



Оценка структуры и биологической активности комплекса ацетата меди(II) с (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальмином

*А. В. Дробышев¹, Н. Ю. Садовская¹✉, В. Н. Глушко¹, Е. И. Кожухова¹,
С. К. Белусь¹, В. М. Ретивов¹, А. В. Акимов², А. С. Шмаков²*

¹Национальный Исследовательский Центр «Курчатовский институт», Москва, Россия,
e-mail: sadovskaya-n@mail.ru

²Федеральный исследовательский центр проблем химической физики и медицинской химии
РАН, Черноголовка, Россия

Поступила в редакцию: 03.04.2024 г.; после доработки: 18.09.2024 г.; принята в печать: 08.10.2024 г.

Аннотация – Работа посвящена прогнозированию и экспериментальному исследованию структуры и биологической активности комплекса ацетата меди(II) с (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальмином. На первом этапе работы оценивали сравнительную термодинамическую стабильность структур с разной координацией краунэфирного лиганда на атоме меди. Оценку проводили относительно суммарной свободной энергии (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальмина и ацетата меди(II) $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ методом DFT в программе Priroda 20. Прогнозирование спектра биологической активности, а также оценку вероятной токсичности этих соединений по отношению к микроорганизмам выполняли с использованием доступных в сети Интернет компьютерных программ PASS, GUSAR. Исследование *in vitro* на клеточных линиях показало противоопухолевый эффект синтезированных соединений. Кроме того, был обнаружен антибактериальный эффект в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) микроорганизмов.

Ключевые слова: краун-эфиры, основания Шиффа, медные комплексы, структура, биологическая активность.

Materials with new functional properties

Evaluation of the structure and biological activity of the complex of copper (II) acetate with (4-aminobenzo-15-crown-5)-4-pyridinecarboxalimine

*Aleksey V. Drobyshev¹, Natalia Yu. Sadovskaya¹✉, Valentina N. Glushko¹, Evgenia I. Kozhukhova¹, Svetlana K. Belus¹, Vasiliy M. Retivov¹, Alexander V. Akimov²,
and Alexander S. Shmakov²*

¹National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow, Russia, e-mail: sadovskaya-n@mail.ru²Federal Research Center of Problems of Chemical Physics and Medical Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow Region, Chernogolovka, Russia

Received: April 3, 2024; Revised: September 18, 2024; Accepted: October 8, 2024

Abstract – The work is devoted to the prediction and experimental study of the structure and biological activity of the complex of copper(II) acetate with (4-aminobenzo-15-crown-5)-4-pyridinecarboxalimine. At the first stage of the work, the comparative thermodynamic stability of structures with different coordination of the crown ether ligand on the copper atom was assessed. The evaluation was carried out regarding the total free energy of (4-aminobenzo-15-crown-5)-4-pyridinecarboxalimine and copper(II) acetate $\text{Cu}(\text{AcO})_2$ using the DFT method in the Priroda 20 program. Prediction of the spectrum of biological activity, as well as assessment of the probable toxicity of these compounds, was carried out using the PASS and GUSAR computer programs available on the Internet. An in vitro study on cell lines showed the antitumor effect of the synthesized compound. In addition, an antibacterial effect was discovered against gram-positive (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*) and gram-negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) microorganisms.

Keywords: crown ethers, Schiff bases, copper complexes, structure, biological activity.

ВВЕДЕНИЕ

Медные комплексы азометиновых производных краун-эфиров представляют интерес при разработке биологически активных препаратов [1–4], поскольку проявляют противоопухолевую и антибактериальную активность.

Разработка методики синтеза новых соединений, установление структуры и изучение свойств полученных соединений являются довольно трудоемким процессом. Часто возникают трудности с расшифровкой спектров при экранировании сигналов иона-комплексобразователя, а проведение рентгеноструктурного анализа не всегда представляется возможным по причине выпадения аморфного порошка. В связи с этим прогнозирование существования той или иной структуры возможно оценить с помощью методов квантовой химии. Также дизайн структуры нового соединения подразумевает прогнозирование свойств, обуславливающих практическое применение. В нашем конкретном случае мы прогнозировали и исследовали антибактериальные и противоопухолевые свойства впервые полученных соединений. Поскольку химическое и пространственное строение вещества определяет наличие у него биоактивности, данная работа посвящена прогнозированию геометрии и биологических применений синтезированного соединения *in silico*, а также экспериментальному исследованию *in vitro* противоопухолевых и антибактериальных свойств медного комплекса (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальмина.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ^1H и ^{13}C регистрировали на приборе Bruker AVANCE III NanoBay с рабочими частотами 300,28 и 75,50 МГц соответственно, в DMSO-d_6 при 25°C. Химические сдвиги ^1H и ^{13}C

калибровали по сигналам остаточных протонов (2,50 м. д.) и атомов углерода (39,51 м. д.) ДМСО-d₆.

Элементный анализ проводили на CHNS-анализаторе Eurovector EuroEA 3000.

ИК-спектры поглощения регистрировали на ИК-Фурье спектрометре VERTEX 70 в диапазоне волновых чисел от 400 до 3800 см⁻¹ с разрешением 4 см⁻¹ для образцов в виде таблеток с матрицей KBr.

Масс-спектры с ионизацией электроспреем (ESI) были получены с помощью масс-спектрометра с ионизацией электроспреем AmaZon Bruker Daltonik GmbH, в режиме UltraScan позитивной и негативной ионизации. Технические характеристики: диапазон регистрируемых фрагментов: 70–2200 m/z, подача образца со скоростью 240 мкл/ч, напряжение ионизации – 4,5 кВ, поток газа-носителя – 6 л/мин, температура капилляра – 100°C, накопление сигнала – 300 000 ионов в ионной ловушке, усреднение сигнала – 14 сканов.

Для метода ЭПР образцы медного комплекса (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальмина массой около 100 мг помещали в кварцевую ампулу с внешним диаметром 4 мм, из ампулы откачивали воздух и заполняли аргоном. Далее ампулу помещали в резонатор спектрометра ЭПР Bruker Elexsys II E500 непрерывного излучения X-диапазона (9,5 ГГц). Температуру контролировали проточным криостатом жидкого азота, спектры регистрировали при температуре 100К. Мощность СВЧ-излучения составляла 6,325 мВт (ослабление 15 дБ), частота модуляции — 100 кГц, амплитуда модуляции — 10,0 Гс. Затем снимались спектры в растворе, исследуемое вещество растворяли в соотношении 1:500 в 2-метилтетрагидрофуране. Ампулу с раствором быстро замораживали в жидком азоте для стеклования образца и далее помещали в криостат.

При проведении синтезов использовали реагенты: этанол, метанол, изопропанол, (квалификация х.ч., ЗАО «Экрос»), диэтиловый эфир (квалификация ч.д.а., ООО «Кузбассоргхим»), 4-пиридинкарбоксальдегид (98%, «Merck»), ацетат меди (II) (98%, ООО АО «Реахим»), 4-аминобензо-15-краун-5 синтезирован нами ранее по методике [5]).

Термодинамический расчет структуры молекулы проводили методом DFT в программе Priroda 20 [6] с обменно-корреляционным функционалом PBE [7] и базисом 3z.

Синтез (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальдимина

В трехгорлую колбу помещали 1.41 г (0.005 моль) 4-аминобензо-15-краун-5, растворенного в 5 мл EtOH, нагревали до 40–42 °С. Добавляли по каплям 0.535 мл (0.006 моль). Выдерживали при температуре 40–42 °С 3 ч. По окончании выдержки раствор упаривали, получали масло желтого цвета, высаживали серным эфиром. Перекристаллизовывали из изопропилового спирта. Продукт представлял собой порошок зеленого цвета с т. пл. 75,1–77,0°C. Выход продукта - 86%, чистота - 98%.

ИК-спектр (KBr), ν/см⁻¹: 391 сл, 519 сл, 548 сл, 592 сл, 627 сл, 761 сл, 795 сл, 814 сл, 851 сл, 878 сл, 916 сл, 934 сл, 989 сл, 1026 сл, 1091 ср, 1131 с (C-O-C), 1230 с, 1266 с (C-H), 1316 сл, 1330 сл, 1363 сл, 1375 сл, 1414 сл, 1453 ср

(Py), 1513 с (CH₂), 1555 сл, 1588 ср (Py), 1598 ср (Py), 1626 сл (C=N), 2868 ср (C-H), 2922 ср (C-H), 3030 сл (C-H_{Ar}), 3067 сл (C-H_{Ar}).

ЯМР ¹H (DMSO-d₆, 300 МГц): 3,63 (уш. с., 8H), 3,72–3,85 (м, 4H), 4,03–4,17 (м, 4H), 6,96 (д.д., 1H, J = 8,5 Гц, J = 2,0 Гц), 7,01 (д, 1H, J = 8,5 Гц), 7,08 (м, 1H, J = 2,0 Гц), 7,79–7,84 (м, 2H), 7,70–7,76 (м, 3H).

ЯМР ¹³C (DMSO-d₆, 75 МГц): 68,46, 68,64, 68,76, 68,81, 69,73, 70,48, 106,89, 113,75, 114,73, 121,94, 142,79, 143,49, 148,13, 148,98, 150,39, 156,63.

Найдено (%): С, 64,69; Н, 6,57; N, 7,58. C₂₀H₂₄N₂O₅. Вычислено (%): С, 64,50; Н, 6,53; N, 7,52.

Синтез медного комплекса (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальдимина

К раствору 0.001 моль ацетата меди(II) в 15 мл MeOH прибавляли раствор 0.001 моль основания Шиффа в 10 мл MeOH. Полученную смесь выдерживали при 45–47 °С в течение 4 ч. Осадок отфильтровывали и сушили на воздухе при комнатной температуре. Перекристаллизовывали из изопропилового спирта. Продукт представлял собой порошок зеленого цвета с т. пл. 203.2–203.8°С. Выход продукта – 94 %, чистота – 98%.

ИК-спектр (KBr), ν/см⁻¹: 109 с, 122 с, 157 с, 190 сл, 202, с, 237ср, 259 с, 278 ср, 310 ср, 354 с, 401ср, 522 ср, 596 ср, 617 с, 628 с, 680 с, 792 сл, 831 сл, 890 с, 942 ср, 974 сл, 1012 сл, 1026 ср, 1053 ср, 1084 сл, 1120 с (C–O–C), 1142 с, 1202 сл, 1276 ср (C–H_{Ar}), 1301 ср, 1350 сл, 1418 с, 1432 с, 1508 с, 1608 с (AcOCu), 1628 с (C=N), 2869–2930 уш. ср (C–H).

Найдено (%): С, 52,12; Н, 5,51; N, 5,14. C₂₄H₃₀N₂O₉Cu. Вычислено (%): С, 52,02; Н, 5,46; N, 5,06.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами проведен синтез нового основания Шиффа методом конденсации 4-пиридинкарбоксальдегида. Медный комплекс получали добавлением к соответствующему азометину эквимольного количества ацетата меди(II) (рис. 1).

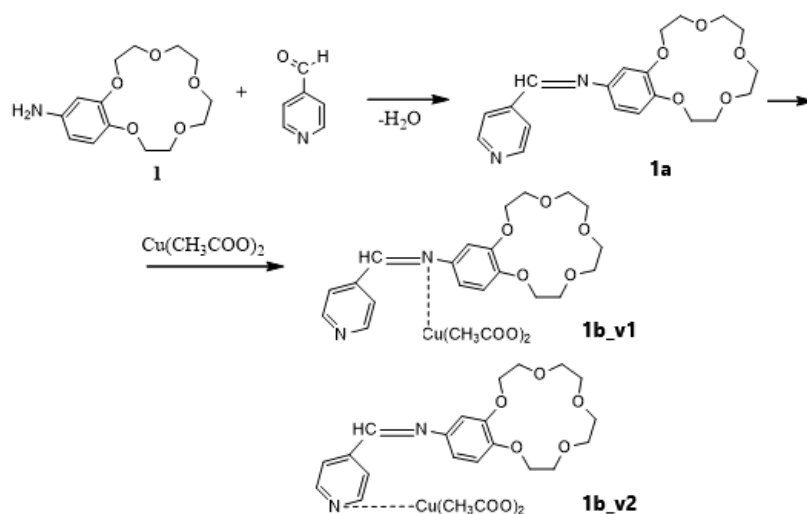


Рис. 1. Схема синтеза медного комплекса (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальдимина.

Fig. 1. Scheme for the synthesis of the copper complex (4-aminobenzo-15-crown-5)-4-pyridinecarboxalimine.

Идентификацию полученных соединений проводили с применением ЯМР, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии, РФА, ЭПР и элементного анализа.

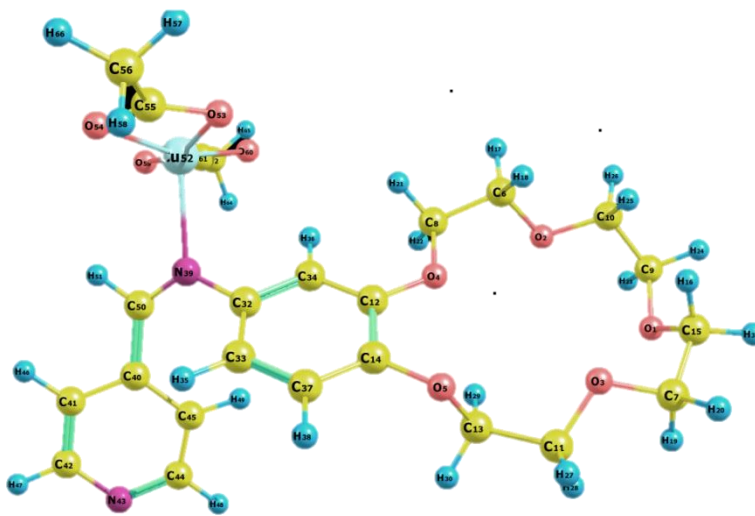
Оценка структуры комплекса ацетата меди(II) с (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальмином

Эксперименты по росту кристаллов соединений (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальмина (**1a**) и комплекса ацетата меди(II) с (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальмином (**1b**) не увенчались успехом, что довольно часто встречается у подобных структур [8, 9]. Поэтому стало необходимым провести расчеты геометрии предполагаемых структур **1a**, **1b_v1** и **1b_v2** (рис. 1). Анализ ЯМР-спектров **1b** указывает на то, что полученный комплекс может быть как моно-, так и димерным [10]), поэтому димерные структуры комплекса также были рассчитаны.

Анализ источников с исследованиями строения подобных по структуре комплексов с карбоксилатами меди(II) [11–13] также позволяет предположить возможность существования комплекса с одним или двумя лигандами $L_{(1/2)}[Cu_2(\mu-AcO)_4]$, где L – краунэфирный лиганд, апикально координированный на димерном медном ядре, связанном четырьмя ацетатными мостиками.

На первом этапе работы оценивали сравнительную термодинамическую стабильность структур с разной координацией краунэфирного лиганда на атоме меди. Оценку проводили относительно суммарной свободной энергии (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальмина (вещество **1a**) и мономерного ацетата меди(II) $Cu(AcO)_2$. Нами проведен расчет методом DFT в программе Priroda 20 [6] с обменно-корреляционным функционалом PBE [7] и базисом 3z. Оптимизацию геометрии проводили без ограничения на симметрию молекулы. Тип найденных стационарных точек и термодинамические параметры были определены на основе аналитически рассчитанных вторых производных энергии и колебательных частот.

Были рассмотрены две структуры комплекса с мономерным ацетатом меди(II) (рисунки 2, 3).



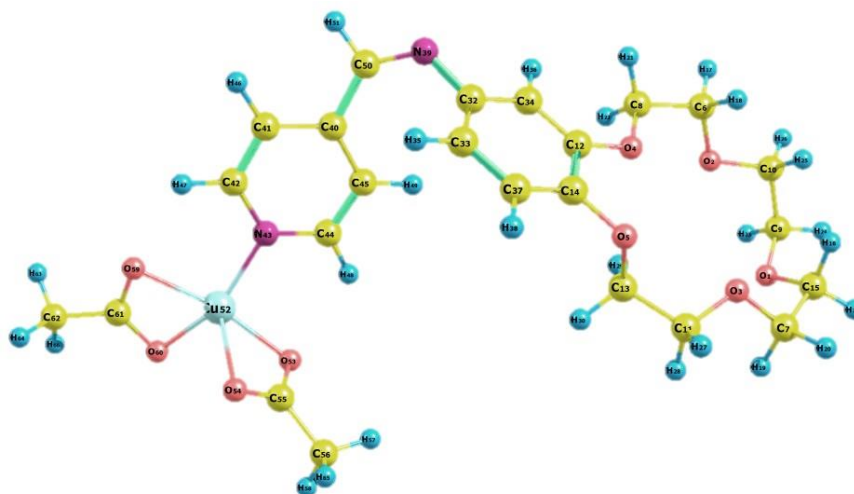


Рис. 3. Структура **1b_v2**. $d(\text{N-C}) = 2,01 \text{ \AA}$.

Fig. 3. Structure **1b_v2**. $d(\text{N-C}) = 2.01 \text{ \AA}$.

Результаты расчета структур приведены в таблице 1.

Таблица 1. Относительная устойчивость позиционных изомеров **1b**

Table 1. Relative stability of positional isomers **1b**

Соединение	E	E ₀	H	G	S	ΔE	ΔH_0	ΔH_{298}	ΔG_{298}	ΔS_{298}
	a.u.		kcal·mol ⁻¹			kcal·mol ⁻¹				cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹
Cu(AcO) ₂	-2097,03	-2096,94	69,9	36,8	111,0					
1a	-1261,05	-1260,65	271,5	218,3	178,4					
sum	-3358,09	-3357,59	341,4	255,1	289,5					
1b_v1	-3436,65	-3436,08	379,2	299,0	269,1	-9,2	-8,7	-7,4	2,5	-33,2
1b_v2	-3358,11	-3357,60	342,9	267,7	252,1	-12,2	-11,3	-10,0	1,4	-37,4

Примечание: E – энергия молекулы, E₀ – энергия с поправкой на нулевые колебания. $\Delta H_0 = (E_0^{\text{B-Ba}} - E_0^{\text{sum}}) \cdot 627,5$ [ккал/моль]; $\Delta H_{298} = (H^{\text{B-Ba}} - H^{\text{sum}}) + \Delta H_0$; $\Delta G_{298} = (G^{\text{B-Ba}} - G^{\text{sum}}) + \Delta H_0$.

Устойчивость синглетного и триплетного димера Cu₂(μ-AcO)₄ относительно мономерной формы приведены в таблице 2.

Таблица 2. Устойчивость синглетного и триплетного димера Cu₂(μ-AcO)₄ относительно мономерной формы

Table 2. Stability of singlet and triplet Cu₂(μ-AcO)₄ dimers relative to the monomeric form

Соединение	E	E ₀	H	G	S	ΔE	ΔH_0	ΔH_{298}	ΔG_{298}	ΔS_{298}
	a.u.		kcal·mol ⁻¹			kcal·mol ⁻¹				cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹
Cu(AcO) ₂	-2097,03	-2096,94	69,9	36,8	111,0	-	-	-	-	-
[Cu ₂ (μ-AcO) ₄] (s)	-4194,10	-4193,90	141,2	89,8	172,3	-18,7	-17,0	-15,6	-0,8	-49,7
[Cu ₂ (μ-AcO) ₄] (t)	-4194,11	-4193,91	141,3	90,4	170,5	-21,7	-19,9	-18,4	-3,0	-51,6

Также были рассчитаны структуры димерных медных комплексов с мостиковыми ацетатными лигандами и апикально-координированными через пиридиновый фрагмент молекулами **1a**, $(\mathbf{1a})_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (рисунки 4, 5); с теми же лигандами, но координированными через иминовый атом азота, $(\mathbf{1a}')_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (рис. 6), а также комплекс с лигандами **1a** со смешанной координацией $(\mathbf{1a})(\mathbf{1a}')[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (рис. 7). Были исследованы синглетные основные состояния этих комплексов.

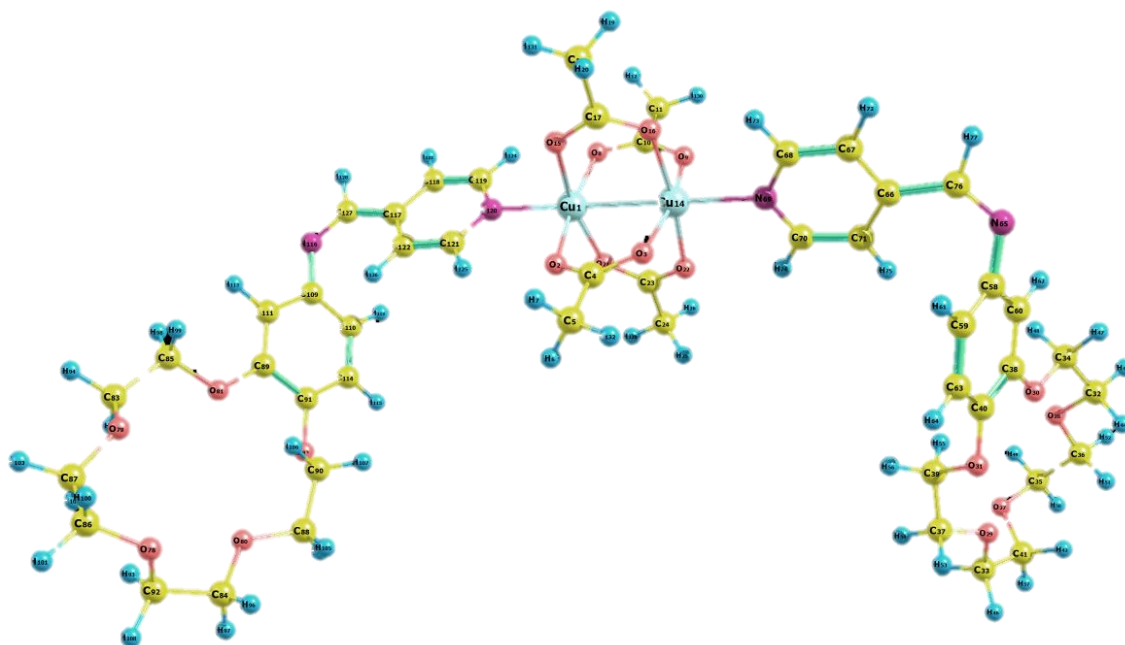


Рис. 4. Структура $(\mathbf{1a})_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (синглет). $d(\text{Cu-Cu}) = 2,64 \text{ \AA}$; $d(\text{Cu-N}) = 2,23 \text{ \AA}$.

Fig. 4. Structure $(\mathbf{1a})_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (singlet). $d(\text{Cu-Cu}) = 2.64 \text{ \AA}$; $d(\text{Cu-N}) = 2.23 \text{ \AA}$.

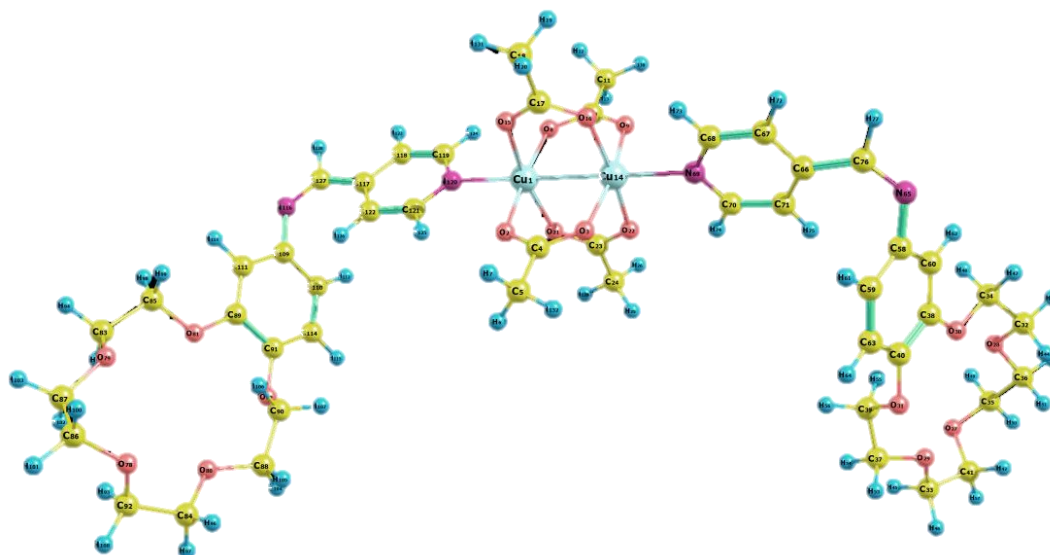


Рис. 5. Структура $(\mathbf{1a})_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (триплет). $d(\text{Cu-Cu}) = 2,60 \text{ \AA}$; $d(\text{Cu-N}) = 2,24 \text{ \AA}$.

Fig. 5. Structure $(\mathbf{1a})_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (triplet). $d(\text{Cu-Cu}) = 2.60 \text{ \AA}$; $d(\text{Cu-N}) = 2.24 \text{ \AA}$.

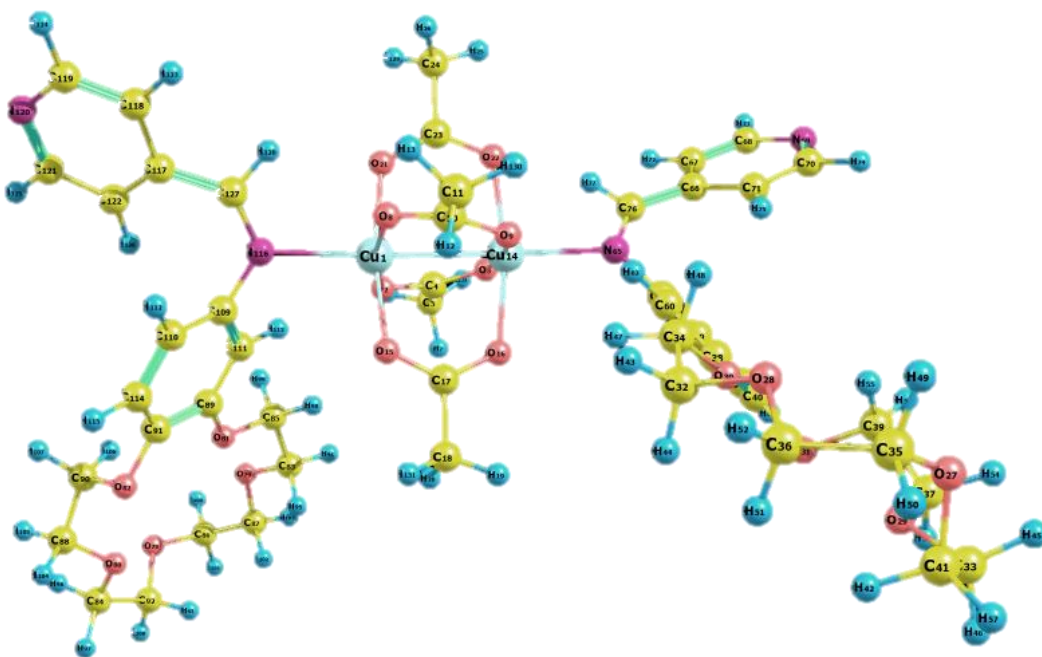


Рис. 6. Структура $(\mathbf{1a}')_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (синглет). $d(\text{Cu-Cu}) = 2,64 \text{ \AA}$; $d(\text{Cu-N}) = 2,28 \text{ \AA}$.

Fig. 6. Structure (**1a'**)₂[Cu₂(μ-AcO)₄] (singlet). $d(\text{Cu-Cu}) = 2.64 \text{ \AA}$; $d(\text{Cu-N}) = 2.28 \text{ \AA}$.

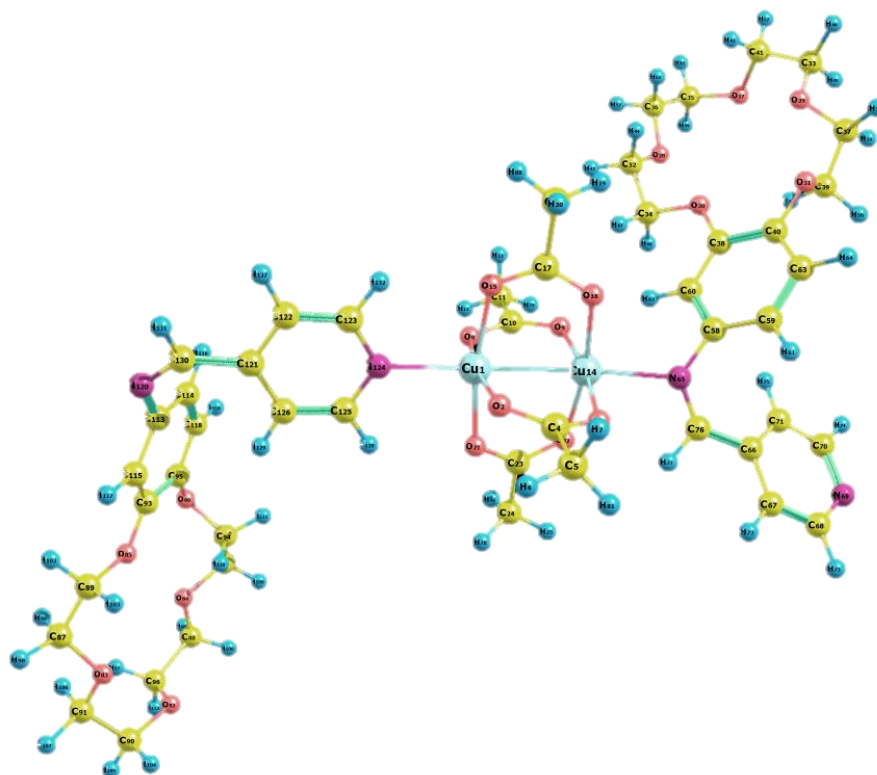


Рис. 7. Структура **(1a)(1a')**[Cu₂(μ-АсО)₄] (синглет). $d(\text{Cu}-\text{Cu}) = 2,64 \text{ \AA}$; $d(\text{Cu}^{\text{I}}-\text{N}^{124}) = 2,22 \text{ \AA}$, $d(\text{Cu}^{\text{I4}}-\text{N}^{65}) = 2,29 \text{ \AA}$.

Fig. 7. Structure (1a)(1a')[Cu₂(μ-AcO)₄] (singlet). $d(\text{Cu-Cu}) = 2.64 \text{ \AA}$; $d(\text{Cu}^{\text{I}}\text{-N}^{124}) = 2.22 \text{ \AA}$, $d(\text{Cu}^{14}\text{-N}^{65}) = 2.29 \text{ \AA}$.

Устойчивость комплексов $(\mathbf{1a})_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$, $(\mathbf{1a}')_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ и $(\mathbf{1a})(\mathbf{1a}')[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ оценивалась относительно суммарной энергии двух свободных молекул $\mathbf{1a}$ и димерного синглетного ацетата меди(II) без апикальных лигандов $[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (табл. 3). В свою очередь, в условиях расчета димерный ацетат – термодинамически и кинетически предпочтительная форма по сравнению с мономерным ацетатом, как видно из таблицы 2, причем преобладающим является высокоспиновое состояние относительно синглетного комплекса.

Таблица 3. Относительная устойчивость комплексов $(\mathbf{1a})_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$, $(\mathbf{1a}')_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$, $(\mathbf{1a})(\mathbf{1a}')[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$

Table 3. Relative stability of complexes $(\mathbf{1a})_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$, $(\mathbf{1a}')_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$, $(\mathbf{1a})(\mathbf{1a}')[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$

Соединение	E	E ₀	H	G	S	ΔE	ΔH ₀	ΔH ₂₉₈	ΔG ₂₉₈	ΔS ₂₉₈
	a.u.		kcal·mol ⁻¹			kcal·mol ⁻¹				cal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹
$[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (s)	-4194,10	-4193,90	141,2	89,8	172,3	-	-	-	-	-
$\mathbf{1a}$	-1261,05	-1260,65	271,5	218,3	178,4	-	-	-	-	-
sum 2· $\mathbf{1a}$ + $[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (s)	-6716,22	-6715,20	684,2	526,4	529,2	-	-	-	-	-
$(\mathbf{1a})_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (s)	-6716,25	-6715,24	686,3	552,3	449,4	-23,8	-22,7	-20,6	3,2	-79,9
$(\mathbf{1a})_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (t)	-6716,26	-6715,25	686,5	550,6	455,8	-27,7	-26,5	-24,2	-2,3	-73,4
$(\mathbf{1a}')_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (s)	-6716,25	-6715,23	686,8	551,3	454,3	-21,0	-20,1	-17,5	4,8	-74,9
$(\mathbf{1a})(\mathbf{1a}')[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (s)	-6716,25	-6715,24	686,2	553,0	446,9	-22,4	-21,4	-19,4	5,2	-82,3
$(\mathbf{1a})(\mathbf{1a}')[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ (s)	-6716,26	-6715,24	687,0	550,6	457,2	-26,1	-25,0	-22,2	-0,7	-72,0

Энергии рассчитаны относительно суммарной энергии двух свободных молекул мономера.

Сравнение изменений энергии двух структур комплекса с мономерным ацетатом меди(II) относительно изолированных веществ указывает на предпочтительность структуры $\mathbf{1b_v2}$, где основание Шиффа $\mathbf{1a}$ координировано на меди атомом азота пиридинового фрагмента. Однако разница в энергиях лежит в пределах энергий изменения конформации молекулы, поэтому можно предположить, что эти две формы комплекса способны сосуществовать в условиях получения. Также заметим, что длина связи N-C в комплексе $\mathbf{1b_v2}$ на 0,26 Å меньше, чем в $\mathbf{1b_v1}$.

Анализ источников с исследованиями строения подобных по структуре комплексов с карбоксилатами меди(II) [3–6] позволил предположить возможность существования в комплексах с одним или двумя лигандами $L_{(1|2)}[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$, где L – краунэфирный лиганд, апикально координированный на димерном медном ядре, связанном четырьмя ацетатными мостиками. На данном этапе нами были рассмотрены структуры с двумя лигандами,

отвечающими низко- и высокоспиновому состоянию меди (рисунки 4–7). Как видно из таблицы 3, высокоспиновый комплекс **1a** с димерными ацетатом является термодинамически и кинетически более предпочтительным, чем синглетный: $\Delta\Delta H_0 = -3.8$ ккал/моль, $\Delta\Delta G_{298} = -5.5$ ккал/моль. Однако разница в энергиях этих комплексов также лежит в конформационном диапазоне, поэтому мы предполагаем, что они сосуществуют в условиях получения. Наблюдаемое уширение сигналов ЯМР можно приписать присутствию высокоспиновой формы, а саму возможность записать спектр ЯМР достаточного качества – низкоспиновой.

В димерных комплексах расстояние между атомами меди $d_{(s)}(\text{Cu-Cu}) = 2,64$ Å, $d_{(t)}(\text{Cu-Cu}) = 2,60$ Å; в димере без апикальных лигандов $d_{(s)}(\text{Cu-Cu}) = 2,45$ Å. Для дигидрата димерного ацетата экспериментально определено значение $d(\text{Cu-Cu}) = 2,633$ Å [14]. Пиридиновые кольца противоположных лигандов практически перпендикулярны друг другу: диэдральный угол между плоскостями колец составляет для синглета $\delta_{(s)}^{\text{Py}} = 79,6^\circ$, для триплета $\delta_{(t)}^{\text{Py}} = 91^\circ$, а структура мостиковых лигандов слегка искажена: диэдральный угол между плоскостями противоположных мостиковых карбоксильных групп составляет $\delta_{(s)}^{\text{AcO}} = 15^\circ$, $\delta_{(t)}^{\text{AcO}} = 1^\circ$. Для сравнения: в димерном ацетате противоположные карбоксилы лежат в одной плоскости ($\delta^{\text{AcO}} < 1^\circ$) вне зависимости от спинового состояния, а для димера с апикально координированными молекулами метанола $(\text{CH}_3\text{OH})_2[\text{Cu}_2(\mu\text{-AcO})_4]$ этот угол составляет порядка 5° для синглетной и порядка $1,5^\circ$ для триплетной формы.

Таким образом, сравнение значений изменения энтальпии и свободной энергии Гиббса для комплексов с разным типом координации апикальных лигандов позволяет предположить, что наиболее вероятным является высокоспиновый комплекс **1a** с димерными ацетатом.

Исследования структуры медного комплекса методами ЯМР, ИК-спектроскопии, масс-спектрометрии и ЭПР

Для подтверждения расчетной структуры медного комплекса нами проведены ЯМР, ИК-спектроскопия ближней и дальней областей, элементный анализ, масс-спектрометрия ESI и ЭПР.

ЯМР спектры комплексов имеют уширенные сигналы вследствие парамагнитных примесей меди II.

Полосы в ИК спектре (рис.8) при 3043 и 3028 см^{-1} относятся к валентным колебаниям $\nu(\text{CH})$ бензольных колец. Широкий пик 3400 см^{-1} колебания H_2O . Валентным колебаниям группы $\text{C}=\text{N}$ соответствует сильная полоса 1590 см^{-1} . На спектре присутствуют валентные $\text{Cu-N} = 259$ см^{-1} , $\text{Cu-O} = 234$ см^{-1} , что согласуется с расчетными данными. Также были получены данные ICP-MS: содержание меди составило $11,0\%$, что согласуется с расчетными $11,2\%$.

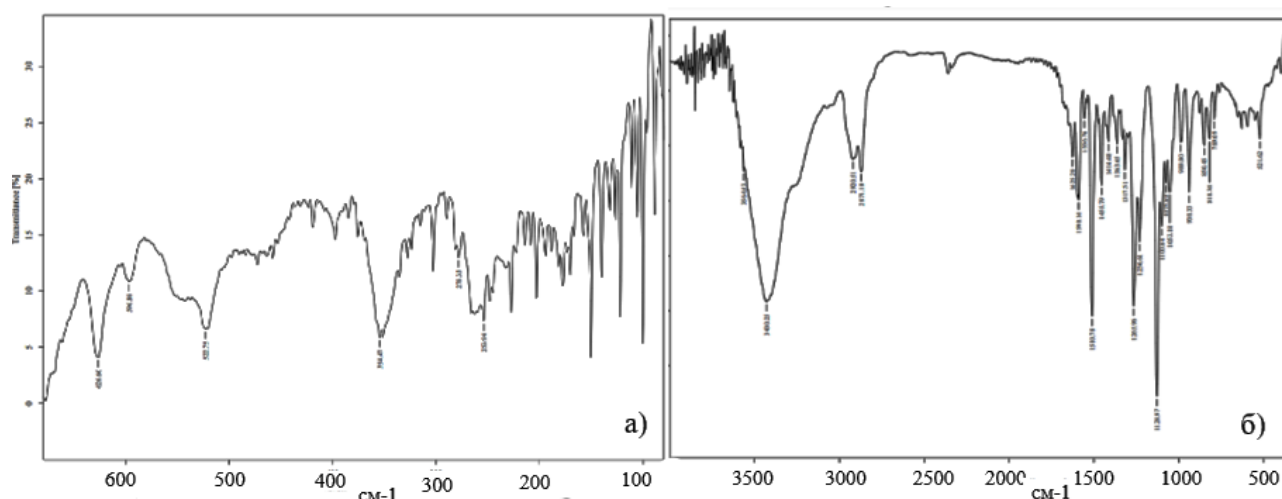


Рис. 8. ИК спектр комплекса (4-аминобензо-15-крауна-5)-4-пиридинкарбоксальдимина дальняя ИК-область (а), ближняя ИК-область (б).

Fig. 8. IR spectrum of the complex (4-aminobenzo-15-crown-5)-4-pyridine carboxaldimine far infrared region (a), near infrared region (b).

В позитивном режиме ионизации ESI обнаружены следующие фрагменты m/z (найдено / рассчитано): 557,20 / 557,26, 291,52 / 291,04, которые соответствуют $(C_{14}H_{19}O_5)(C_6H_7N_2)(CH_3COOH)_2Cu$ и $(C_6H_7N_2)(CH_3COOH)_2Cu$. В негативном режиме ионизации обнаружены следующие фрагменты m/z (найдено / рассчитано): 288,64 / 289,02, 402,64 / 403,02, 409,57 / 409,07, которые соответствуют $(C_6H_7N_2)(CH_3COOH)_2Cu$, $(C_6H_5N_2)(CH_3COO)_4Cu$ и $(C_6H_7N_2)(CH_3COOH)_4Cu$. Данные хорошо коррелируют с расчетными (рис.9).

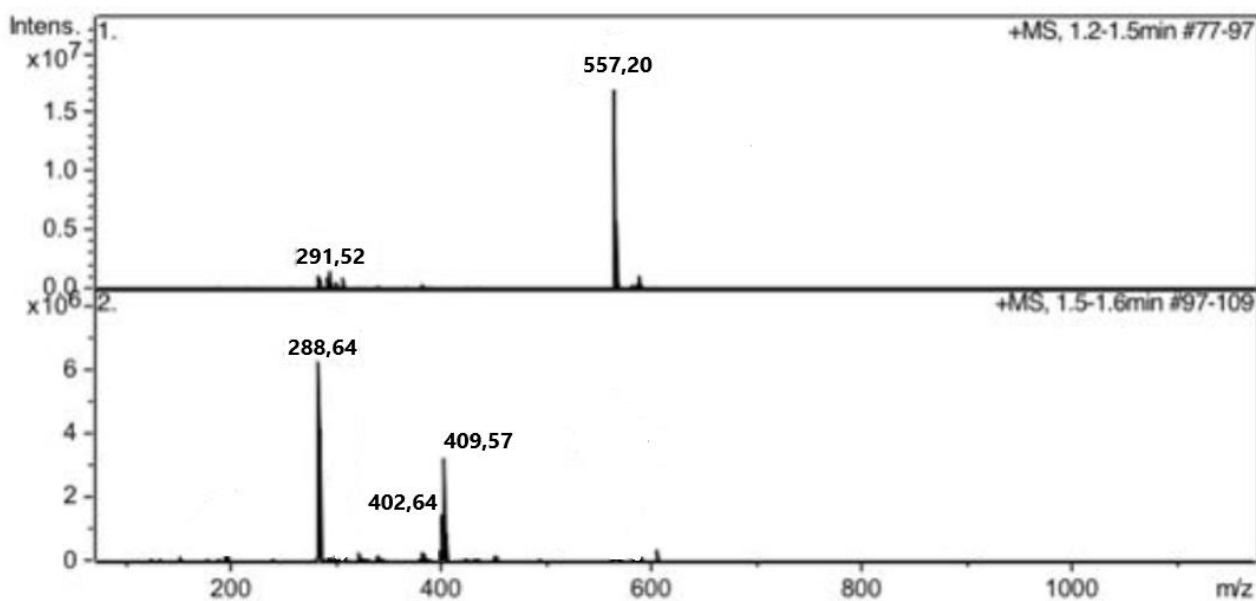


Рис. 9. Масс- спектр ESI медного комплекса (4-аминобензо-15-крауна-5)-4-пиридинкарбоксальдимина
Рис. 9. ESI mass spectrum of the complex (4-aminobenzo-15-crown-5)-4-pyridine carboxaldimine

Спектр ЭПР порошкового образца исследуемого комплекса меди приведен на рисунке 10а. На ряду с ожидаемым сигналом от мономерного комплекса со спином $S = \frac{1}{2}$ (отмечен М на рис. 10) в спектре явственно присутствует спектр

димерных комплексов в триплетном состоянии со спином $S = 1$. Предельно похожий спектр димеров меди наблюдался ранее в статье [16], причем расстояние Cu-Cu примерно 2,6 Å очень близко к предсказанному для нашего комплекса из квантово-химического расчета. Смоделированный спектр с магнитными параметрами $S = 1$, $D = 0,339 \text{ см}^{-1}$; $E = 0,0027 \text{ см}^{-1}$; $g = [2,061 \ 2,063 \ 2,352]$; $\nu = 9,374053 \text{ ГГц}$, $A_z = 0,0067 \text{ см}^{-1}$ взятые из статьи [16] приведен на рисунке 10б. Необходимо отметить, что этот комплекс обладает нехарактерно большой величиной расщепления в нулевом поле примерно 0,34, что в сравнении с расстоянием между атомами меди указывает на то, что наряду с диполь-дипольным вкладом в данном комплексе имеется существенный вклад от изотропного обменного взаимодействия. Несмотря на сравнимую амплитуду линий мономеров и димеров, значительная протяженность спектра димеров по магнитному полю означает, что основное количество комплекса находится в димерном состоянии.

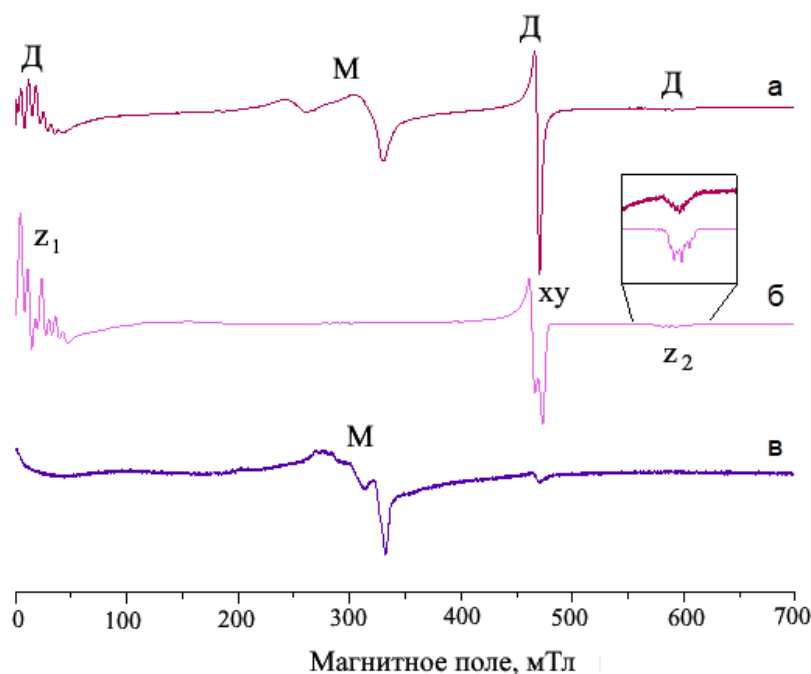


Рис. 10. Спектры ЭПР: (а) Порошковый спектр исследуемого комплекса. (б) Смоделированный спектр димера комплекса меди со спиновым состоянием $S = 1$, $D = 0,339 \text{ см}^{-1}$, $E = 0,0027 \text{ см}^{-1}$, $g = [2,061 \ 2,063 \ 2,352]$, $\nu = 9,374053 \text{ ГГц}$, $A_z = 0,0067 \text{ см}^{-1}$ параметры взяты из статьи [1]. (в) Спектр изолированного в стеклющемся растворителе комплекса меди.

Fig. 10. EPR spectra: (a) Powder spectrum of the studied complex. (б) Simulated spectrum of the dimer of the copper complex with the spin state $S = 1$, $D = 0.339 \text{ cm}^{-1}$, $E = 0.0027 \text{ cm}^{-1}$, $g = [2.061 \ 2.063 \ 2.352]$, $\nu = 9.374053 \text{ GHz}$, $A_z = 0.0067 \text{ cm}^{-1}$ parameters are taken from the article [1]. (в) Spectrum of the copper complex isolated in a glassy solvent.

На рис 10в приведен спектр изолированного в стеклющемся растворителе комплекса меди, на нем М и Д отмечаются линии мономера и димера соответственно. На смоделированном спектре указаны линии, соответствующие каноническим ориентациям комплекса. Но в твердом растворе в органическом растворителе 2-метилтетрагидрофуране спектры мономеров присутствуют, а спектры димеров практически не наблюдаются (рис.1в).

Таким образом, результаты ЭПР исследования находятся в качественном соответствии с ранее сделанными выводами и квантово-химическими расчетами. Однозначно показано формирование связанного димерного комплекса в триплетном основном состоянии.

Оценка и исследование биологической активности комплекса ацетата меди(II) с (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальмином

В целях предварительной оценки биологической активности полученных соединений были использованы технологии компьютерного моделирования (программный продукт PASS), данные приведены в таблице 4. Выявлено, что синтезированный медный комплекс с высокой долей вероятности может быть хемосенсибилизатором, антибиотиком, способен обладать противоопухолевым эффектом.

Таблица 4. Биологическая активность полученных в работе соединений *in silico*

Table 4. Biological activity of the compounds obtained in this work *in silico*

Соединение	Pa	Pi	Вид активности
1b	0,843	0,005	Никотиновый ацетилхолиновый рецептор
	0,843	0,007	Ингибитор гликозилфосфатидилинозитолфосфолипазы D
	0,819	0,004	Ингибитор Холестантриол-26-монооксигеназы
	0,786	0,039	Препарат для лечения фобических расстройств
	0,740	0,013	Антибиотик
	0,540	0,003	Противоопухолевый препарат
1a	0,756	0,017	Ингибитор киназы β -адренорецепторов
	0,756	0,017	Ингибитор киназы рецепторов, связанных с G-белком
	0,726	0,010	Регулятор метаболизма нуклеотидов
	0,668	0,013	Ингибитор инсулина

Для проверки прогноза нами проведена оценка противоопухолевой активности *in vitro* полученных соединений, с использованием МТТ-теста [15] на клеточных линиях (карцинома толстой кишки НСТ-116; карцинома простаты РС-3; карцинома легкого А549; аденокарцинома молочной железы MCF-7; Т-клеточный лимфобластный лейкоз Jurkat). Соединение считали цитостатически активным, если оно вызывало подавление роста клеток более 50% (табл. 5).

Таблица 5. Ингибирование роста клеток синтезированных соединений

Table 5. Inhibition of cell growth by synthesized compounds

Концентрация 100 мкМ	Ингибирование роста клеточных линий*, %				
	PC-3	MCF-7	A549	HCT-116	Jurkat
1a	8	16	14	39	44
1b	50	65	54	15	60

*Погрешность – 3%. Для массива данных среднее значение находится в диапазоне $[x-1,43, x+1,43]$.

Выявлена противоопухолевая активность полученного медного комплекса **1b** против карциномы простаты PC-3; карциномы легкого A549; аденокарциномы молочной железы MCF-7; Т-клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat.

Также *in vitro* нами была подтверждена антибактериальная активность и **1a** и **1b** против некоторых штаммов бактерий (табл. 6). Исследование проводили чашечным методом на МПА (мясопептонном агаре): в лунки размером 8×8 вносили по 50 мкл образца (50 мкг в 1 мл). Образцы растворяли в 1% DMSO.

Таблица 6. Зоны задержки роста штаммов тест-культур

Table 6. Zones of growth inhibition of test culture strains

№ образца	Соединение	Штаммы тест-культур, зоны задержки роста**, мм			
		Micrococcus luteus +	Staphylococcus aureus +	Escherihia coli -	Pseudomonas aeruginosa
1	1a	21×21	18×18	12×12	17×17
2	Cu(CH ₃ COO) ₂	19×19	18×18	16×16	15×15
3	1b	25×25	24×24	21×21	18×18

**Погрешность – 1 мм. Для массива данных среднее значение находится в диапазоне $[x-1,24, x+1,24]$.

Зоны задержки роста, диаметр которых превышает 20 мм, для медного комплекса **1b** свидетельствуют о высокой чувствительности микроорганизмов к испытываемой концентрации антимикробного вещества, что хорошо соотносится с теоретическими расчетами программного комплекса.

Также с применением сервиса GUSAR определена возможная токсичность синтезированных реактивов. Все соединения относятся к малотоксичным и практически нетоксичным веществам, что соответствует 4 и 5 классу токсичности по классификации К.К. Сидорова и по классификации ОЭСД.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенных расчетов строения комплекса ацетата меди(II) с (4-аминобензо-15-краун-5)-4-пиридинкарбоксальмина выявлены приоритетные димерные структуры соединения, что подтверждено показателями энтропии и энергии Гиббса. Расчетные данные подтверждены спектрами ЭПР, показано формирование связанного димерного комплекса в триплетном основном состоянии. В целях предварительной оценки биологической активности полученных соединений были использованы технологии компьютерного моделирования – программа PASS. Выявленные возможности применения данного соединения в качестве антибактериального и противоопухолевого соединения подтверждены экспериментально. Показана противоопухолевая активность полученного медного комплекса против карциномы простаты PC-3; карциномы легкого A549; аденокарциномы молочной железы MCF-7; Т-

клеточного лимфобластного лейкоза Jurkat. Также экспериментально подтверждена антимикробная активность комплекса в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*) и грамотрицательных (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) микроорганизмов, что полностью подтверждает результаты программного моделирования в PASS.

Работа по синтезу выполнена при финансовой поддержке НИЦ «Курчатовский институт». Аналитические исследования выполнены с использованием научного оборудования НИЦ «Курчатовский институт» при финансовой поддержке проекта Российской Федерацией в лице Минобрнауки России, Соглашение № 075-15-2023-370 от 22.02.2023.

ЭПР исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ, государственное задание: № 124013100858-3.

ACKNOWLEDGEMENT

Synthetic work was carried out with the financial support of the National Research Center “Kurchatov Institute”. Analytical studies were carried out using scientific equipment of the National Research Center “Kurchatov Institute” with financial support of the project by the Russian Federation represented by the Ministry of Education and Science of Russia, Agreement No. 075-15-2023-370 dated 02/22/2023.

The EPR study was carried out with the financial support of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation, state assignment: No. 124013100858-3.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

CONFLICT OF INTERESTS:

The authors declare no conflict of interests.

Список литературы:

1. Tso W.W., Fung W.-P., Tso M. Y. (1981). Variability of crown ether toxicity. *J. Inorg. Biochem.*, 14(3), 237. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(00\)80003-3](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)80003-3)
2. Tso W.W., Fung W.-P. (1980). Intracellular potassium level: possible trigger for bacterial logarithmic growth. *Inorganica Chimica Acta*. 46, 33. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)84130-4](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)84130-4).
3. Leevy W.M., Weber M.E., Gokel M.R., Hughes-Strange G.B., Daranciang D.D., Ferdani R., Gokel G.W. (2005). Correlation of bilayer membrane cation transport and biological activity in alkyl-substituted lariat ethers. *Organic&Biomolecular Chemistry*. 9(3), 1647. <https://doi.org/10.1039/B418194H>.
4. Садовская Н.Ю., Глушко В.Н., Блохина Л.И., Ретивов В.М. (2020). Биологическая активность краун-эфиров и их металлокомплексов. *Химическая безопасность*, 4(2), 80–100. <https://doi.org/10.25514/CHS.2020.2.18006>.

5. Садовская Н.Ю., Глушко В.Н., Ретивов В.М., Белусь С.К., Гроховский В.В. (2015) Синтез и свойства макрогетероциклических азометинов на основе 4-аминобензо-15-крауна-5. *Журнал общей химии*, 85(12), 2041–2048 <https://doi.org/10.1134/S1070363215120191>.
6. Shubert V.A., Zwier T.S. (2007). IR–IR–UV Hole-Burning: Conformation Specific IR Spectra in the Face of UV Spectral Overlap. *J. Phys. Chem. A*, 111(51), 13283–13286. <https://doi.org/10.1021/jp0775606>.
7. Laikov D.N. (1997). Fast evaluation of density functional exchange-correlation terms using the expansion of the electron density in auxiliary basis sets. *Chemical Physics Letters*, 281, 151–156. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(97\)01206-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(97)01206-2).
8. Logacheva N.M., Baulin V.E., Tsivadze A. Yu., Pyatova E.N. (2009). Ni(II), Co(II), Cu(II), Zn(II) and Na(I) complexes of a hybrid ligand 4'-(4''-benzo-15-crown-5)-methyloxy-2,2':6',2''-terpyridine. *Dalton Transactions*, 14, 2482–2489. <https://doi.org/10.1039/b819805e>.
9. Semyonov O., Lyssenko K.A., Safin D.A. (2019). Copper(II) acetate structures with benzimidazole derivatives. *Inorganica Chimica Acta*, 488, 238–245. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2018.12.054>.
10. Carlin R. (2012). *Magnetochemistry*. 5.4. P. 77–82. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-70733-9>.
11. Ahmed I.Y., Abu-Hijleh A.L. (1982). Monomer and dimer complexes of copper(II) acetate with pyridine and picolines. Part I. Synthesis and characterization. *Inorganica Chimica Acta*, 61, 241–246. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)89147-1](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)89147-1).
12. Alexandru M.-G., Cirkovic Velickovic T., Jitaru I., Grgurić-Sipka S., Draghici C. (2010). Synthesis, characterization and antitumor activity of Cu(II), Co(II), Zn (II) and Mn(II) complex compounds with aminothiazole acetate derivative. *Open Chemistry*, 8(3), 639–645. <https://doi.org/10.2478/s11532-010-0022-2>.
13. Barwiolek M., Kaczmarek-Kedziera A., Muziol T., Jankowska D., Jezierska J., Bieńko A. (2020). Dinuclear Copper(II) Complexes with Schiff Bases Derived from 2-Hydroxy-5-Methylisophthalaldehyde and Histamine or 2-(2-Aminoethyl)pyridine and Their Application as Magnetic and Fluorescent Materials in Thin Film Deposition. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(13), 4587. <https://doi.org/10.3390/ijms21134587>.
14. Evans W. J., Hain J.H., Broomhall-Dillard R.N.R., Ziller J.W. (1999). STRUCTURAL STUDIES OF THE COPPER(II) ACETATE COMPLEXES $\text{Cu}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2(\text{pyridine})_3$ AND $\text{Cu}_6(\mu\text{-O}_2\text{CCH}_3)_4(\mu_4\text{-O}_2\text{CCH}_3)_2(\mu\text{-OCMe}_3)_6$. *Journal of Coordination Chemistry*, 47, 199–209. <https://doi.org/10.1080/00958979908023054>.
15. Яковлев Д.С., Султанова К.Т., Золотова Е.А., Гасайниева А.Г., Спасов А.А. Оптимизация МТТ-теста для определения цитотоксичности новых химических соединений на клеточной линии MCF-7. *Волгоградский научно-медицинский журнал*. 65(1), 8–61. <https://doi.org/10.24412/1995-7225-2020-1-58-61>.
16. Jezierska, J., Kokozay, V. & Ożarowski, A. EPR studies of spin-spin interactions between Cu(II) centers in dimeric, hexameric and homo- and heteronuclear tetrameric complexes. *Res Chem Intermed* 33, 901–914 (2007). <https://doi.org/10.1163/156856707782169381>.

References:

1. Tso, W. W., Fung, W.-P. & Tso, M. Y. (1981). Variability of crown ether toxicity. *J. Inorg. Biochem.* 14(3), 237. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(00\)80003-3](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(00)80003-3).
2. Tso, W.W. & Fung, W.-P. (1980). Intracellular potassium level: possible trigger for bacterial logarithmic growth. *Inorganica Chimica Acta*. 46, 33. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)84130-4](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)84130-4).
3. Leevy, W.M., Weber, M.E., Gokel, M.R., Hughes-Strange, G.B., Daranciang, D.D., Ferdani, R. & Gokel, G.W. (2005). Correlation of bilayer membrane cation transport and biological activity in alkyl-substituted lariat ethers. *Organic&Biomolecular Chemistry*. 9(3), 1647. <https://doi.org/10.1039/B418194H>.

4. Sadovskaya, N.Yu., Glushko, V.N., Blokhina, L.I. & Retivov, V.M. (2020). Biological activity of crown ethers and their metal complexes. *Khimicheskaya Bezopasnost' = Chemical Safety*, 4(2), 80–100 (in Russ). <https://doi.org/10.25514/CHS.2020.2.18006>.
5. Sadovskaya N.Yu., Glushko V.N., Retivov V.M., Belus S.K., Grokhovsky V.V. (2015) Synthesis and properties of macroheterocyclic azomethines based on 4-aminobenzo-15-crown-5. *Journal of General Chemistry*, 85(12), 2771–2777 <https://doi.org/10.1134/S1070363215120191>.
6. Shubert, V.A. & Zwier, T.S. (2007). IR–IR–UV Hole-Burning: Conformation Specific IR Spectra in the Face of UV Spectral Overlap. *J. Phys. Chem. A*, 111(51), 13283–13286. <https://doi.org/10.1021/jp0775606>.
7. Laikov, D.N. (1997). Fast evaluation of density functional exchange-correlation terms using the expansion of the electron density in auxiliary basis sets. *Chemical Physics Letters*, 281, 151–156. [https://doi.org/10.1016/S0009-2614\(97\)01206-2](https://doi.org/10.1016/S0009-2614(97)01206-2).
8. Logacheva, N.M., Baulin, V.E., Tsivadze, A. Yu. & Pyatova, E.N. (2009). Ni(II), Co(II), Cu(II), Zn(II) and Na(I) complexes of a hybrid ligand 4'-(4'''-benzo-15-crown-5)-methyloxy-2,2':6',2''-terpyridine. *Dalton Transactions*, 14, 2482–2489. <https://doi.org/10.1039/b819805e>.
9. Semyonov O., Lyssenko K.A., Safin D.A. (2019). Copper(II) acetate structures with benzimidazole derivatives. *Inorganica Chimica Acta*, 488, 238–245.
10. Carlin, R.L. (2012). *Magnetochemistry*. 5.4. P. 77–82. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-70733-9>.
11. Ahmed, I.Y. & Abu-Hijleh, A.L. (1982). Monomer and dimer complexes of copper(II) acetate with pyridine and picolines. Part I. Synthesis and characterization. *Inorganica Chimica Acta*, 61, 241–246. [https://doi.org/10.1016/S0020-1693\(00\)89147-1](https://doi.org/10.1016/S0020-1693(00)89147-1).
12. Alexandru, M.-G., Cirkovic Velickovic, T., Jitaru, I., Grgurić-Sipka, S. & Draghici, C. (2010). Synthesis, characterization and antitumor activity of Cu(II), Co(II), Zn (II) and Mn(II) complex compounds with aminothiazole acetate derivative. *Open Chemistry*, 8(3), 639–645. <https://doi.org/10.2478/s11532-010-0022-2>.
13. Barwiolek, M., Kaczmarek-Kedziera, A., Muziol, T., Jankowska, D., Jezierska, J. & Bieńko, A.(2020). Dinuclear Copper(II) Complexes with Schiff Bases Derived from 2-Hydroxy-5-Methylisophthalaldehyde and Histamine or 2-(2-Aminoethyl)pyridine and Their Application as Magnetic and Fluorescent Materials in Thin Film Deposition. *Int. J. Mol. Sci.*, 21(13), 4587. <https://doi.org/10.3390/ijms21134587>.
14. Evans, W. J., Hain, J.H., Broomhall-Dillard, R.N.R. & Ziller, J.W. (1999). STRUCTURAL STUDIES OF THE COPPER(II) ACETATE COMPLEXES $\text{Cu}(\text{O}_2\text{CCH}_3)_2(\text{pyridine})_3$ AND $\text{Cu}_6(\mu\text{-O}_2\text{CCH}_3)_4(\mu_4\text{-O}_2\text{CCH}_3)_2(\mu\text{-OCMe}_3)_6$. *Journal of Coordination Chemistry*, 47, 199–209. <https://doi.org/10.1080/00958979908023054>.
15. Yakovlev, D.S., Sultanova, K.T., Zolotova, E.A., Gasaynieva, A.G. & Spasov, A.A. Optimization of the MTT test to determine the cytotoxicity of new chemical compounds on the MCF-7 cell line. *Volgogradskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Volgograd scientific and medical journal*. 65(1), 8–61 (in Russ). <https://doi.org/10.24412/1995-7225-2020-1-58-61>.
16. Jezierska, J., Kokozay, V. & Ożarowski, A. EPR studies of spin-spin interactions between Cu(II) centers in dimeric, hexameric and homo- and heteronuclear tetrameric complexes. *Res Chem Intermed* 33, 901–914 (2007). <https://doi.org/10.1163/156856707782169381>.