Infect. Dis.* – 2020. – V. 20. – 453.
254. Stoitsova, S. The multicellular behavior of *Escherichia coli*: A target interferences / S. Stoitsova, A. Vacheva, T. Paunova-Krasteva, R. Ivanova, S. Danova, J. Manasiev // *Proceedings of the New Trends in Microbiology 65th Anniversary of the Stephan Angeloff.* – Sofia: Bulgarian Academy of Sciences, 2012. – P. 147–156.
255. Syroeshkin, A.V. The Influence Of *Escherichia Coli* Specific Surface Cell Structures On The Process Of Polycellular Forms Creation In Liquid Medium / A.V. Syroeshkin, N.I. Buyanova, S.L. Sokolova, V.P. Shchipkov // *Вестник РУДН.* – 2009. – N 4. – С. 154-7.
256. Abendrot, M. Zinc(II) complexes of amino acids as new active ingredients for anti-acne dermatological preparations / M. Abendrot, E. Płuciennik, A. Felczak, K. Zawadzka, E. Piatczak, P. Nowaczyk, U. Kalinowska-Lis // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – 1641.
257. Aiyelabola, T.O. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activities of Coordination Compounds of Aspartic Acid / T.O. Aiyelabola, D.A. Isabirye, E.O. Akinkunmi, O.A. Ogunkunle, I.A.O. Ojo // *J. Chem.* – 2016. – V. 2016. – 7317015.
258. Stanila, A. Antibacterial Activity of Copper and Cobalt Amino Acids Complexes / A. Stanila, C. Braicu, S. Stanila // *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj.* – 2011. – V. 39. – P. 124–129.
259. Harrison, J.J. Biofilms: A new understanding of these microbial communities is driving a revolution that may transform the science of microbiology / J.J. Harrison, R.J. Turner, L.L.R. Marques, H. Ceri // *Am. Sci.* – 2005. – V. 93. – P. 508–515.

260. López, D. Biofilms / D. López, H. Vlamakis, R. Kolter // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. – 2010. – V. 2. – N 7. – a000398. DOI: 10.1101/cshperspect.a000398.
261. Rolfe, R.D. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health / R.D. Rolfe // J. Nutr. – 2000. – V. 130. – P. 396S–402S.
262. Kruis, W. Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis / W. Kruis, E. Schütz, P. Fric, B. Fixa, G. Judmaier, M. Stolte // Aliment. Pharmacol. Ther. – 1997. – V. 11. – P. 853–858.
263. Fitzpatrick, L.R. In vitro and in vivo effects of the probiotic Escherichia coli strain M-17: Immunomodulation and attenuation of murine colitis / L.R. Fitzpatrick, J. Small, R.A. Hoerr, E.F. Bostwick, L. Maines, W.A. Koltun // Br. J. Nutr. – 2008. – V. 100. – P. 530–541.
264. Hillyer, J.F. Gastrointestinal persorption and tissue distribution of differently sized colloidal gold nanoparticles / J.F. Hillyer, R.M. Albrecht // J. Pharm. Sci. – 2001. – V. 90. – P. 1927-1936. DOI:10.1002/jps.1143.
265. Головнев, Н.Н. Синтез соединений d-элементов с аминокислотами / Н.Н. Головнев, Г.В. Новикова, А.Д. Васильев, Т.В. Исакова, Е.А. Ронжина // Вестник Красноярского государственного университета. Естественные науки. – 2006. – N 2. – С. 38–44.
266. Hakkak, R.A. Ultrasonic synthesis of Zn(II)methionine nanostructures: as a precursor for ZnO nano-particles and in vitro study / R.A. Hakkak, M. Ranjbar, S. Mirzaie // JPST. – 2020. – V. 5. – P. 109-116. DOI: 10.22104/jpst.2019.3551.1147.
267. Wilson, R.B. Structural Characterization of Bis(L-methionate)zinc(II), Zn(L-Met) / R.B. Wilson, P. De Meester, D.J. Hodgson // Inorg. Chem. – 1977. – V. 16. – P. 1498-1502. DOI: 10.1021/ic50172a052.
268. Tori, K. Crystal Structures and Molecular Conformations of L-Methionine and L-Norleucine / K. Tori, Y. Iitaka // Acta Cryst. B. – 1973. – V. 29. – P. 2799-2807. DOI: 10.1107/S0567740873007569.

269. Smets, M.M.H. Understanding the single-crystal-to-single-crystal solid-state phase transition of DL-methionine / Smets, M.M.H., S.J.T. Brugman, E.R.H. van Eck, P. Tinnemans, H. Meekes, H. Cuppen // *CrystEngComm*. – 2016. – V. 18. – P. 9363-9373. DOI: 10.1039/C6CE02079H.
270. Yamanobe, M. Polymorphic transformation of dl-methionine crystals in aqueous solutions / M. Yamanobe, H. Takiyama, M. Matsuoka // *J. Cryst. Growth*. – 2002. – V. 237. – P. 2221–2226. DOI: 10.1016/S0022-0248(01)02279-5.
271. Mathieson, A.McL. The Crystal Structures of the Dimorphs of DL-Methionine / A.McL. Mathieson // *Acta Cryst.* – 1952. – V. 5. – P. 332-341. DOI: 10.1107/S0365110X52001015.
272. Suresh, M. Polymorphic Control of α and β dl-Methionine through Swift Cooling Crystallization Process / M. Suresh, K. Srinivasan // *Cryst. Res. Technol.* – 2021. – V. 56. – 2000208. DOI: 10.1002/crat.202000208.
273. Condrate, R.A. Infrared Spectra and Normal Coordinate Analysis of Metal Glycino Complexes / R.A. Condrate, K. Nakamoto // *J. Chem. Phys.* – 1965. – V. 42. – P. 2590-2598. DOI: 10.1063/1.1696337.
274. Yasui, T. Metal complexes of amino acids. I. The circular dichroism of copper(II) complexes with optically active amino acids / T. Yasui // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1965. – V. 38. – P. 1746-1749. DOI: 10.1246/bcsj.38.1746.
275. Yasui, T. Metal Complexes of Amino Acids. III. The Circular Dichroism of Cobalt(III) Ammine and Ethylenediamine Complexes with L-Amino Acids / T. Yasui, J. Hidaka, Y. Shimura // *Bull. Chem. Soc. Jpn.* – 1966. – V. 39. – P. 2417-2424. DOI: 10.1246/bcsj.39.2417.
276. Dudev, T. Tetrahedral vs Octahedral Zinc Complexes with Ligands of Biological Interest: A DFT/CDM Study / T. Dudev, C. Lim // *J. Am. Chem. Soc.* – 2000. – V. 112. – P. 11146-11153. DOI: 10.1021/ja0010296.
277. Park, M.-G. Method for preparation of amino acid chelate [Электронный ресурс] / M.-G. Park, M.H. Choi. // Patent USA № US7375243B2, 20.05.2008. – 2008. – Режим доступа: <https://patents.google.com/patent/US7375243B2/en>.

278. Nastiti, S.A. Synthesis and analysis of zinc methionine, zinc glycine, copper leucine, and copper glycine complexes using atomic absorption spectrophotometry / S.A. Nastiti, H., C.Jatmika // *Int. J. Appl. Pharm.* – 2018. – V. 10. – P. 388–391. DOI: 10.22159/ijap.2018.v10s1.86.

279. Li, G. Elemental impurities in pharmaceutical excipients / G. Li, D. Schoneker, K.L. Ulman, J.J. Sturm, L.M. Thackery, J.F. Kauffman // *J. Pharm. Sci.* – 2015. – V. 104. – N 12. – P. 4197-4206. DOI: 10.1002/jps.24650.

280. Hineman, A. Meeting the USP <232> and <233> Guidelines with ICP-OES / A. Hineman, K. Neubauer // *Spectrosc.* – 2018. – V. 33. – N 9. – P. 8–15.

281. Hineman, A. Determination of Elemental Impurities in Antacids by ICP-MS According to the Validation Protocols Defined in USP Chapters <232> and <233> and ICH Q3D Step 4 Guidelines / A. Hineman // *Spectrosc.* – 2017. – V. 32. – N 7. – P. 36-40.

282. Klopper, R. Microwave Digestion for Elemental Impurities Analysis According to ICH and USP Guidelines / R. Klopper // *Spectrosc.* – 2017. – V. 32. – N 1. – P. 44-49.

283. Furukawa, H. Using XRF as an alternative technique to plasma spectrochemistry for the new USP and ICH directives on elemental impurities in pharmaceutical materials / H. Furukawa, D. Davis // *Spectrosc.* – 2017. – V. 32. – N 7. – P. 12-17.

284. Rousseau, R.M. Concept of the influence coefficient / R.M. Rousseau // *Rigaku J.* – 2001. – V. 18. – N 1. – P. 8-21.

285. Rousseau, R.M. Corrections for matrix effects in X-ray fluorescence analysis—A tutorial / R.M. Rousseau // *Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy.* – 2006. – V. 61. – N 7. – P. 759-777. DOI: 10.1016/j.sab.2006.06.014.

286. Государственная фармакопея РФ XIV изд. Том 1. ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». [Электронное издание]. – Режим доступа: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

**ТОПОЛОГИЧЕСКИЕ МАТРИЦЫ РАССТОЯНИЯ ДЛЯ ХЕЛАТНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ ЦИНКА С АМИНОКИСЛОТАМИ**

Таблица 14. Топологическая матрица расстояния для аланината цинка $Zn(Ala)_2$ для расчета индекса Балабана (J).

N atom i/j	1 N	2 C	3C	4 C	5 O	6 O	7 Zn	8 N	9 C	10 C	11 C	12 O	13 O	$\sum S_{ij}$
1 N	0,143	0,857	1,857	1,857	2,232	0,321	0,171	0,342	1,199	2,199	1,071	1,446	0,321	14,016
2 C	0,857	0	1	1	1,375	1,75	1,028	1,199	2,056	3,056	1,928	2,303	1,178	18,73
3C	1,857	1	0	2	2,375	2,75	2,028	2,199	3,056	4,056	2,928	3,303	2,178	29,73
4 C	1,857	1	2	0	0,375	0,75	0,9	1,071	1,928	2,928	1,8	2,175	1,05	17,834
5 O	2,232	1,375	2,375	0,375	0,25	1,125	1,275	1,446	2,303	3,303	2,175	2,55	1,425	22,209
6 O	0,321	1,75	2,75	0,75	1,125	0,25	0,15	0,321	1,178	2,178	1,05	1,425	0,3	13,548
7 Zn	0,171	1,028	2,028	0,9	1,275	0,15	0,8	0,171	1,028	2,028	0,9	1,275	0,15	11,904
8 N	0,342	1,199	2,199	1,071	1,446	0,321	0,171	0,143	0,857	1,857	1,857	2,232	0,321	14,016
9 C	1,199	2,056	3,056	1,928	2,303	1,178	1,028	0,857	0	1	1	1,375	1,75	18,73
10 C	2,199	3,056	4,056	2,928	3,303	2,178	2,028	1,857	1	0	2	2,375	2,75	29,73
11 C	1,071	1,928	2,928	1,8	2,175	1,05	0,9	1,857	1	2	0	0,375	0,75	17,834
12 O	1,446	2,303	3,303	2,175	2,55	1,425	1,275	2,232	1,375	2,375	0,375	0,25	1,125	22,209
13 O	0,321	1,178	2,178	1,05	1,425	0,3	0,15	0,321	1,75	2,75	0,75	1,125	0,25	13,548

Таблица 15. Топологическая матрица расстояния для валината цинка $Zn(Val)_2$ для расчета индекса Балабана (J).

N atom i/j	1 N	2 C	3 C	4 C	5 C	6 C	7 O	8 O	9 Zn	10 N	11 C	12 C	13 C	14 C	15 C	16 O	17 O	$\sum S_{ij}$
1 N	0,143	0,857	1,857	2,857	2,857	1,857	2,232	0,321	0,171	0,342	1,199	2,199	3,199	3,199	1,071	1,446	0,321	26,128
2 C	0,857	0	1	2	2	1	1,375	1,75	1,028	1,199	2,056	3,056	4,056	4,056	1,928	2,303	1,178	30,842
3 C	1,857	1	0	1	1	2	2,375	2,75	2,028	2,199	3,056	4,056	5,056	5,056	2,928	3,303	2,178	41,842
4 C	2,857	2	1	0	2	3	3,375	3,75	3,028	3,199	4,056	5,056	6,056	6,056	3,928	4,303	3,178	56,842
5 C	2,857	2	1	2	0	3	3,375	3,75	3,028	3,199	4,056	5,056	6,056	6,056	3,928	4,303	3,178	56,842
6 C	1,857	1	2	3	3	0	0,375	0,75	0,9	1,071	1,928	2,928	3,928	3,928	1,8	2,175	1,05	31,69
7 O	2,232	1,375	2,375	3,375	3,375	0,375	0,25	1,125	1,275	1,446	2,303	3,303	4,303	4,303	2,175	2,55	1,425	37,565
8 O	0,321	1,75	2,75	3,75	3,75	0,75	1,125	0,25	0,15	0,321	1,178	2,178	3,178	3,178	1,05	1,425	0,3	27,404
9 Zn	0,171	1,028	2,028	3,028	3,028	0,9	1,275	0,15	0,8	0,171	1,028	2,028	3,028	3,028	0,9	1,275	0,15	24,016
10 N	0,342	1,199	2,199	3,199	3,199	1,071	1,446	0,321	0,171	0,143	0,857	1,857	2,857	2,857	1,857	2,232	0,321	26,128
11 C	1,199	2,056	3,056	4,056	4,056	1,928	2,303	1,178	1,028	0,857	0	1	2	2	1	1,375	1,75	30,842
12 C	2,199	3,056	4,056	5,056	5,056	2,928	3,303	2,178	2,028	1,857	1	0	1	1	2	2,375	2,75	41,842
13 C	3,199	4,056	5,056	6,056	6,056	3,928	4,303	3,178	3,028	2,857	2	1	0	2	3	3,375	3,75	56,842
14 C	3,199	4,056	5,056	6,056	6,056	3,928	4,303	3,178	3,028	2,857	2	1	2	0	3	3,375	3,75	56,842
15 C	1,071	1,928	2,928	3,928	3,928	1,8	2,175	1,05	0,9	1,857	1	2	3	3	0	0,375	0,75	31,69
16 O	1,446	2,303	3,303	4,303	4,303	2,175	2,55	1,425	1,275	2,232	1,375	2,375	3,375	3,375	0,375	0,25	1,125	37,565
17 O	0,321	1,178	2,178	3,178	3,178	1,05	1,425	0,3	0,15	0,321	1,75	2,75	3,75	3,75	0,75	1,125	0,25	27,404

Таблица 16. Топологическая матрица расстояния для лейцината цинка $Zn(Leu)_2$ для расчета индекса Балабана (J).

№ атома i/j	1 N	2 C	3 C	4 C	5 C	6 C	7 C	8 O	9 O	10 Zn	11 N	12 C	13 C	14 C	15 C	16 C	17 C	18 O	19 O	$\sum S_{ij}$
1 N	0,143	0,857	1,857	2,857	3,857	3,857	1,857	2,232	0,321	0,171	0,342	1,199	2,199	3,199	4,199	4,199	1,071	1,446	0,321	36,184
2 C	0,857	0	1	2	3	3	1	1,375	1,75	1,028	1,199	2,056	3,056	4,056	5,056	5,056	1,928	2,303	1,178	40,898
3 C	1,857	1	0	1	2	2	2	2,375	2,75	2,028	2,199	3,056	4,056	5,056	6,056	6,056	2,928	3,303	2,178	51,898
4 C	2,857	2	1	0	1	1	3	3,375	3,75	3,028	3,199	4,056	5,056	6,056	7,056	7,056	3,928	4,303	3,178	64,898
5 C	3,857	3	2	1	0	2	4	4,375	4,75	4,028	4,199	5,056	6,056	7,056	8,056	8,056	4,928	5,303	4,178	81,898
6 C	3,857	3	2	1	2	0	4	4,375	4,75	4,028	4,199	5,056	6,056	7,056	8,056	8,056	4,928	5,303	4,178	81,898
7 C	1,857	1	2	3	4	4	0	0,375	0,75	0,9	1,071	1,928	2,928	3,928	4,928	4,928	1,8	2,175	1,05	42,618
8 O	2,232	1,375	2,375	3,375	4,375	4,375	0,375	0,25	1,125	1,275	1,446	2,303	3,303	4,303	5,303	5,303	2,175	2,55	1,425	49,243
9 O	0,321	1,75	2,75	3,75	4,75	4,75	0,75	1,125	0,25	0,15	0,321	1,178	2,178	3,178	4,178	4,178	1,05	1,425	0,3	38,332
10 Zn	0,171	1,028	2,028	3,028	4,028	4,028	0,9	1,275	0,15	0,8	0,171	1,028	2,028	3,028	4,028	4,028	0,9	1,275	0,15	34,072
11 N	0,342	1,199	2,199	3,199	4,199	4,199	1,071	1,446	0,321	0,171	0,143	0,857	1,857	2,857	3,857	3,857	1,857	2,232	0,321	36,184
12 C	1,199	2,056	3,056	4,056	5,056	5,056	1,928	2,303	1,178	1,028	0,857	0	1	2	3	3	1	1,375	1,75	40,898
13 C	2,199	3,056	4,056	5,056	6,056	6,056	2,928	3,303	2,178	2,028	1,857	1	0	1	2	2	2	2,375	2,75	51,898
14 C	3,199	4,056	5,056	6,056	7,056	7,056	3,928	4,303	3,178	3,028	2,857	2	1	0	1	1	3	3,375	3,75	64,898
15 C	4,199	5,056	6,056	7,056	8,056	8,056	4,928	5,303	4,178	4,028	3,857	3	2	1	0	2	4	4,375	4,75	81,898
16 C	4,199	5,056	6,056	7,056	8,056	8,056	4,928	5,303	4,178	4,028	3,857	3	2	1	2	0	4	4,375	4,75	81,898
17 C	1,071	1,928	2,928	3,928	4,928	4,928	1,8	2,175	1,05	0,9	1,857	1	2	3	4	4	0	0,375	0,75	42,618
18 O	1,446	2,303	3,303	4,303	5,303	5,303	2,175	2,55	1,425	1,275	2,232	1,375	2,375	3,375	4,375	4,375	0,375	0,25	1,125	49,243
19 O	0,321	1,178	2,178	3,178	4,178	4,178	1,05	1,425	0,3	0,15	0,321	1,75	2,75	3,75	4,75	4,75	0,75	1,125	0,25	38,332

Таблица 17. Топологическая матрица расстояния для изолейцината цинка $Zn(Le)_2$ для расчета индекса Балабана (J).

№ атома i/j	1 N	2 C	3 C	4 C	5 C	6 C	7 C	8 O	9 O	10 Zn	11 N	12 C	13 C	14 C	15 C	16 C	17 C	18 O	19 O	ΣS_{ij}
1 N	0,143	0,857	1,857	2,857	2,857	3,857	1,857	2,232	0,321	0,171	0,342	1,199	2,199	3,199	3,199	4,199	1,071	1,446	0,321	34,184
2 C	0,857	0	1	2	2	3	1	1,375	1,75	1,028	1,199	2,056	3,056	4,056	4,056	5,056	1,928	2,303	1,178	38,898
3 C	1,857	1	0	1	1	2	2	2,375	2,75	2,028	2,199	3,056	4,056	5,056	5,056	6,056	2,928	3,303	2,178	49,898
4 C	2,857	2	1	0	2	3	3	3,375	3,75	3,028	3,199	4,056	5,056	6,056	6,056	7,056	3,928	4,303	3,178	66,898
5 C	2,857	2	1	2	0	1	3	3,375	3,75	3,028	3,199	4,056	5,056	6,056	6,056	7,056	3,928	4,303	3,178	64,898
6 C	3,857	3	2	3	1	0	4	4,375	4,75	4,028	4,199	5,056	6,056	7,056	7,056	8,056	4,928	5,303	4,178	81,898
7 C	1,857	1	2	3	3	4	0	0,375	0,75	0,9	1,071	1,928	2,928	3,928	3,928	4,928	1,8	2,175	1,05	40,618
8 O	2,232	1,375	2,375	3,375	3,375	4,375	0,375	0,25	1,125	1,275	1,446	2,303	3,303	4,303	4,303	5,303	2,175	2,55	1,425	47,243
9 O	0,321	1,75	2,75	3,75	3,75	4,75	0,75	1,125	0,25	0,15	0,321	1,178	2,178	3,178	3,178	4,178	1,05	1,425	0,3	36,332
10 Zn	0,171	1,028	2,028	3,028	3,028	4,028	0,9	1,275	0,15	0,8	0,171	1,028	2,028	3,028	3,028	4,028	0,9	1,275	0,15	32,072
11 N	0,342	1,199	2,199	3,199	3,199	4,199	1,071	1,446	0,321	0,171	0,143	0,857	1,857	2,857	2,857	3,857	1,857	2,232	0,321	34,184
12 C	1,199	2,056	3,056	4,056	4,056	5,056	1,928	2,303	1,178	1,028	0,857	0	1	2	2	3	1	1,375	1,75	38,898
13 C	2,199	3,056	4,056	5,056	5,056	6,056	2,928	3,303	2,178	2,028	1,857	1	0	1	1	2	2	2,375	2,75	49,898
14 C	3,199	4,056	5,056	6,056	6,056	7,056	3,928	4,303	3,178	3,028	2,857	2	1	0	2	3	3	3,375	3,75	66,898
15 C	3,199	4,056	5,056	6,056	6,056	7,056	3,928	4,303	3,178	3,028	2,857	2	1	2	0	1	3	3,375	3,75	64,898
16 C	4,199	5,056	6,056	7,056	7,056	8,056	4,928	5,303	4,178	4,028	3,857	3	2	3	1	0	4	4,375	4,75	81,898
17 C	1,071	1,928	2,928	3,928	3,928	4,928	1,8	2,175	1,05	0,9	1,857	1	2	3	3	4	0	0,375	0,75	40,618
18 O	1,446	2,303	3,303	4,303	4,303	5,303	2,175	2,55	1,425	1,275	2,232	1,375	2,375	3,375	3,375	4,375	0,375	0,25	1,125	47,243
19 O	0,321	1,178	2,178	3,178	3,178	4,178	1,05	1,425	0,3	0,15	0,321	1,75	2,75	3,75	3,75	4,75	0,75	1,125	0,25	36,332

Таблица 18. Топологическая матрица расстояния для метионината цинка $Zn(Met)_2$ для расчета индекса Балабана (J).

№ атома i/j	1 N	2 C	3 C	4 C	5 S	6 C	7 C	8 O	9 O	10 Zn	11 N	12 C	13 C	14 C	15 S	16 C	17 C	18 O	19 O	ΣS_{ij}
1 N	0,143	0,857	1,857	2,857	3,232	3,607	1,857	2,232	0,321	0,171	0,342	1,199	2,199	3,199	3,574	3,949	1,071	1,446	0,321	34,434
2 C	0,857	0	1	2	2,375	2,75	1	1,375	1,75	1,028	1,199	2,056	3,056	4,056	4,431	4,806	1,928	2,303	1,178	39,148
3 C	1,857	1	0	1	1,375	1,75	2	2,375	2,75	2,028	2,199	3,056	4,056	5,056	5,431	5,806	2,928	3,303	2,178	50,148
4 C	2,857	2	1	0	0,375	0,75	3	3,375	3,75	3,028	3,199	4,056	5,056	6,056	6,431	6,806	3,928	4,303	3,178	63,148
5 S	3,232	2,375	1,375	0,375	0,625	0,375	3,375	3,75	4,125	3,403	3,574	4,431	5,431	6,431	6,806	7,181	4,303	4,678	3,553	69,398
6 C	3,607	2,75	1,75	0,75	0,375	0	3,75	4,125	4,5	3,778	3,949	4,806	5,806	6,806	7,181	7,556	4,678	5,053	3,928	75,148
7 C	1,857	1	2	3	3,375	3,75	0	0,375	0,75	0,9	1,071	1,928	2,928	3,928	4,303	4,678	1,8	2,175	1,05	40,868
8 O	2,232	1,375	2,375	3,375	3,75	4,125	0,375	0,25	1,125	1,275	1,446	2,303	3,303	4,303	4,678	5,053	2,175	2,55	1,425	47,493
9 O	0,321	1,75	2,75	3,75	4,125	4,5	0,75	1,125	0,25	0,15	0,321	1,178	2,178	3,178	3,553	3,928	1,05	1,425	0,3	36,582
10 Zn	0,171	1,028	2,028	3,028	3,403	3,778	0,9	1,275	0,15	0,8	0,171	1,028	2,028	3,028	3,403	3,778	0,9	1,275	0,15	32,322
11 N	0,342	1,199	2,199	3,199	3,574	3,949	1,071	1,446	0,321	0,171	0,143	0,857	1,857	2,857	3,232	3,607	1,857	2,232	0,321	34,434
12 C	1,199	2,056	3,056	4,056	4,431	4,806	1,928	2,303	1,178	1,028	0,857	0	1	2	2,375	2,75	1	1,375	1,75	39,148
13 C	2,199	3,056	4,056	5,056	5,431	5,806	2,928	3,303	2,178	2,028	1,857	1	0	1	1,375	1,75	2	2,375	2,75	50,148
14 C	3,199	4,056	5,056	6,056	6,431	6,806	3,928	4,303	3,178	3,028	2,857	2	1	0	0,375	0,75	3	3,375	3,75	63,148
15 S	3,574	4,431	5,431	6,431	6,806	7,181	4,303	4,678	3,553	3,403	3,232	2,375	1,375	0,375	0,625	0,375	3,375	3,75	4,125	69,398
16 C	3,949	4,806	5,806	6,806	7,181	7,556	4,678	5,053	3,928	3,778	3,607	2,75	1,75	0,75	0,375	0	3,75	4,125	4,5	75,148
17 C	1,071	1,928	2,928	3,928	4,303	4,678	1,8	2,175	1,05	0,9	1,857	1	2	3	3,375	3,75	0	0,375	0,75	40,868
18 O	1,446	2,303	3,303	4,303	4,678	5,053	2,175	2,55	1,425	1,275	2,232	1,375	2,375	3,375	3,75	4,125	0,375	0,25	1,125	47,493
19 O	0,321	1,178	2,178	3,178	3,553	3,928	1,05	1,425	0,3	0,15	0,321	1,75	2,75	3,75	4,125	4,5	0,75	1,125	0,25	36,582

Таблица 19. Топологическая матрица расстояния для треонината цинка $Zn(Thr)_2$ для расчета индекса Балабана (J).

№ атома i/j	1 N	2 C	3 C	4 C	5 O	6 C	7 O	8 O	9 Zn	10 N	11 C	12 C	13 C	14 O	15 C	16 O	17 O	ΣS_{ij}
1 N	0,143	0,857	1,857	2,857	2,607	1,857	2,232	0,321	0,171	0,342	1,199	2,199	3,199	2,949	1,071	1,446	0,321	25,628
2 C	0,857	0	1	2	1,75	1	1,375	1,75	1,028	1,199	2,056	3,056	4,056	3,806	1,928	2,303	1,178	30,342
3 C	1,857	1	0	1	0,75	2	2,375	2,75	2,028	2,199	3,056	4,056	5,056	4,806	2,928	3,303	2,178	41,342
4 C	2,857	2	1	0	1,75	3	3,375	3,75	3,028	3,199	4,056	5,056	6,056	5,806	3,928	4,303	3,178	56,342
5 O	2,607	1,75	0,75	1,75	0,25	2,75	3,125	3,5	2,778	2,949	3,806	4,806	5,806	5,556	3,678	4,053	2,928	52,842
6 C	1,857	1	2	3	2,75	0	0,375	0,75	0,9	1,071	1,928	2,928	3,928	3,678	1,8	2,175	1,05	31,19
7 O	2,232	1,375	2,375	3,375	3,125	0,375	0,25	1,125	1,275	1,446	2,303	3,303	4,303	4,053	2,175	2,55	1,425	37,065
8 O	0,321	1,75	2,75	3,75	3,5	0,75	1,125	0,25	0,15	0,321	1,178	2,178	3,178	2,928	1,05	1,425	0,3	26,904
9 Zn	0,171	1,028	2,028	3,028	2,778	0,9	1,275	0,15	0,8	0,171	1,028	2,028	3,028	2,778	0,9	1,275	0,15	23,516
10 N	0,342	1,199	2,199	3,199	2,949	1,071	1,446	0,321	0,171	0,143	0,857	1,857	2,857	2,607	1,857	2,232	0,321	25,628
11 C	1,199	2,056	3,056	4,056	3,806	1,928	2,303	1,178	1,028	0,857	0	1	2	1,75	1	1,375	1,75	30,342
12 C	2,199	3,056	4,056	5,056	4,806	2,928	3,303	2,178	2,028	1,857	1	0	1	0,75	2	2,375	2,75	41,342
13 C	3,199	4,056	5,056	6,056	5,806	3,928	4,303	3,178	3,028	2,857	2	1	0	1,75	3	3,375	3,75	56,342
14 O	2,949	3,806	4,806	5,806	5,556	3,678	4,053	2,928	2,778	2,607	1,75	0,75	1,75	0,25	2,75	3,125	3,5	52,842
15 C	1,071	1,928	2,928	3,928	3,678	1,8	2,175	1,05	0,9	1,857	1	2	3	2,75	0	0,375	0,75	31,19
16 O	1,446	2,303	3,303	4,303	4,053	2,175	2,55	1,425	1,275	2,232	1,375	2,375	3,375	3,125	0,375	0,25	1,125	37,065
17 O	0,321	1,178	2,178	3,178	2,928	1,05	1,425	0,3	0,15	0,321	1,75	2,75	3,75	3,5	0,75	1,125	0,25	26,904

Таблица 20. Топологическая матрица расстояния для цинка лизината $Zn(Lys)_2$ для расчета индекса Балабана (J).

№ атома i/j	1 N	2 C	3 C	4 C	5 C	6 C	7 N	8 C	9 O	10 O	11 Zn	12 N
1 N	0,143	0,857	1,857	2,857	3,857	4,857	5,714	1,857	2,232	0,321	0,171	0,342
2 C	0,857	0	1	2	3	4	4,857	1	1,375	1,75	1,028	1,199
3 C	1,857	1	0	1	2	3	3,857	2	2,375	2,75	2,028	2,199
4 C	2,857	2	1	0	1	2	2,857	3	3,375	3,75	3,028	3,199
5 C	3,857	3	2	1	0	1	1,857	4	4,375	4,75	4,028	4,199
6 C	4,857	4	3	2	1	0	0,857	5	5,375	5,75	5,028	5,199
7 N	5,714	4,857	3,857	2,857	1,857	0,857	0,143	5,857	6,232	6,607	5,885	6,056
8 C	1,857	1	2	3	4	5	5,857	0	0,375	0,75	0,9	1,071
9 O	2,232	1,375	2,375	3,375	4,375	5,375	6,232	0,375	0,25	1,125	1,275	1,446
10 O	0,321	1,75	2,75	3,75	4,75	5,75	6,607	0,75	1,125	0,25	0,15	0,321
11 Zn	0,171	1,028	2,028	3,028	4,028	5,028	5,885	0,9	1,275	0,15	0,8	0,171
12 N	0,342	1,199	2,199	3,199	4,199	5,199	6,056	1,071	1,446	0,321	0,171	0,143
13 C	1,199	2,056	3,056	4,056	5,056	6,056	6,913	1,928	2,303	1,178	1,028	0,857
14 C	2,199	3,056	4,056	5,056	6,056	7,056	7,913	2,928	3,303	2,178	2,028	1,857
15 C	3,199	4,056	5,056	6,056	7,056	8,056	8,913	3,928	4,303	3,178	3,028	2,857
16 C	4,199	5,056	6,056	7,056	8,056	9,056	9,913	4,928	5,303	4,178	4,028	3,857
17 C	5,199	6,056	7,056	8,056	9,056	10,056	10,913	5,928	6,303	5,178	5,028	4,857
18 N	6,056	6,913	7,913	8,913	9,913	10,913	11,77	6,785	7,16	6,035	5,885	5,714
19 C	1,071	1,928	2,928	3,928	4,928	5,928	6,785	1,8	2,175	1,05	0,9	1,857
20 O	1,446	2,303	3,303	4,303	5,303	6,303	7,16	2,175	2,55	1,425	1,275	2,232
21 O	0,321	1,178	2,178	3,178	4,178	5,178	6,035	1,05	1,425	0,3	0,15	0,321

Продолжение таблицы 20.

№ атома i/j	13 C	14 C	15 C	16 C	17 C	18 N	19 C	20 O	21 O	ΣS_{ij}
1 N	1,199	2,199	3,199	4,199	5,199	6,056	1,071	1,446	0,321	49,954
2 C	2,056	3,056	4,056	5,056	6,056	6,913	1,928	2,303	1,178	54,668
3 C	3,056	4,056	5,056	6,056	7,056	7,913	2,928	3,303	2,178	65,668
4 C	4,056	5,056	6,056	7,056	8,056	8,913	3,928	4,303	3,178	78,668
5 C	5,056	6,056	7,056	8,056	9,056	9,913	4,928	5,303	4,178	93,668
6 C	6,056	7,056	8,056	9,056	10,056	10,913	5,928	6,303	5,178	110,668
7 N	6,913	7,913	8,913	9,913	10,913	11,77	6,785	7,16	6,035	127,094
8 C	1,928	2,928	3,928	4,928	5,928	6,785	1,8	2,175	1,05	57,26
9 O	2,303	3,303	4,303	5,303	6,303	7,16	2,175	2,55	1,425	64,635
10 O	1,178	2,178	3,178	4,178	5,178	6,035	1,05	1,425	0,3	52,974
11 Zn	1,028	2,028	3,028	4,028	5,028	5,885	0,9	1,275	0,15	47,842
12 N	0,857	1,857	2,857	3,857	4,857	5,714	1,857	2,232	0,321	49,954
13 C	0	1	2	3	4	4,857	1	1,375	1,75	54,668
14 C	1	0	1	2	3	3,857	2	2,375	2,75	65,668
15 C	2	1	0	1	2	2,857	3	3,375	3,75	78,668
16 C	3	2	1	0	1	1,857	4	4,375	4,75	93,668
17 C	4	3	2	1	0	0,857	5	5,375	5,75	110,668
18 N	4,857	3,857	2,857	1,857	0,857	0,143	5,857	6,232	6,607	127,094
19 C	1	2	3	4	5	5,857	0	0,375	0,75	57,26
20 O	1,375	2,375	3,375	4,375	5,375	6,232	0,375	0,25	1,125	64,635
21 O	1,75	2,75	3,75	4,75	5,75	6,607	0,75	1,125	0,25	52,974

Таблица 21. Топологическая матрица расстояния для цинка триптофаната $Zn(Trp)_2$ для расчета индекса Балабана (J).

№ атома i/j	1 N	2 C	3 C	4 C	5 C	6 N	7 C	8 C	9 C	10 C	11 C	12 C	13 C	14 O	15 O	16 Zn
1 N	0,143	0,857	1,857	2,857	3,357	4,214	4,527	5,197	5,867	5,197	4,527	3,857	1,857	2,232	0,321	0,171
2 C	0,857	0	1	2	2,5	3,357	3,67	4,34	5,01	4,34	3,67	3	1	1,375	1,75	1,028
3 C	1,857	1	0	1	1,5	2,357	2,67	3,34	4,01	3,34	2,67	2	2	2,375	2,75	2,028
4 C	2,857	2	1	0	0,5	1,357	1,67	2,34	3,01	2,34	1,67	1	3	3,375	3,75	3,028
5 C	3,357	2,5	1,5	0,5	0	0,857	1,714	2,384	3,054	2,84	2,17	1,5	3,5	3,875	4,25	3,528
6 N	4,214	3,357	2,357	1,357	0,857	0,143	0,857	1,527	2,197	2,867	2,197	1,527	4,357	4,732	5,107	4,385
7 C	4,527	3,67	2,67	1,67	1,714	0,857	0	0,67	1,34	2,01	1,34	0,67	4,67	5,045	5,42	4,698
8 C	5,197	4,34	3,34	2,34	2,384	1,527	0,67	0	0,67	1,34	2,01	1,34	5,34	5,715	6,09	5,368
9 C	5,867	5,01	4,01	3,01	3,054	2,197	1,34	0,67	0	0,67	1,34	2,01	6,01	6,385	6,76	6,038
10 C	5,197	4,34	3,34	2,34	2,84	2,867	2,01	1,34	0,67	0	0,67	1,34	5,34	5,715	6,09	5,368
11 C	4,527	3,67	2,67	1,67	2,17	2,197	1,34	2,01	1,34	0,67	0	0,67	4,67	5,045	5,42	4,698
12 C	3,857	3	2	1	1,5	1,527	0,67	1,34	2,01	1,34	0,67	0	4	4,375	4,75	4,028
13 C	1,857	1	2	3	3,5	4,357	4,67	5,34	6,01	5,34	4,67	4	0	0,375	0,75	0,9
14 O	2,232	1,375	2,375	3,375	3,875	4,732	5,045	5,715	6,385	5,715	5,045	4,375	0,375	0,25	1,125	1,275
15 O	0,321	1,75	2,75	3,75	4,25	5,107	5,42	6,09	6,76	6,09	5,42	4,75	0,75	1,125	0,25	0,15
16 Zn	0,171	1,028	2,028	3,028	3,528	4,385	4,698	5,368	6,038	5,368	4,698	4,028	0,9	1,275	0,15	0,8
17 N	0,342	1,199	2,199	3,199	3,699	4,556	4,869	5,539	6,209	5,539	4,869	4,199	1,071	1,446	0,321	0,171
18 C	1,199	2,056	3,056	4,056	4,556	5,413	5,726	6,396	7,066	6,396	5,726	5,056	1,928	2,303	1,178	1,028
19 C	2,199	3,056	4,056	5,056	5,556	6,413	6,726	7,396	8,066	7,396	6,726	6,056	2,928	3,303	2,178	2,028
20 C	3,199	4,056	5,056	6,056	6,556	7,413	7,726	8,396	9,066	8,396	7,726	7,056	3,928	4,303	3,178	3,028
21 C	3,699	4,556	5,556	6,556	7,056	7,913	8,226	8,896	9,566	8,896	8,226	7,556	4,428	4,803	3,678	3,528
22 N	4,556	5,413	6,413	7,413	7,913	8,77	9,083	9,753	10,423	9,753	9,083	8,413	5,285	5,66	4,535	4,385
23 C	4,869	5,726	6,726	7,726	8,226	9,083	9,396	10,066	10,736	10,066	9,396	8,726	5,598	5,973	4,848	4,698
24 C	5,539	6,396	7,396	8,396	8,896	9,753	10,066	10,736	11,406	10,736	10,066	9,396	6,268	6,643	5,518	5,368
25 C	6,209	7,066	8,066	9,066	9,566	10,423	10,736	11,406	12,076	11,406	10,736	10,066	6,938	7,313	6,188	6,038
26 C	5,539	6,396	7,396	8,396	8,896	9,753	10,066	10,736	11,406	10,736	10,066	9,396	6,268	6,643	5,518	5,368
27 C	4,869	5,726	6,726	7,726	8,226	9,083	9,396	10,066	10,736	10,066	9,396	8,726	5,598	5,973	4,848	4,698
28 C	4,199	5,056	6,056	7,056	7,556	8,413	8,726	9,396	10,066	9,396	8,726	8,056	4,928	5,303	4,178	4,028
29 C	1,071	1,928	2,928	3,928	4,428	5,285	5,598	6,268	6,938	6,268	5,598	4,928	1,8	2,175	1,05	0,9
30 O	1,446	2,303	3,303	4,303	4,803	5,66	5,973	6,643	7,313	6,643	5,973	5,303	2,175	2,925	1,425	1,275
31 O	0,321	1,178	2,178	3,178	3,678	4,535	4,848	5,518	6,188	5,518	4,848	4,178	1,05	1,425	0,3	0,15

Продолжение таблицы 21.

№ атома i/j	17 N	18 C	19 C	20 C	21 C	22 N	23 C	24 C	25 C	26 C	27 C	28 C	29 C	30 O	31 O	ΣS_{ij}
1 N	0,342	1,199	2,199	3,199	3,699	4,556	4,869	5,539	6,209	5,539	4,869	4,199	1,071	1,446	0,321	96,294
2 C	1,199	2,056	3,056	4,056	4,556	5,413	5,726	6,396	7,066	6,396	5,726	5,056	1,928	2,303	1,178	101,008
3 C	2,199	3,056	4,056	5,056	5,556	6,413	6,726	7,396	8,066	7,396	6,726	6,056	2,928	3,303	2,178	112,008
4 C	3,199	4,056	5,056	6,056	6,556	7,413	7,726	8,396	9,066	8,396	7,726	7,056	3,928	4,303	3,178	125,008
5 C	3,699	4,556	5,556	6,556	7,056	7,913	8,226	8,896	9,566	8,896	8,226	7,556	4,428	4,803	3,678	137,14
6 N	4,556	5,413	6,413	7,413	7,913	8,77	9,083	9,753	10,423	9,753	9,083	8,413	5,285	5,66	4,535	154,504
7 C	4,869	5,726	6,726	7,726	8,226	9,083	9,396	10,066	10,736	10,066	9,396	8,726	5,598	5,973	4,848	158,132
8 C	5,539	6,396	7,396	8,396	8,896	9,753	10,066	10,736	11,406	10,736	10,066	9,396	6,268	6,643	5,518	174,882
9 C	6,209	7,066	8,066	9,066	9,566	10,423	10,736	11,406	12,076	11,406	10,736	10,066	6,938	7,313	6,188	191,632
10 C	5,539	6,396	7,396	8,396	8,896	9,753	10,066	10,736	11,406	10,736	10,066	9,396	6,268	6,643	5,518	176,678
11 C	4,869	5,726	6,726	7,726	8,226	9,083	9,396	10,066	10,736	10,066	9,396	8,726	5,598	5,973	4,848	159,928
12 C	4,199	5,056	6,056	7,056	7,556	8,413	8,726	9,396	10,066	9,396	8,726	8,056	4,928	5,303	4,178	143,178
13 C	1,071	1,928	2,928	3,928	4,428	5,285	5,598	6,268	6,938	6,268	5,598	4,928	1,8	2,175	1,05	107,96
14 O	1,446	2,303	3,303	4,303	4,803	5,66	5,973	6,643	7,313	6,643	5,973	5,303	2,175	2,925	1,425	119,46
15 O	0,321	1,178	2,178	3,178	3,678	4,535	4,848	5,518	6,188	5,518	4,848	4,178	1,05	1,425	0,3	103,674
16 Zn	0,171	1,028	2,028	3,028	3,528	4,385	4,698	5,368	6,038	5,368	4,698	4,028	0,9	1,275	0,15	94,182
17 N	0,143	0,857	1,857	2,857	3,357	4,214	4,527	5,197	5,867	5,197	4,527	3,857	1,857	2,232	0,321	96,294
18 C	0,857	0	1	2	2,5	3,357	3,67	4,34	5,01	4,34	3,67	3	1	1,375	1,75	101,008
19 C	1,857	1	0	1	1,5	2,357	2,67	3,34	4,01	3,34	2,67	2	2	2,375	2,75	112,008
20 C	2,857	2	1	0	0,5	1,357	1,67	2,34	3,01	2,34	1,67	1	3	3,375	3,75	125,008
21 C	3,357	2,5	1,5	0,5	0	0,857	1,714	2,384	3,054	2,84	2,17	1,5	3,5	3,875	4,25	137,14
22 N	4,214	3,357	2,357	1,357	0,857	0,143	0,857	1,527	2,197	2,867	2,197	1,527	4,357	4,732	5,107	154,504
23 C	4,527	3,67	2,67	1,67	1,714	0,857	0	0,67	1,34	2,01	1,34	0,67	4,67	5,045	5,42	158,132
24 C	5,197	4,34	3,34	2,34	2,384	1,527	0,67	0	0,67	1,34	2,01	1,34	5,34	5,715	6,09	174,882
25 C	5,867	5,01	4,01	3,01	3,054	2,197	1,34	0,67	0	0,67	1,34	2,01	6,01	6,385	6,76	191,632
26 C	5,197	4,34	3,34	2,34	2,84	2,867	2,01	1,34	0,67	0	0,67	1,34	5,34	5,715	6,09	176,678
27 C	4,527	3,67	2,67	1,67	2,17	2,197	1,34	2,01	1,34	0,67	0	0,67	4,67	5,045	5,42	159,928
28 C	3,857	3	2	1	1,5	1,527	0,67	1,34	2,01	1,34	0,67	0	4	4,375	4,75	143,178
29 C	1,857	1	2	3	3,5	4,357	4,67	5,34	6,01	5,34	4,67	4	0	0,375	0,75	107,96
30 O	2,232	1,375	2,375	3,375	3,875	4,732	5,045	5,715	6,385	5,715	5,045	4,375	0,375	0,25	1,125	119,46
31 O	0,321	1,75	2,75	3,75	4,25	5,107	5,42	6,09	6,76	6,09	5,42	4,75	0,75	1,125	0,25	103,674

Таблица 22. Топологическая матрица расстояния для цинка фенилаланинат $Zn(Phe)_2$ для расчета индекса Балабана (J).

№ атома i/j	1 N	2 C	3 C	4 C	5 C	6 C	7 C	8 C	9 C	10 C	11 O	12 O	13 Zn	14 N
1 N	0,143	0,857	1,857	2,857	3,527	4,197	4,867	4,197	3,527	1,857	2,232	0,321	0,171	0,342
2 C	0,857	0	1	2	2,67	3,34	4,01	3,34	2,67	1	1,375	1,75	1,028	1,199
3 C	1,857	1	0	1	1,67	2,34	3,01	2,34	1,67	2	2,375	2,75	2,028	2,199
4 C	2,857	2	1	0	0,67	1,34	2,01	1,34	0,67	3	3,375	3,75	3,028	3,199
5 C	3,527	2,67	1,67	0,67	0	0,67	1,34	2,01	1,34	3,67	4,045	4,42	3,698	3,869
6 C	4,197	3,34	2,34	1,34	0,67	0	0,67	1,34	2,01	4,34	4,715	5,09	4,368	4,539
7 C	4,867	4,01	3,01	2,01	1,34	0,67	0	0,67	1,34	5,01	5,385	5,76	5,038	5,209
8 C	4,197	3,34	2,34	1,34	2,01	1,34	0,67	0	0,67	4,34	4,715	5,09	4,368	4,539
9 C	3,527	2,67	1,67	0,67	1,34	2,01	1,34	0,67	0	3,67	4,045	4,42	3,698	3,869
10 C	1,857	1	2	3	3,67	4,34	5,01	4,34	3,67	0	0,375	0,75	0,9	1,071
11 O	2,232	1,375	2,375	3,375	4,045	4,715	5,385	4,715	4,045	0,375	0,25	1,125	1,275	1,446
12 O	0,321	1,75	2,75	3,75	4,42	5,09	5,76	5,09	4,42	0,75	1,125	0,25	0,15	0,321
13 Zn	0,171	1,028	2,028	3,028	3,698	4,368	5,038	4,368	3,698	0,9	1,275	0,15	0,8	0,171
14 N	0,342	1,199	2,199	3,199	3,869	4,539	5,209	4,539	3,869	1,071	1,446	0,321	0,171	0,143
15 C	1,199	2,056	3,056	4,056	4,726	5,396	6,066	5,396	4,726	1,928	2,303	1,178	1,028	0,857
16 C	2,199	3,056	4,056	5,056	5,726	6,396	7,066	6,396	5,726	2,928	3,303	2,178	2,028	1,857
17 C	3,199	4,056	5,056	6,056	6,726	7,396	8,066	7,396	6,726	3,928	4,303	3,178	3,028	2,857
18 C	3,869	4,726	5,726	6,726	7,396	8,066	8,736	8,066	7,396	4,598	4,973	3,848	3,698	3,527
19 C	4,539	5,396	6,396	7,396	8,066	8,736	9,406	8,736	8,066	5,268	5,643	4,518	4,368	4,197
20 C	5,209	6,066	7,066	8,066	8,736	9,406	10,076	9,406	8,736	5,938	6,313	5,188	5,038	4,867
21 C	4,539	5,396	6,396	7,396	8,066	8,736	9,406	8,736	8,066	5,268	5,643	4,518	4,368	4,197
22 C	3,869	4,726	5,726	6,726	7,396	8,066	8,736	8,066	7,396	4,598	4,973	3,848	3,698	3,527
23 C	1,071	1,928	2,928	3,928	4,598	5,268	5,938	5,268	4,598	1,8	2,175	1,05	0,9	1,857
24 O	1,446	2,303	3,303	4,303	4,973	5,643	6,313	5,643	4,973	2,175	2,55	1,425	1,275	2,232
25 O	0,321	1,178	2,178	3,178	3,848	4,518	5,188	4,518	3,848	1,05	1,425	0,3	0,15	0,321

Продолжение таблицы 22.

№ атома i/j	15 C	16 C	17 C	18 C	19 C	20 C	21 C	22 C	23 C	24 O	25 O	ΣS_{ij}
1 N	1,199	2,199	3,199	3,869	4,539	5,209	4,539	3,869	1,071	1,446	0,321	62,412
2 C	2,056	3,056	4,056	4,726	5,396	6,066	5,396	4,726	1,928	2,303	1,178	67,126
3 C	3,056	4,056	5,056	5,726	6,396	7,066	6,396	5,726	2,928	3,303	2,178	78,126
4 C	4,056	5,056	6,056	6,726	7,396	8,066	7,396	6,726	3,928	4,303	3,178	91,126
5 C	4,726	5,726	6,726	7,396	8,066	8,736	8,066	7,396	4,598	4,973	3,848	103,856
6 C	5,396	6,396	7,396	8,066	8,736	9,406	8,736	8,066	5,268	5,643	4,518	116,586
7 C	6,066	7,066	8,066	8,736	9,406	10,076	9,406	8,736	5,938	6,313	5,188	129,316
8 C	5,396	6,396	7,396	8,066	8,736	9,406	8,736	8,066	5,268	5,643	4,518	116,586
9 C	4,726	5,726	6,726	7,396	8,066	8,736	8,066	7,396	4,598	4,973	3,848	103,856
10 C	1,928	2,928	3,928	4,598	5,268	5,938	5,268	4,598	1,8	2,175	1,05	71,462
11 O	2,303	3,303	4,303	4,973	5,643	6,313	5,643	4,973	2,175	2,55	1,425	80,337
12 O	1,178	2,178	3,178	3,848	4,518	5,188	4,518	3,848	1,05	1,425	0,3	67,176
13 Zn	1,028	2,028	3,028	3,698	4,368	5,038	4,368	3,698	0,9	1,275	0,15	60,3
14 N	0,857	1,857	2,857	3,527	4,197	4,867	4,197	3,527	1,857	2,232	0,321	62,412
15 C	0	1	2	2,67	3,34	4,01	3,34	2,67	1	1,375	1,75	67,126
16 C	1	0	1	1,67	2,34	3,01	2,34	1,67	2	2,375	2,75	78,126
17 C	2	1	0	0,67	1,34	2,01	1,34	0,67	3	3,375	3,75	91,126
18 C	2,67	1,67	0,67	0	0,67	1,34	2,01	1,34	3,67	4,045	4,42	103,856
19 C	3,34	2,34	1,34	0,67	0	0,67	1,34	2,01	4,34	4,715	5,09	116,586
20 C	4,01	3,01	2,01	1,34	0,67	0	0,67	1,34	5,01	5,385	5,76	129,316
21 C	3,34	2,34	1,34	2,01	1,34	0,67	0	0,67	4,34	4,715	5,09	116,586
22 C	2,67	1,67	0,67	1,34	2,01	1,34	0,67	0	3,67	4,045	4,42	103,856
23 C	1	2	3	3,67	4,34	5,01	4,34	3,67	0	0,375	0,75	71,462
24 O	1,375	2,375	3,375	4,045	4,715	5,385	4,715	4,045	0,375	0,25	1,125	80,337
25 O	1,75	2,75	3,75	4,42	5,09	5,76	5,09	4,42	0,75	1,125	0,25	67,176