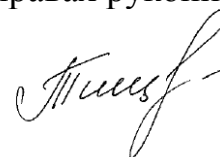


ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА»

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи



Тищенко Ксения Игоревна

**НОВЫЕ ПРОИЗВОДНЫЕ 2-ТИОКСО-ТЕТРАГИДРО-4H-ИМИДАЗОЛ-4-
ОНОВ И ИХ МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ КОМПЛЕКСЫ**

02.00.03 – органическая химия

Диссертация на соискание ученой степени

кандидата химических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук
Белоглазкина Елена Кимовна

Москва – 2017

Оглавление

1.	Введение.....	4
2.	Медьсодержащие ферменты: типы, низкомолекулярные модельные соединения, биологическое применение (обзор литературы).....	9
2.1.	Медьсодержащие ферменты типа 1	15
2.1.1.	Малые синие белки (купредоксины).....	15
2.1.2.	«Голубые» оксидазы	16
2.1.3.	Примеры низкомолекулярных моделей ферментов типа 1.....	17
2.2.	Медьсодержащие ферменты типа 2	19
2.2.1.	«Не-голубые» оксидазы.....	19
2.2.2.	Оксиредуктазы.....	21
2.2.3.	Биядерный фермент Cu-Zn-супероксиддисмутаза.....	23
2.2.4.	Примеры низкомолекулярных моделей ферментов типа 2.....	23
2.3.	Медьсодержащие ферменты типа 3	26
2.3.1.	Примеры низкомолекулярных моделей ферментов типа 3.....	27
2.4.	Медьсодержащие ферменты типа 4 (Тип 2 + Тип 3).....	29
2.4.1.	Примеры низкомолекулярных моделей ферментов типа 4.....	31
2.5.	Медьсодержащие ферменты типа Cu _A	36
2.6.	Медьсодержащие ферменты типа Cu _B	38
2.7.	Медьсодержащие ферменты типа Cu _Z	40
2.7.1.	Примеры низкомолекулярных моделей цитохром-с-оксидазы и N ₂ O-редуктазы	42
3.	Обсуждение результатов	46
3.1.	Синтез органических лигандов – производных 2-тиогидантоинов.....	48
3.1.1.	Синтез производных 2-тиогидантоина, незамещенных в 5-м положении	48
3.1.2.	Синтез моно- и бис- 5-пиридилметиленазамещенных 2-тиогидантоинов	50
3.1.3.	Алкилирование производных 2-тиогидантоинов.....	52
3.2.	Синтез координационных соединений с производными 5-пиридилметилена-2-алкилтио-имидазол-4-онов	54
3.2.1.	Синтез координационных соединений с лигандами Типа 1	54
3.2.2.	Синтез координационных соединений с лигандами Типа 2	56
3.2.3.	Синтез координационных соединений с лигандами Типа 3	57
3.3.	Физико-химические исследования лигандов и координационных структур	58

3.3.1. Оценка растворимости модельных лигандов и их комплексов в средах вода:ДМСО	60
3.3.2. Оценка устойчивости комплексов меди с выбранными модельными лигандами	62
3.3.3. Исследование модельной каталитической реакции.....	69
3.3.4. Исследование адсорбции лигандов на поверхности золота.....	73
3.3.5. Оценка цитотоксичности полученных координационных соединений	76
3.4. Заключение.....	78
4. Экспериментальная часть.....	79
4.1. Общие сведения	79
4.2. Синтез лигандов и их координационных соединений	81
4.2.1. Синтез исходных соединений	81
4.2.2. Синтез 3-замещенных 2-тиогидантоинов	81
4.2.3. Синтез 3-замещенных 5-((Z)-2-пиридилметил)-2-тиогидантоинов	87
4.2.4. Алкилирование 3,5-дизамещенных 2-тиогидантоинов	93
4.2.5. Алкилирование производных замещенных в 3-м и 5-м положении 2-тиогидантоинов метилиодидом	93
4.2.6. Алкилирование 3,5-дизамещенных 2-тиогидантоинов 1,2-дибромэтаном и 9,10-бис(хлорметил)-антраценом	97
4.2.7. Получение комплексных соединений лигандов с хлоридом меди(II)	99
4.3. Подбор растворителя для исследования лигандов и комплексов.....	102
4.3.1. Приготовление растворов.....	102
4.3.2. Обработка данных	103
4.4. Определение константы устойчивости по разрушению комплекса	103
4.4.1. Приготовление растворов.....	103
4.4.2. Обработка данных	104
4.5. Определение стехиометрии комплексов в растворе (метод изомолярных серий)..	107
4.5.1. Приготовление растворов.....	107
4.5.2. Обработка данных	108
4.6. Определение стехиометрии комплексов по кривой насыщения	108
4.6.1. Приготовление растворов.....	108
4.7. Окисление трифенилфосфина с использованием комплексных соединений.....	108
5. Выводы.....	110
6. Список литературы	111

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Осуществление синтетических процессов органической химии с эффективностью и селективностью, близким к реакциям, протекающим в живых системах, является важной задачей. Известно, что окислительно-восстановительные реакции в организмах катализируются металлоферментами, имеющими в своем составе атомы переходных металлов (медь, кобальт, железо и т.п.). Ион меди в таких металлоферментах обычно координирован донорными атомами азота и серы аминокислотных белковых фрагментов, поэтому синтез низкомолекулярных медьсодержащих координационных соединений с N,S-содержащими лигандами, моделирующими окружение металла в природных биокатализаторах, представляет актуальную задачу. Производные 2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она (2-тиогидантоина) с заместителями различной природы, имеющие в составе экзоциклический атом серы и эндоциклические имидазольные атомы азота, являются перспективными лигандами для моделирования ферментативных систем.

Производные 2-тиогидантоинов также хорошо известны своей фармакологической активностью [1, 2]. Данные соединения проявляют антимикробную [3], противораковую [4], противосудорожную [5], противовирусную активность [6,7], обладают антипролиферативным эффектом, а также могут использоваться для лечения вируса иммунодефицита, против заболеваний щитовидной железы, туберкулеза [8]. Актуальной задачей современной синтетической органической химии является разработка низкотоксичных и высокоэффективных агентов, способных подавлять развитие злокачественных опухолей, в том числе – металлсодержащих комплексов органических лигандов.

Цисплатин (цис-диаминодихлорид платины(II)) является одним из наиболее известных и широко используемых металлсодержащих противоопухолевых препаратов [9]. Являясь высокоэффективным агентом, цисплатин также обладает рядом побочных эффектов и является крайне токсичным [10]. Поэтому в последние годы ведется интенсивная разработка новых органических структур и их координационных соединений с переходными металлами. Идея создания подобных соединений заключается в поиске альтернативных молекул, наряду с цисплатином обладающих высоким сродством к злокачественным образованиям, но имеющих более эффективные показатели в отношении заявленной пользы к возможному риску. Введение эндогенного металла (Cu^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+}) в органическую молекулу позволяет снизить токсичность, повысить селективность и, соответственно, биодоступность координационного соединения. Был протестирован ряд координационных соединений

различных переходных металлов с разнообразными органическими лигандами, в результате чего было выяснено, что наиболее перспективными аналогами цисплатина являются комплексы меди(II) [11].

Ранее сотрудниками нашей научной группы была синтезирована серия органических лигандов – производных 2-тиогидантоина и их координационных соединений с Ni^{2+} , Cu^{2+} , Co^{2+} [12-14], также проведены исследования биологической активности полученных лигандов и комплексов. Было показано, что при введении в положение 5 тиогидантоинового цикла заместителей, содержащих различные донорные атомы, значительно расширяются возможности синтеза координационных соединений [15]. Исходя из геометрического строения 5-арилметилена-2-тиогидантоинов, а также электронных эффектов имеющих в них заместителей, было предположено, что соединения данного класса, а также металлокомплексы на их основе, могут моделировать G-квадруплексы – особые структуры на концах теломер в молекуле ДНК, блокирующие активность теломеразы – фермента, избыточная активность которого создает благоприятные условия для перерождения нормальных клеток в раковые. В ходе предыдущих исследований найдено соединение-лидер — смешанновалентный медьсодержащий хелатный комплекс на основе 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазол-4-она, блокирующий действие теломеразы и являющийся перспективным для дальнейшего изучения его терапевтической активности [16]. Кроме того, показано, что биядерные медьсодержащие координационные соединения 5-пиримидилметилена-2-тиогидантоинов способны эффективно катализировать реакции окисления органических соединений под действием кислорода воздуха и закиси азота [17]. Перспективным представлялось получить новые структурно-подобные лиганды и координационные соединения, установить взаимосвязь структура–активность, изучить устойчивость получаемых соединений в условиях, моделирующих биологические, а также оценить возможность их применения как катализаторов окислительно-восстановительных реакций.

Для решения этой задачи было необходимо проведение многопланового исследования, включающего разработку методов синтеза исходных органических лигандов, получение их координационных соединений и изучение физико-химических и биологических свойств синтезированных молекул, позволяющее оценить возможность их дальнейшего изучения в качестве катализаторов окислительно-восстановительных реакций и противораковых препаратов.

Цель работы – установить характер наличия и положения линкерного фрагмента в 2-тиогидантоинах и 2-алкилтиоимидазолоновых лигандах на состав и структуру образующихся

координационных соединений в реакциях с хлоридом меди(II), а также физико-химические и биологические свойства этих металлокомплексов.

Задачи работы. (1) Разработка синтетических подходов к получению новых классов производных моно- и бис-5-(2-пиридилметилена)замещенных 2-тиогидантоинов; (2) Получение медьсодержащих координационных соединений с лигандами – производными 2-алкилтиоимидазололин-4-онов и 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазол-4-онов; (3) Оценка устойчивости полученных координационных соединений, определение констант устойчивости комплексов; (4) Оценка цитотоксичности и возможности каталитического использования полученных комплексов Cu.

Научная новизна.

- Предложены новые и оптимизированы ранее описанные методы синтеза производных моно- и бис-5-(2-пиридилметилена)замещенных 2-тиогидантоинов.
- Впервые получена серия бис-(5-(2-пиридилметилена)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов) с полиметиленовыми, полиэтиленгликолевыми и диалкил- и диарилдисульфидными линкерами между имидазолоновыми фрагментами.
- Впервые исследована стабильность координационных соединений 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазолонов в водно-органической среде; измерены константы устойчивости медьсодержащих комплексов 3-х различных структурных типов.
- Изучены каталитические свойства биядерных координационных соединений меди - производных 5-(2-пиридилметилена)замещенного 2-тиогидантоина, являющихся низкомолекулярными моделями медьсодержащих ферментов типа Cu₂.

Теоретическая и практическая значимость.

- Разработаны методы синтеза нового класса органических лигандов - производных 5-(2-пиридилметилена)замещенных 2-тиогидантоинов, соединенных линкерами различной природы между атомами азота N(3) имидазолоновых фрагментов.
- Изучено комплексообразование полученных лигандов с хлоридом меди(II) с получением биядерных координационных соединений.
- Изучена цитотоксическая активность полученных координационных соединений на основе бис-(5-(2-пиридилметилена)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов).

- Определены константы устойчивости медьсодержащих координационных соединений с органическими лигандами – производными 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазолонов.
- Исследована каталитическая активность биядерных комплексов меди с лигандами на основе 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазолона. Показано, что полученные комплексы представляют собой низкомолекулярные модели фермента N₂O-редуктаза.
- Изучена адсорбция органических производных 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазолонов и их координационных соединений на поверхности золота.

Положения, выносимые на защиту.

- Оптимизированные методы синтеза производных 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазолонов, 2-алкилтиоимидазолонов и их моно- и биядерных координационных соединений.
- Разработка методов получения производных бис-5-(2-пиридилметил)замещенных 2-тиогидантоинов с полиметиленовыми, полиэтиленгликолевыми и диалкил- и диарилдисульфидными линкерами между атомами азота N(3) имидазолоновых фрагментов и их координационных соединений с медью(II).
- Определение констант устойчивости полученных медьсодержащих координационных соединений различных структурных типов, оценка их цитотоксичности.

Достоверность полученных результатов: все полученные соединения проанализированы с применением современных физико-химических методов установления структуры (спектроскопия ЯМР ¹H и ИК, электронная спектроскопия в УФ и видимой области, данные рентгеноструктурного анализа), состав ранее не описанных соединений подтвержден данными элементного анализа.

Апробация работы. Результаты работы докладывались на XVII Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов-2010" (Москва, 2010), III Международной конференции "Химия гетероциклических соединений", посвященной 95-летию со дня рождения профессора Алексея Николаевича Коста, (Москва, 2010), Международной Чугаевской конференции по координационной химии (Суздаль, 2011), Всероссийской научной конференции с международным участием посвященной международному году химии «Успехи синтеза и комплексообразования» (Москва, 2011), I

Всероссийской молодёжной школе-конференции “Успехи синтеза и комплексообразования” (Москва, 2016).

Публикации по теме работы. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах, отвечающих требованиям Высшей аттестационной комиссии и 5 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Работа состоит из введения, обзора литературы, посвященного медьсодержащим ферментам и их известным низкомолекулярным моделям, обсуждения полученных результатов, экспериментальной части, выводов и списка литературы. Материал диссертации изложен на 128 страницах машинописного текста, включает 8 таблиц, 66 рисунков. Библиография насчитывает 192 ссылки.

Благодарности.

Особую глубокую благодарность и признательность автор выражает соруководителю данной диссертационной работы д.х.н., профессору **Проскурнину Михаилу Алексеевичу** за совместно выполненные исследования, ценные научные замечания, предоставленные рекомендации и всестороннюю поддержку.

Искреннюю благодарность автор выражает:

Коллективу научной группы лазерной термооптической спектроскопии за ценные консультации при выполнении совместных исследований;

К.х.н., доценту **Должиковой Валентине Дмитриевне** и к.х.н., доценту **Богдановой Юлии Геннадиевне** за совместную работу над разделом «3.3. Физико-химические исследования лигандов и координационных структур»;

К.х.н, н.с. **Моисеевой Анне Анисимовне** за проведение электрохимических исследований и помощь в подготовке раздела «3.3.3. Исследование модельной каталитической реакции».

Академику РАН, профессору **Донцовой Ольге Анатольевне**, к.х.н., доценту **Зверевой Марии Эмильевне** и к.х.н., с.н.с. **Скворцову Дмитрию Александровичу** за помощь в подготовке раздела «3.4. Биохимические исследования координационных структур»;

Коллективу лаборатории биологически активных органических соединений за совместно проведенные исследования и ценные научные рекомендации.

2. МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ: ТИПЫ, НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫЕ МОДЕЛЬНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ, БИОЛОГИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Поскольку одной из задач диссертационного исследования было изучение полученных координационных соединений меди как низкомолекулярных аналогов природных металлоферментов, в рамках обзора литературы суммированы имеющиеся литературные данные по структуре медьсодержащих ферментов и приведены примеры их низкомолекулярных аналогов.

Медь является жизненно важным микроэлементом, который входит в состав многих витаминов, гормонов, ферментов, дыхательных пигментов. Медь обладает выраженным противовоспалительным свойством, смягчает проявления аутоиммунных заболеваний (например, ревматоидного артрита), способствует усвоению железа. Действие меди на углеводный обмен заключается в ускорении процессов окисления глюкозы и торможении распада гликогена в печени [18]. Кроме того, медь входит в состав миелиновых оболочек нервов. Медь является важной составляющей нервной системы высших эукариот, присутствуя в белках, которые отвечают за биосинтез катехоламина и пептидных гормонов/нейромедиаторов [19]. Медь также присутствует в системе антиоксидантной защиты организма, являясь кофактором фермента супероксиддисмутазы, участвующего в нейтрализации свободных радикалов кислорода, а также ключевым кофактором в различных биологических окислительно-восстановительных реакциях [20].

Изменение активности медьсодержащих ферментов влечет за собой существенное нарушение ряда биохимических процессов, в том числе синтеза фосфолипидов, фосфатидов, гема, сильное снижение концентрации миоглобина (особенно в сердечной мышце), РНК в мозге, глутатиона в печени, уменьшение количества эластина и повышение растворимости коллагена в аорте, венечных сосудах сердца. Наиболее токсичными агентами, действующими в организме при дефиците меди, являются сульфиды. Они образуются в печени при распаде цистеина и накапливаются при снижении активности сульфидоксидазы в 2-3 раза, поражая печень, а после выведения из строя ее барьерной функции – и другие органы [21].

В настоящее время известно более 25 различных медьсодержащих ферментов. Биологическая роль медьсодержащих ферментов связана со следующими процессами:

- Перенос электронов;
- Связывание, хранение и транспорт кислорода;
- Окислительный катализ;
- Восстановление оксида азота на последней стадии круговорота азота.

Это обусловлено рядом особенностей меди:

- По сравнению с ионами других «металлов жизни» ионы меди активнее реагируют с аминокислотами и белками, образуя более устойчивые комплексы;
- Ионы меди являются эффективными катализаторами, особенно в комплексах с белками;
- Медь легко переходит из одной степени окисления в другую, что способствует проявлению окислительно-восстановительных свойств ее соединениями. Относительная устойчивость комплексов Cu^+ и Cu^{2+} зависит от природы лиганда, и равновесие $2 \text{Cu}^+ \rightleftharpoons \text{Cu}^{2+} + \text{Cu}$ может легко смещаться в любом направлении в зависимости от условий. Например, различные медьсодержащие оксидазы выполняют свои функции путем циклического обмена между этими состояниями меди с постоянным использованием молекулярного кислорода.

На рис. 1 представлен ряд медьсодержащих ферментов, одной из главных функций которых является взаимодействие с кислородом [22-26].

В зависимости от числа атомов меди медьсодержащие белки могут быть моно-, би-, трех- и четырехъядерными. Типы медьсодержащих ферментов в зависимости от строения активного центра и спектральных характеристик представлены в работе [27].

Интерес к низкомолекулярным аналогам медьсодержащих ферментов вызван широкими возможностями их использования для моделирования процессов, выполняемых ферментами, таких как каталитические реакции, транспорт кислорода и перенос электронов. Понимание строения и свойств этих моделей позволяет исследовать их также в качестве потенциальных лекарственных препаратов.

Комплексы меди показали свою эффективность при лечении различных нейродегенеративных заболеваний, а также злокачественных опухолей, таких как опухоли мозга, молочной железы, толстой кишки и других [28]. Также показано, что неорганические комплексы меди могут быть эффективными при лечении рака в связи с их цитотоксическим действием на опухолевые клетки [29].

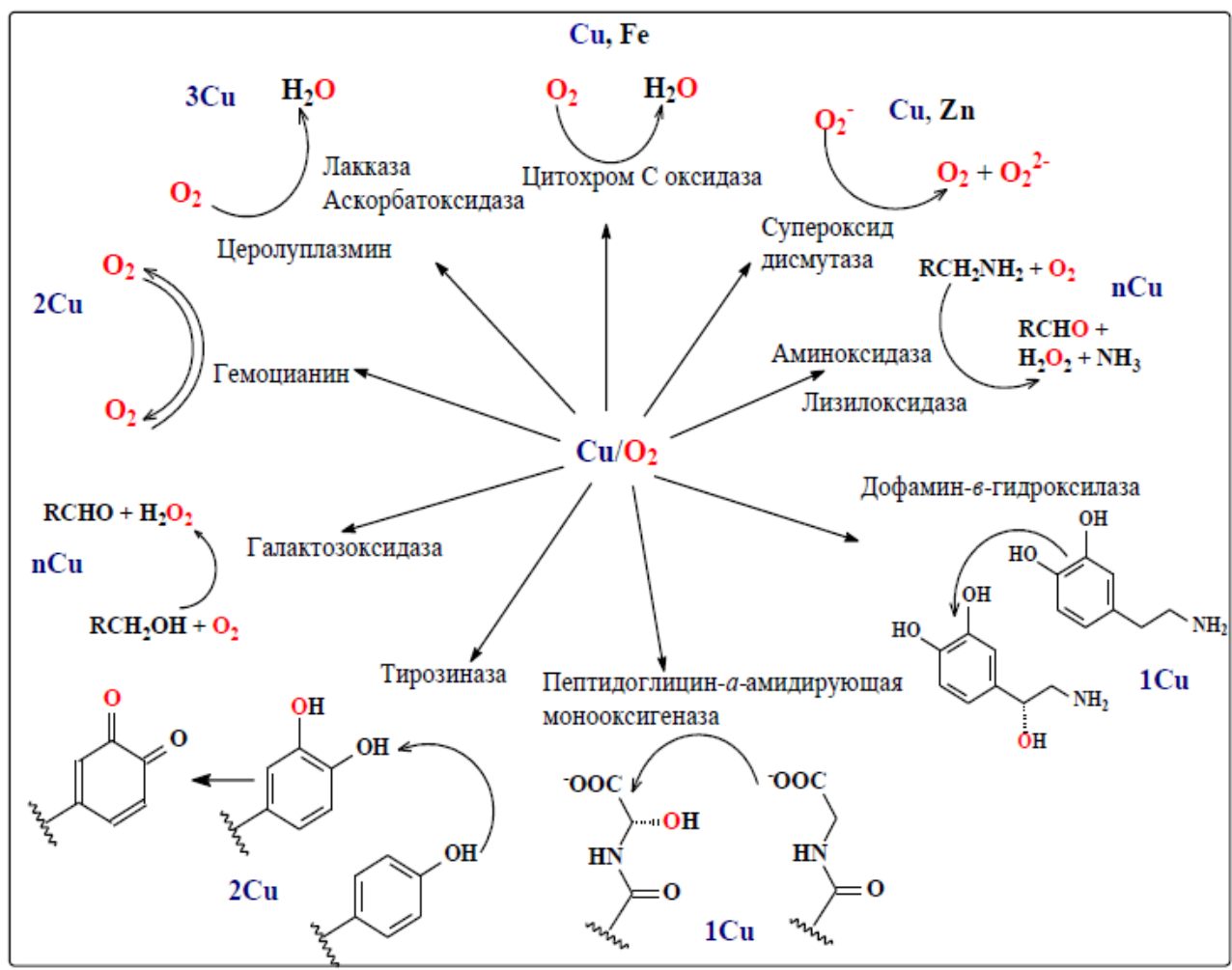
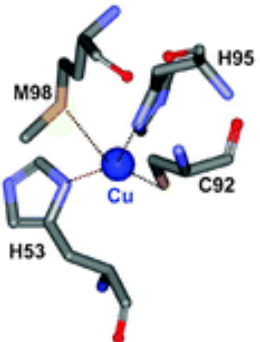
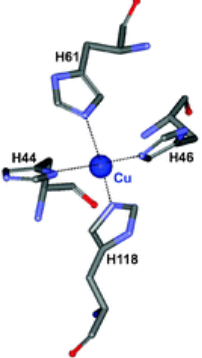
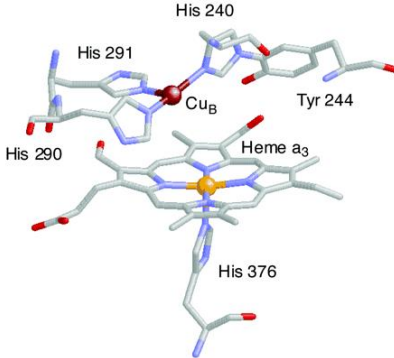


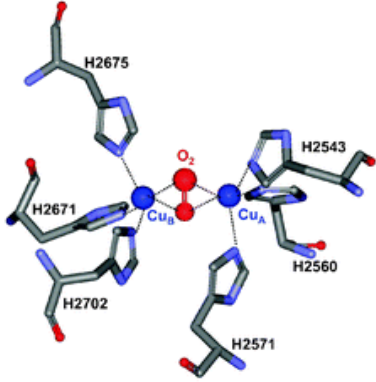
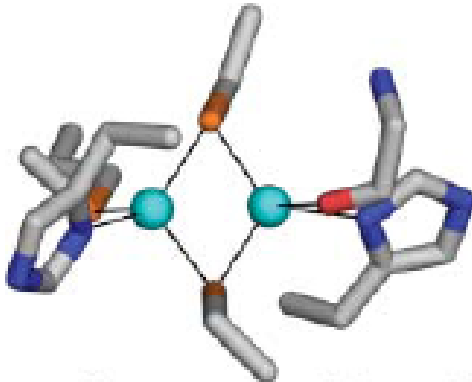
Рисунок 1. Медьсодержащие ферменты, участвующие в окислительном катализе

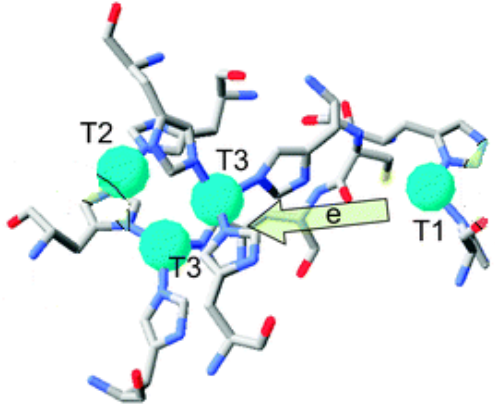
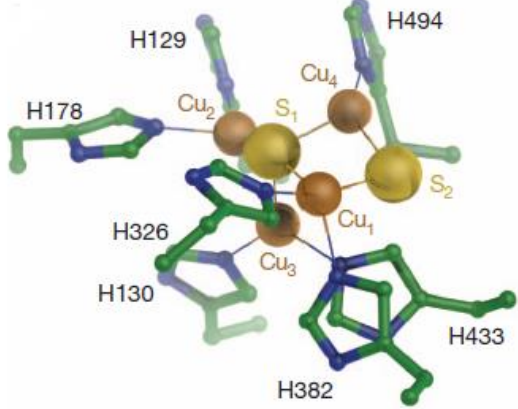
Наибольший интерес исследователей вызывают биядерные координационные соединения меди(II), обладающие цитотоксической активностью или способностью ингибирования ферментов и, таким образом, имеющие противоопухолевые свойства. Описано значительное число координационных соединений — потенциальных противораковых агентов, имеющих в своем составе два атома меди(II) [30]. Наряду с биядерными, интерес вызывают также координационные соединения, содержащие три атома меди(II). При этом количество описанных координационных соединений меди(I) несравнимо меньше в связи с их пониженной стабильностью [31].

В табл. 1 систематизированы данные по типам медьсодержащих ферментов, их геометрии, функциям в организме, а также приведены примеры ферментов, содержащих в своем составе указанные активные центры.

Таблица 1. Типы медьсодержащих центров металлоферментов

Тип	Моноядерный центр		
	Тип 1	Тип 2	Cu _B
УФ-спектроскопия	Интенсивная полоса поглощения ~600 нм (и в некоторых белках) 450 нм	Поглощение в области ~700 нм	Поглощение в области ~ 610 нм
Основные лиганды	His, Cys, (Met)	His, Asp, (Tyr)	His
Геометрия	Искаженная тетрагональная Тригональная планарная	Искаженная тетрагональная	Тригональная пирамида
Примеры структуры [32, 33]	<p>Амицианин</p> 	<p>Супероксиддисмутаза</p> 	<p>Цитохром с-оксидаза</p> 
Функция (катализируемая реакция)	Перенос электронов	Катализ реакций окисления и восстановления	Транспорт кислорода
Примеры	Пластоцианин Азурин Стеллацианин Нитритредуктаза Лакказа Псевдоазуарин Пластоцианины Амицианин Растицианин Галоцианин Сульфоцианины Умецианин Плантацианин Стеллацианин	Супероксиддисмутаза Галактозооксидаза Аминооксидаза Нитритредуктаза Лакказа	Цитохром с-оксидаза

Биядерный центр		
Тип	Тип 3	Cu_A
<i>УФ-спектроскопия</i>	Поглощение в области ~700 нм	Интенсивная полоса поглощения ~480 нм, ~530-580 нм, наличие полосы поглощения при 800 нм
<i>Основные лиганды</i>	His, (Tyr)	His, Cys, (Met)
<i>Геометрия</i>	Тетрагональная	Тригональная планарная
<i>Примеры структуры [32, 34]</i>	<p>Гемоцианин</p> 	<p>Цитохром с-оксидаза, Cu_A - сайт</p> 
<i>Функция (катализируемая реакция)</i>	Окисление аминокислот Транспорт кислорода	Транспорт кислорода
<i>Примеры</i>	Гемоцианин Тирозиназа Катехолоксидаза Лакказа	Цитохром с-оксидаза N ₂ O редуктаза

	Трехъядерный центр	Четырехъядерный центр
Тип	Тип 4 (Тип 2 + Тип 3)	Cu_z
<i>УФ-спектроскопия</i>	Поглощение в области 330 нм и ~600 нм	Интенсивное поглощение ~640 нм
<i>Основные лиганды</i>	His	His, S ²⁻
<i>Геометрия</i>	Трехъядерный центр	m ₄ -S ²⁻ четырехъядерный медный кластер
<i>Примеры структуры [35, 36]</i>	<p>Лакказа <i>Trametes hirsute</i> (трутовик жестковолосистый)</p> 	<p>N₂O редуктаза грамотрицательной бактерии <i>Pseudomonas stutzeri</i></p> 
<i>Функция (катализируемая реакция)</i>	Катализ реакций окисления	Восстановление оксида азота (I) до молекулярного азота
<i>Примеры</i>	Лакказа Аскорбатоксидаза Церулоплазмин	N ₂ O редуктаза

2.1. МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ ТИПА 1

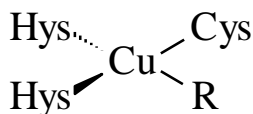


Рисунок 2. Общая структура ферментов типа 1

Ферменты, содержащие данный тип активного центра, имеют интенсивную полосу в спектре поглощения при 600 нм и характеризуются очень высокими редокс-потенциалами (183–680 мВ) и слабым сверхтонким расщеплением в спектрах ЭПР. Среди ферментов типа 1 можно выделить следующие подгруппы: малые синие белки (*купредоксины*), в состав которых входят азурин; семейство пластоцианинов; семейство фитоцианинов (умецианин, плантацианин, стеллацианин); растициацин, аурацианин и «голубые» оксидазы (аскорбатоксидаза, лакказа, церрулплазмин). Общая структура ферментов типа 1 приведена на рис. 2. Медьсодержащие синие белки могут содержать медь как типа 1, так и других типов (как в случае «голубых» оксидаз; см. раздел «Медьсодержащие ферменты типа 4 (тип 2 + тип 3)»). Центр связывания ферментов типа 1 имеет геометрию неправильного тетраэдра, что, вероятно, является компромиссом между полноценным тетраэдром, характерным для Cu^+ , и плоско-квадратной координацией Cu^{2+} в составе низкомолекулярных комплексов меди или «не-голубых» медьсодержащих белков. По всей видимости, требуя наименьших энергетических затрат на реорганизацию центра, такая геометрия обеспечивает необычайно быстрые переходы иона меди типа 1 из одного состояния окисления в другое и обратно, что, в свою очередь, дает возможность ферментам, содержащим один или два независимых центра типа 1, эффективно участвовать в реакциях переноса электронов [37, 38].

2.1.1. МАЛЫЕ СИНИЕ БЕЛКИ (КУПРЕДОКСИНЫ)

Малые синие белки (купредоксины) являются водорастворимыми ферментами. Они имеют в своем составе один атом меди и отвечают за перенос электронов $\text{S}(\text{Cys}) \rightarrow \text{Cu}(\text{II})$ в транспортной цепи прокариот и эукариот в таких процессах, как дыхание и фотосинтез [26]. Атом меди в активном центре купредоксинов находится в искаженном тетраэдрическом лигандном окружении и координирован тремя основными лигандами: двумя остатками гистидина и одним цистеином. Все купредоксины, за исключением стеллацианина, в качестве четвертого лиганда используют метионин (координация по атому серы). В азурине присутствует также дополнительный пятый лиганд — карбоксильный кислород глицина (Рис. 3) [23, 38-40].

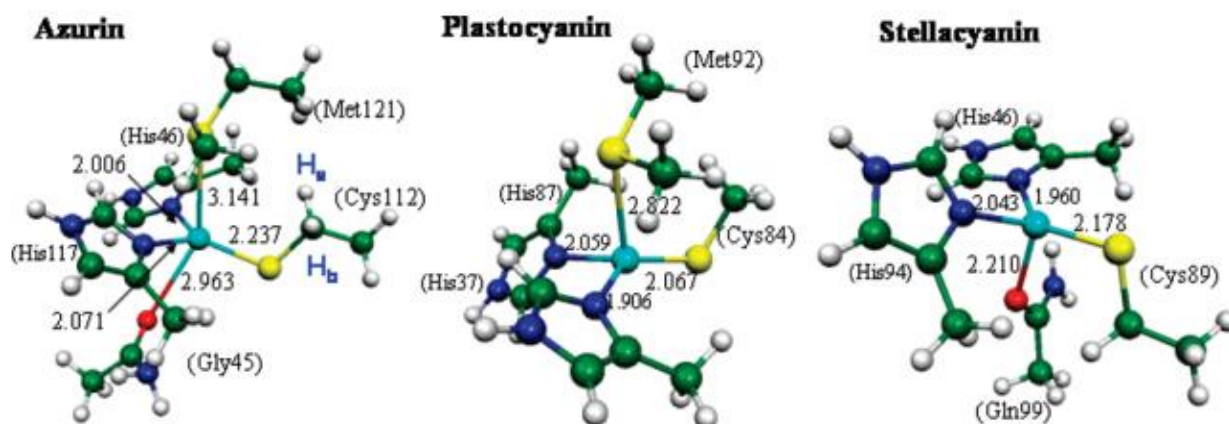
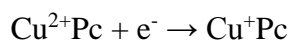


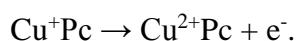
Рисунок 3. Координация иона меди в активных центрах азурина, пластоцианина и стеллацианина [41]

Пластоцианин представляет собой элемент гетеро-олигомерного интегрального мембранного белкового комплекса цитохрома b_6f , ответственного за транспорт электронов в кислородных фотосинтетических мембранах [42]. В указанной системе фрагмент цитохрома f является донором электронов, в то время как фрагмент $P700^+$ принимает электрон от восстановленного пластоцианина [43].

Пластоцианин ($Cu^{2+}Pc$) восстанавливается цитохромом f в соответствии со следующей реакцией:



После восстановления, Cu^+Pc связывается с субъединицей F фотосистемы I . $P700^+$ окисляет Cu^+Pc в соответствии по реакции:



2.1.2. «ГОЛУБЫЕ» ОКСИДАЗЫ

«Голубые» оксидазы представляют собой группу ферментов, которые отвечают за четырехэлектронное восстановление молекулярного кислорода до воды, минуя стадию образования пероксида водорода. Реакция включает процесс присоединения кислорода и перенос на кислород 4-х электронов и 4-х протонов. Если окисляемое вещество — субстрат реакции — представляет собой одноэлектронный донор, то схема процесса может быть представлена следующим образом (Рис. 4 Рисунок 4):

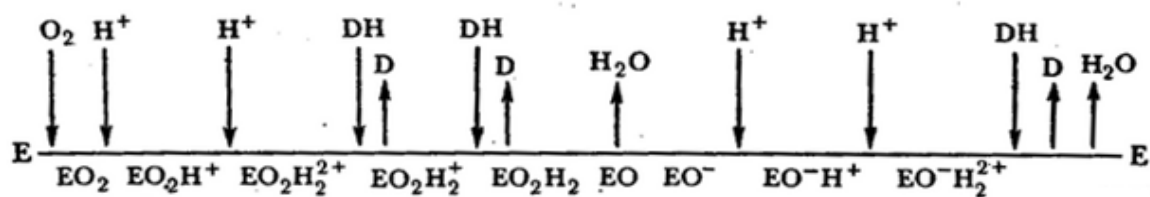


Рисунок 4. Схема восстановления кислорода до воды при катализе «голубыми» медьсодержащими оксидазами. $EO_2, \dots, EO\text{-}H_2^{2+}$ - возможные промежуточные состояния активного центра.

Наиболее хорошо изученными на настоящий момент ферментами этого типа являются лакказа, аскорбатоксидаза и церрулоплазмин [44]. В состав указанных ферментов помимо ионов меди типа 1 также входят ионы меди типа 2 и типа 3, которые и определяют их основную биологическую роль, поэтому более подробное рассмотрение данных ферментов с точки зрения их строения и функций будет проведено далее (см. п. 1.4).

2.1.3. ПРИМЕРЫ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МОДЕЛЕЙ ФЕРМЕНТОВ ТИПА 1

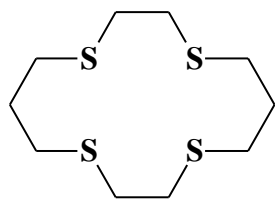


Рисунок 5. Пример симметричной структуры тиоэфирного лиганда, выступающего в качестве основы низкомолекулярной модели «голубых» оксидаз

Одними из первых низкомолекулярных аналогов «голубых» оксидаз стали комплексы тиоэфиров, в которых атом меди расположен в центре симметричного лиганда (Рис. 5Рисунок 5).

Подобные соединения не только аналогичны ферментам по спектральным свойствам (наличие интенсивной полосы поглощения в области 600 нм), но и характеризуются близкими редокс-потенциалами [45], что делает их перспективными моделями для анализа свойств малых медьсодержащих белков.

Авторами работы [46] был получен комплекс – модель медного сайта типа 1 в грибковой лакказе (Рис. 6):

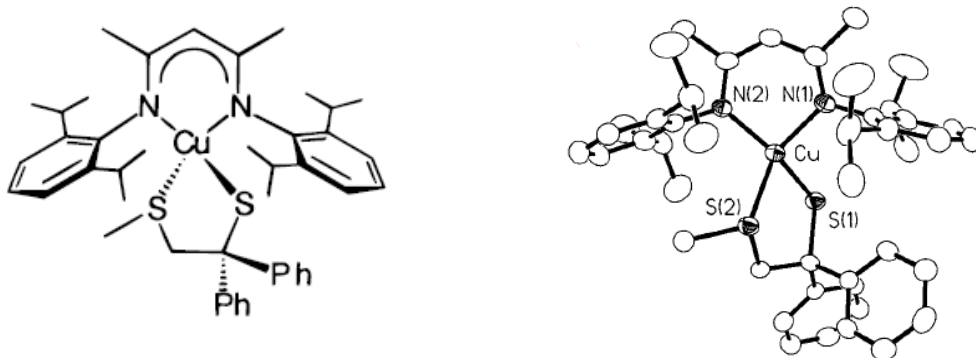


Рисунок 6. Низкомолекулярная модель «голубой» оксидазы – лакказы [46]

Геометрия комплекса несколько отличается от «классической» геометрии медного сайта типа 1, но сходна с геометрией измененных азуринов (например, M121H азурина) и нитритредуктазы. Электронный спектр поглощения полученного комплекса демонстрирует существенное смещение характеристического сдвига в область 691 нм наряду с одновременным снижением интенсивности. Эти данные демонстрируют сходство с изменениями, наблюдаемыми при депротонировании глутамина в модифицированном азурине M121H. Данные изменения можно объяснить увеличением длины связи Cu-S (тиолят) (Рис. 7).

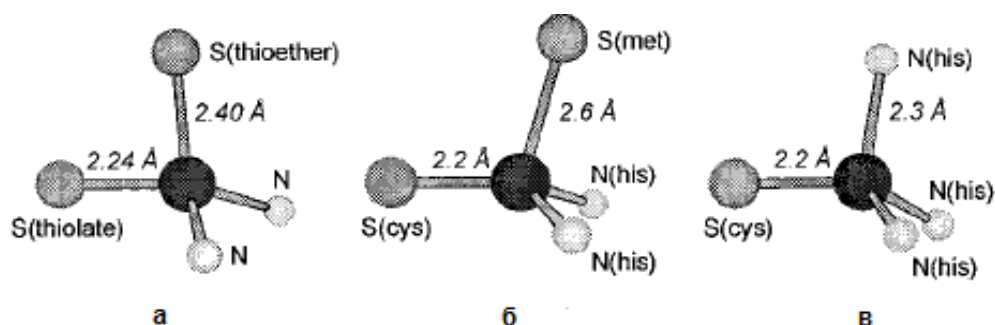
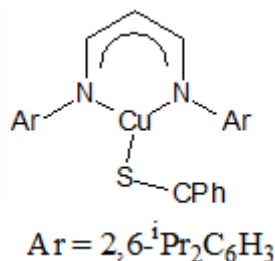


Рисунок 7. Геометрия активного центра в низкомолекулярных моделях лакказы (а), нитритредуктазы pdb1NDT (б), азурина M121H (в) [46]

Остаток тиоэфира в модельном комплексе прочно связан с атомом меди; при этом геометрия металлоцентра молекулы наиболее точно соответствует структуре медного сайта типа «1,5», упоминаемой авторами работ [47-50], и близка к тригональной планарной геометрии.

В работе [51] рассмотрена синтетическая модель грибковой лакказы и церуллоплазмина, координационная геометрия атома меди в которой близка к тригональной планарной (Рис. 8).

А)



Б)

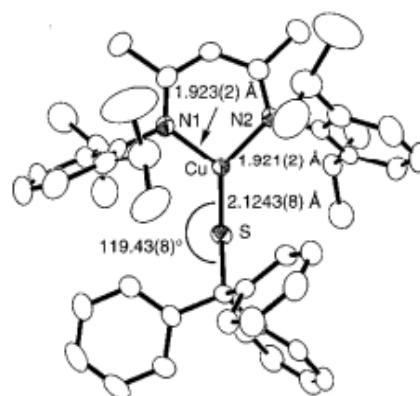


Рисунок 8. Структура синтетической модели грибковой церуллоплазмина (а) и лакказы (б)

Длины связей Cu-N и Cu-S (1,922 Å и 2,124 Å соответственно) близки к длинам связей в кристаллической структуре тригонального планарного активного сайта типа 1 грибовой лакказы (1,9 Å и 2,2 Å соответственно). Полоса поглощения при $\lambda=749$ нм в спектрах поглощения в гептане, зарегистрированных для данной низкомолекулярной модели, обуславливает интенсивную голубую окраску полученного комплекса, несмотря на большее значение длины волны поглощения, чем величина, регистрируемая для медного сайта типа 1, $\lambda \sim 600$ нм.

Предполагается, что нестандартная для сайта типа 1 тригональная планарная структура обеспечивает минимальные изменения геометрии лиганда при восстановлении Cu(II) до Cu(I) [52].

2.2. МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ ТИПА 2

На основе данных ЭПР спектроскопии среди медьсодержащих ферментов был выделен тип 2, к которому принадлежат «не-голубые» оксидазы: галактооксидаза и аминоксидаза, оксидоредуктазы: монооксигеназы и диоксигеназы, некоторые биядерные ферменты: Cu-Zn-супероксиддисмутаза [53-55]. Было показано, что для ферментов данного типа характерны «нормальные» параметры в спектрах ЭПР ($g_{\parallel} > g_{\perp} > 2.00$, $A_{\parallel} > 140 \times 10^{-4} \text{ см}^{-1}$), при этом присутствует слабая полоса поглощения в видимой области спектра [56, 57]. Геометрия сайта типа 2 характеризуется искаженным тетрагональным лигандным окружением.

2.2.1. «НЕ-ГОЛУБЫЕ» ОКСИДАЗЫ

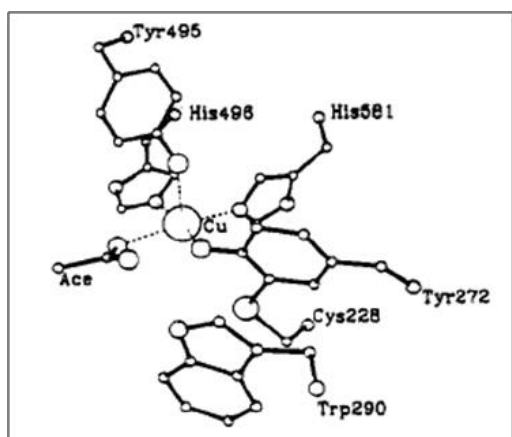
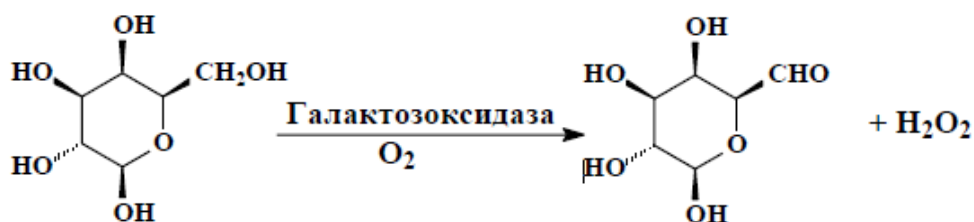


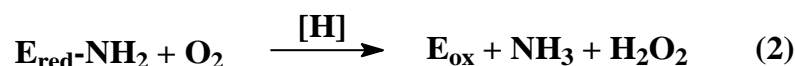
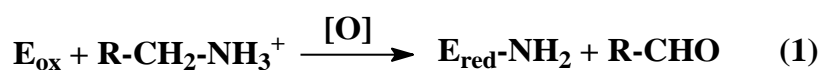
Рисунок 9. Координация иона меди в активном центре галактооксидазы [58]

Медные ферменты, содержащие активный центр, относящийся к типу 2, известны как «нормальные» или «не-голубые» медные ферменты благодаря тому, что их спектральные характеристики аналогичны обычным комплексам меди(II). Основной функцией «не-голубых» оксидаз является катализ восстановления кислорода до пероксида водорода. Координационная геометрия меди, характерная для ферментов данного типа, — плоский квадрат, либо плоская квадратная пирамида (Рис. 9 Рисунок 9) [19, 59, 60].

Галактозоксидаза — фермент, выделенный из древесного гриба *Polyporus circinatus* Fr [61], содержит один атом меди, который катализирует окисление первичных спиртов в альдегиды [24, 62, 63].



Аминоксидаза катализирует реакцию деаминирования первичных аминов путем переноса двух электронов от амина на молекулярный кислород. Механизм такой реакции может быть представлен как две последовательные стадии: на первой происходит восстановление фермента субстратом (1), с последующим его окислением кислородом на второй стадии (2) [23, 63]:



Активный сайт аминоксидазы имеет структуру искаженной квадратной пирамиды (Рис. 10 Рисунок 10). Основание пирамиды образуют три гистидиновых остатка и молекула воды. В вершине пирамиды находится вторая молекула воды [60].

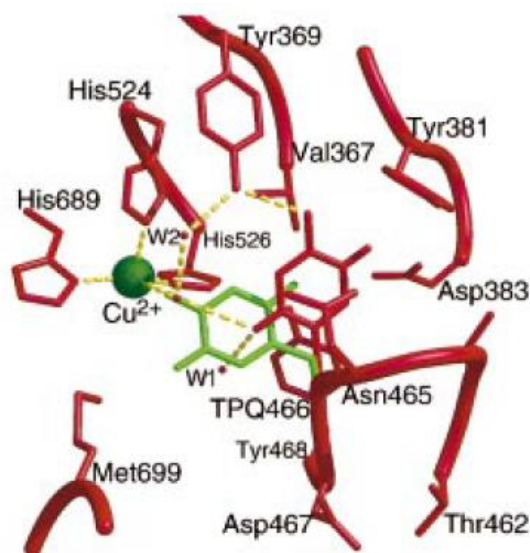


Рисунок 10. Активный сайт меди в ферменте аминоксидаза [60]. В неактивной форме фермента атом меди связан с модифицированным остатком тирозина (изображен на рисунке зеленым)

2.2.2. ОКСИРЕДУКТАЗЫ

Оксиредуктазы функционально подразделяются на монооксигеназы и диоксигеназы. Основной функцией монооксигеназ и диоксигеназ является внедрение атома кислорода в органический субстрат, при этом молекулярный кислород используется в качестве донора кислорода. Монооксигеназы катализируют внедрение в субстрат одного атома кислорода, а диоксигеназы обеспечивают введение обоих атомов молекулярного кислорода [64].

Примером монооксигеназ может служить фермент метанмонооксигеназа, который окисляет метан до метанола [34] или дофамин- β -гидроксилаза, жизненно важная роль которой заключается в синтезе норадреналина из дофамина путем β -гидроксилирования [65].

Фермент метанмонооксигеназа был найден в большинстве известных метанотрофных бактерий. В соответствии с их морфологическими и физиологическими свойствами метанотрофные бактерии разделены на две ферментные системы – растворимую (sММО) и мембраносвязанную (pММО) [66]. Хорошо изученный к настоящему моменту активный сайт sММО содержит два атома железа, при этом мембраносвязанная система метан монооксигеназы является менее изученной. Предполагается, что pММО представляет собой медный сайт типа 2 с одним атомом меди (Рис. 11) [67, 68]:

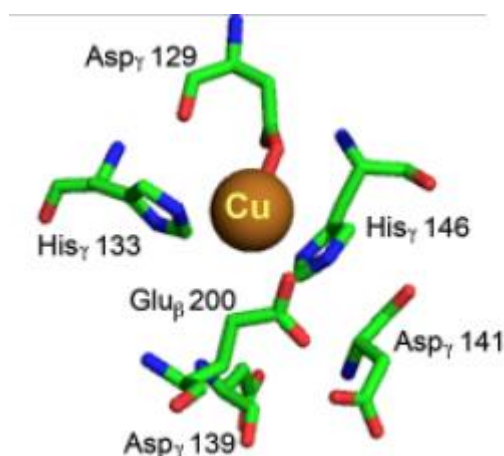
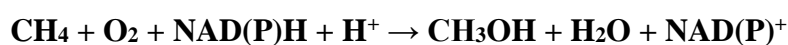


Рисунок 11. Моноядерный медный сайт мембраносвязанной метан монооксигеназы pММО бактерии *Methylosinus trichosporium* OB3b [67]

Суммарная реакция, протекающая при катализе монооксигеназой, может быть представлена следующим образом:



Наиболее известным и изученным ферментом среди медьсодержащих диоксигеназ является фермент кверцетин-2,3-диоксигеназа (Рис. 12).

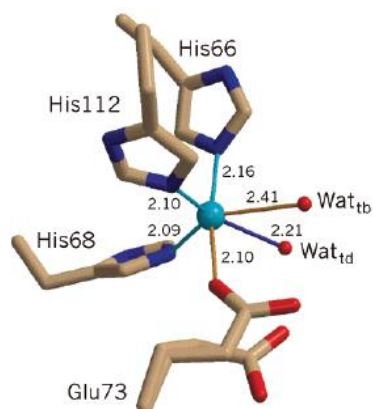


Рисунок 12. Тетрагональная структура кверцетин-2,3-диоксигеназы и смешанная тригонально-бипирамидальная и квадратно-пирамидальная геометрия [69]

Кверцетин-2,3-диоксигеназа является единственной диоксигеназой, не содержащей атома железа, кристаллическую структуру которого удалось изучить. В мономере данного фермента присутствует только один атом меди, координированный тремя атомами азота гистидиновых остатков и молекулой воды, которые образуют искаженную тетрагональную пирамиду [70]. При этом авторы работы [69] заявляют также о смешанной тригонально-бипирамидальной и квадратно-пирамидальной геометрии, в результате координации меди тремя гистидиновым остатками (His66, His68, His112), молекулой растворителя (Wat_{tb}) и боковой карбоксилатной цепью Glu73 в качестве лигандного окружения.

Кверцетин-2,3-диоксигеназа катализирует расщепление *орто*-гетероароматического кольца флавонолов с образованием депсидов (сложных эфиров 4,6-дигидроксibenзойной кислоты) и монооксида углерода (Рис. 13) [71]:

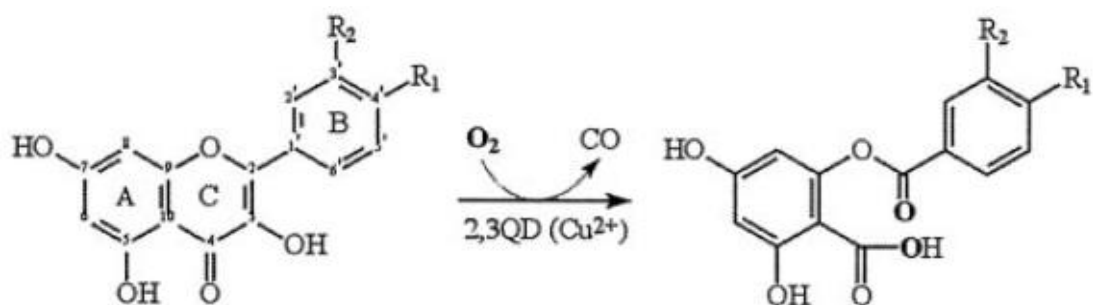


Рисунок 13. Расщепление флавоноловых субстратов кверцетина (5,7,3',4'-тетрагидрокси-флавонол, $R_1 = R_2 = \text{OH}$) и кемферола (5,7,4'-тригидрокси флавонол, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$)

2.2.3. БИЯДЕРНЫЙ ФЕРМЕНТ CU-ZN-СУПЕРОКСИДДИСМУТАЗА

Cu-Zn-супероксиддисмутаза представляет собой димерный белок с двумя субъединицами, одна из которых содержит в качестве активного центра атом меди(II), а другая – атом цинка(II) [72]. Атом меди связан с четырьмя гистидиновыми остатками, а атом цинка – с тремя гистидиновыми и одним аспартатным фрагментом (Рис. 14).

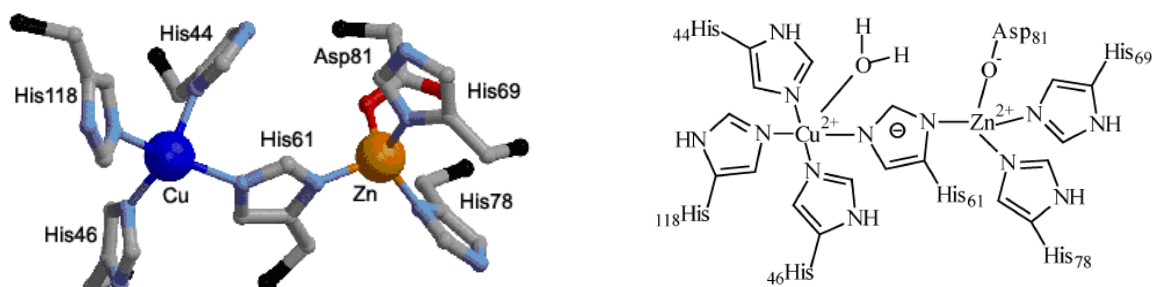
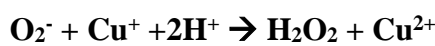
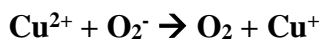


Рисунок 14. Структура активного центра Cu-Zn-супероксиддисмутазы

Реакция дисмутации (диспропорционирования), катализируемая супероксиддисмутазой, выглядит следующим образом [73]:



Цинк не участвует в этой реакции, но имеет важное значение для стабилизации конформации активного центра фермента; при этом формирование межсубъединичной дисульфидной связи стабилизирует фермент и играет важную роль в предотвращении агрегации металл-дефицитной супероксиддисмутазы [74].

2.2.4. ПРИМЕРЫ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МОДЕЛЕЙ ФЕРМЕНТОВ ТИПА 2

Ранее показано, что наличие иона меди имеет принципиальное значение для протекания реакций окисления и восстановления, катализируемых ферментом Cu-Zn-супероксиддисмутаза [75], однако роль имидазольного кольца, связывающего атомы меди и цинка, остается менее ясной [76].

В качестве модели Cu-Zn-супероксиддисмутазы в работе [76] был синтезирован гетероядерный комплекс, содержащий в своем составе атомы меди и цинка, а также лиганд 4,5-бис(ди(2-пиридилметил)аминометил)имидазол (Рис.15, 16).

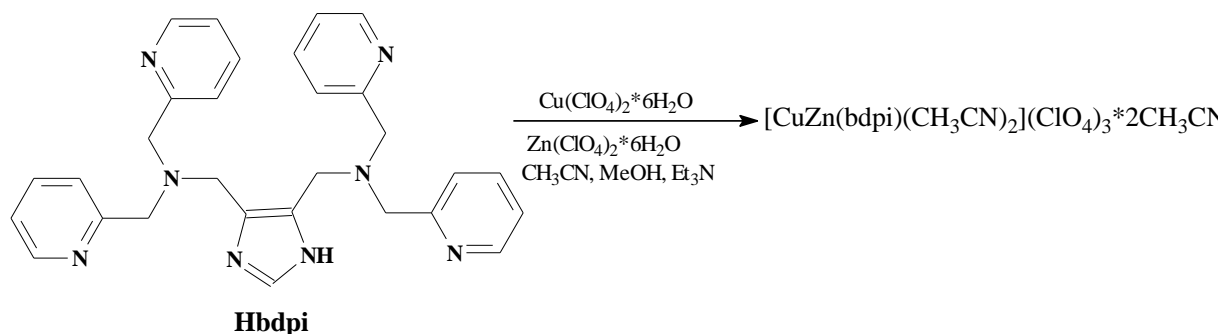


Рисунок 15. Образование гетероядерного координационного соединения, имеющего в составе ионы меди и цинка

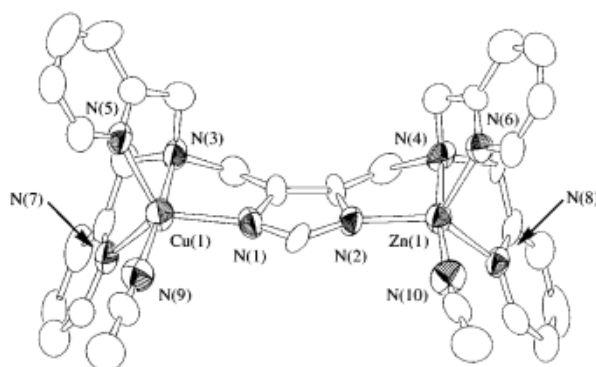


Рисунок 16. Координационное соединение $\text{CuZn}(\text{bdpi})(\text{CH}_3\text{CN})_2(\text{ClO}_4)_3 \cdot 2\text{CH}_3\text{CN}$

Для полученного комплекса характерна немного искаженная тригонально-бипирамидальная геометрия. Свойства комплекса изучены при сравнении моно- и биядерного координационных соединений меди с данным лигандом. Также на основе данных спектроскопии в УФ и видимой областях спектра и данных рентгеноструктурного анализа установлено, что полученный биядерный комплекс аналогичен по своей структуре активному сайту фермента Cu-Zn-супероксиддисмутазы [77].

Наличие иона цинка также может способствовать ускорению электронного переноса от комплекса Cu(I)-Zn(II) к супероксиду [77, 78].

Интересными примерами миметиков Cu-Zn-супероксиддисмутазы являются супрамолекулярные полимеры, в состав которых входит биядерный комплекс меди(II) и связанный с ним имидазольным мостиком фрагмент β -циклодекстрина или фрагмент гуанидил-модифицированного β -циклодекстрина [55]. Для полученных комплексов были зарегистрированы электронные спектры поглощения, при этом максимум поглощения для обоих комплексов находится в диапазоне от 619 до 622 нм. Данные значения близки к диапазону значений, полученному для Cu-Zn-супероксиддисмутазы: от 630 нм до 680 нм.

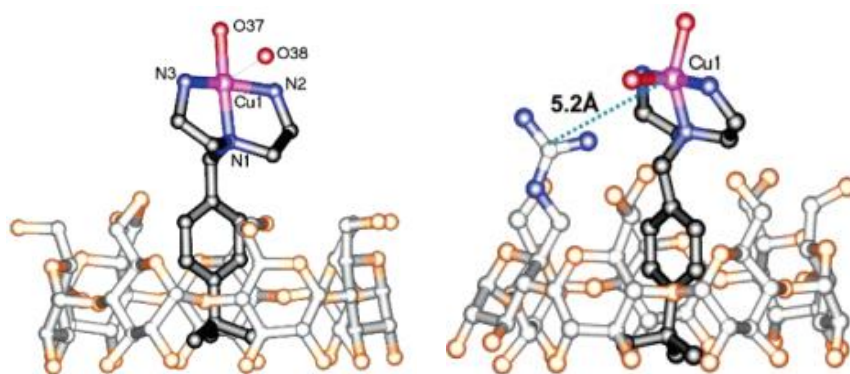


Рисунок 17. Супрамолекулярное моделирование комплексов меди [55]

составе гуанидил-модифицированный β -циклодекстрин, на 40% больше по сравнению со значением IC_{50} для комплекса без модификации β -циклодекстрина.

На рис. 18 представлен предположительный механизм дисмутации комплекса, в структуру которого входит гуанидил-модифицированный β -циклодекстрин [55]. Под влиянием гуанидил-катиона анион супероксида сближается с атомом меди(II) и напрямую с ним связывается. После этого анион супероксида, связанный с атомом меди(II), может быстро менять свое положение между аксиальным и планарным положениями искаженной квадратной пирамиды молекулы, что приводит к потере электрона и формированию свободной молекулы кислорода, которая затем удаляется из системы. После этого второй анион супероксида связывается с атомом меди(I), при этом молекула комплекса получает возможность выступать в качестве акцептора электрона. Молекула далее протонируется, при этом супероксид-анион образует нейтральную молекулу пероксида водорода, которая затем выходит из системы, таким образом, завершая каталитический цикл.

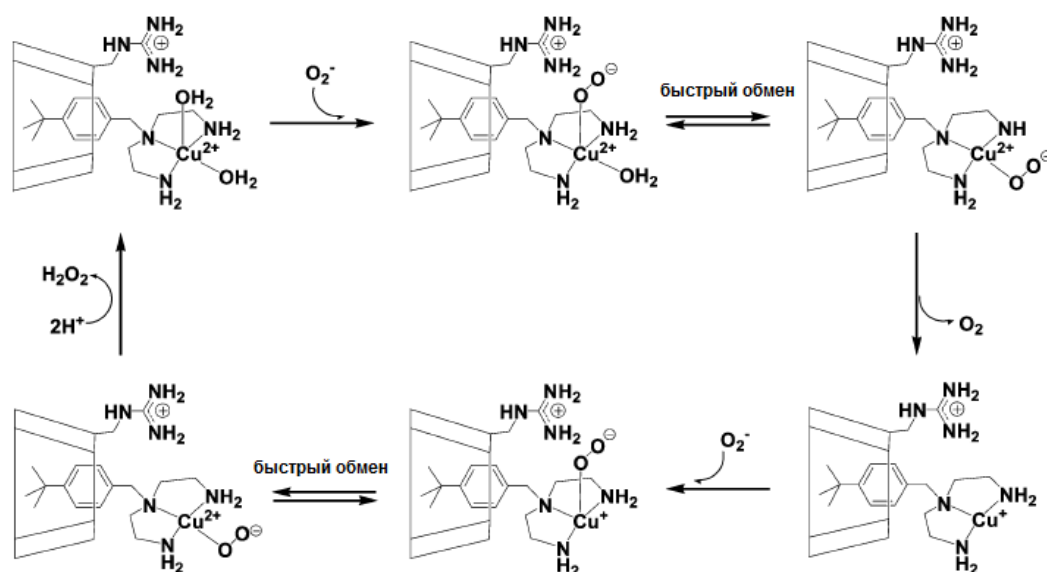


Рисунок 18. Предположительный механизм дисмутации супрамолекулярного миметика, содержащего гуанидил-катион.

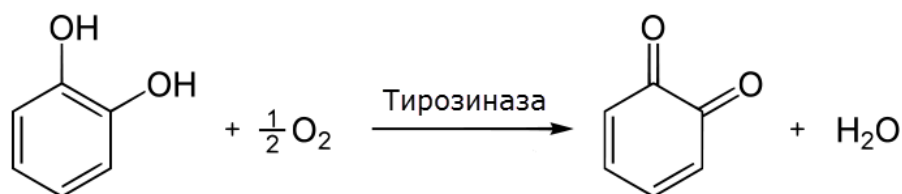
Для комплексов, представленных на рис. 17 были также проведены исследования супероксиддисмутазной активности, и было показано, что значение IC_{50} комплекса, содержащего в своем

2.3. МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ ТИПА 3

Отличительной особенностью медьсодержащих ферментов 3-го типа является наличие пары медных центров, в каждом из которых атом меди координирован тремя гистидиновыми остатками. Основные функции, выполняемые данным ферментами данного типа – окисление аминокислот и транспорт кислорода. Геометрия сайта типа 3 – тетрагональная. Ферменты, относящиеся к третьему типу, ЭПР-неактивны, так как взаимодействие двух парамагнитных ионов меди ($S=1/2$) приводит к диамагнитному состоянию ($S=0$) [79].

К третьему типу относятся три фермента: тирозиназа, катехолоксидаза и гемоцианин.

Тирозиназа – биядерный медьсодержащий белок, подобный гемоцианину. Тирозиназа активирует кислород и действует как монооксигеназа, гидроксيليруя фенолы в *орто*-положение и далее окисляя пирокатехин в *о*-хинон [24]:



Главной особенностью тирозиназы является ее способность катализировать окисление аминокислоты тирозина, в результате чего образуется черный пигмент меланин. Тирозин окисляется этим ферментом даже тогда, когда он находится в составе белка [24].

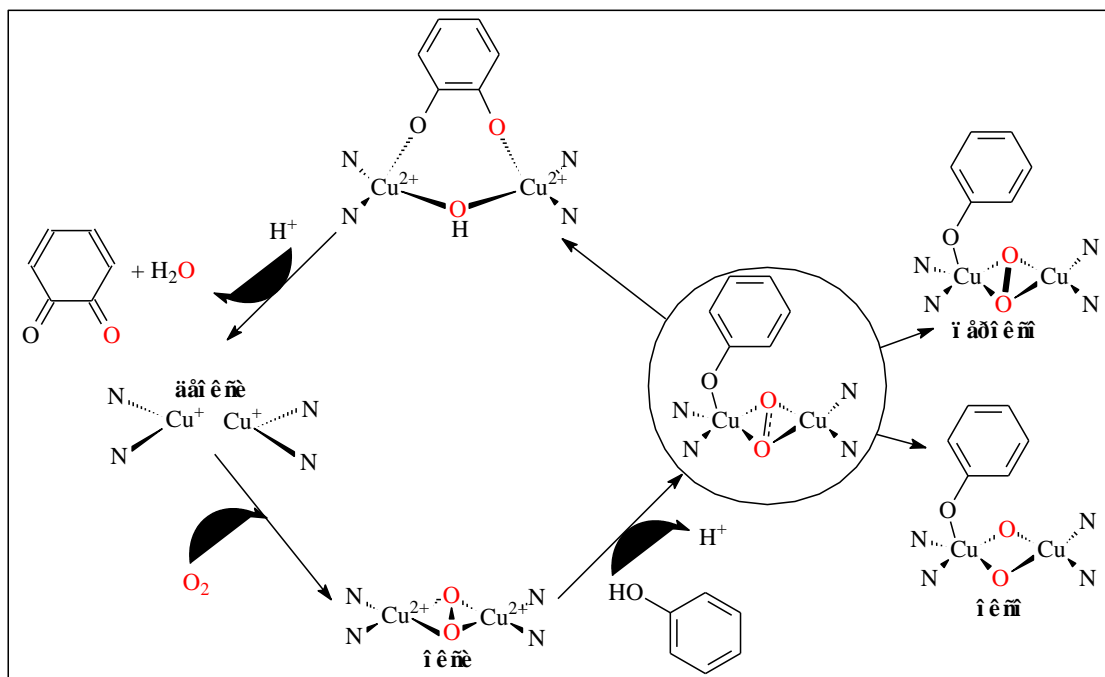


Рисунок 19. Механизм действия тирозиназы [24, 80]

Начиная с 1984 г., когда была получена первая модель тирозиназы, проведено много исследований по этой теме и синтезирован ряд биомиметиков тирозиназы [80-87].

Гемоцианин – дыхательный пигмент гемолимфы некоторых беспозвоночных животных - привлекает большое внимание ученых с конца 80-х годов [88]. В его состав входят два атома меди, которые связываются с молекулярным кислородом. При связывании с кислородом бесцветный центр, содержащий ионы Cu(I), переходит в голубой, содержащий Cu(II), чем объясняется синий цвет крови большинства моллюсков и некоторых видов членистоногих. Данный фермент обеспечивает транспорт кислорода в крови, его функции аналогичны функциям гемоглобина [24, 25, 37].

Активный центр белка содержит два близко расположенных друг к другу катиона меди ($d_{\text{Cu-Cu}} = 3.6 \text{ \AA}$), которые обратимо связывают молекулу кислорода в комплекс. При этом сами катионы меди прочно связаны в структуре белка шестью атомами азота имидазольных колец гистидиновых остатков двух разных цепей [24]. Атомы меди связаны между собой через гидроксильную группу. Окси-форма имеет также мостиковые атомы кислорода (Рис. 20). Каждый атом меди находится в искаженном тетраэдрическом лигандном окружении.

Были синтезированы низкомолекулярные аналоги активного центра данного фермента, а также получены продукты взаимодействия комплексов с кислородом [25].

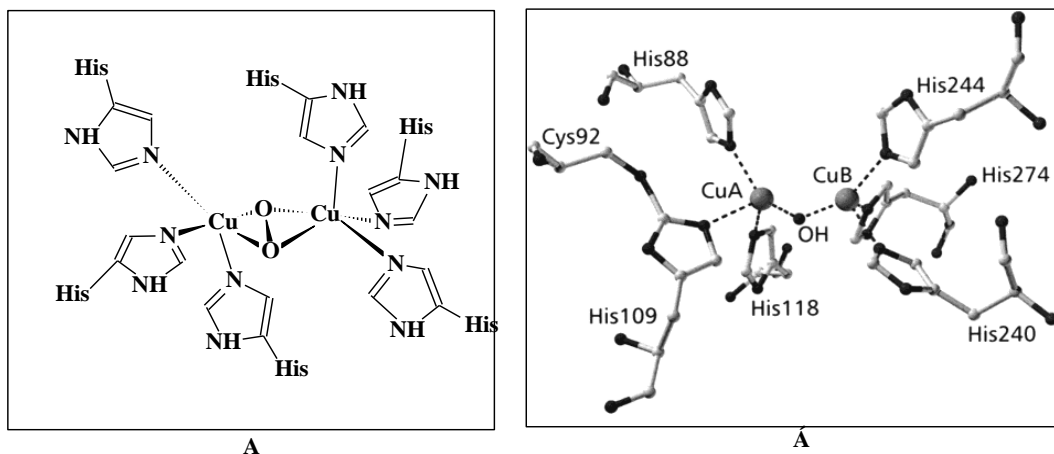


Рисунок 20. Структура активного центра гемоцианина: (А) окси-форма; (Б) восстановленная форма [89]

2.3.1. ПРИМЕРЫ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МОДЕЛЕЙ ФЕРМЕНТОВ ТИПА 3

Медные биядерные комплексы, представляющие собой низкомолекулярные модели гемоцианина и тирозиназы, должны быть координированы тремя атомами азота, так как данное расположение подобно координации атомов меди в гемоцианине и тирозиназе [90].

В работе [91] представлены исследования кристаллической структуры, магнитных, окислительно-восстановительных и спектроскопических свойств несимметричного

биядерного комплекса меди (II) с лигандом *N,N,N'*-трис-(2-пиридилметил)-1,3-диаминопропан-2-олом (HTPPNOL) (Рис. 21):

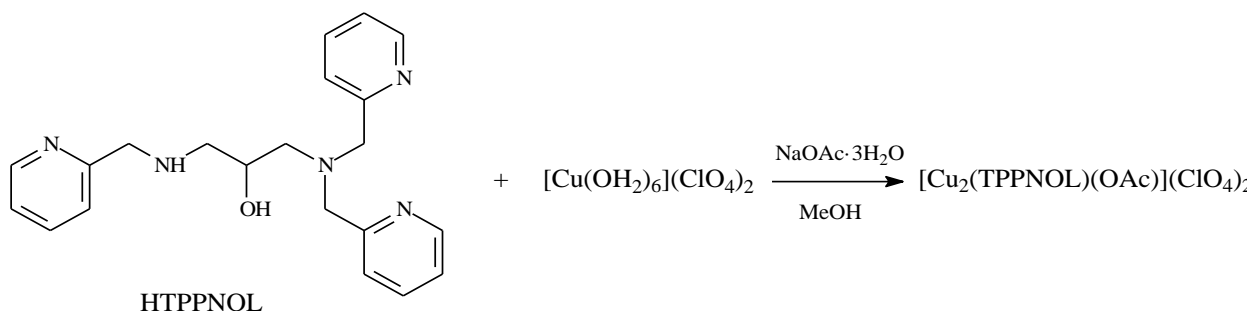


Рисунок 21. Синтез несимметричного биядерного комплекса меди [91]

Проведенные исследования показали, что координация активного центра полученного комплекса наряду с расстоянием Cu–Cu соответствует параметрам, определенным для катехолоксидазы. Кроме того, была изучена катехолоксидазная активность данной низкомолекулярной модели, и были получены положительные результаты, что позволяет утверждать, что комплекс представляет собой низкомолекулярную модель активного сайта катехолоксидазы (Рис. 22).

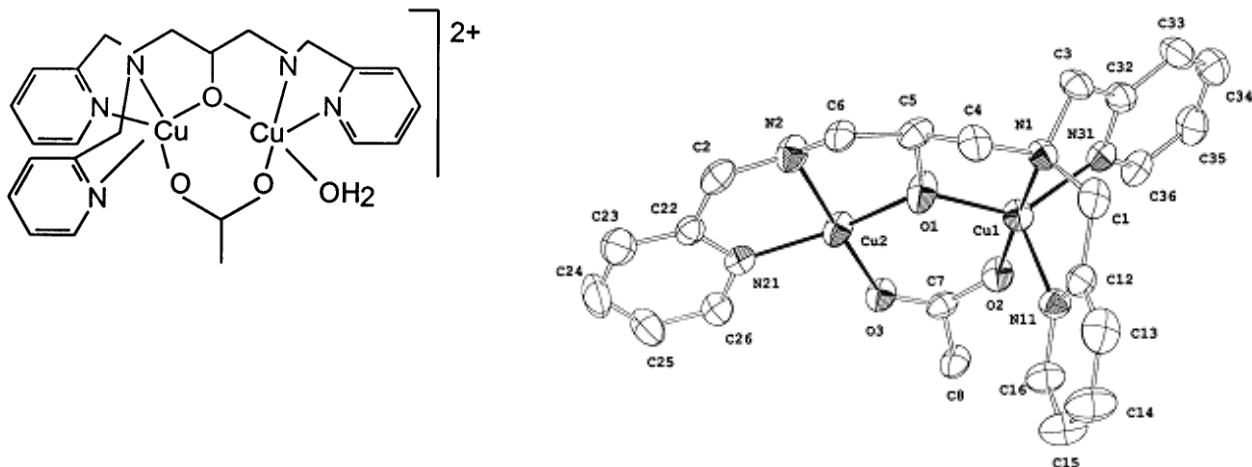


Рисунок 22. Кристаллическая структура несимметричного биядерного комплекса – модели катехолоксидазы I [91]

Один атом меди комплекса координирован пятью донорными атомами (тремя атомами азота и двумя атомами кислорода) и имеет искаженную тригонально-бипирамидальную геометрию. Другой атом меди координирован двумя атомами азота и двумя атомами кислорода и имеет искаженную плоско-квадратную геометрию. Показано, что комплекс окисляет 3,5-ди-*трет*-бутилпирокатехин в соответствующий *орто*-хинон.

2.4. МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ ТИПА 4 (Тип 2 + Тип 3)

Активный центр медьсодержащих ферментов типа 4 обычно объединяет в себе типы 2 и 3, образуя трехъядерный кластер. В некоторых случаях присутствует также активный центр 1 типа, тогда такие ферменты относят к «голубым оксидазам». Атом меди, относящийся к типу 2, связан с двумя атомами азота гистидина и гидроксильной группой и находится в некотором отдалении от биядерного центра типа 3, в котором каждый атом меди связан с тремя гистидиновыми остатками, и атомы меди связаны между собой гидроксильной группой [37].

К данному типу относятся такие ферменты, как лакказа (Рис. 23), аскорбатоксидаза и церулоплазмин, функцией которых является катализ реакций окисления.

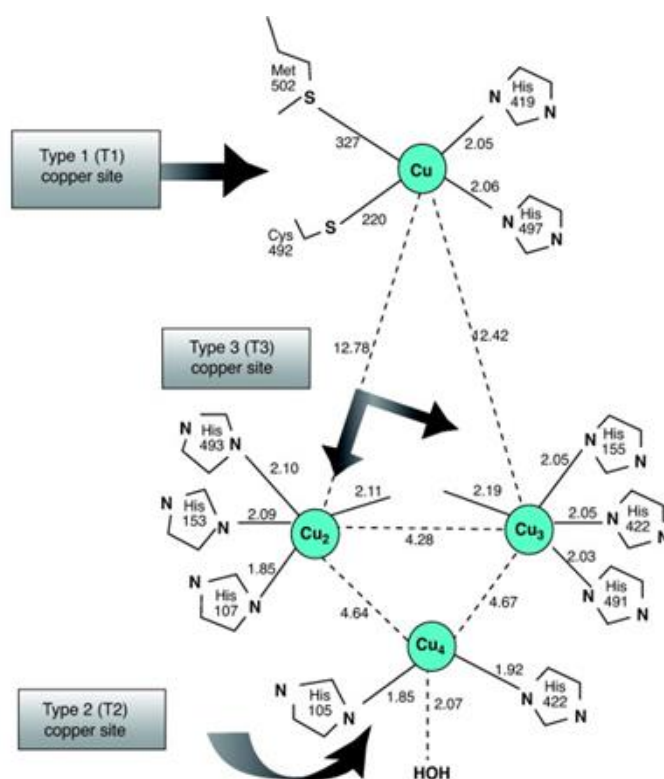


Рисунок 23. Структура лакказы [92]

Лакказа представляет собой фермент, содержащийся в различных микроорганизмах, растениях и грибах [93, 94]. В своем составе лакказа имеет атомы меди трех типов. Медный центр типа 1 отвечает за интенсивную голубую окраску фермента и характеризуется полосой поглощения около 600 нм в электронных спектрах поглощения, а также определяется в спектрах ЭПР [95]. Наличие в лакказе медного центра типа 2 подтверждено характерным спектром ЭПР, при этом данный моноядерный центр не детектируется в УФ и видимой областях. Биядерный диамагнитный медный центр типа 3 содержит 2 атома меди, которые ЭПР-неактивны, однако проявляются в спектрах поглощения в области около 330 нм в виде

сильно размытого плеча на полосе поглощения [95, 96]. Медные центры типов 2 и 3 образуют трехъядерный кластер, в котором медь типа 2 координирована двумя гистидиновыми остатками и одной молекулой воды, при этом на основе ЭПР спектров предполагается, что геометрия данного фрагмента каталитического сайта является тетрагональной или имеет слегка искаженную тетраэдрическую форму. Ионы меди типа 3 окружены шестью гистидиновыми остатками, при этом между собой ионы меди типа 2 и типа 3 не связаны [92, 96, 97].

Основная функция лакказы заключается в катализе реакций окисления органических субстратов, таких как фенолы (Рис. 24) [98]:

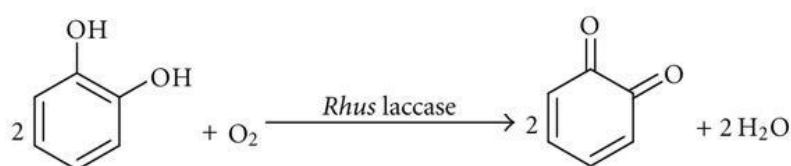


Рисунок 24. Реакция окисления, катализируемая лакказой [99]

Аскорбатоксидаза является широко распространенным ферментом и была найдена во многих высших растениях, как в растворимой фракции клетки, так и в связанном с клеточными стенками состоянии. [100]. Присутствие в аскорбатоксидазе ионов меди типа 1 и типа 2 определяется по данным ЭПР спектроскопии. Ионы меди типа 3 не дают вклада в спектры ЭПР [101].

Аскорбатоксидаза специфична по отношению к аскорбиновой кислоте и ее близким аналогам [102]. Реакция окисления L-аскорбиновой кислоты аскорбатоксидазой до дегидро-L-аскорбиновой кислоты представлена на Рис. 25:

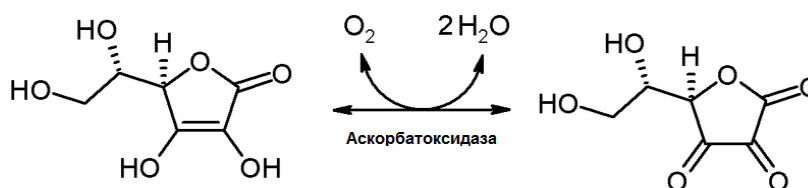


Рисунок 25. Реакция окисления L-аскорбиновой кислоты аскорбатоксидазой

Основной функцией фермента церулоплазмينا, присутствующего как в организме человека, так и многих млекопитающих, является транспорт ионов меди в организме. Отсутствие церулоплазмينا приводит к развитию гепатоцеребральной дистрофии, при которой происходит отравление организма свободными ионами меди [103]. Кроме того, церулоплазмин обладает каталитической активностью, окисляя аскорбиновую кислоту,

адреналин, диоксифенилаланин [103], а также ионы Fe^{2+} до Fe^{3+} , после чего окисленные ионы железа связываются с белком трансферрином (Рис. 26) [104].

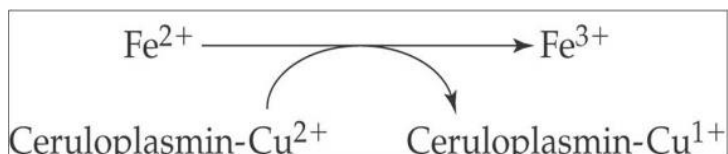


Рисунок 26. Реакция окисления ионов Fe^{2+} до Fe^{3+} церулоплазмином

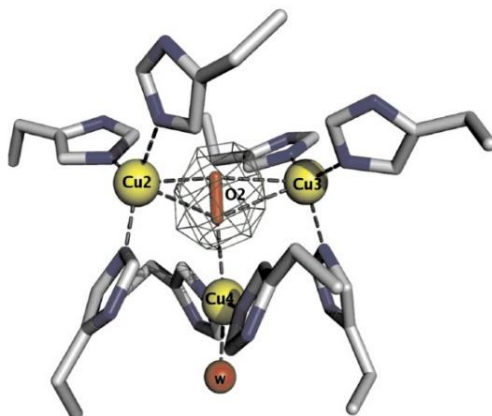


Рисунок 27. Структура трехъядерного кластера церулоплазмينا

Структура церулоплазмينا напоминает структуру лакказы (Рис. 27). Ионы меди в церулоплазмине представлены тремя типами. Ион меди типа 1 координирован двумя атомами азота гистидина, SH-группой цистеина и остатком метионина. Ион меди типа 2 дает типичный ЭПР-спектр двухвалентной меди и не вносит вклада в оптические спектры. Два антиферромагнитных иона меди третьего типа образуют биядерный медный комплекс с максимумом поглощения 330 нм, неактивный в ЭПР спектрах [105]. Как и в лакказе, ион меди типа 2 и два иона меди типа 3 образуют трехъядерный кластер [106].

2.4.1. ПРИМЕРЫ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МОДЕЛЕЙ ФЕРМЕНТОВ ТИПА 4

Актуальной на настоящий момент задачей является разработка синтетических аналогов лакказы, аскорбатоксидазы и церулоплазмينا. В работе [107] представлен синтез и стереохимические исследования биядерного и трехъядерного комплексов, представляющих собой модели таких кластеров.

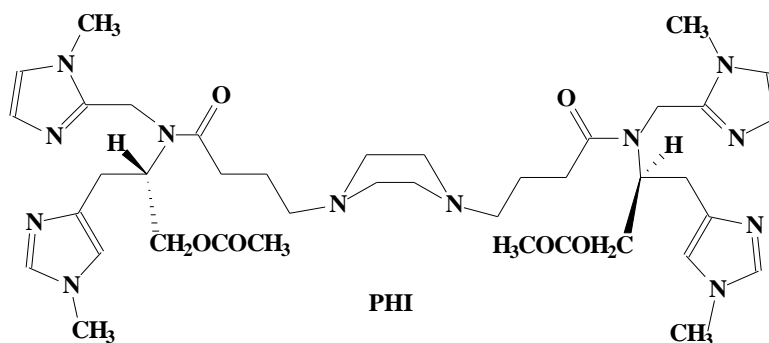


Рисунок 28. Хиральный лиганд **PHI**, использованный в работе [107] для получения моделей трехъядерных кластеров

В состав комплексов входит хиральный лиганд **PHI** (Рис. 28) с двумя фрагментами аминокислоты. Схема синтеза хирального лиганда **PHI** представлена на рис. 29. В результате реакции дикислоты **II** с метиловым эфиром *N*-метилгистидина **I** был получен диамид **III**. Восстановление карбонильных групп диамида **III** $\text{BH}_3 \cdot \text{Me}_2\text{S}$ привело к получению соединения **IV**, которое далее было введено в реакцию с 1-метил-1*H*-имидазол-2-карбальдегидом и $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ с образованием продукта **V**. Последующее ацилирование в присутствии DMAP привело к образованию лиганда **PHI**. Дальнейшие реакции лиганда **PHI** с соответствующими количествами гексагидрата перхлората меди привели к образованию биядерного комплекса состава $\text{Cu}_2\text{PHI}(\text{ClO}_4)_4$ и трехъядерного $\text{Cu}_3\text{PHI}(\text{ClO}_4)_6$.

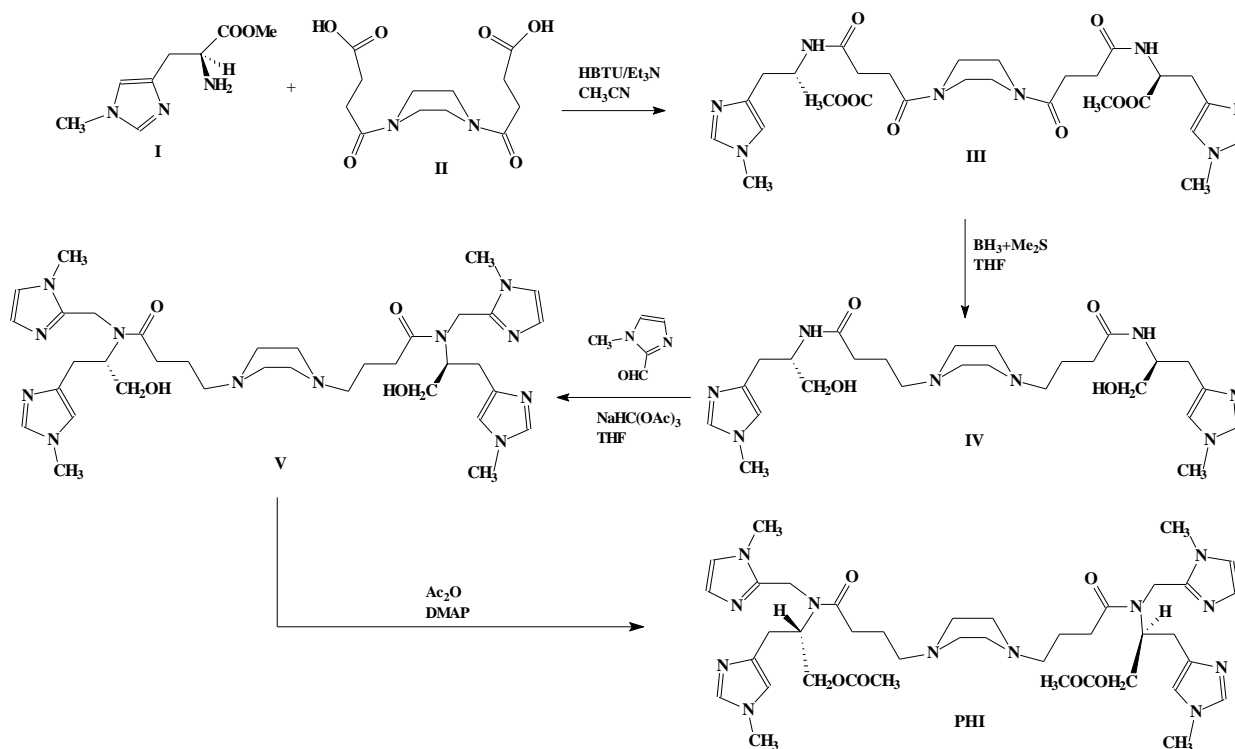


Рисунок 29. Схема синтеза хирального лиганда **PHI**

Моделирование данного кластера предъявляет к структуре лиганда следующие требования:

- полидентатный лиганд должен иметь в составе 8 донорных атомов азота (например, атомов азота имидазольного цикла);
- лиганд должен обладать достаточной гибкостью для обеспечения возможных геометрических перегруппировок;
- экзогенный лиганд должен обладать способностью связываться с металлическими центрами [107].

Авторами работы [108] доказано, что стереохимия молекулы также является одним из важных условий для создания эффективных моделей трехъядерного кластера.

На примере моноядерного фрагмента одного из полученных авторами [108] комплексов показано, что для лиганда *N*-[2-гидрокси-1(*R*)-метил-2(*R*)-фенилэтил]-*N*-метилглицина, составляющего основу моноядерного фрагмента, более энергетически выгодной является форма *трео*-изомера (Рис. 30), где фенил и С-Ме расположены в *транс* положениях. Кроме того, оказалось невозможно выделить *эритро*-форму данного соединения. Таким образом, сделан вывод о том, что изменение конфигурации лиганда с *трео* на *эритро* не позволяет синтезировать модели трехъядерных кластеров.

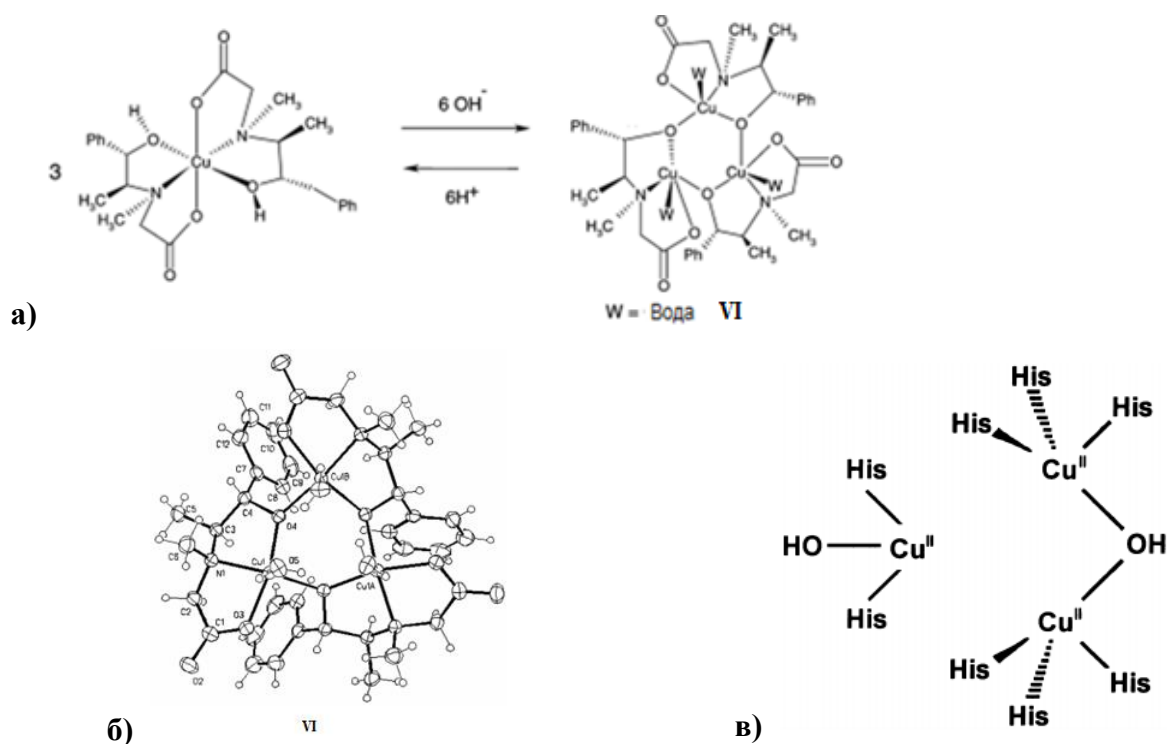


Рисунок 30. а) Обратимое образование комплекса VI при добавлении NaOH; б) кристаллическая структура комплекса VI; в) схематическое изображение моноядерного фрагмента модельного соединения трехъядерного кластера VI голубых оксидаз [108]

Одним из наиболее ранних примеров синтеза низкомолекулярных моделей многоядерных голубых оксидаз стало соединение, полученное в работе [109]. Путем проведения реакции переметаллирования макроциклического комплекса, содержащего два атома серебра(I) (Рис. 31), получен трехъядерный макроциклический комплекс состава $[\text{Cu}_3\text{L}_4(\text{OH})][\text{ClO}_4]_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$:

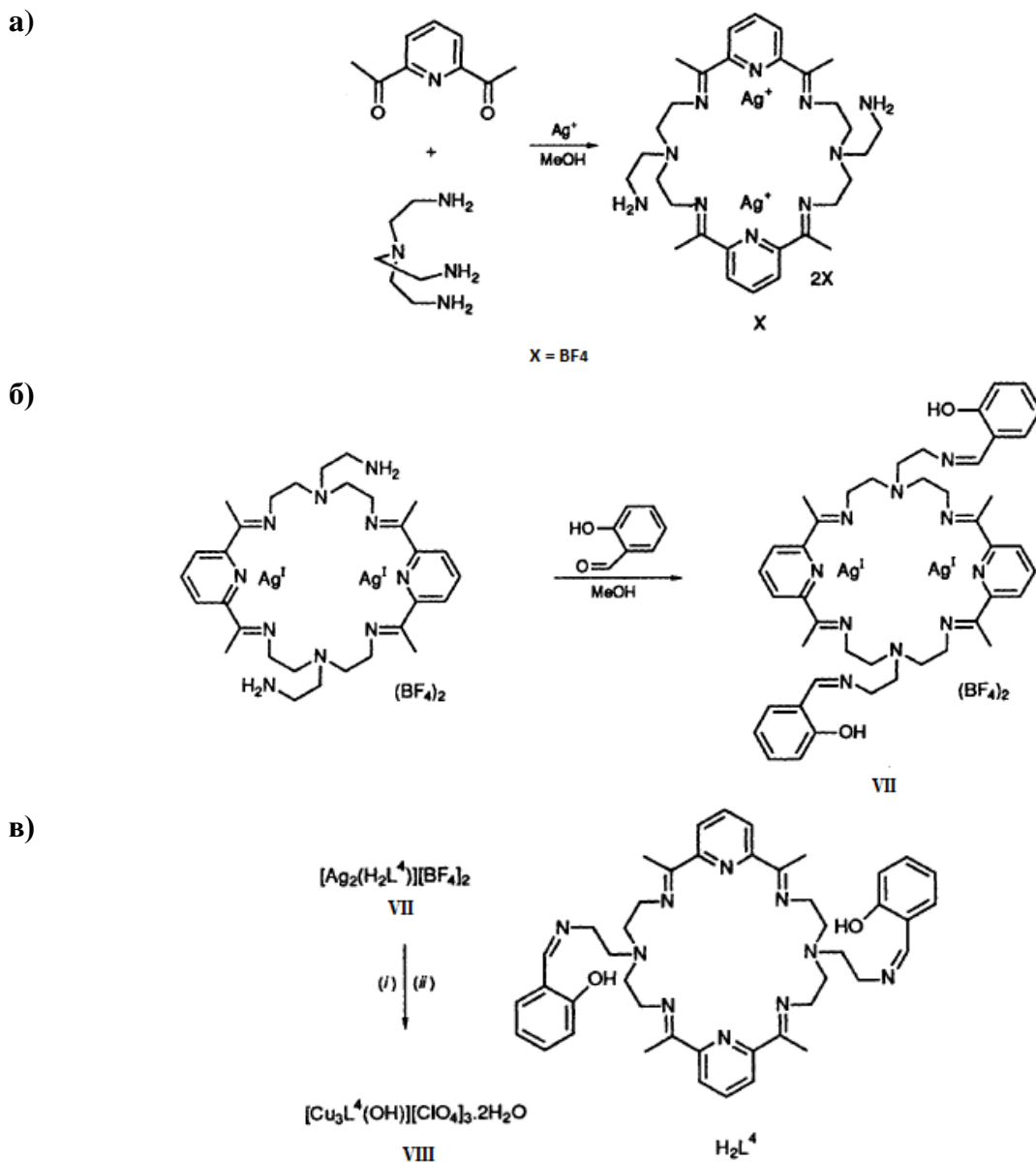


Рисунок 31. а) Синтез макроциклического комплекса серебра; б) Функционализация макроциклического комплекса серебра; в) Переметаллирование макроциклического комплекса: получение трехъядерного комплекса меди(II). (i): $\text{Cu}(\text{MeCO}_2)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $2\text{Cu}(\text{BF}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MeOH}-\text{MeCN}$. (ii): NaClO_4 , EtOH

Рентгеноструктурный анализ полученного комплекса показал, что трехъядерный металлический кластер располагается внутри макроциклического лиганда. Кластер состоит из μ -гидрокси-связанной пары $\text{Cu}(1)$ и $\text{Cu}(2)$ и несвязанного атома меди $\text{Cu}(3)$. Геометрия атомов меди комплекса может быть охарактеризована как искаженная квадратно-пирамидальная.

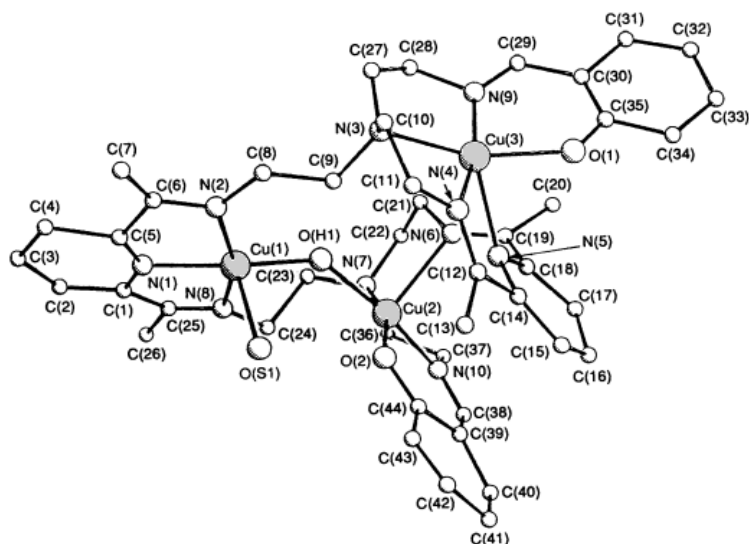


Рисунок 32. Молекулярная структура $[\text{Cu}_3\text{L}^4(\text{OH})]^{3+}$ в комплексе **VIII**

Структура полученного трехъядерного комплекса (Рис. 32) аналогична по структуре трехъядерному кластеру аскорбатоксидазы, что продемонстрировано на рис. 33 при сравнении длин связей (Å) между атомами меди:

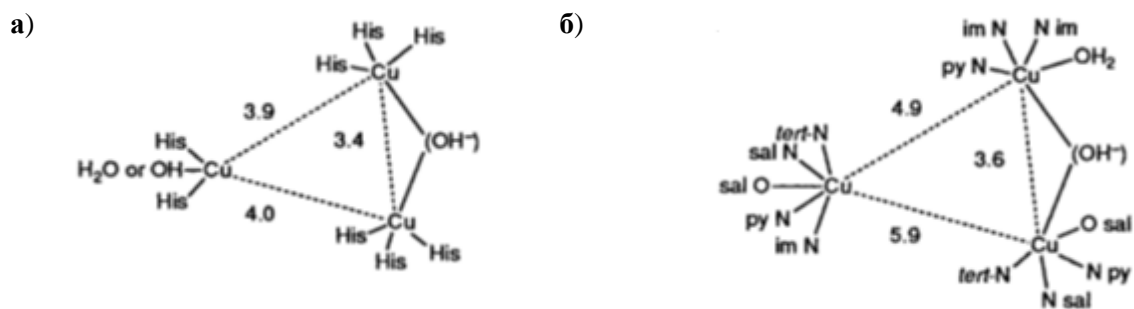


Рисунок 33. а) Структура трехъядерного центра аскорбатоксидазы; б) структура трехъядерного центра координационного соединения **VIII**. His – остаток гистидина, im N – азот имида, py N – азот пиридинового фрагмента, sal N – азот салицилового фрагмента, sal O – кислород салицилового фрагмента, tert-N – азот третичного амина.

Немаловажным аспектом при создании аналогов трехъядерных кластеров является по возможности точное воспроизведение магнитного момента, близкого по значению к магнитному моменту в ферментах [110, 111]. В цитируемых работах получены трехъядерные комплексы меди(II) путем ковалентного соединения мономерного фрагмента миметика с координацией меди типа 2 и биядерного фрагмента с координацией меди типа 3 (Рис. 34). Биядерный фрагмент комплекса **IX** демонстрирует умеренные антиферромагнитные свойства, что соответствует магнитному моменту медного ядра типа 3 в ферментах [110].

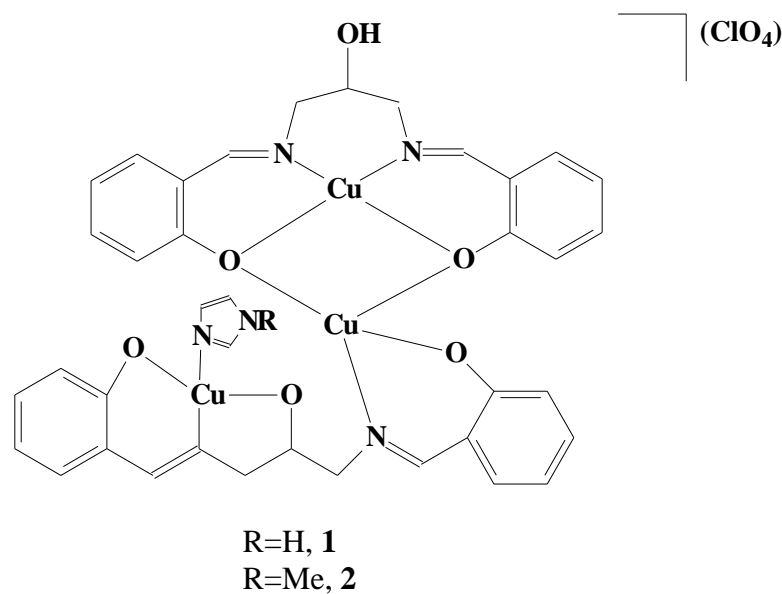


Рисунок 34. Структура биядерного комплекса **IX** [110]

Комплекс **X**, представленный в работе [111], является моделью активного сайта аскорбатоксидазы и также обладает магнитными свойствами данной структуры (Рис. 35).

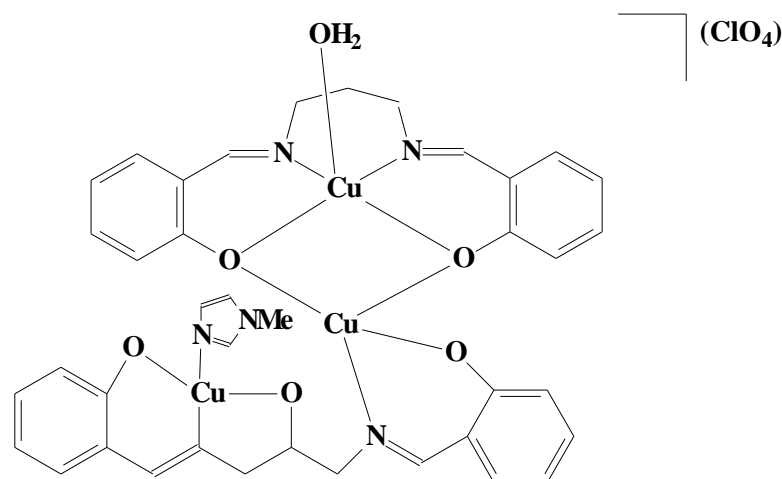


Рисунок 35. Структура биядерного комплекса **X** [111]

2.5. МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ ТИПА Cu_A

Этот тип активного центра также называют центром со смешанной валентностью, так как он содержит два атома меди, каждый из которых в окисленном состоянии имеет формальный заряд +1.5. Геометрия каждого атома меди – искаженный тетраэдр. Один из атомов меди в аксиальном положении вместо серы взаимодействует с карбонильным атомом кислорода глутамина (Рис. 36) [112].

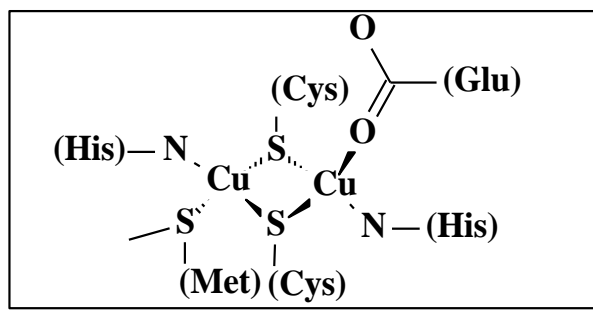


Рисунок 36. Активный центр цитохром-с-оксидазы Cu_A -типа

Электронные спектры в УФ и видимой области Cu_A -ферментов характеризуются тремя полосами поглощения при 480, 530 и 800 нм. Мостиковые атомы серы цистеина играют важную роль для стабилизации структуры ферментов и во многом определяют их свойства: окислительно-восстановительные, спектральные и каталитические [112, 113]. Изучение ЭПР спектров цитохром-с-оксидазы и нитритредуктазы показало, что Cu_A центр по свойствам близок к биядерному медному центру в нитритредуктазе и при этом имеет окислительное состояние $[\text{Cu} (1,5) \dots (\text{Cu} (1,5))]$ [114].

Cu_A -тип характерен для фермента цитохром-с-оксидазы. Это важный элемент клеточного дыхания (транспорта кислорода через клеточную мембрану). Активный центр данного фермента содержит атомы меди двух типов: 1) Cu_A -центр отвечает за перенос электронов, 2) Cu_B -центр отвечает за связывание кислорода и превращение его в воду (Рис. 37 Рисунок 37) [115, 116].

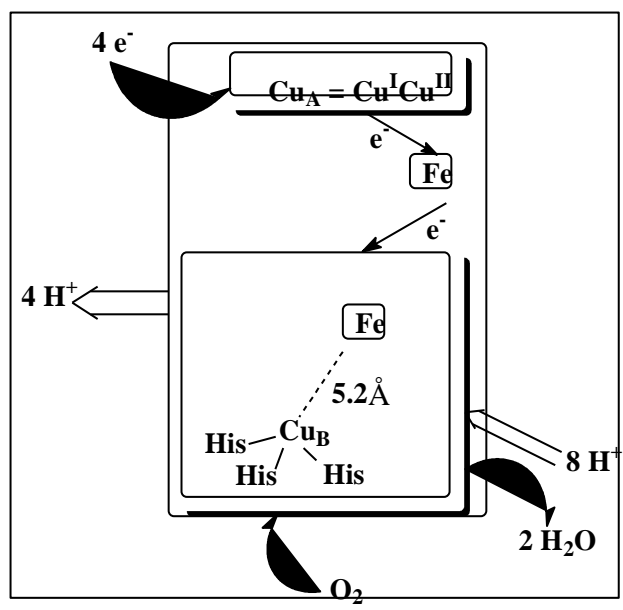


Рисунок 37. Схематическое изображение активного центра цитохром-с-оксидазы

Суммарное уравнение процесса выглядит следующим образом: $\text{O}_2 + 4\text{e}^- + 4\text{H}^+ \rightarrow 2\text{H}_2\text{O}$ [116].

Металлический центр фермента представляет собой комбинацию атома железа, характерного для миоглобина, с *трис*-гистидиновым атомом меди [117]. Процесс восстановления молекулы кислорода до молекулы воды и быстрого электронного переноса от цитохрома С в активный сайт гема *a3*/*Cu_B* представлен на Рис. 38:

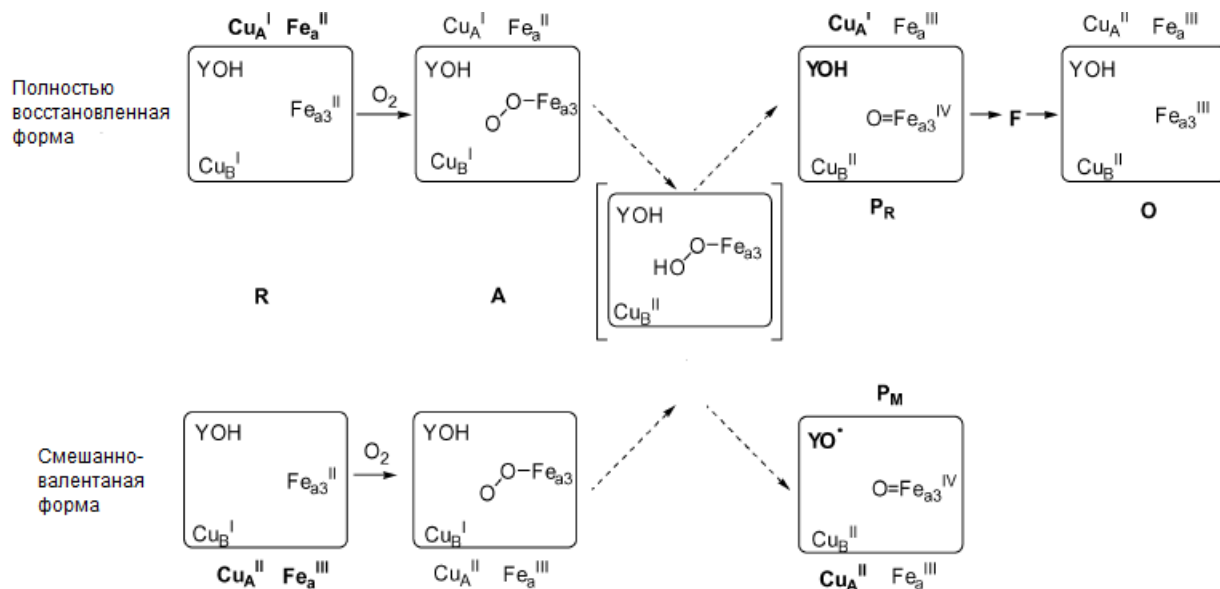


Рисунок 38. Механизм восстановления кислорода полностью восстановленной и смешанно-валентной формами цитохром-с-оксидазы. YOH – остаток тирозина [117]

2.6. МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ ТИПА Cu_B

Функцией Cu_B - (или Cu_M -) центра, например, в дофамин- β -гидроксилазе [118] является связывание с субстратом и гидроксирование, а в пептидоглицин- α -амидирующей монооксигеназе (ПАМ) данный центр отвечает за перенос электронов [119]. Наиболее хорошо изучен данный тип медных центров в ферменте цитохром-с-оксидаза, основной биологической ролью которого является 4-электронное восстановление кислорода до воды. Для данного типа ферментов характерно тригонально-пирамидальное лигандное окружение металла. Атом меди связан с тремя атомами азота гистидина и атомом углерода тирозина.

Дофамин β -гидроксилаза является катализатором гидроксирования дофамина в нейромедиатор норадреналин (Рис. 39) [118].

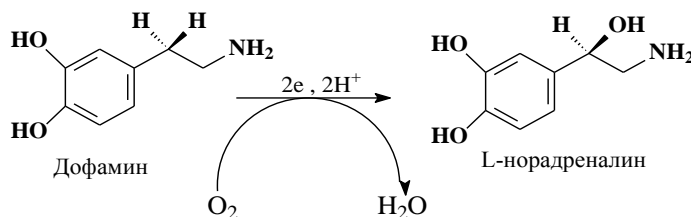


Рисунок 39. Реакция гидроксирования дофамина

Данный фермент содержит два типа активных центров — Cu_A и Cu_B . Два атома металла в этих центрах расположены на расстоянии примерно 11\AA [120], что также подтверждено отсутствием спин-спинового взаимодействия в спектрах ЭПР (Рис. 40). Также на основании ЭПР спектров показано, что атомы меди находятся в окисленной форме $\text{Cu}_A(\text{His})_3(\text{H}_2\text{O})$ и $\text{Cu}_B(\text{His})_2\text{X}(\text{H}_2\text{O})$, где X — остаток гистидина или лиганд-донор атома кислорода [121].

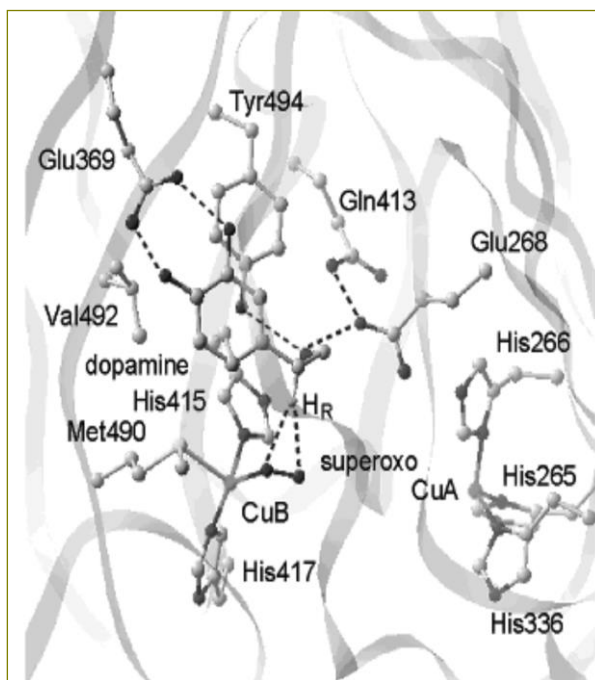


Рисунок 40. Структура активных центров Cu_A - и Cu_B -типов дофамин β -гидроксилазы

Как уже было сказано выше, главную роль в механизме гидроксирования играет Cu_B -центр, поэтому на схеме (Рис. 41) рассмотрим лишь один атом меди от Cu_A -центра [120]:

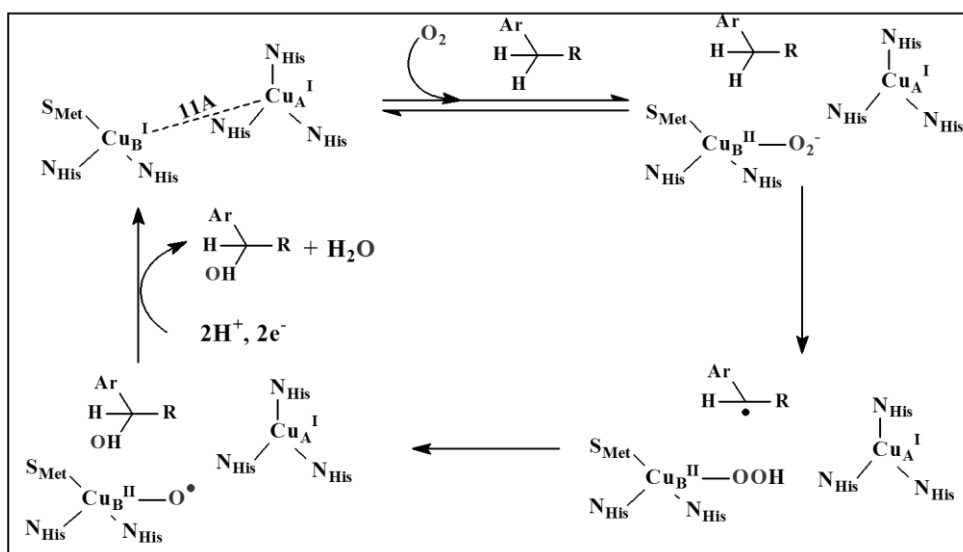


Рисунок 41. Механизм гидроксирования фенолов [120]

Пептидоглицин- α -амидирующая монооксигеназа (ПАМ) — бифункциональный фермент, способный катализировать превращение пептидов, содержащих остаток глицина на С-конце (в том числе и природных L-форм) в соответствующий пептидамирид [24]. Как и дофамин β -гидроксилаза, ПАМ содержит два типа активных центров Cu_A и Cu_B [119, 120], но в отличие от последнего Cu_A -центр отвечает за связывание с кислородом и активацию субстрата, а Cu_B -центр только за перенос электронов (Рис. 42):

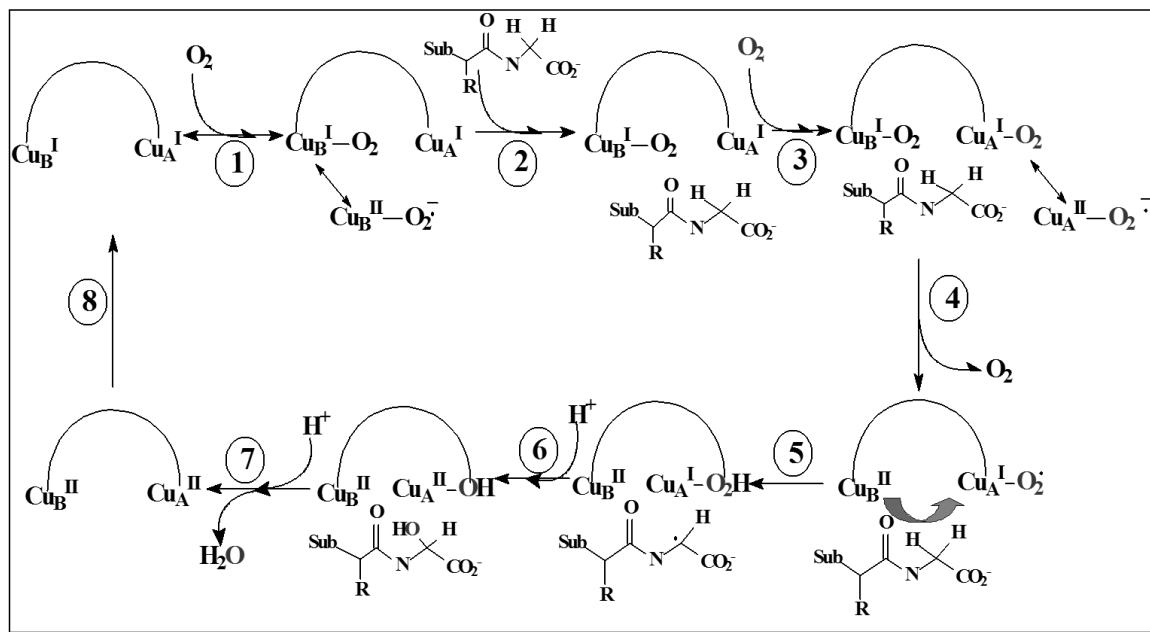


Рисунок 42. Механизм действия ПАМ на амиды [119]

Такое окислительное расщепление является основополагающим в биоактивации многих белковых гормонов и нейропептидов. Ряд химических моделей ПАМ изучен ранее [119], но точный механизм расщепления связи С–N до сих пор не ясен, несмотря на кристаллографические данные, дающие частичное объяснение указанной схемы [24].

2.7. МЕДЬСОДЕРЖАЩИЕ ФЕРМЕНТЫ ТИПА Cu_Z

Cu_Z -центр содержит четыре атома меди, соединенные μ_4 -сульфидным мостиком, и имеет конфигурацию искаженного тетраэдра. Четыре атома меди связаны с семью атомами азота, причем три из них связаны с двумя атомами азота гистидина, а четвертый атом связан только с одним атомом азота; также четвертый атом связан с атомом кислорода [122-124].

Единственным представителем данного типа является фермент N_2O -редуктаза (N_2OR). Это фермент, который отвечает за восстановление N_2O до N_2 на последней стадии круговорота азота в природе [122, 125]. Общую схему превращения можно представить следующим образом (Рис. 43):

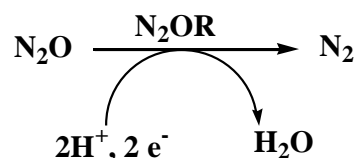


Рисунок 43. Восстановление N_2O до N_2

В данном ферменте содержится два типа активных центров: Cu_A -центр, отвечающий за перенос электронов, и каталитический Cu_Z -центр [122, 123, 125]. Структура активного центра Cu_Z -типа представлена на Рис. 44:

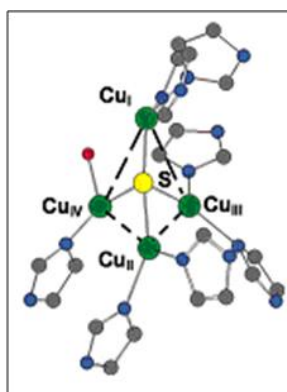


Рисунок 44. Координация ионов меди в четырёхъядерном Cu_Z -центре N_2O -редуктазы [22]

Предполагаемый механизм понижения энергетического барьера в Cu_Z -кластере для последующего разрыва связи $\text{N}-\text{O}$ представлен на Рис. 45 [126].

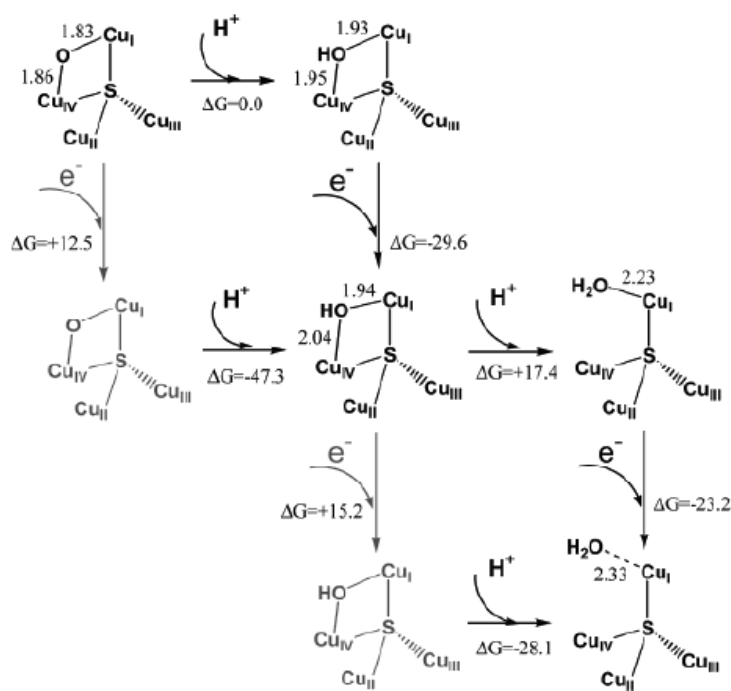


Рисунок 45. Окисленно-восстановленные формы Cu_Z -кластера, соответствующие каталитическому циклу в N_2O -редуктазе (для упрощения схемы имидазольные фрагменты удалены). Межатомные расстояния приведены в Å. Свободные энергии Гиббса (ккал/моль) рассчитаны при температуре 298 К [38].

Перенос протона совмещен со стадией разрыва связи N–O, при этом барьер активации может быть снижен до нуля. Таким образом, при низких значениях pH (4–8) скоростьюопределяющей стадией в каталитическом цикле N₂O-редуктазы является электронный перенос от восстановителя к Cu₂ кластеру, а не расщепление N–O связи.

Авторами работы [127] проведены исследования N₂O-редуктазы методом ЭПР спектроскопии, на основе которой было показано, что четырехъядерный кластер фермента представляет собой делокализованную смешанно-валентную систему.

2.7.1. ПРИМЕРЫ НИЗКОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МОДЕЛЕЙ ЦИТОХРОМ-С-ОКСИДАЗЫ И N₂O-РЕДУКТАЗЫ

2.7.1.1. Примеры моделей цитохром-с-оксидазы

В последнее время увеличилось число работ, посвященных разработке и изучению подобных соединений, однако ни один бионеорганический комплекс не воспроизводит гетероядерную структуру «гем-супероксид», характерную для цитохром-с-оксидазы [128].

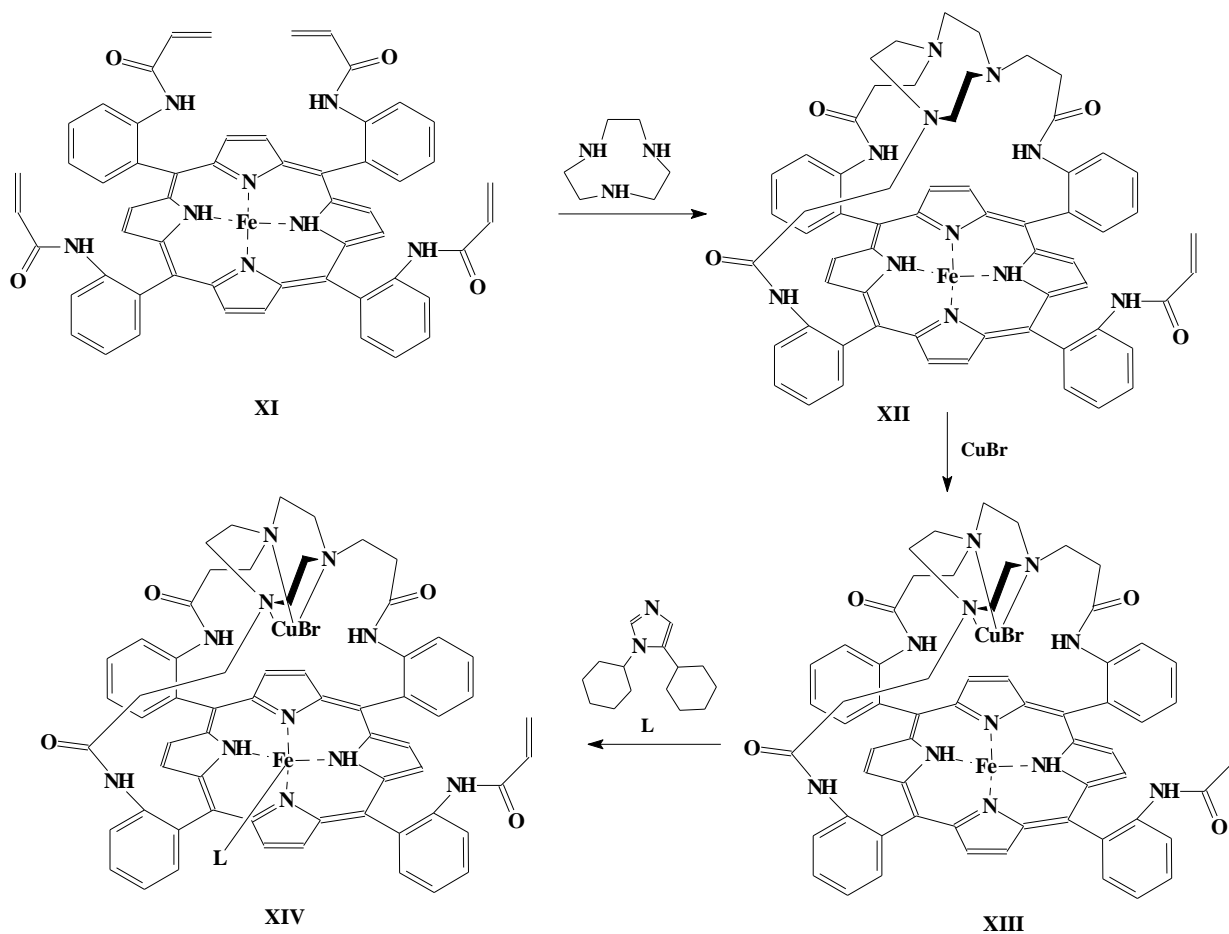


Рисунок 46. Схема получения биомиметика цитохром-с-оксидазы XIV [129]

Описанный в работе [129] назкомолекулярный аналог фермента получают серией реакций, приведенных на рис. 46. Акцептор Михаэля **XI** в реакции металлизации железом с последующим присоединением 1,4,7-триазабициклонона дает продукт **XII**, который в свою очередь вступает в реакцию с CuBr с получением модели цитохром-с-оксидазы **XIII**. Как и природный фермент, соединение **XIII** содержит в своем составе порфириновый атом железа, находящийся в непосредственной близости к атому меди (I). Добавление избытка 1,5-дициклогексилимидазола приводит к смещению атома железа в узловом центре в аксиальное положение по аналогии с ферментом, и получению соединения **XIV** [128, 129].

2.7.1.2. Примеры моделей N_2O -редуктазы

Предложены два способа классификации моделей N_2O -редуктазы:

1. По типу реакций для получения комплекса [130]:

- Реакции координационных соединений Cu(I) с элементарной серой;
- Реакции координационных соединений Cu(II) с соединениями, содержащими в своем составе серу;

2. По типу комплекса [131]:

- Биядерные комплексы;
- Трехъядерные комплексы;
- Многоядерные комплексы.

Помимо указанных вариантов классификации получаемые координационные соединения могут быть также разделены на Cu_2 -модельные кластеры, а также на смешанно-валентные комплексы – модели Cu_A -сайта.

В работе [132] представлены синтез и физико-химические исследования смешанно-валентного биядерного координационного соединения меди как биомиметика активного сайта N_2O -редуктазы – производного 2-тиоксо-3-фенил-5-(пиридин-2-илметил)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она (соединение **XV** на Рис. 47).

Было показано, что в полученном комплексе расстояние между атомами меди составляет 2,562 Å, что близко по значению к расстоянию $\text{Cu}_I\text{-Cu}_{IV}$ в активном центре N_2O -редуктазы. Одинаковая геометрия атомов меди в комплексе позволяет предположить, что комплекс существует в делокализованной смешанно-валентной форме, аналогичной по структуре Cu_A -сайту. Трехъядерные кластеры - модели Cu_2 центра были описаны в исследованиях [131, 133].

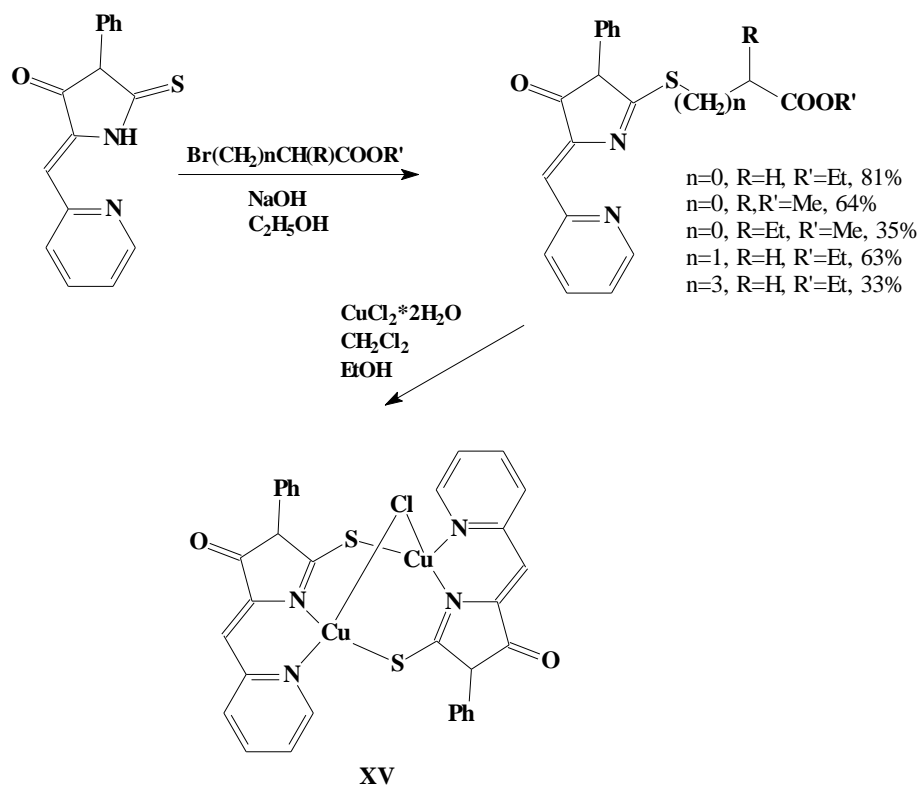


Рисунок 47. Схема синтеза биомиметика **XV** на основе производного 2-тиоксо-3-фенил-5-(пиридин-2-илметил)-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она [132]

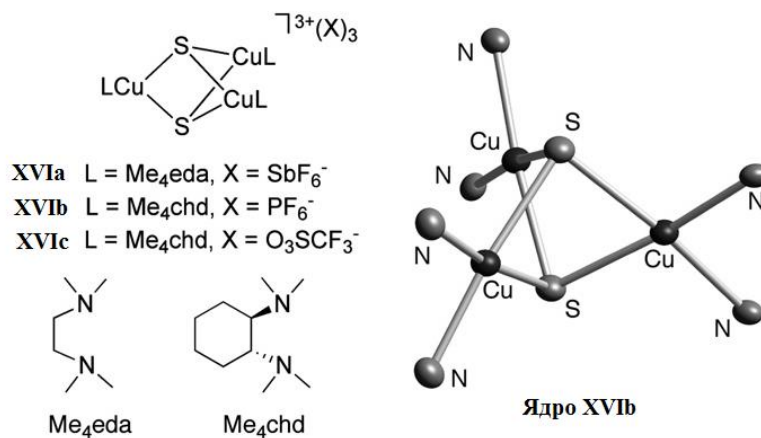


Рисунок 48. Трехъядерные модели **XVIa-XVIc** Cu₂ активного сайта; Me₄eda - N,N,N',N'-тетраметил-1,2-диаминоэтан, Me₄chd - N,N,N',N'-тетраметил-*транс*-1*R*,2*R*-диаминоциклогексан. [133]

На основании данных рентгеноструктурного анализа для комплексов **XVIa-XVIc** (Рис. 48) было показано, что ядро комплекса, являющееся катионом с зарядом 3⁺, находится в формально окисленном состоянии [Cu^{III}Cu^{II}₂(μ-S₂²⁻)]³⁺. При этом расстояния металл-лиганд в каждом из представленных комплексов практически идентичны.

В работе [134] описаны новые многоядерные структурно-подобные аналоги координационного центра Cu₂ – комплексы **XVII** и **XVIII** [(μ₂-dppm)₄Cu₄(μ₄-S)]²⁺ [dppm = бис-(дифенилфосфино)метан] (Рис. 49, а). Интересно отметить, что ядро комплекса [Cu₄(μ₄-S)]

XVII относительно симметрично (соседние расстояния между атомами Cu-Cu составляют около 2.869(1)–3.129(1) Å), при этом комплекс **XVIII** является ассиметричным: в то время как 3 медных центра находятся на близком расстоянии друг к другу ([Cu(1)···Cu(2), 2.6571(7) Å; Cu(2)···Cu(3), 2.7184(4) Å], четвертый медный центр значительно смещен относительно других центров [Cu(4)···Cu(1), 3.1005(5) Å; Cu(4)···Cu(3), 3.5365(6) Å] (Рис. 49, б). Циклические вольтамперограммы обоих комплексов демонстрируют обратимость окислительного процесса, что доказывает функциональное подобие данных комплексов Cu₂ центру.

В работе [131] приведена систематизация низкомолекулярных структур, которые могут проявлять активность N₂O-редуктазы и выступать как потенциальные восстановители N₂O до N₂. Было показано, что свойства данных кластеров значительно зависят от лиганда, соли меди, а также от условий реакции [135-137].

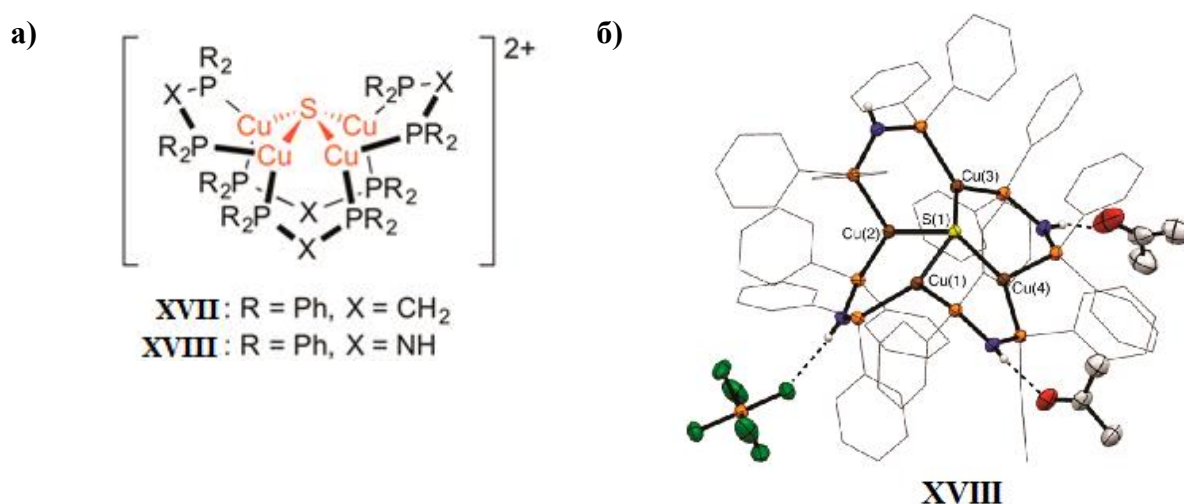


Рисунок 49. а) Синтетические модели **XVII** и **XVIII** N₂O-редуктазы; б) Молекулярная структура комплекса **XVIII** [134]

Таким образом, анализ литературных данных показал, что разработка и изучение моделей активных сайтов медьсодержащих ферментов – низкомолекулярных биомиметиков – представляет собой перспективное направление. Отметим, однако, что имеющиеся в литературе сведения о низкомолекулярных моделях Cu₂-сайта - аналогах активного центра фермента N₂O-редуктаза, значительно уступает по объему данным, характеризующим структурно подобные аналоги других сайтов медьсодержащих ферментов. Представляется необходимым поиск новых структурных моделей Cu₂-сайта и изучение их свойств как биомиметиков.

3. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В обзоре литературы показано, что медьсодержащие координационные соединения N- и S-содержащих лигандов могут рассматриваться как низкомолекулярные модели медьсодержащих ферментов. Как результат, данные соединения способны катализировать как различные синтетические окислительно-восстановительные процессы, так и реакции в организме, связываться с биологическими молекулами или осуществлять расщепление ДНК, благодаря чему происходит блокировка роста опухолей. Поэтому целесообразной представляется разработка медьсодержащих лекарственных препаратов, потенциально имеющих значительно более низкую общую токсичность по сравнению с аналогичными препаратами на основе других комплексов металлов.

Показано, что медьсодержащие координационные соединения могут непосредственно связывать теломеры (концевые участки хромосом) [138]. Теломера на своем конце содержит последовательность, называемую G4-квадруплексом – образование, состоящее из 4 фрагментов азотистых оснований, соединенных вместе за счет водородных связей и π - π взаимодействий. Взаимодействие различных препаратов с G4-квадруплексом привлекает значительное внимание [139-141], поскольку в большинстве дифференцированных клеток теломераза заблокирована, однако она активна в стволовых, половых и опухолевых клетках, и для того, чтобы прекратить развитие опухолевых клеток, можно использовать ингибитор теломеразы.

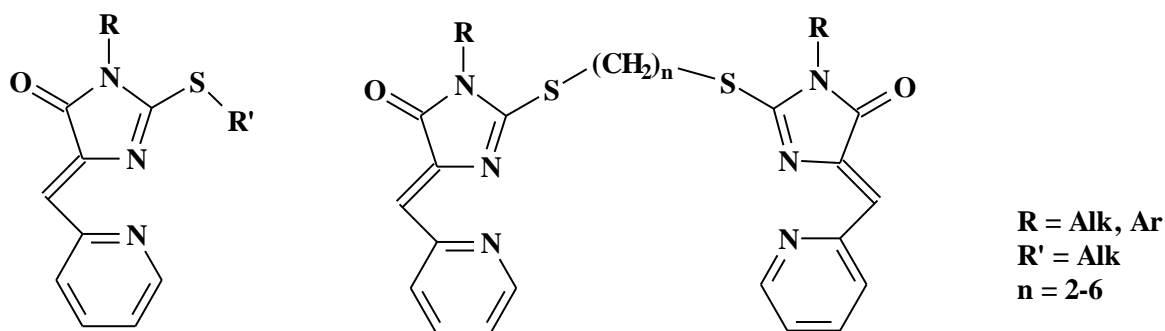
В работах [9, 142] в качестве перспективных противораковых агентов исследованы комплексы меди на основе тетрадентатного лиганда 2-[(2-(2-гидроксиэтиламино)-этилимино)метил]фенола (tdp) и L-тирозина (L-tyr) и различных дииминов. Показано, что комплексы tdp и L-tyr с дииминовыми лигандами, содержащими метильные группы в различных положениях 1,10-фенантролина, связываются с ДНК благодаря гидрофобному взаимодействию с поверхностью молекулы ДНК. Значения IC_{50} для ряда комплексов L-tyr близки к IC_{50} для цисплатина в экспериментах на аналогичной серии опухолевых клеток.

При изучении противораковой активности координационных соединений оснований Шиффа установлено, что обычно наиболее высокую противоопухолевую активность проявляют комплексные соединения меди(II) [143]. Помимо оснований Шиффа хорошую противораковую активность демонстрируют также различные комплексные соединения меди(II) с производными бензимидазола, терпиридина, триазола [144-146]. Примерами исследования комплексов с триазольными и бензимидазольными лигандами могут служить работы [145, 147]. Так, в работе [147] описан макроциклический комплекс меди(II) с 2,2,2',2'-S,S[бис(бис-N,N-2-тиобензимидазолксалато-1,2-этаном)].

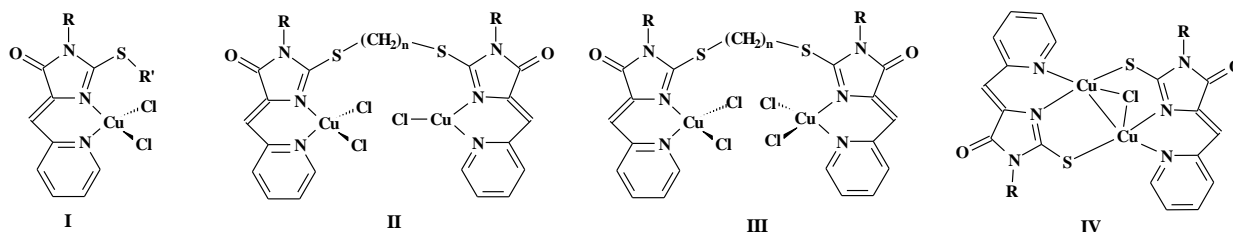
Механизм действия координационных соединений меди на опухолевые клетки не является единым для всех комплексов. Однако известно, что во многих случаях расщепление ДНК под действием комплексных соединений происходит при введении восстановителя. В очень редких случаях активация процесса расщепления координационным соединением происходит в отсутствие дополнительных реагентов.

Настоящее исследование посвящено разработке методов получения медьсодержащих комплексных соединений с новыми лигандами ряда 2-тио-имидазол-4-онов с целью поиска эффективных катализаторов окислительно-восстановительных реакций и цитотоксических агентов, а также оценке устойчивости координационных соединений в растворе.

Предпосылками к этой работе, определившими выбор ее объектов, послужили результаты исследований, проводимых ранее в нашей научной группе и направленных на изучение возможностей синтеза 5-пиридилметилена-моно- и бис-имидазол-4-онов, показанных ниже структурных типов



и их медьсодержащих координационных соединения типов **I-IV**:



некоторые из которых показали каталитическую активность в реакциях окисления, а также высокую цитотоксичность по отношению к раковым клеткам. Однако к началу наших исследований не проводились исследования устойчивости получаемых координационных соединений, оставалась нерешенной проблема низкой растворимости лигандов и комплексов в водных средах, и не были известны бис-5-пиридилметилена-имидазолоновые лиганды, в которых имидазольные циклы соединялись бы линкерами не через атомы серы.

В рамках данной работы синтезированы новые органические лиганды с гидрофильными и гидрофобными заместителями при атомах азота или серы, в том числе лиганды, в которых два хелатирующих 5-(2-пиридилметилена)-2-аклилтио-имидазолоновых

фрагмента соединены линкерными фрагментами через атомы N(3), и их медьсодержащие координационные соединения.

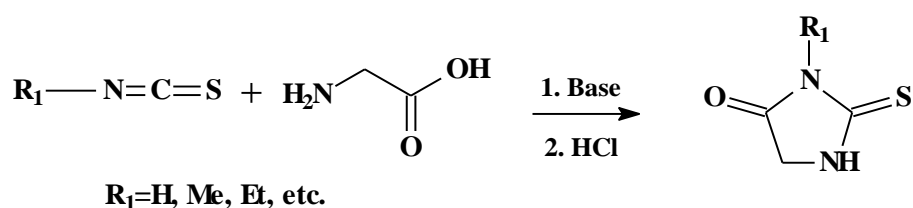
В настоящее время интенсивно исследуются способы направленной доставки физиологически активных соединений в целевые клетки. Одним из возможных способов такой доставки является использование наночастиц (НЧ) в качестве вектора, на который иммобилизовано координационное соединение [148]. Система «НЧ-комплекс» может селективно проникать в опухолевую клетку, не затрагивая при этом здоровую. Было показано, что НЧ золота наиболее перспективны для использования в биосистемах, так как являются малотоксичными и биосовместимыми [149, 150]. Мы предположили, что введение в молекулу 2-тиогидантоина дисульфидной группы позволит впоследствии иммобилизовать его комплекс на золотой поверхности. В качестве модельной системы для изучения возможности такой иммобилизации в рамках диссертационной работы использованы золотые пластины, которые модифицировали 2-тиоимидазолоновым лигандом, содержащим дисульфидную группировку, с получением самоорганизующегося монослоя (СОМ). При дальнейшей обработке СОМ солью меди(II) получен Cu-содержащий комплекс на поверхности золота [151, 152].

3.1. СИНТЕЗ ОРГАНИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ – ПРОИЗВОДНЫХ 2-ТИОГИДАНТОИНОВ

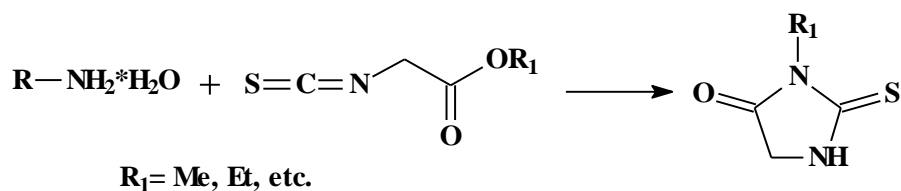
3.1.1. СИНТЕЗ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ТИОГИДАНТОИНА, НЕЗАМЕЩЕННЫХ В 5-М ПОЛОЖЕНИИ

Для получения 5-незамещенных 2-тиогидантоинов в работе использованы два различных препаративно удобных подхода.

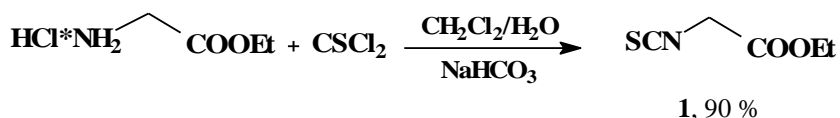
Первый подход представляет собой реакцию арил- или алкилизотиоцианата и аминокислоты. В присутствии основания в реакции образуется замещенная тиомочевина, которая при дальнейшей обработке раствором соляной кислоты образует замещенный 2-тиогидантоин [153]:



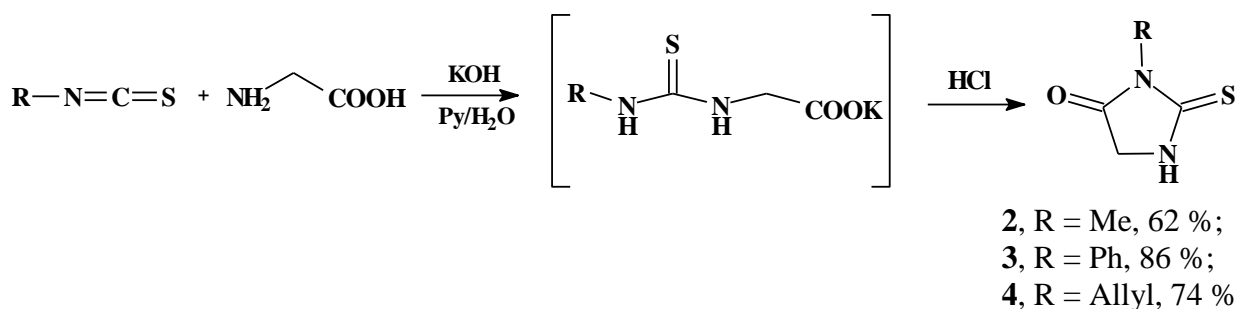
Второй подход представляет собой взаимодействие изотиоцианата, получаемого из аминокислоты, с амином. Этот метод является наиболее простым и препаративно значимым, так как позволяет выбирать широкий круг аминов для получения разнообразных производных 2-тиогидантоинов:



В качестве исходного соединения для синтеза по этому методу получен изотиоцианатоэтилацетат **1** по реакции гидрохлорида этилового эфира глицина с тиофосгеном:

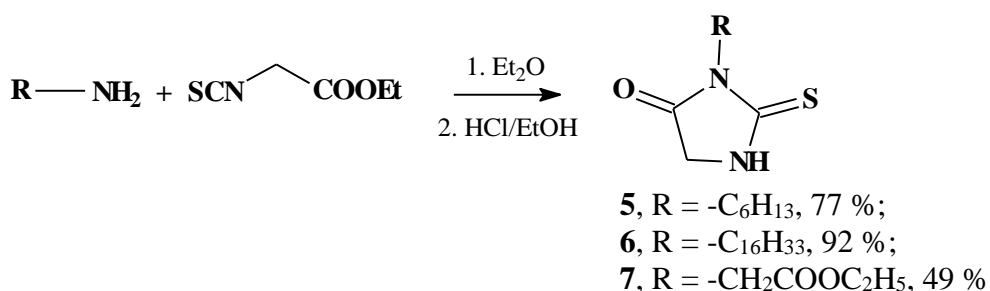


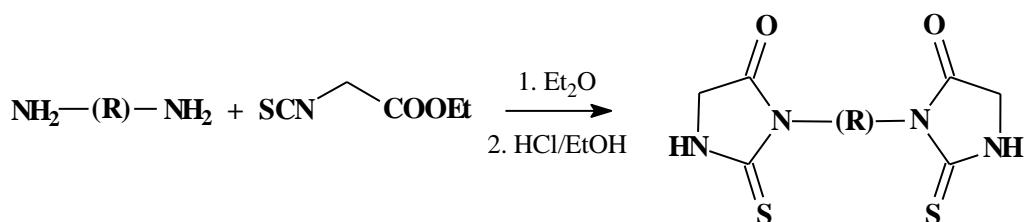
Реакция алкил- или арилизотиоцианата с глицином в смеси пиридин-вода в присутствии гидроксида натрия приводила к образованию замещенной тиомочевины, которую затем без выделения циклизовали в целевые продукты **2-4** действием концентрированной соляной кислоты:



Для получения ранее не описанных моно- и бис-2-тиогидантоинов, содержащих гидрофобные и гидрофильные при атоме N(3) тиогидантоинового цикла, был выбран и оптимизирован метод 2. Целевые соединения **5-16** были синтезированы при взаимодействии исходного изотиоцианатоэтилацетата и серии различных аминов в эфире с получением промежуточных тиомочевин и последующей циклизацией в конечные 2-тиогидантоины под действием концентрированной соляной кислоты в этиловом спирте.

Все полученные соединения охарактеризованы данными спектроскопии ЯМР ^1H и ИК-спектроскопии, состав подтвержден данными элементного анализа.



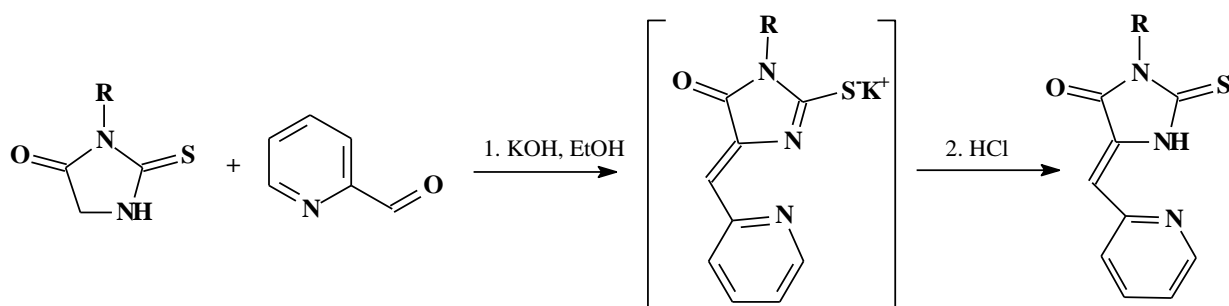


- 8**, R = $-(\text{CH}_2)_2-$, 21 %;
9, R = $-(\text{CH}_2)_3-$, 54 %;
10, R = $-(\text{CH}_2)_5-$, 28 %;
11, R = $-(\text{CH}_2)_6-$, 45 %;
12, R = $-(\text{CH}_2)_8-$, 51 %;
13, R = $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$, 25 %;
14, R = $-(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_4-$, 49 %;
15, R = $-(\text{CH}_2)_2\text{SS}(\text{CH}_2)_2-$, 24 %;
16, R = $-\text{C}_6\text{H}_4\text{SSC}_6\text{H}_4-$, 80 %.

3.1.2. СИНТЕЗ МОНО- И БИС- 5-ПИРИДИЛМЕТИЛЕНЗАМЕЩЕННЫХ 2-ТИОГИДАНТОИНОВ

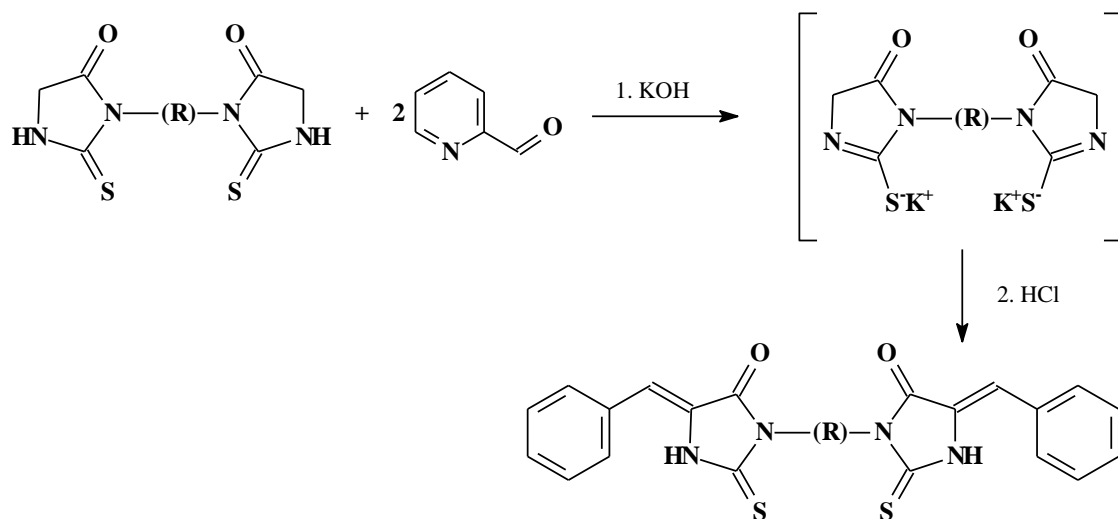
Наличие в положении С(5) имидазолонового цикла нуклеофильного атома углерода открывает возможности для введения в молекулу 2-тиогидантоина различных донорных группировок.

5-Пиридилметиленовые производные тиогидантоинов **17-22** были получены с использованием двухстадийного one-pot синтеза. На первой стадии тиогидантоин реагировал с альдегидом в присутствии гидроксида калия в абсолютном этиловом спирте с образованием калиевой соли 2-тио-5-арилиден-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она, которую затем гидролизовали разбавленной соляной кислотой. Амбидентный анион получаемой калиевой соли может вступать в реакции алкилирования по атому серы, что открывает широкие синтетические возможности для дальнейшего введения заместителей различной природы в молекулу и варьирования ее координационных свойств.



- 17**, R = Me, 85 %;
18, R = Ph, 95 %;
19, R = Allyl, 90 %
20, R = $-\text{C}_6\text{H}_{13}$, 67%;
21, R = $-\text{C}_{16}\text{H}_{33}$, 83%;
22, R = $-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$, 62 %

Для получения бис-2-тиогидантоинов **23-31**, содержащих два тиогидантоиновых фрагмента, соединенных через атомы азота в 3-м положении тиогидантоинового цикла различными мостиковыми группировками, использована аналогичная методика:



- 23**, R = $-(\text{CH}_2)_2-$, 21 %;
24, R = $-(\text{CH}_2)_3-$, 79 %;
25, R = $-(\text{CH}_2)_5-$, 96 %;
26, R = $-(\text{CH}_2)_6-$, 82 %;
27, R = $-(\text{CH}_2)_8-$, 80 %;
28, R = $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$, 83 %;
29, R = $-(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_4\text{O}(\text{CH}_2)_4-$, 33 %;
30, R = $-(\text{CH}_2)_2\text{SS}(\text{CH}_2)_2-$, 73 %;
31, R = $-\text{C}_6\text{H}_4\text{SSC}_6\text{H}_4-$, 81 %.

Все полученные 5-пиридилметилден-2-тиогидантоины могут образовываться в виде двух геометрических изомеров: *Z*- или *E*-. Однако на основании полученных ранее данных по отнесению сигналов в спектрах ЯМР ^1H протонов при экзоциклической двойной C=C связи для *E*- и *Z*-изомеров производных 2-тиогидантоинов показано, что химические сдвиги винильных протонов для *Z*-изомеров лежат в диапазоне 6.40-6.85 м.д. и *E*- изомеров – в диапазоне 6.10-6.35 м.д. Поэтому мы относим полученные соединения **17-31** к *Z*-изомерам (см. таблицу 2):

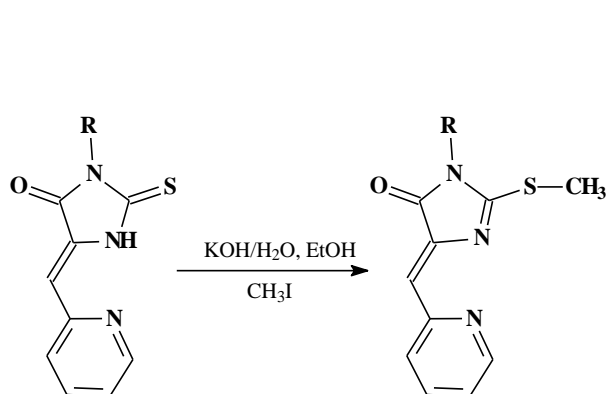
Таблица 2. Химические сдвиги протонов при двойной связи в спектрах ЯМР ^1H соединений **17-31** (растворитель – ДМСО- d_6):

№	δ , м.д.	№	δ , м.д.	№	δ , м.д.
17	6,72	22	6,85	27	6,74
18	6,81	23	6,85	28	6,73
19	6,75	24	6,72	29	6,73
20	6,75	25	6,74	30	6,75
21	6,75	26	6,74	31	6,81

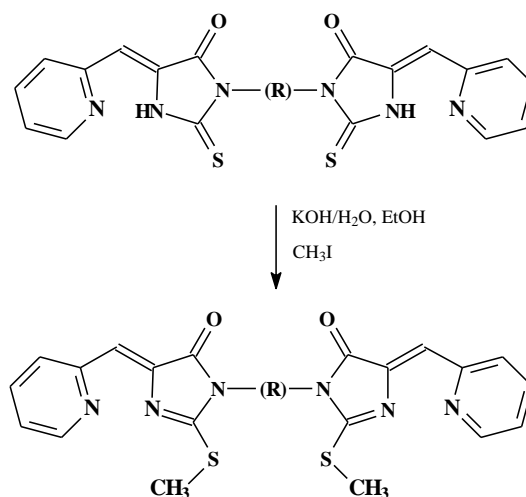
3.1.3. АЛКИЛИРОВАНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ 2-ТИОГИДАНТОИНОВ

3.1.3.1. Алкилирование моно- и бис- производных 2-тиогидантоинов метилиодидом

Замещенные в 3-м положении 2-тиогидантоины **19**, **21**, **22**, **24-28**, **31** вводились в реакции алкилирования метилиодидом. В качестве продуктов выделены продукты S-алкилирования – 5-пиридилметилен-2-метилтио-имидазол-4-оны **32-40**, структура которых подтверждена данными ЯМР ^1H и ИК-спектроскопии, состав – данными элементного анализа.



32: R = Allyl, 74 %;
33: R = $-\text{C}_{16}\text{H}_{33}$, 92 %;
34: R = $-\text{CH}_2\text{COOC}_2\text{H}_5$, 31 %;

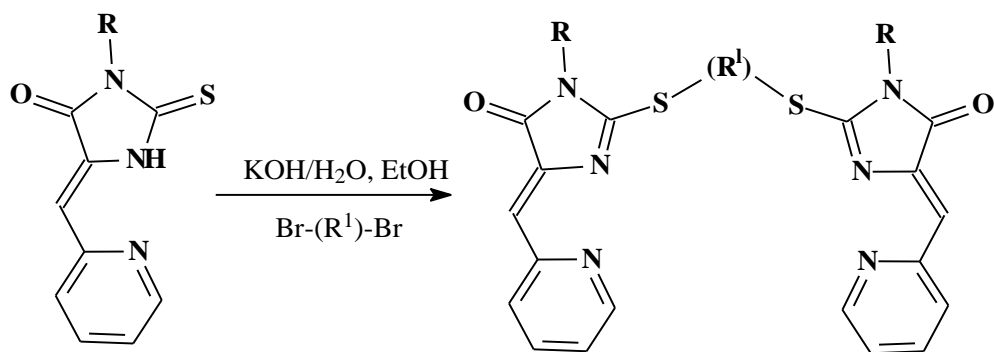


35: R = $-(\text{CH}_2)_3-$, 84 %;
36: R = $-(\text{CH}_2)_5-$, 72 %;
37: R = $-(\text{CH}_2)_6-$, 65 %;
38: R = $-(\text{CH}_2)_8-$, 25 %;
39: R = $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$, 50%;
40: R = $-\text{C}_6\text{H}_4\text{SSC}_6\text{H}_4$, 31 %.

В ИК-спектрах полученных лигандов наблюдаются полосы поглощения, соответствующие колебаниям связи $\text{C}=\text{N}$ при $1640\text{-}1670\text{ см}^{-1}$ и деформационным колебаниям связи $-\text{S}-\text{CH}_3$ при $1350\text{-}1370\text{ см}^{-1}$.

3.1.3.2. Алкилирование производных 2-тиогидантоинов α,ω -дигалогенидами

Алкилирование 2-тиогидантоинов дигалогенидами позволило получить производные **41-45**, содержащие два донорных 5-(2-пиридил)-2-тиоимидазолоновых фрагмента. Данную реакцию проводили в диметилформамиде в присутствии карбоната калия:



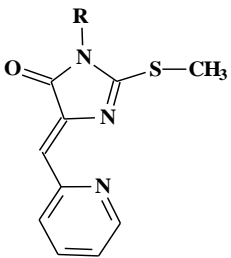
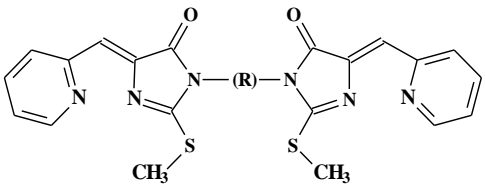
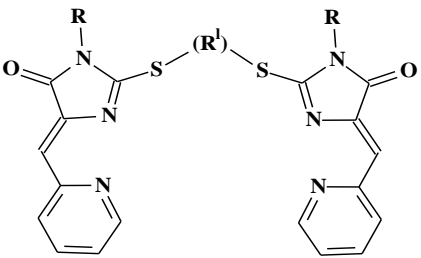
- 41:** R = Allyl, R' = $-(\text{CH}_2)_2-$, 89%;
42: R = C₆H₁₃, R' = $-(\text{CH}_2)_2-$, 51%;
43: R = C₁₆H₃₃, R' = $-(\text{CH}_2)_2-$, 32%;
44: R = Me, R' = 9,10-MeAnt*, 88%;
45: R = Ph, R' = 9,10-MeAnt*, 97%.
 * - Ant – антрацен.

Введение координационного соединения в организм требует комплексного исследования его поведения в биологической системе, а также изучения взаимодействия с биомолекулами (нуклеиновые кислоты, белки). Связывание с биомолекулами возможно детектировать по изменению спектра флуоресценции, при этом введение флуоресцентной группировки непосредственно в молекулу потенциального лекарственного средства позволяет упростить проведение исследований. Молекулы, содержащие флуоресцентные группы, также могут быть использованы в качестве флуоресцентных маркеров для ранней диагностики рака [154]. Кроме того, благодаря флуоресцентным меткам появляется возможность установить, действительно ли используемый препарат влияет на механизмы развития заболевания, либо он только устраняет его симптомы. Поэтому для возможного исследования флуоресценции координационных соединений были получены лиганды, содержащие флуоресцентную группировку. В качестве такой группировки в рамках данной работы выбран 9,10-дизамещенный антрацен (соединения **44** и **45**).

Состав полученных соединений подтвержден данными элементного анализа, а строение - данными ЯМР ¹H и ИК-спектроскопии. В спектрах ЯМР ¹H соединений **32-45** исчезает присутствовавший в спектрах исходных соединений сигнал протонов NH групп при 11-12 м.д. Во всех спектрах наблюдается типичный набор сигналов α-замещенного пиридинового фрагмента в области 8.65-8.82 м.д. В ИК-спектрах полученных соединений появляется характерная полоса поглощения C=N-группы при 1630-1670 см⁻¹.

3.2. СИНТЕЗ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ПРОИЗВОДНЫМИ 5-ПИРИДИЛМЕТИЛЕН-2-АЛКИЛТИО-ИМИДАЗОЛ-4-ОНОВ

Ранее показано [155], что S-алкилированные производные 5-(пиридилметилен)-2-тиогидантоинов являются перспективными лигандами для образования комплексных соединений, т.к. содержат донорные атомы различной природы: атомы азота пиридинового и имидазольного колец и тиоэфирный атом серы. Все синтезированные нами 5-пиридилметилен-2-алкилтио-имидазол-4-оновые лиганды можно разделить на 3 структурных типа.

Тип 1	Тип 2	Тип 3
		
32: R = Allyl; 33: R = -C ₁₆ H ₃₃ ; 34: R = - CH ₂ COOC ₂ H ₅	35: R = -(CH ₂) ₃ -; 36: R = -(CH ₂) ₅ -; 37: R = -(CH ₂) ₆ -; 38: R = -(CH ₂) ₈ -; 39: R = -(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ -; 40: R = -C ₆ H ₄ SSC ₆ H ₄	41: R = Allyl, R' = -(CH ₂) ₂ -; 42: R = C ₆ H ₁₃ , R' = -(CH ₂) ₂ -; 43: R = C ₁₆ H ₃₃ , R' = -(CH ₂) ₂ -; 44: R = Me, R' = 9,10-MeAnt; 45: R = Ph, R' = 9,10-MeAnt

Лиганды типа **1** потенциально способны образовывать моноядерные хелатные комплексы, координируя ионы металлов пиридиновым атомом азота и атомом азота N1 имидазолонового цикла, неподеленная электронная пара которого копланарна пиридиновому фрагменту. В отличие от них, лиганды типов **2** и **3** способны к образованию биядерных комплексов.

Координационные соединения с Cu(II) были получены при смешивании растворов тиогидантоиновых лигандов и растворов дигидрата хлорида меди в смеси CH₂Cl₂-MeOH при комнатной температуре. Структуры всех полученных комплексов подтверждены данными ИК-спектроскопии, а состав – элементным анализом.

3.2.1. СИНТЕЗ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ЛИГАНДАМИ ТИПА 1

Лиганды типа **1** (**32-34**) хорошо растворимы в органических растворителях. Поэтому для получения их кристаллических координационных соединений использован метод медленной диффузии соли металла в раствор лиганда.

Попытки получения комплексов на основе лигандов **33** и **34** не увенчались успехом: в результате смешивания растворов лигандов и раствора хлорида меди ожидаемые комплексы не кристаллизовались.

В случае лиганда **32**, содержащего в качестве заместителя при атоме азота N(3) аллильный фрагмент, вместо ожидаемого координационного соединения состава $L \cdot CuCl_2$ из раствора кристаллизуется ранее описанный биядерный комплекс **32a**, структура которого ранее доказана методом РСА (Рис. 50) [156].

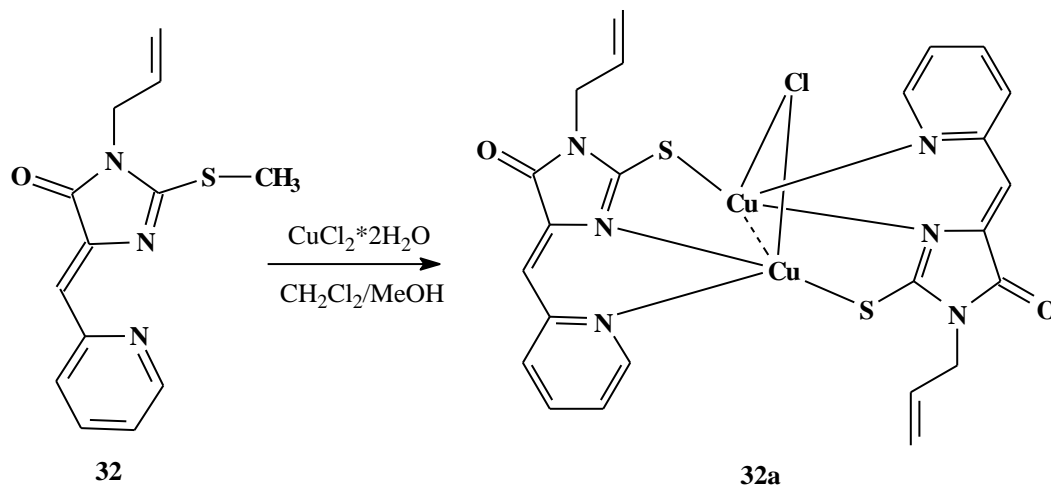


Рисунок 50. Схема синтеза комплекса **32a**

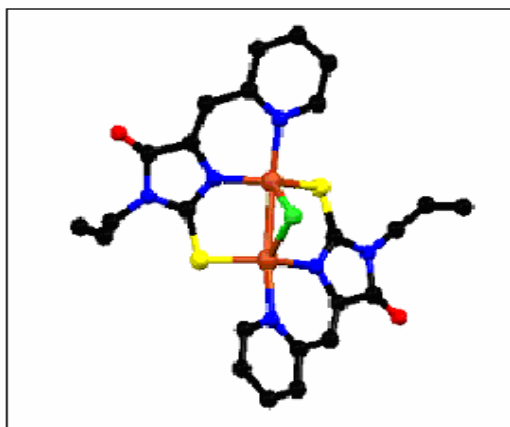
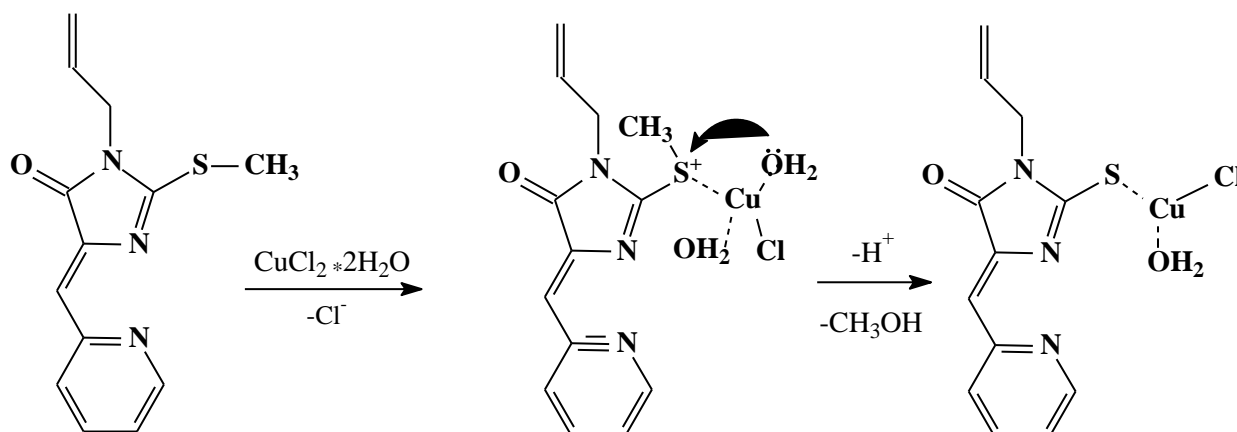


Рисунок 51. Молекулярная структура комплекса **32a**

По данным РСА два атома меди в комплексе эквивалентны, и каждый из них связан с атомом серы и с двумя атомами азота пиридинового и имидазольного циклов. Два атома меди также связаны между собой мостиковым атомом хлора.

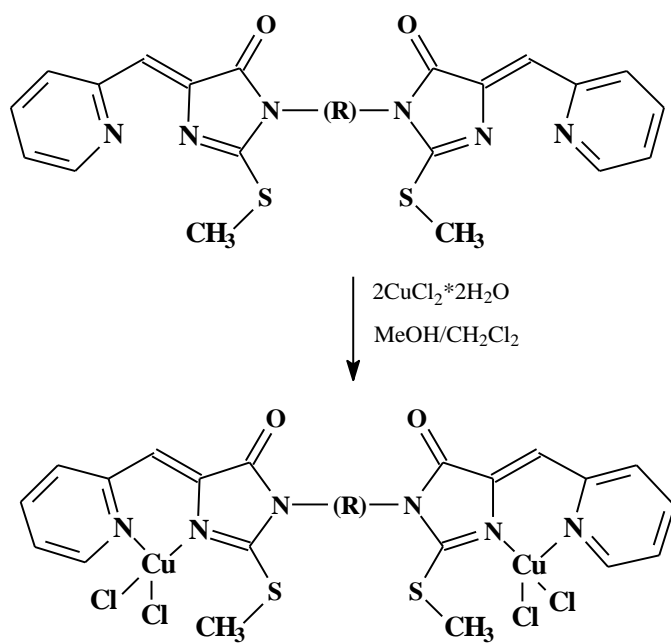
Предполагаемая схема деалкилирования лиганда и образования данного комплекса приведена на схеме. Хлорид меди, как кислота Льюиса, увеличивает нуклеофугность серосодержащего фрагмента и облегчает

протекание реакции S_N2 -замещения при sp^3 -гибридном атоме углерода:



3.2.2. СИНТЕЗ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ЛИГАНДАМИ ТИПА 2

Для синтеза координационных соединений лигандов типа 2 использована методика, аналогичная использованной для получения координационных соединений лигандов типа 1.



- 35a:** R = $-(\text{CH}_2)_3-$, 20%;
36a: R = $-(\text{CH}_2)_5-$, 29%;
37a: R = $-(\text{CH}_2)_6-$, 13%;
38a: R = $-(\text{CH}_2)_8-$, 14%;
39a: R = $-(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{O}(\text{CH}_2)_2-$, 25%;
40a: R = $-\text{C}_6\text{H}_4\text{SSC}_6\text{H}_4-$, 33%.

При этом впервые получены координационные соединения бис-5-пиридилметилден-2-алкилтиоимидазолонов, соединенных различными мостиковыми группировками через атомы азота в 3-м положении тиогидантоинового цикла. Состав полученных координационных соединений был подтвержден данными элементного анализа, которые показывают, что в составе комплексов **35a-40a** каждая молекула лиганда координирует две молекулы хлорида меди(II).

3.2.3. СИНТЕЗ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ С ЛИГАНДАМИ ТИПА 3

В ходе предыдущих исследований нашей научной группы на основе лиганда **41** было получено соединение **41a**, показавшее наиболее высокую цитотоксичность при исследованиях на клеточных линиях MCF-7, HEK293 и SiHa. Мы воспроизвели синтез данного координационного для сравнения его свойств со свойствами впервые полученных нами подобных координационных соединений. Однако попытки получения аналогичных **41a** комплексных соединений на основе лигандов **42-44** не увенчались успехом: в результате смешивания растворов лигандов и раствора хлорида меди ожидаемые комплексы не выпадали. В реакции с участием лиганда **45** был получен комплекс **45a**.

Кристаллическое координационное соединение **45a**, пригодное для рентгеноструктурного исследования, было получено в результате диффузии эфира в раствор комплекса, образующегося при взаимодействии лиганда **45** и хлорида меди(II) в CH_2Cl_2 и CH_3OH . Его молекулярная структура приведена на схеме ниже.

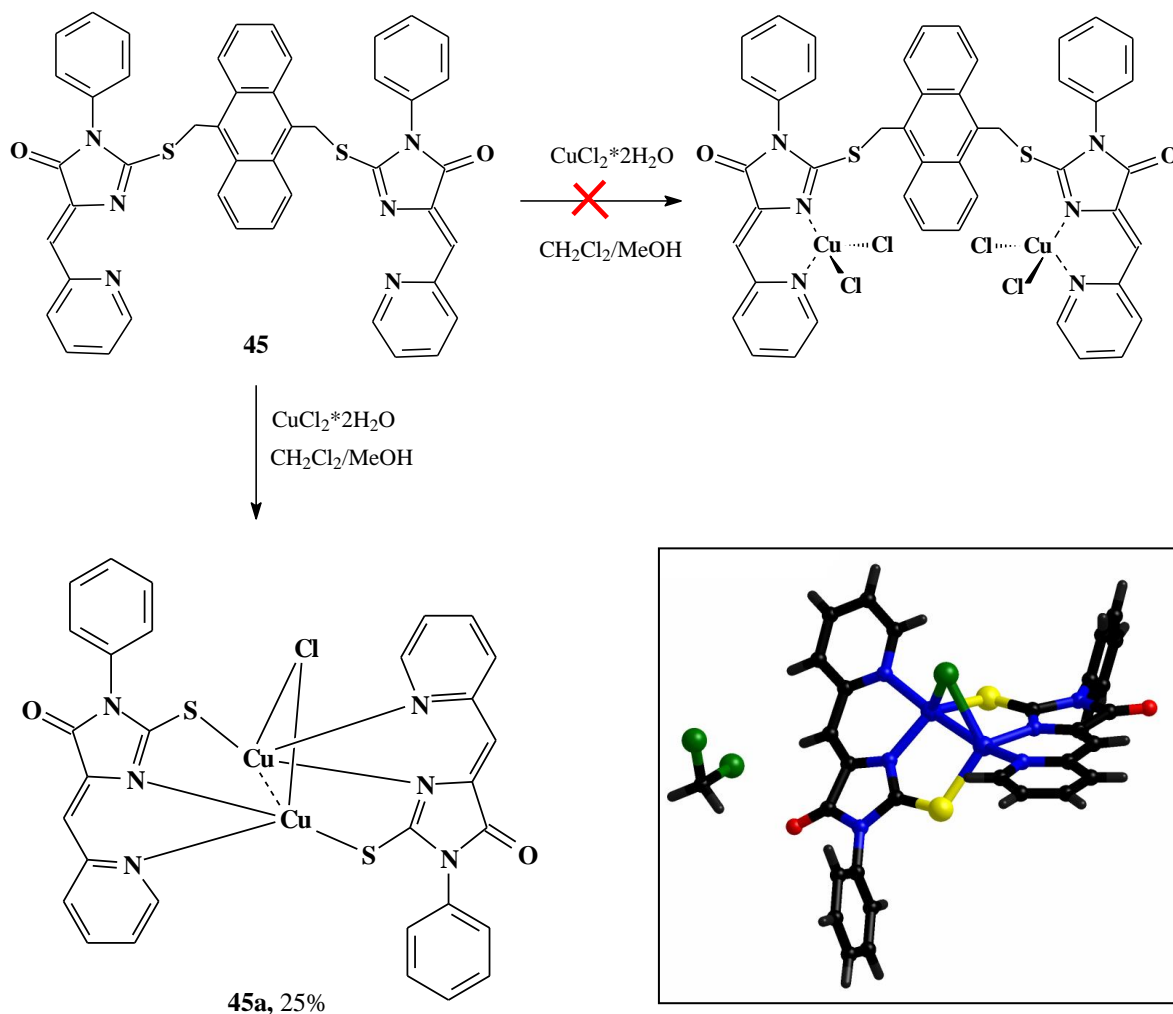


Рисунок 52. Схема образования и молекулярная структура полученного координационного соединения **45a**

Механизм S-деалкилирования в данном случае, по-видимому, аналогичен процессу деалкилирования в реакции лиганда **32**. Полученный результат (потеря лигандом флуорофорного фрагмента) не позволяет в дальнейшем использовать данный комплекс в качестве флуоресцентного маркера.

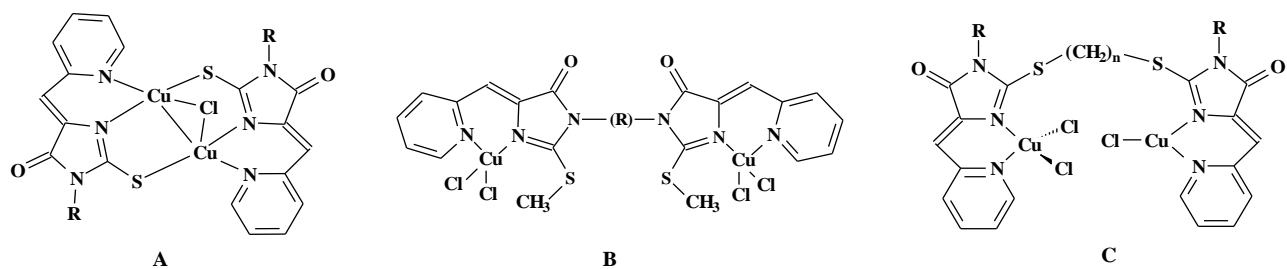
Таблица 3. Избранные длины связей в молекуле координационного соединения **32a** и **45a**

Комплекс 32a		Комплекс 45a	
Связь	Длина связи, Å	Связь	Длина связи, Å
Cu1-N5	1.930	Cu1-N5	1.936
Cu1-N4	2.067	Cu1-N4	2.007
Cu1-S1	2.259	Cu1-S1	2.280
Cu1-C11	2.464	Cu1-Cu2	2.5169
Cu1-Cu2	2.562	Cu2-N2	1.919
Cu2-N2	1.941	Cu2-N1	2.039
Cu2-N1	2.063	Cu2-S2	2.2729
Cu2-S2	2.252		
Cu2-C11	2.462		

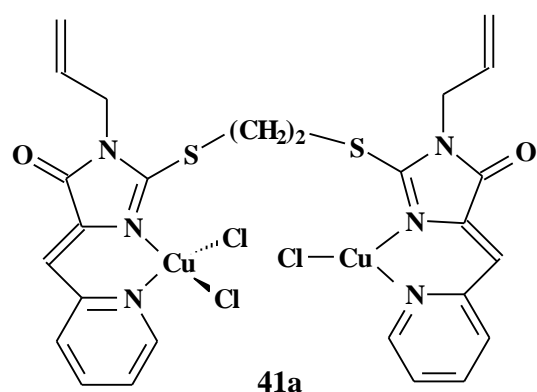
Расстояние между атомами Cu-Cu в молекулах комплексных соединений **32a** и **45a** составляет 2.5 (10) Å, что близко к длине связи Cu_I-Cu_{IV} в природных N₂O-редуктазах (2.6 Å) [157-159]. Геометрия координационной сферы для обоих атомов меди одинакова, поэтому данные комплексы могут рассматриваться как низкомолекулярные аналоги смешанновалентного медьсодержащего центра типа Cu₂, степень окисления меди в котором равна +1,5. Полученные нами комплексы **32a** и **45a** имеют сходное лигандное окружение (два иона меди, каждый из которых связан с двумя атомами азота и одним атомом серы, расстояние Cu-Cu составляет 2.5Å), что позволяет считать полученные комплексы **32a** и **45a** упрощенными моделями данного фермента.

3.3. ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИГАНДОВ И КООРДИНАЦИОННЫХ СТРУКТУР

Все полученные в данной работе координационные соединения 5-пиридилметилден-2-алкилтиоимидазолонов можно разделить на 3 типа, в соответствии с различным координационным окружением ионов меди в комплексе, а также природой заместителей имидазолонового цикла лиганда. Эти типы соответствуют типам лигандов, на основе которых были получены координационные соединения.



Комплексы **32a** и **45a**, относящиеся к типу **A**, представляют собой упрощенные структурные аналоги N_2O -редуктазы, поэтому представляет особый интерес для дальнейшего



изучения каталитической активности. Новые биядерные комплексы **35a-38a** типа **B** представляют интерес в качестве потенциальных интеркаляторов ДНК; также предполагается, что данные комплексы могут взаимодействовать с квартетом азотистых оснований G-квадруплекса и блокировать действие фермента теломеразы. Координационное соединение **41a**, относящееся к типу **C**, является описанным

ранее соединением-лидером при исследовании цитотоксической активности. Тем не менее, для полноценной оценки физико-химических свойств и возможности использования его структурных аналогов в биологических средах для этого комплекса необходимо провести ряд дополнительных физико-химических исследований, прежде всего – определить растворимость, стабильность и константы устойчивости.

В качестве модельных соединений для оценки растворимости выбраны представители каждого структурного типа лигандов – соединения **32**, **37** и **41**, а также их комплексы **32a**, **37a** и **41a**.

Предварительным этапом работы было исследование кинетической и термодинамической устойчивости на основании УФ-спектров поглощения модельных соединений в средах ДМСО и ДМСО-вода.

Полученный результат показывает схожесть хромофорных групп, содержащих ароматический и гетероциклический фрагменты и сопряженные связи, для каждого типа лигандов. Максимумы на спектрах лигандов совпадали: 282–283 нм для **32a** и **37a** (288 нм для **41a**), 372 нм для **32a** и **37a** (374 нм для **41a**), и 391 нм (плечо) для **32a** - **41a**. Молярные коэффициенты поглощения для **32a** ($\epsilon_{372} = 8.1 \times 10^3$ л/моль×см) и **37a** и **41a** ($\epsilon_{374} = 1.35 \times 10^4$ л/моль×см и $\epsilon_{372} = 1.45 \times 10^4$ л/моль×см соответственно) имеют соотношение 1 : 2, которое соответствует числу тиогидантоиновых циклов (хромофоров) в этих соединениях. Спектры комплексов схожи и имеют широкие полосы поглощения 345–348 (~ 1.1×10^4 л/моль×см), 365–

369 нм ($\sim 1.1 \times 10^4$ л/моль \times см), 397–399 нм ($\sim 1.2 \times 10^4$ л/моль \times см), и 420 нм ($\sim 4 \times 10^3$ л/моль \times см), что согласуется с ранее опубликованными данными для аналогичных хелатов [160]. Спектры лигандов и комплексов не отличаются значительно в ДМСО и в выбранных растворах ДМСО-вода в объемных соотношениях 15:5 – 5:15.

Исходя из спектров поглощения выбраны диапазоны длин волн, которые характеризуется (1) максимальным отличием спектра комплекса от спектра лиганда и (2) относительно низким поглощением лиганда для определения самого комплекса. Они составили 360-425 нм для **32a**, 365-408 нм для **37a** и 390-420 нм для комплекса **41a**, что также согласуется с литературными данными [161-164].

Кинетическую стабильность комплексов **32a–41a** оценивали методом УФ-спектрофотометрии в выбранном растворителе ДМСО-вода в объемном соотношении 9:11. Было показано, что комплексы стабильны в течение нескольких часов.

3.3.1. ОЦЕНКА РАСТВОРИМОСТИ МОДЕЛЬНЫХ ЛИГАНДОВ И ИХ КОМПЛЕКСОВ В СРЕДАХ ВОДА:ДМСО

Важной задачей является выбор подходящего растворителя для последующего применения комплекса металла в живых системах. Полученные лиганды и комплексы характеризуются относительно низкой растворимостью в воде, тогда как их растворимость в таких органических растворителях как ДМСО и ДМФА примерно в 100 раз выше растворимости в воде. Известно, что ДМСО допускается для применения в медицинской практике [165, 166], поэтому для оценки растворимости мы выбрали водные среды с добавлением ДМСО. Нашей задачей было оценить, при каких соотношениях растворимость комплексных соединений в выбранных водно-органических средах была бы сопоставимой с растворимостью в ДМСО, а содержание органического растворителя было достаточно низким для минимизации его воздействия при введении в организм.

Помимо задачи последующего использования комплексных соединений меди, для оценки констант устойчивости модельных комплексов (см. ниже), необходимо было найти соотношение вода–органический растворитель, при котором как исследуемые координационные соединения, так и лиганды имели бы достаточно высокие концентрации для повышения точности определения констант.

Поскольку полноценное определение растворимости выходило за рамки этой работы, мы ограничились оценкой растворимости модельных соединений в растворителях вода:ДМСО с преобладающим содержанием воды. Для такой оценки мы использовали относительное значение растворимости: т.е. максимальная растворимость для данного

соединения (лиганда или комплекса) принималась за 1, а остальные значения рассчитаны как отношения к этой величине.

Для оценки растворимости мы использовали спектрофотометрию как наиболее простой метод, а также благодаря значительному светопоглощению всех выбранных соединений в УФ и видимой областях. Найдено, что спектры поглощения всех соединений меняются незначимо при изменении состава среды. Кроме того, полученные спектры поглощения лигандов в смеси ДМСО-вода аналогичны полученным спектрам поглощения в ДМСО.

На Рис. 53 представлены графики зависимости относительной растворимости от соотношения ДМСО-вода для лигандов. Видно, что, как и следовало ожидать, при увеличении объемной доли ДМСО в системе растворимость лигандов увеличивается. Для соотношения ДМСО-вода 1:1 наблюдается наилучшая растворимость.

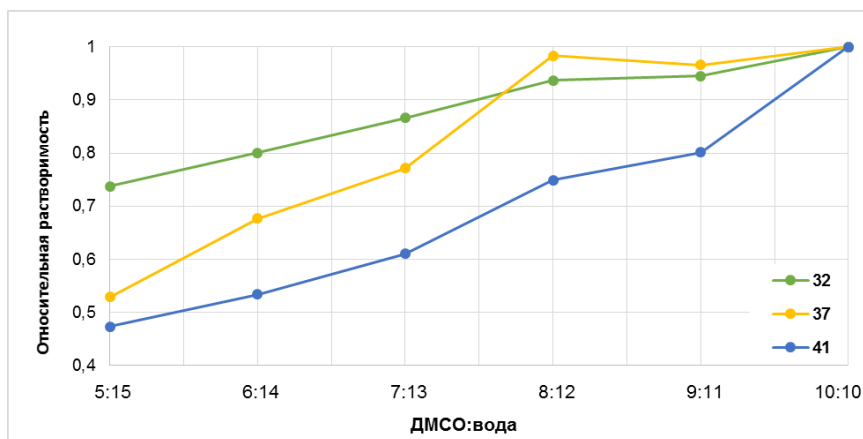


Рисунок 53. Зависимость усредненного по длинам волн значения оптической плотности насыщенных растворов, нормированного на максимальное значение в серии, от объемного соотношения ДМСО-вода для лигандов **32** ($c=2.23 \times 10^{-4}$ М, $\lambda=302-360$ нм), **37** ($c=7.1 \times 10^{-5}$ М, $\lambda=260-330$ нм), **41** ($c=1.15 \times 10^{-4}$ М, $\lambda=260-330$ нм).

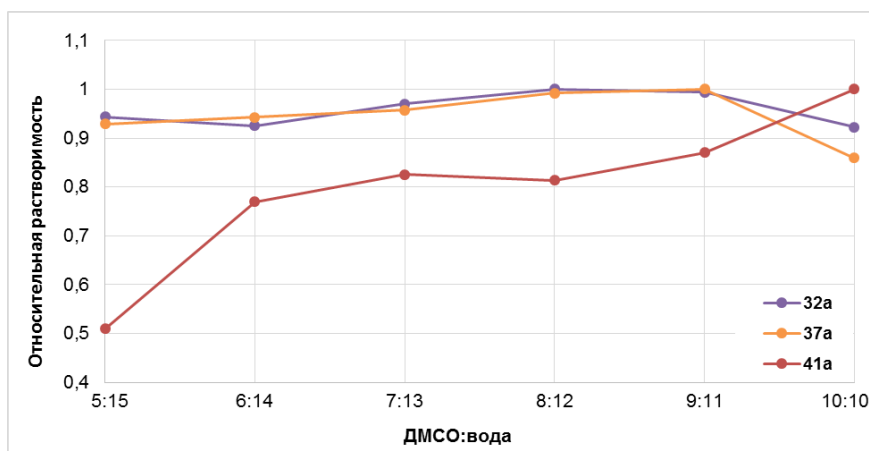


Рисунок 54. Зависимость усредненного по длинам волн (400-330 нм) значения оптической плотности насыщенных растворов, нормированного на максимальное значение в серии, от объемного соотношения ДМСО-вода для комплексов **32a** ($c=4,96 \times 10^{-4}$ М), **37a** ($c=3,29 \times 10^{-4}$ М), **41a** ($c=3,16 \times 10^{-4}$ М).

Из Рис. 54 видно, что растворимость комплексов **32a** и **37a** практически не меняется при изменении соотношения ДМСО-вода, а для комплекса **41a** растворимость изменяется аналогично изменению растворимости лигандов.

Таким образом, для исследуемых комплексов возможно использовать среды, содержащие до 25% ДМСО без существенного снижения растворимости, что допускается для использования в медицинских целях [167]. Для последующих исследований устойчивости комплексных соединений выбрана смесь ДМСО-вода 9:11 для обеспечения высокой растворимости как комплексов, так и лигандов и возможности измерения рН в стандартных условиях (доля воды в смешанном растворителе более 50%).

В течение 1 ч регистрировали УФ-спектры поглощения растворов всех трех координационных соединений в этом растворителе. Спектры оставались неизменными в течение всего периода времени. Это говорит о высокой кинетической устойчивости комплексов.

3.3.2. ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ КОМПЛЕКСОВ МЕДИ С ВЫБРАННЫМИ МОДЕЛЬНЫМИ ЛИГАНДАМИ

Устойчивость комплекса металла имеет решающее значение при использовании его в качестве фармацевтического препарата. Устойчивость комплексов металлов обычно зависит от концентрации протонов (лиганды — слабые основания), и большинство комплексов потенциально подвержены окислительному разрушению лиганда. Например, в кислой среде желудка, при пониженном рН ишемической ткани (лишенная кислорода ткань становится кислой с рН, приближающемуся к 5), или в сильной окислительной среде печени, можно ожидать окислительное разрушение комплекса, при котором освобождаются свободные и потенциально токсичные ионы металлов. В сильно восстановительной среде большинства клеток важную роль в разложении комплекса может играть восстановление металлического центра, что может привести к достаточно сильному изменению устойчивости комплекса. Термодинамические константы устойчивости комплекса для большинства комплексов металлов определяют с помощью электрохимических и спектроскопических методов [168, 169] или с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [170]. Важно отметить, что стехиометрия кристаллических комплексов зачастую отличается от состава комплекса в растворе [171, 172].

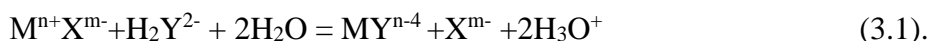
3.3.2.1. Определение константы устойчивости комплексов

В ряде случаев прямое измерение константы связывания комплекса металл–органический лиганд невозможно вследствие большого значения величины константы

связывания. В этих случаях обычно используют методы определения условных констант связывания, основанные либо на конкурентной реакции по лиганду (как правило, подавление кислотной диссоциации слабой кислоты, анион которой является лигандом), либо на вытеснении лигандом-конкурентом с известной константой связывания исследуемого лиганда из комплекса с данным металлом.

Константы устойчивости для исследуемых соединений рассчитаны по разрушению комплексов за счет конкурирующего комплексобразования по меди с использованием этилендиаминтетраацетата (ЭДТА). Этот лиганд выбран в связи с тем, что комплексы с аминополикарбонowymi кислотами (комплексонами) образуются в соотношении 1:1, что исключает ступенчатое комплексобразование и упрощает расчеты. Константа устойчивости комплекса ЭДТА с медью ($\beta^\circ = 6.3 \times 10^{18}$) предположительно близка к константам исследуемых комплексов, при pH 7 условная константа устойчивости комплексоната меди равна 3.03×10^{15} [174]. Наконец, светопоглощение комплексов меди с ЭДТА в выбранном диапазоне длин волн (максимальное поглощение исследуемых комплексов) незначимо.

Вследствие низкой растворимости этилендиаминтетрауксусной кислоты (H_4Y) в воде используют дигидрат ее динатриевой соли $Na_2H_2Y \cdot 2H_2O$ (ЭДТА). Реакцию взаимодействия комплекса металла M с ЭДТА в растворе можно представить уравнением:



Влияние pH среды учитывают с помощью мольной доли $\alpha(Y^{4-})$, ионов Y^{4-} в общей концентрации не связанного с металлом комплексона $c(Y)$, находящегося в различных формах протонирования:

$$c(Y) = [H_4Y] + [H_3Y^-] + [H_2Y^{2-}] + [HY^{3-}] + [Y^{4-}], \quad (3.2)$$

откуда:

$$[Y^{4-}] = c(Y)\alpha(Y^{4-}). \quad (3.3)$$

Величина $\alpha(Y^{4-})$ возрастает с увеличением pH раствора:

$$\alpha(Y^{4-}) = \frac{K_{a1}K_{a2}K_{a3}K_{a4}}{[H^+]^4 + K_{a1}[H^+]^3 + K_{a1}K_{a2}[H^+]^2 + K_{a1}K_{a2}K_{a3}[H^+] + K_{a1}K_{a2}K_{a3}K_{a4}}, \quad (3.4)$$

Конкурентное комплексобразование реализовано как титрование исследуемого комплекса раствором ЭДТА [173]. Для каждого из исследуемых комплексов построены зависимости оптической плотности от содержания ЭДТА в растворе (Рис. 55-57), на которых видно разрушение комплексов под действием ЭДТА. На основании полученных данных рассчитаны условные константы устойчивости, из значений которых получены термодинамические константы (табл.4).

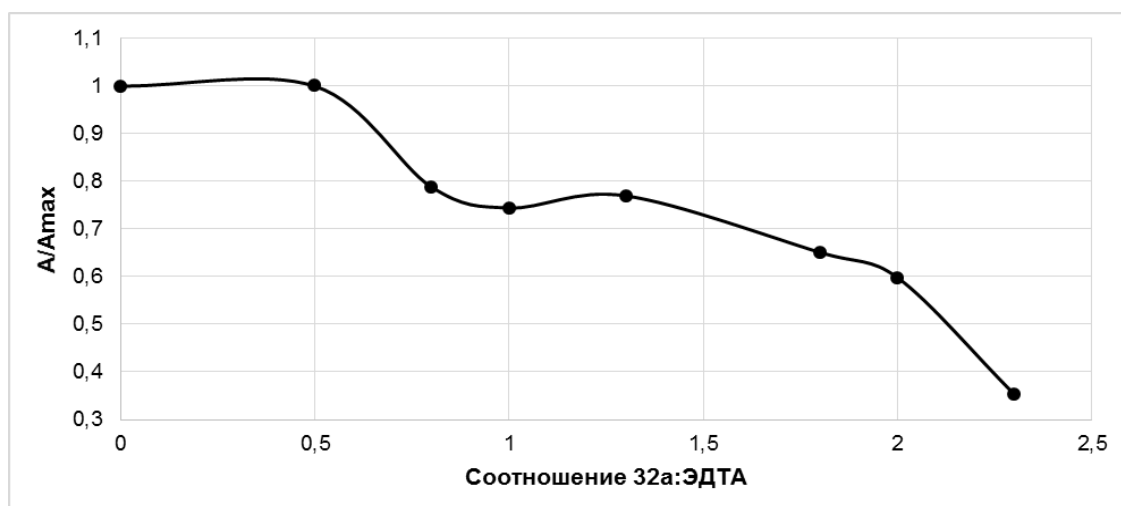


Рисунок 55. Зависимость нормированной усредненной оптической плотности от содержания ЭДТА в растворе комплекса **32а** ($c=4 \times 10^{-5}$ М, $\lambda=360-425$ нм, ДМСО-вода).

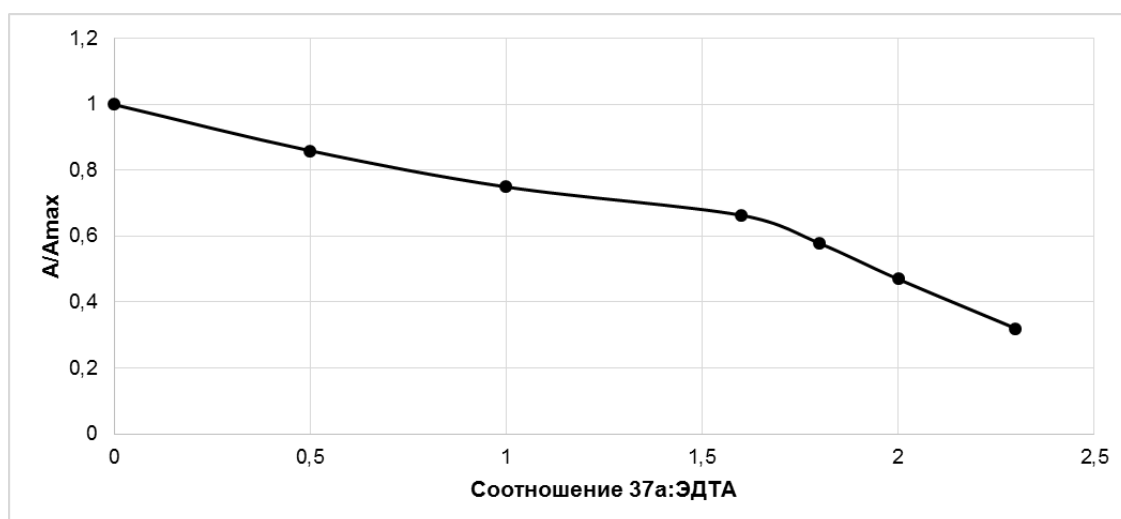


Рисунок 56. Зависимость нормированной усредненной оптической плотности от содержания ЭДТА в растворе комплекса **37а** ($c=6 \times 10^{-5}$ М, $\lambda=365-408$ нм, ДМСО-вода).

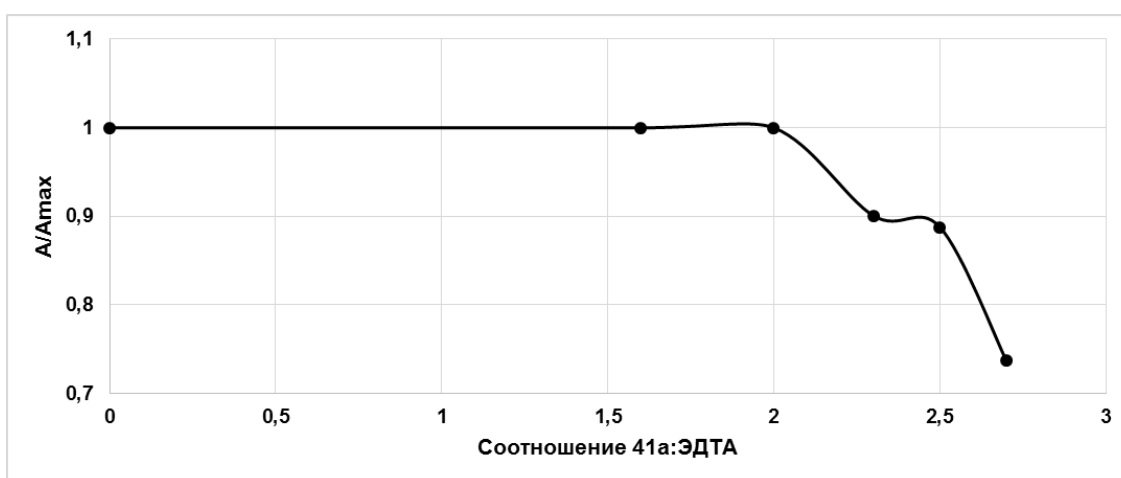


Рисунок 57. Зависимость нормированной усредненной оптической плотности от содержания ЭДТА в растворе комплекса **41а** ($c=6 \times 10^{-5}$ М, $\lambda=390-420$ нм, ДМСО-вода).

Таблица 4. Константы устойчивости комплексов **32a** (8 параллельных измерений), **37a** (4 параллельных измерения), **41a** (7 параллельных измерений).

№	β_0	$\lg \beta_0$
32a	$6.67 (\pm 0.58) \times 10^{15}$	15.8
37a	$5.70 (\pm 0.54) \times 10^{19}$	19.9
41a	$4.88 (\pm 0.38) \times 10^{19}$	19.7

Стабильность комплексов **37a** и **41a** состава L:Cu = 1 : 2 близка и выше по сравнению со стабильностью комплекса **32a**, состав которого L:Cu = 1 : 1. Стабильность комплекса **37a** незначительно выше по сравнению со стабильностью комплекса **41a**. Скорее всего, это связано с наличием в молекуле более длинной метиленовой цепи, которая связывает два тиогидантоиновых остатка. Полученные для комплекса **32a** результаты сравнимы с константами устойчивости для других медьсодержащих низкомолекулярных комплексов (комплексы на основе лигандов бензоилацетона и нитрилотриуксусной кислоты), при этом значения констант для комплексов **37a** и **41a** значительно их превышают [175-177].

3.3.2.2. Определение стехиометрии координационных соединений

Для определения состава комплексных соединений часто применяется метод Остромысленского–Жоба (метод изомолярных серий). Этот метод позволяет определять состав комплексных соединений, если известно ионное состояние компонентов, участвующих в образовании комплексного соединения, и в условиях его образования не наблюдается полимеризации и гидролиза. Суть метода заключается в том, что растворы двух исходных компонентов одинаковой молярной концентрации смешивают в определенном последовательном соотношении, при этом сумма концентраций (г/моль×л) в постоянном объеме не меняется.

В качестве свойства изучаемой системы при фотометрических исследованиях состава соединений используют оптическую плотность приготовленных растворов. Растворы в различных соотношениях перемешивают, добавляют буферный раствор (при необходимости), доводят водой (или другим растворителем) до определенного объема и строят график зависимости оптической плотности от соотношений молярных концентраций реагирующих веществ. Для получения воспроизводимых результатов ионная сила растворов должна быть постоянной. Максимальное поглощение дает раствор, в котором образующееся соединение преобладает. Максимум на кривой состав–свойство определяет стехиометрические коэффициенты в уравнении образования комплексного соединения [178].

Очевидно, что точность определения по методу Остромысленского–Жоба зависит от того, вносят ли компоненты смеси помимо образующегося комплекса вклад в измеряемую оптическую плотность на данной длине волны, и наилучшие результаты метод изомолярных серий дает при значительно различающихся спектрах лигандов и их комплексов. Однако для рассматриваемых соединений спектры поглощения лигандов весьма широки и весьма близки к спектрам их комплексов, поскольку при образовании комплексов не образуется интенсивных полос поглощения. Это затрудняет оценку концентрации комплексного соединения в смесях с лигандом, что неизбежно вносит погрешность при определении как состава комплекса, так и его устойчивости. Таким образом, для всех последующих измерений необходимо проводить измерения на двух длинах волн для учета вклада поглощения лиганда на длине волны, соответствующей образованию комплексного соединения. На рис. 58 представлены графики изомолярных серий для лигандов **32**, **37** и **41**.

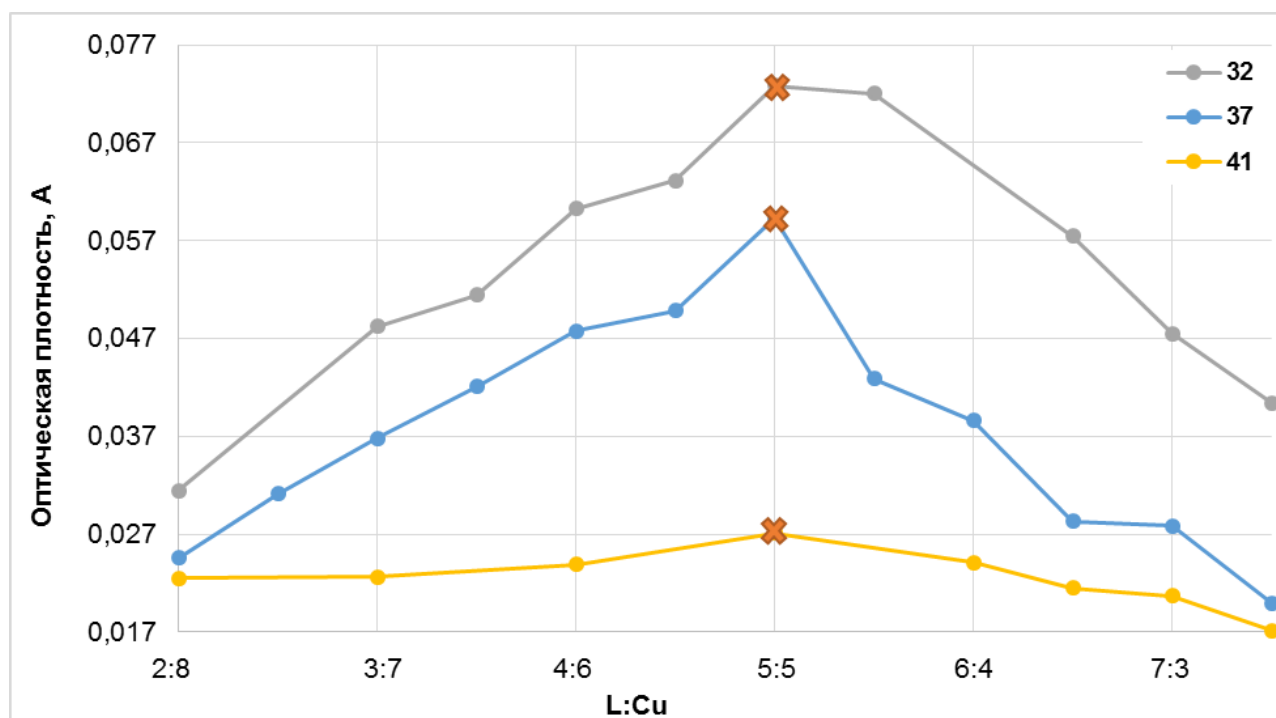


Рисунок 58. Зависимость оптической плотности (A) от соотношения L:Cu в среде ДМСО:вода, где L = **32**, $\lambda = 457$ нм, L = **37**, $\lambda = 450$ нм, L = **41**, $\lambda = 490$ нм.

Для всех исследованных лигандов на основании метода изомолярных серий в растворе можно сказать, что образуются комплексы в соотношении L:Cu = 1:1. Отметим, что поскольку лиганды значимо поглощают в исследуемом диапазоне, это вызывает смещение и искажение левых ветвей кривых, соответствующих избытку лиганда.

Строго говоря, полученный результат применим только для предварительной оценки стехиометрии в растворе. Для координационного соединения **32a** (п. 3.3.1) результаты РСА демонстрируют идентичный состав комплексного соединения, получаемого также в растворе

методом Остромысленского–Жоба. В случае комплекса **32a** на одну молекулу исходного лиганда приходится один атом Cu(II), поэтому конечное соединение, состоящее из двух молекул лиганда и двух атомов меди, имеет состав L:Cu = 1:1. Однако для комплексов **37a** и **41a** на основании данных элементного анализа, а также полученных ранее данных РСА (в случае комплекса **41a**) [16] состав обоих комплексов соответствует соотношению L:Cu = 1:2, что не совпадает с результатами по определению стехиометрии методом изомолярных серий.

Другим способом оценки состава и устойчивости комплекса является метод, основанный на построении кривой насыщения. Кривая насыщения может быть использована для изучения состава комплексного соединения и тогда, когда оказывается непригодным метод изомолярных серий.

При построении кривой насыщения обычно сохраняют постоянной концентрации одного из реагирующих компонентов и меняют концентрации другого. При образовании в системе достаточно прочного комплекса на кривой насыщения образуется резкий излом в точке, абсцисса которой соответствует молярному соотношению иона-комплексобразователя и лиганда в комплексе. При получении кривой насыщения, не имеющей резкого излома, о соотношении компонентов в комплексном соединении можно иногда судить на основании экстраполяции прямолинейных участков на кривой насыщения [179].

На Рис. 59 представлена кривая насыщения для образования комплекса **41a**. При увеличении содержания лиганда **41** при неизменном содержании ионов меди в растворе образуется комплекс, который, как видно на графике, имеет состав L:Cu = 1:1.

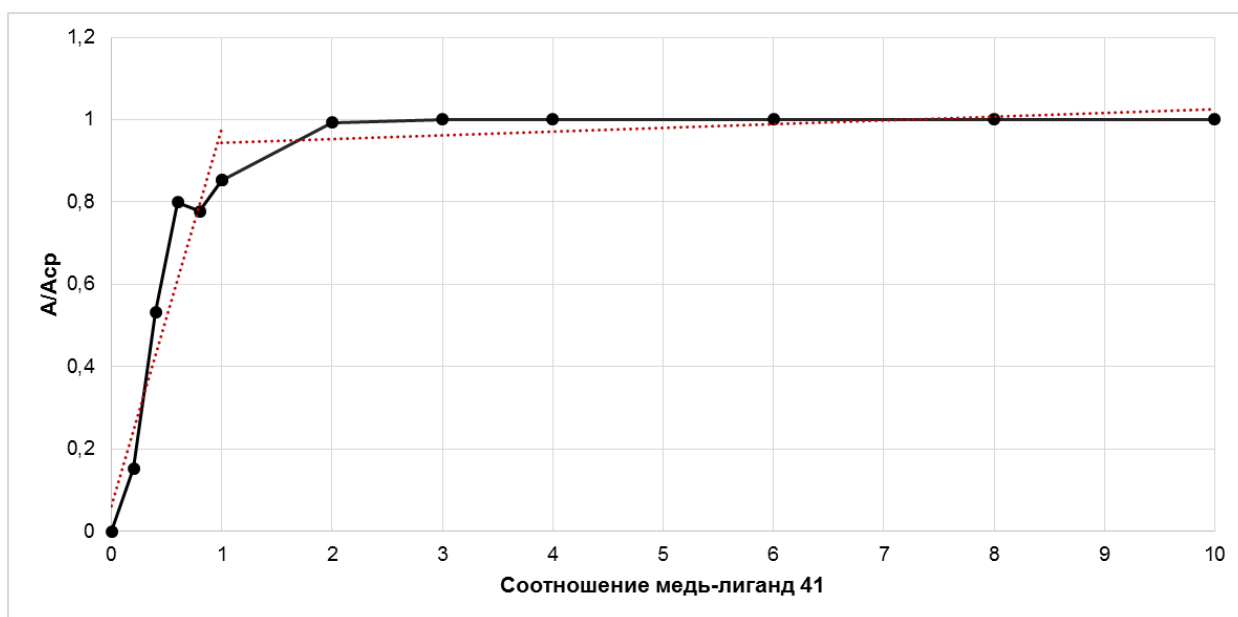


Рисунок 59. Кривая насыщения для **41a** при длине волны 425 нм.

Для комплекса **32a** (Рис. 60) кривая искажена и не отражает истинной стехиометрии в связи с малым поглощением комплекса на фоне лиганда.

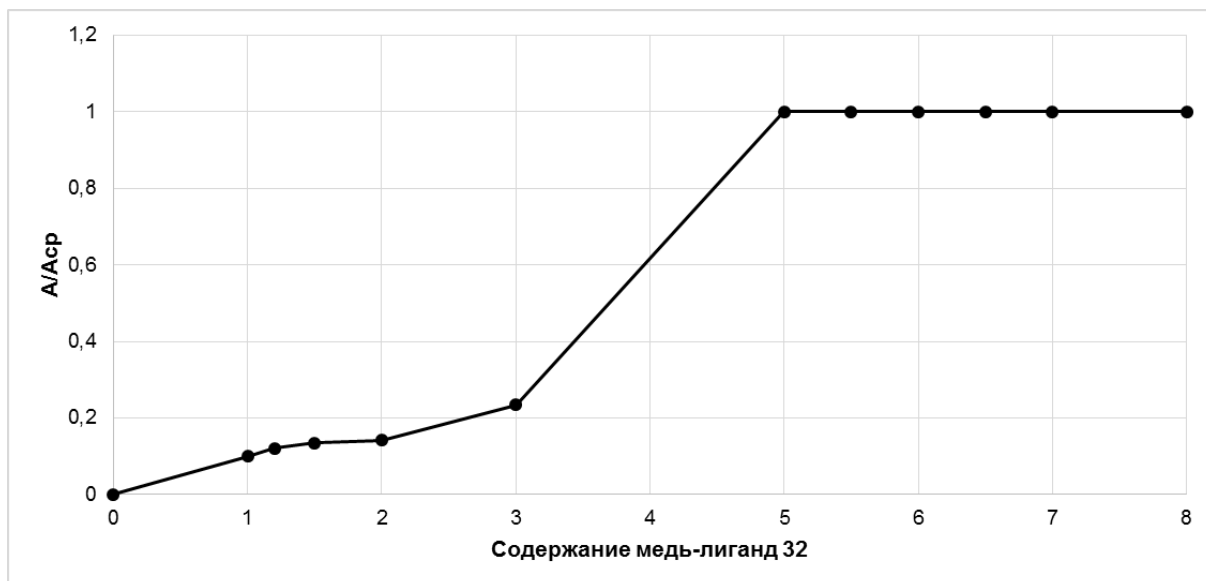


Рисунок 60. Кривая насыщения для **32a** при длине волны 417 нм

Для комплекса **37a** в связи с низкой растворимостью лиганда кривую насыщения построить не удалось.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что расчет констант устойчивости по образованию комплексов в растворе для производных 2-тиогидантоина зачастую очень сложен или же невозможен вовсе. Только для комплекса **41a** получено значение его стехиометрии в растворе. При этом данные стехиометрии по образованию комплекса в растворе отличны от данных, полученных для синтезированных кристаллических комплексов.

3.3.3. ИССЛЕДОВАНИЕ МОДЕЛЬНОЙ КАТАЛИТИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ¹

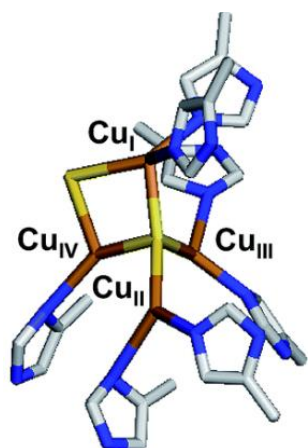


Рисунок 61. Cu₂ активный сайт N₂O редуктазы [180]

Медьсодержащий фермент N₂O-редуктаза отвечает за восстановление N₂O до N₂ на последней стадии круговорота азота в природе. Предполагаемый механизм восстановления N₂O до N₂ включает координацию молекулы оксида азота по двум атомам меди каталитического сайта Cu_I-Cu_{IV}. Один из двух электронов, необходимых для восстановления N₂O, отдает Cu_{IV}, а второй, видимо, Cu_{II} через сульфидный мостик [181].

Изучено электрохимическое поведение комплексов **32a** и **45a** в отсутствие и в присутствии N₂O методами циклической вольтамперометрии (ЦВА) на стеклоуглеродном (СУ) электроде в растворах ДМФА в присутствии 0.1 М Bu₄NClO₄ в качестве индифферентного электролита. Потенциалы электрохимического окисления и восстановления измерены относительно Ag|AgCl|KCl(нас.) и представлены в табл. 5.

Таблица 5. Потенциалы окисления (E^{Ox}) и восстановления (E^{Red}) комплексных соединений **32a** и **45a**, измеренные методом ЦВА на СУ электроде.

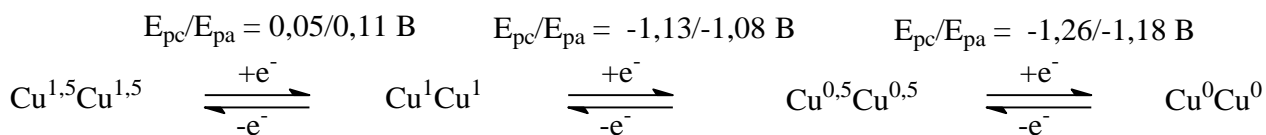
Соединение	E_p^{Red}	E_p^{Ox}
32a	0.09/0.12 ^{b)}	0.46/0.38
	-0.15/-1.00	
	-1.14/-1.10	
	-1.77	
45a	0.05/0.11 ^{b)}	0.47/0.37
	-1.13/-1.08	
	-1.26/-1.18	
	-1.84	

^{a)} E_{pc} – потенциалы пиков (скорость развертки потенциала 200 мВ с⁻¹); после слэша потенциалы обратных пиков.

^{b)} Начальный потенциал 0.24 В

¹ Электрохимические исследования выполнены совместно с к.х.н., н.с. А.А. Моисеевой (химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова)

Оба исследованных комплекса имеют сходный характер окисления и восстановления. Так, для комплекса **45a** при сканировании в катодную область потенциалов на кривой ЦВА наблюдали три обратимых одноэлектронных редокс-процесса, вероятно соответствующих трём последовательным переходам



Перед второй волной присутствует адсорбционный предпик ($E = -0.84 \text{ В}$), свидетельствующий об адсорбции на электроде интермедиата $\text{Cu}^{0,5}\text{Cu}^{0,5}$ (Рис. 62):

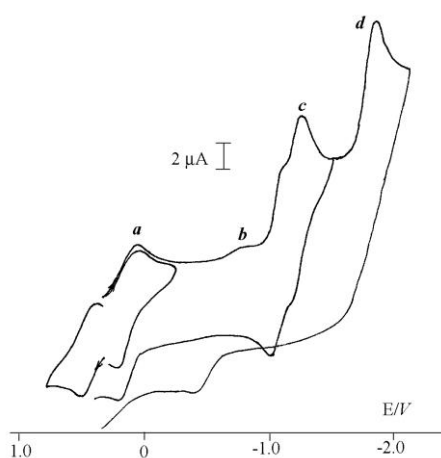


Рисунок 62. ЦВА раствора комплекса **45a** ($5 \cdot 10^{-4} \text{ М}$), 200 мВ/с .

Далее на ЦВА наблюдается двухэлектронная необратимая волна, соответствующая, очевидно, восстановлению анионных лигандов ($E_{pc} = -1.84 \text{ В}$). На обратных сканах кривых после прохождения потенциала третьей волны ($E = -1.40 \text{ В}$) не наблюдалось окислительной десорбции нульвалентной меди даже при проведении электролиза в течение 30 с. Также не происходило осаждение меди на электроде. Данный факт позволяет предположить, что отрицательно заряженный лиганд прочно удерживает атомы меди и, следовательно, комплекс, содержащий Cu^0Cu^0 , устойчив [182].

В анодной области ЦВА наблюдается квазиобратимый пик $E_{pa}/E_{pc} = 0.47/0.37 \text{ В}$, очевидно, соответствующий переходу $\text{Cu}^{1,5}\text{Cu}^{1,5} \rightarrow \text{Cu}^{\text{II}}\text{Cu}^{\text{II}}$.

Во всех случаях вольтамперометрический отклик комплекса в присутствии N_2O и в его отсутствии не изменялся при скоростях сканирования потенциала 500, 200, 100, 50 мВ/с. При скорости, не превышающей 20 мВ/с, в присутствии N_2O первая волна восстановления остаётся неизменной и сохраняет обратимость, из чего следует, что субстрат не связывается ни с исходным, ни с образующимся на первой стадии восстановления комплексом меди.

Следует заметить, что N_2O в отсутствие комплекса восстанавливаются гораздо труднее ($E_{pc} = -2.12$ В).

Каталитический прирост тока наблюдали только при потенциалах адсорбционного предпика ($E^{Red} = -0.84$ В) и второго катодного пика ($E^{Red} = -1.13$ В), соответствующего образованию интермедиата $Cu^{0.5}Cu^{0.5}$ (Рис 63). Величина тока при этом сильно возростала, последующие же пики становились низкоинтенсивными. Электродокаталитическое восстановление N_2O адсорбированным катализатором наблюдали ранее для комплексов Ni^{II} с макроциклическими полиаминами, для которых каталитический прирост тока наблюдался также на предпике адсорбции [183]. Представляется, что образование адсорбированных частиц $Cu^{0.5}Cu^{0.5}$ является важным шагом для данной каталитической реакции.

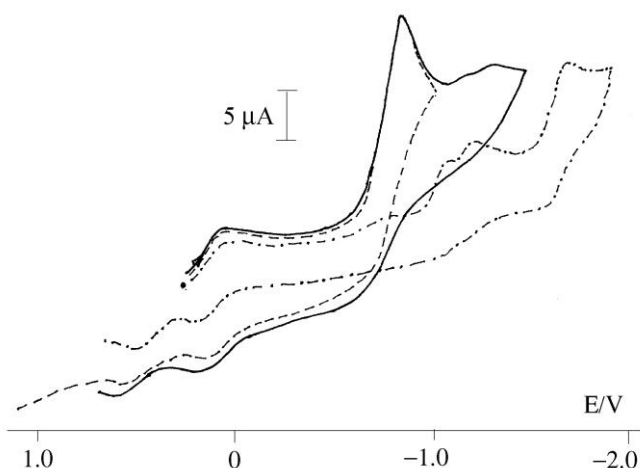


Рисунок 63. ЦВА раствора комплекса **45a** ($2 \cdot 10^{-4}$ М), насыщенного N_2O . —, --- при 20 мВ/с; ····· при 200 мВ/с.

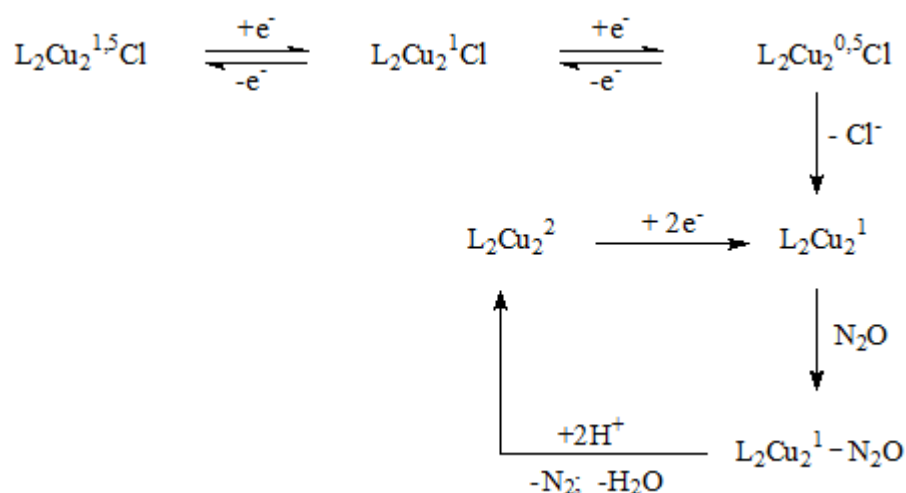
В случае электродокаталитического восстановления N_2O из двух возможных азотсодержащих продуктов восстановления (N_2 и NH_3) образуется только N_2 , поскольку на обратном скане после достижения катодного потенциала ($E = -1.00$ В) в анодной области не наблюдали пика окисления NH_3 при $E_{pa} \approx 1.00$ В.

Преимущество двухэлектронно-восстановленного интермедиата в электродокаталитическом процессе заключается в том, что он имеет более высокую отрицательную величину потенциала реокисления E^{Ox} (-1.08 В), по сравнению с E^{Ox} (0.11 В) продукта, полученного в результате первого одноэлектронного восстановления и, следовательно, наиболее способен к восстановлению N_2O , как более донорный.

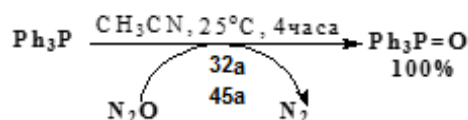
Кроме того, продукт двухэлектронного восстановления может терять хлорид-ион, что повышает вероятность быстрого взаимодействия при непосредственной координации субстрата по возникшему вакантному координационному месту (молекулы растворителя, как довольно лабильные лиганды, легко замещаются на молекулы субстрата). В этом случае

восстановление происходит интермедиатом, который в результате двухэлектронного восстановления субстрата переходит в состояние $\text{Cu}^I \text{Cu}^I$, дальнейшее электрохимическое восстановление которого приводит к замыканию каталитического цикла (см. схему). Тогда, вероятно, исходный комплекс не входит в каталитический цикл, как это установлено для редокс-активной формы фермента N_2OR *Pseudomonas nautica* [184].

На основании вышесказанного предлагается схема каталитического процесса, с которой согласуются все данные электрохимического эксперимента.



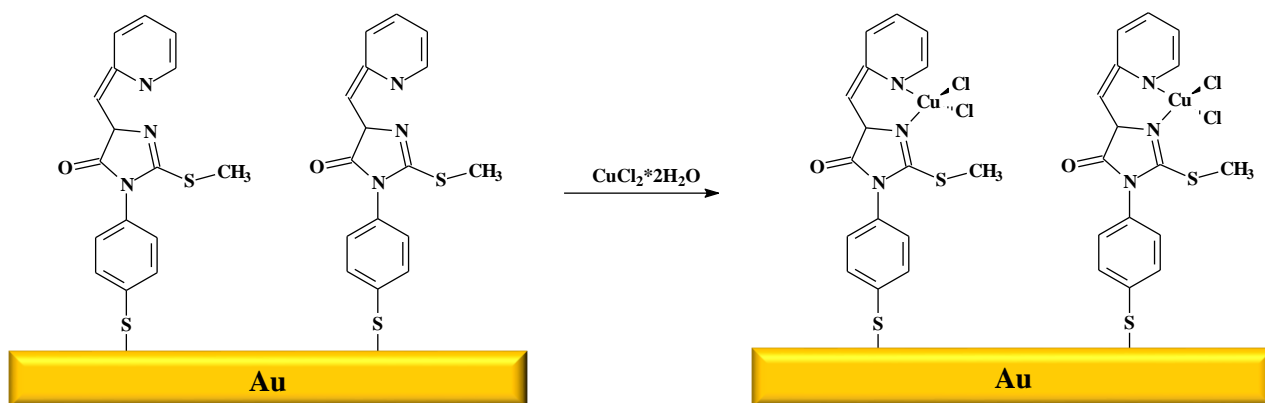
Таким образом, комплексы **32a** и **45a** способны катализировать восстановление N_2O до N_2 в мягких условиях при умеренных потенциалах (около -1.0 В). Каталитическое действие комплексов **32a** и **45a**, структурные центры которого подобны центру в ферменте N_2O -редуктаза, изучено в модельной реакции окисления PPh_3 . Установлено, что в присутствии 5 мол.% комплекса **32a** и **45a** реакция образования оксида трифенилфосфина проходит на 100% в течение 4 ч при комнатной температуре, при этом выход Ph_3PO в реакции окисления PPh_3 с N_2O при отсутствии исследуемых комплексов в тех же условиях составляет только 8%.



Полученные данные подтверждают ранее сделанное предположение о том, что комплексы **32a** и **45a** являются функциональными аналогами N_2O -редуктазы.

3.3.4. ИССЛЕДОВАНИЕ АДСОРБЦИИ ЛИГАНДОВ НА ПОВЕРХНОСТИ ЗОЛОТА²

Помимо получения комплексных соединений меди(II) с органическими лигандами в кристаллическом состоянии, исследована возможность образования таких комплексов с лигандами, адсорбированными на поверхности золота. В качестве модельного соединения для изучения образования самоорганизующихся монослоев на поверхности золота исследован (5*Z*,5'*Z*)-3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис[5-(2-пиридилметил)-2-метилтиотетрагидро-4*H*-имидазол-4-он] **40** и исследовано образование его комплексного соединения на поверхности по следующей схеме:



Для адсорбции использовали кремниевые пластины с вакуумно-напыленным слоем золота (толщина 50 ± 10 нм, размер пластины 5×5 мм) фирмы НТ-MDT. Пластины выдерживали в 10^{-3} М этанольном растворе **40** в течение разных промежутков времени, после чего несколько раз промывали этиловым спиртом и высушивали. Далее на модифицированных поверхностях измеряли краевые углы натекания θ_a и отекания θ_r с помощью горизонтального микроскопа марки «МГ» с гониометрической приставкой. Точность измерений составила ± 1 град. Краевые углы натекания на твердых поверхностях измеряли при нанесении на нее капле объемом 2 мкл тестовых жидкостей (вода и этиленгликоль). Краевые углы отекания измеряли при подведении пузырька воздуха объемом 2 мкл к поверхности образца, находящегося в воде. Измерения краевых углов проводили при 20 °С. Среднеквадратичное отклонение при измерениях краевых углов составило ± 2 град. Величина гистерезиса $\Delta\theta = \theta_a - \theta_r$ дает информацию о степени однородности твердой поверхности. Полученные результаты представлены в табл. 6.

² Данная часть работы выполнена совместно с к.х.н., доц. Должиковой В.Д. и к.х.н., доц. Богдановой Ю.Г., кафедры коллоидной химии Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Таблица 6. Степень заполнения поверхности $x(\%)$ и краевые углы натекания θ_a воды и отекания θ_r на поверхности золота, модифицированной лигандом **40**

Время выдерживания пластины в 10^{-3} р-ре 40	Краевые углы, град.			$x(\%)$
	θ_a	θ_r	$\Delta\theta = \theta_a - \theta_r$	
Чистая поверхность Au	61	60	1	
1 мин	64	58	6	11
30 мин	67	57	10	23
1 час	70	67	3	34
3 часа	73	67	6	38
24 часа	73	67	6	46

На основании молекулярной теории смачивания проведен расчет удельной поверхностной энергии монослоя [185]. Для этого использовали краевые углы двух тестовых жидкостей (воды и этиленгликоля) с известными значениями поверхностного натяжения, а также дисперсионных и полярных компонент. Для расчета этой величины решали систему следующих уравнений:

$$\begin{cases} (1 + \omega_s \theta_{L1}) \sigma_{L1} = 2(\sigma_{L1}^d \cdot \sigma_{SV}^d)^{1/2} + 2(\sigma_{L1}^p \cdot \sigma_{SV}^p)^{1/2} \\ (1 + \omega_s \theta_{L2}) \sigma_{L2} = 2(\sigma_{L2}^d \cdot \sigma_{SV}^d)^{1/2} + 2(\sigma_{L2}^p \cdot \sigma_{SV}^p)^{1/2} \end{cases} \quad (3.5)$$

где θ_{L1} и θ_{L2} – краевые углы воды и этиленгликоля на твердой поверхности, σ_{L1}^p , σ_{L2}^p , σ_{SV}^p , σ_{L1}^d , σ_{L2}^d , и σ_{SV}^d – полярная и дисперсионная составляющие поверхностного натяжения тестовых жидкостей и твердой поверхности [186-188]. При этом удельная свободная поверхностная энергия монослоя σ_{SV} равна сумме полярной и дисперсионной составляющих свободной поверхностной энергии, т.е. $\sigma_{SV} = \sigma_{SV}^p + \sigma_{SV}^d$. Получено, что $\sigma_S^d = 13$ мДж/м², $\sigma_S^p = 18$ мДж/м², $\sigma_S = \sigma_S^d + \sigma_S^p = 31$ мДж/м². Таким образом, модифицируя поверхность золота лигандом можно тонко регулировать поверхностные свойства высокоэнергетической подложки ($\sigma(\text{Au}) = 1620$ мДж/м²) и получить низкоэнергетическую поверхность, аналогичную поверхности полимеров (таких как полиэтилен, полиимид и др.).

Используя теорию смачивания гетерогенных поверхностей, рассчитана степень заполнения поверхности золота (x) адсорбционным слоем по уравнению [189]:

$$x = \frac{\cos \theta - \cos \theta_0}{\cos \theta_m - \cos \theta_0} \quad (3.6)$$

где для расчета использовали следующие значения краевых углов воды: на поверхности золота $\theta_0 = 61^\circ$, на поверхности, полностью модифицированной замещенным тиогидантоином $\theta_m =$

85°. Измерения краевых углов на модифицированных поверхностях показали, что монослой полностью формируется через 3 ч выдерживания в растворе лиганда **40**, при этом степень заполнения поверхности составляет 46 %. Возможно, такая величина степени заполнения поверхности связана с большими объемными заместителями в лиганде, а небольшой гистерезис модифицированной поверхности $\Delta\theta = \theta_a - \theta_r = 73^\circ - 67^\circ = 6^\circ$ свидетельствует о том, что образовавшийся монослой является достаточно однородным.

В дальнейшем исследовали процесс образования комплекса адсорбированного на поверхности золота лиганда **40** с $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Для этого золотые пластины, модифицированные монослоем лиганда **40**, выдерживали в 10^{-3} М этанольном растворе $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в течение различных промежутков времени для получения комплекса на поверхности золота. Полученные данные представлены в табл. 7:

Таблица 7. Степень заполнения поверхности $x(\%)$ и краевые углы натекания θ_a воды, отекания θ_r на поверхности золота, модифицированной лигандом **40** и $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Время выдерживания пластины в 10^{-3} р-ре $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		Краевые углы, град.			$x(\%)$
		θ_a	θ_r	$\theta_a - \theta_r$	
Поверхность модифицированная лигандом 40	Au,	73	67	6	46
1 мин		77	57	20	62
30 мин		76	57	19	58
1 час		76	58	18	58
3 часа		69	52	17	30
24 часа		68	52	17	26

Значительный гистерезис краевых углов монослоя, содержащего $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, свидетельствует о неоднородности поверхности монослоя, что, возможно, связано с наличием в молекуле лиганда донорных атомов различной природы (азота, серы и кислорода), которые могут связываться с атомами меди, или с неполным протеканием реакции комплексообразования, в результате чего на поверхности остается большое число некоординированных лигандных фрагментов.

Рассчитана удельная свободная поверхностная энергия монослоя σ_{sv} . Получено, что $\sigma_s^d = 12$ мДж/м², $\sigma_s^p = 22$ мДж/м², $\sigma_s = \sigma_s^d + \sigma_s^p = 34$ мДж/м², т.е. удельная поверхностная энергия монослоя комплекса незначительно возрастает по сравнению с энергией модифицированной монослоем лиганда **40** золотой поверхности.

Полученные экспериментальные данные могут служить основой для получения в дальнейшем НЧ золота, стабилизированных лигандом **40** с последующим образованием комплексных соединений данного лиганда на поверхности золота.

3.3.5. ОЦЕНКА ЦИТОТОКСИЧНОСТИ ПОЛУЧЕННЫХ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ³

На заключительном этапе проведено исследование биологической активности модельных координационных соединений. В качестве модели был выбран фермент теломеразы, который экспрессируется в 80% опухолевых клеточных линий. Для исследования биологической активности использовался метод амплификации теломерных повторов TRAP. TRAP-анализ является стандартным методом определения активности теломеразы, благодаря некоторым модификациям получивший возможности полуколичественного метода. Выбор метода детекции теломеразной активности определялся его широкой освещенностью в мировой литературе и высокой чувствительностью.

Протокол амплификации теломерных повторов можно подразделить на 3 основных шага: удлинение праймера, амплификация получившегося продукта (продуктов) и детектирование. На шаге удлинения теломерные повторы прибавляются присутствующей в клеточном экстракте теломеразой к олигонуклеотиду, узнаваемому ею как субстрат (TS). При амплификации продуктов удлинения олигонуклеотида TS теломеразой могут появляться ложные сигналы с теломер хромосом, содержащихся в клеточном экстракте. Чтобы избежать этого, 5'-конец олигонуклеотида TS имеет нетеломерную последовательность, мешающую ему связываться с теломерами, однако узнается теломеразой как субстрат. Поскольку человеческая теломераза добавляет серию повторов по шесть нуклеотидов, то в результате удлинения олигонуклеотида TS теломеразой получается набор фрагментов ДНК, различающихся по длине. Затем следует шаг увеличения количества продукта с помощью специфических праймеров методом ПЦР с нуклеотидами, содержащими радиоактивную или флуоресцентную метку для детекции. Далее осуществляется детектирование, как правило, с помощью электрофоретического разделения и последующего сканирования.

При TRAP-анализе использованы праймеры TS и ACX (TS = 5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3', ACX = 5'-GCGCGG(CTTACC)3СТААСС-3'). ACX имеет на 5'-конце нетеломерный довесок из 6 нуклеотидов, и за счет этого не образует димеров с теломеразным субстратом. При использовании этих праймеров количество встроенной метки

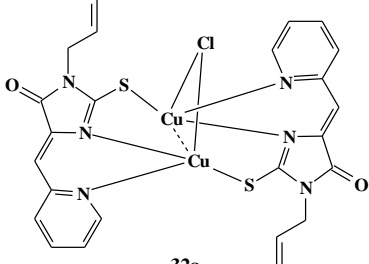
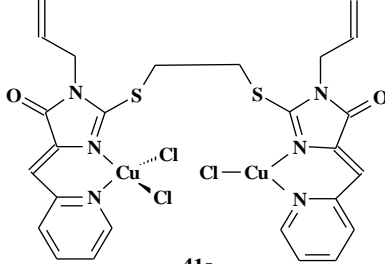
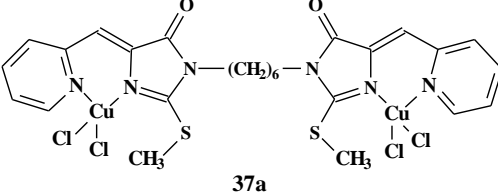
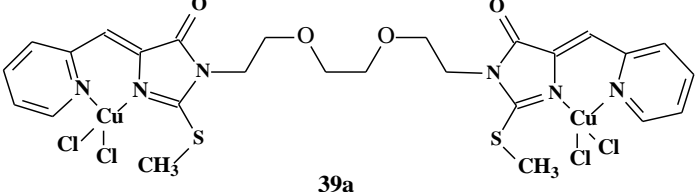
³ Данная часть работы выполнена совместно с зав. кафедрой ХПС Химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова академиком РАН, профессором Донцовой О.А. и к.х.н., доцентом Зверевой М.Э.

пропорционально числу добавленных теломеразой повторов. Количество ПЦР-продукта слабо зависит от того, сколько в реакции было исходной матрицы, поэтому нельзя оценить количество теломеразного продукта по интенсивности его сигнала на фотографии. При введении в ПЦР набора теломеразных продуктов они все амплифицируются. Поэтому мы можем использовать число добавленных теломеразой повторов как критерий ее активности.

Для определения IC_{50} (концентрации вещества, при которой происходит ингибирование теломеразной активности на 50%) проводили реакции для различных концентраций препаратов. Для более точного определения IC_{50} проводилось отдельное повторное измерение ингибирования веществами с использованием дополнительных разведений.

Наиболее активным ингибитором теломеразы, а также раковых клеток молочной железы MCF-7, раковых клеток шейки матки SiHa и эмбриональных клеток почек HEK293 из синтезированных в нашей научной группе ранее является координационное соединение (5*Z*,5'*Z*)-2,2'-(этан-1,2-диилдисульфанилдиил)бис(5-(2-пиридилметил)-3-аллил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она) с $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ **41**. Задачей данной части работы было установление биологической активности биядерных координационных соединений с полиметиленовой цепью между атомами азота органического лиганда. Результаты исследования приведены в табл. 8:

Таблица 8. Значения IC_{50} , измеренные для комплексов **32a**, **37a**, **39a**, **41a**.

 <p>32a</p> <p>$IC_{50} = 100.1 \pm 1.6 \text{ мкМ}^4$</p>	 <p>41a</p> <p>$IC_{50} = 2.1 \pm 0.8 \text{ мкМ}$</p>
 <p>37a</p> <p>$IC_{50} = 4.2 \pm 2.3 \text{ мкМ}$</p>	 <p>39a</p> <p>$IC_{50} = 6.1 \pm 1.9 \text{ мкМ}$</p>

⁴ Юдина А.В. Новые органические лиганды ряда 2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-онов и 2-алкилтио-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов и их координационные соединения с $Cu(II)$. Синтез и физико-химическое исследование : дисс. ... канд. хим. наук : 02.00.03 / Юдина Анна Валерьевна. – М., 2012 – 140 с.

Согласно полученным ранее в нашей научной группе данным ⁵, механизм цитотоксического действия медьсодержащих комплексов тиогидантоиновых лигандов не включает образование активных форм кислорода, а деградация ДНК, по-видимому, происходит за счет интеркаляции.

Для координационного соединения **32a** величина IC₅₀ оказалась существенно выше, чем для соединения-лидера. Значение IC₅₀ для комплекса **37a** составило 4.2 мкМ. Можно сделать вывод, что изменение степени окисления одного из атомов меди (два иона меди(II) в составе комплекса) и линкерного фрагмента между атомами азота (вместо линкера между атомами серы) не оказывает существенного влияния на величину IC₅₀ по сравнению с описанным ранее соединением-лидером.

3.4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в работе синтезированы новые производные 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазол-4-онов, в том числе разработан метод получения нового типа производных 2-тиогидантоинов – бис-5-(2-пиридилметилена)замещенных 2-тиогидантоинов, соединенных через атомы азота N(3) имидазолоновых фрагментов. Предложенная методика позволяет варьировать природу линкера, соединяющего два тиогидантоиновых фрагмента. Получен ряд координационных соединений разработанных лигандов с медью(II).

Также разработана методика оценки константы устойчивости трех основных типов тиогидантоиновых комплексов с использованием ЭДТА в подходящем для синтезированных соединений растворителе ДМСО-вода 9:11. С помощью разработанной методики возможна простая и экспрессная оценка стабильности координационных соединений с тиогидантоиновыми лигандами различной природы.

Помимо этого, показана цитотоксическая активность полученных координационных соединений и возможность их получения в адсорбированной на поверхности золота форме.

⁵ Красновская О.О. Синтез и физико-химическое исследование координационных соединений Co(II), Cu(II), Cu(I) на основе имидазолин-4-онов для биофармацевтического применения. дисс. ... канд. хим. наук : 02.00.03, 02.00.16 / Красновская Ольга Олеговна. – М., 2016 – 150 с.

4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

4.1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Контроль за ходом реакций и индивидуальности продуктов осуществляли методом тонкослойной хроматографии на закрепленном слое силикагеля (Silufol).

Спектры ЯМР ^1H зарегистрированы на приборе Varian-XR-400 с рабочей частотой 400 МГц. В качестве растворителя использовали дейтерохлороформ, диметилсульфоксид- d_6 . Химические сдвиги приведены в миллионных долях по шкале δ относительно гексаметилдисилоксана как внутреннего стандарта.

ИК-спектры регистрировали на приборе UR-20 в вазелиновом масле и на ИК-спектрометре с преобразованием Фурье IR200 (TermoNicolet, USA) с разрешением 4 см^{-1} .

Использованные растворители очищены и абсолютированы по методикам, приведенным в руководстве [190].

Температуры плавления определяли в блоке с открытым капилляром. Приведены неисправленные величины температур плавления.

Элементный анализ синтезированных соединений выполнен на CHN-анализаторе фирмы Carlo-Erba.

Для электрохимических исследований применяли потенциостат ПИ-50-1.1, подключенный к программатору ПР-8. Рабочим электродом служили ($d = 2\text{ мм}$), платиновый ($d = 2.8\text{ мм}$) и золотой ($d = 2\text{ мм}$) диски, фоновый электролит 0.1 М раствор Bu_4NBF_4 , электрод сравнения $\text{Ag}/\text{AgCl}/\text{KCl}$ (нас.). Все измерения проводили в атмосфере аргона. Образцы растворяли в заранее деаэрированном растворителе. Диметилформамид («х.ч.») перемешивали с безводным карбонатом калия (20 г л^{-1}) 4 сут при $20\text{ }^\circ\text{C}$, декантировали с твердой фазы и далее очищали последовательно кипячением и вакуумной перегонкой над гидридом кальция и безводным сульфатом меди (10 г л^{-1}). Очищенный растворитель хранили над молекулярными ситами 4 \AA .

Для получения СОМ на золотой поверхности использовали пластины кремния с вакуумно напыленным слоем золота (толщина $50 \pm 10\text{ нм}$, размер пластинки $5 \times 5\text{ мм}$) фирмы НТ-MDT.

Краевые углы натекания θ_a измеряли с помощью горизонтального микроскопа марки «МГ» с гониометрической приставкой при нанесении капель объемом $0.01\text{--}0.02\text{ мл}$ на твердую поверхность. Точность измерения $\pm 1^\circ$. Для каждого случая измеряли краевые углы для 6-8 капель на одной и той же подложке. Измерения проводили в закрытой камере (для предотвращения испарения) через 3-5 минут после нанесения капли. Полученные значения краевых углов близки к равновесным, поскольку не изменялись со временем: в течение 30 мин

после проведения измерений краевой угол оставался постоянным. Измерения краевых углов проводили при 20°C. Среднеквадратичное отклонение при измерении краевых углов составил $\pm 2^\circ$.

Рентгеноструктурные исследования проведены на дифрактометре Syntex P21 при 293 К (графитовый монохроматор, $\lambda(\text{MoK}\alpha) = 0.71073 \text{ \AA}$, ω -сканирование). Учет поглощения проведен по измерениям интенсивностей эквивалентных отражений (T_{\min}/T_{\max}). Структуры расшифрованы прямым методом (SHELXS-97) и уточнена в полноматричном анизотропном МНК по F^2 для всех неводородных атомов (SHELXL-97). Все атомы водорода были локализованы объективно и уточнены в изотропном приближении.

Спектры поглощения в УФ и видимой области зарегистрированы на спектрофотометре SHIMADZU UV-mini – 1240CE.

Первым этапом биологических исследований было культивирование раковых клеточных линий человека для выделения активных экстрактов, необходимых для проверки. Для этого перевиваемые клетки карциномы шейки матки человека линий SiHa, C33A, CaSki и HeLa выращивали на стандартной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки (FCS), 4мМ L-глутамин, 1мМ пирувата натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед/мл, соответственно, при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для посева клеток клеточный монослой промывали PBS (10 мМ Na₂HPO₄, 2 мМ KH₂PO₄, 137 мМ NaCl, 2 мМ KCl), добавляли стандартный раствор трипсин:EDTA (Sigma) и помещали в CO₂-инкубатор на 3-5 мин, добавляли среду с FCS и суспендировали пипетированием, клетки рассеивали в необходимое количество культуральных флаконов. После образования монослоя клетки линий смывали с подложки раствором трипсина и осаждали центрифугированием (10 мин., 2000g). Дважды промывали буфером PBS. Ресуспендировали в лизирующем буфере (10 мМ Tris-HCl или 10 мМ HEPES-KOH, pH 7,5, 1,0 мМ MgCl₂, 1 мМ EGTA, 5 мМ β -меркаптоэтанол, 5% глицерина, 0,5% CHAPS, 0,1 мМ PMSF), 1 мл на 0,3-10 млн. клеток, в зависимости от необходимой концентрации. Инкубировали 30 минут во льду. Центрифугировали 10 минут при 4°C на 15000 об/мин и отбирали надосадочный раствор. Экстракт делили на аликвоты по 10 мкл и замораживали в жидком азоте. После этого проводили анализ теломеразной активности методом TRAP-теста. На первом шаге готовили смесь N1: 49 мкл смеси TRAP, содержащей 1x TRAP-буфер (1x TRAP-буфер: 20 мМ HEPES-KOH pH 8.3, 1.5 мМ MgCl₂, 63 мМ KCl, 1мМ EGTA, 0.1 мг/мл BSA, 0,005% v/v Tween-20), 20 мкМ dNTP, 1.6 мкМ олигонуклеотида TS, 1 мкл раствора тестируемого препарата в ДМСО и экстракт клеток клеточных линий или тканей. Реакционную смесь инкубировали 30 минут при 30°C. На втором шаге к смеси добавляли 2 ед. Taq-ДНК-полимеразы (“Хеликон”), 0.1 мкг

олигонуклеотида АСХ и проводили ПЦР по следующей схеме: 35 с 94°C, 35 с 50°C 90 с 72°C (30 циклов, амплификатор Mastercycler (“Eppendorf”, Германия)). 15 мкл раствора и 2.5 мкл буфера для нанесения 6xDNA loading dye (“Fermentas”, 10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.03% бромфенолового голубого, 0.03% ксиленоцианола, 60% глицерина, 60 mM ЭДТА) наносили на полиакриламидный 20% гель (акриламид: BIS-акриламид 1:19 10%, TBE1x, TEMED 0.1%, персульфат аммония 0.1%). В качестве электродного буфера использовали TBE 1x (0.1 M Tris, 0.1 M H₃BO₃, 2 mM Na₂ЭДТА). Проводили электрофорез пока ксиленцианол не пройдет 10-20 см. Гель окрашивали раствором SYBR Green (10000× концентрат в ДМСО фирмы Sigma-Aldrich, разведенный в 10000 раз 0,1M буфером Tris-HCl с pH 8.5). Окраску детектировали с помощью сканирования флуоресценции в геле.

4.2. СИНТЕЗ ЛИГАНДОВ И ИХ КООРДИНАЦИОННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

4.2.1. СИНТЕЗ ИСХОДНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

4.2.1.1. Синтез изотиоцианатоэтилацетата (1)

В трехгорлой колбе растворяли 13.5 г гидрохлорида этилового эфира глицина в смеси 50 мл H₂O и 50 мл CH₂Cl₂. Через две капельные воронки постепенно, при перемешивании добавляли растворы 25.2 г NaHCO₃ в 100 мл H₂O и 11,5 г CSCl₂ в 40 мл CH₂Cl₂. По окончании реакции раствор имел светло-желтый цвет (водный слой бесцветен); разогревания практически не происходило; pH водного слоя равен 6.

Органический слой отделяли на делительной воронке, промывали его H₂O (3×30 мл). Объединенные органические фракции сушили над безводным сульфатом натрия. Растворитель удаляли при пониженном давлении. Изотиоцианатоэтилацетат перегоняли в вакууме масляного насоса при 76°C/3 мм. рт. ст. [191].

Полученный продукт – маслянистая, светло-желтая прозрачная жидкость. В результате реакции получили 12.9 г (90 %) изотиоцианатоэтилацетата.

Спектр ЯМР ¹H (400МГц, ДМСО-d₆, δ, м.д.): 4.60 (с, 2H, CH₂NCS), 4.20 (кв., J=9 Гц, 2H, -CH₂-), 1.25 (т, 3H, J=9 Гц, CH₃-).

4.2.2. СИНТЕЗ 3-ЗАМЕЩЕННЫХ 2-ТИОГИДАНТОИНОВ

Общая методика 1 (синтез из глицина и изотиоцианата):

1 экв. глицина растворяли в смеси вода-пиридин (1:1), после чего добавляли 2N раствор гидроксида натрия, поддерживая pH раствора в течение всей реакции около 9. Смесь нагревали до 40°C и поддерживали эту температуру в течение всей реакции. Затем добавляли

1.5 экв. изотиоцианата. Смесь перемешивали в течение 1 часа, периодически контролируя значение pH. Пиридин и избыток изотиоцианата удаляли экстракцией равным количеством бензола. К водной фазе добавляли концентрированную соляную кислоту до pH 6-7 и кипятили 2 часа. Реакционную смесь упаривали до половины объема при пониженном давлении и охлаждали до комнатной температуры. Образовавшийся осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из метанола.

4.2.2.1. Синтез 3-метил-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она (2)

В результате реакции 2.25 г (30 ммоль) глицина и 3.3 г (45 ммоль) метилизотиоцианата получили 3.53 г (62%) 3-метил-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она **2**.

$T_{пл} = 139-141$ °C. (Лит $T_{пл}=140^{\circ}\text{C}$ [1]).

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 7.31 (уш.с, 1H, NH), 4.12 (с, 2H $\underline{\text{CH}_2\text{NH}}$), 3.30 (с, 3H, N- CH_3).

Элементный анализ: $\text{C}_4\text{H}_6\text{N}_2\text{OS}$ вычислено C – 36.91% H – 4.65% N – 21.25%; найдено C – 36.52% H – 4.28% N – 21.84%.

4.2.2.2. Синтез 3-фенил-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она (3)

В результате реакции 2.25 г (30 ммоль) глицина и 5.4 мл (45 ммоль) фенилизотиоцианата получили 4.86 г (86%) 3-фенил-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она **3**.

$T_{пл} = 249-251$ °C. (Лит $T_{пл}=251$ °C [1]).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 3180(NH), 1730(C=O).

4.2.2.3. Синтез 3-аллил-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она (4)

В результате реакции 5.1 г (67 ммоль) глицина и 10 г (100 ммоль) аллилизотиоцианата получили 7.74 г (74%) 3-аллил-2-тиоксо-4*H*-имидазол-4-она **4**.

$T_{пл} = 196-198$ °C.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 7.44 (ушс, 1H, NH), 5.88 (м, 1H, =CH), 5.27 (м, 2H, = CH_2), 4.46 (д, $J=5,8$ Гц, 2H, - CH_2 -), 4.1 (с, 2H, - CH_2 -).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 3280(NH), 1750(C=O), 1650(C=C).

Элементный анализ: $\text{C}_6\text{H}_8\text{N}_2\text{OS}$ вычислено C – 46.14% H – 5.16% N – 17.93%; найдено C – 46.43% H – 5.51% N – 17.87%.

Общая методика 2 (синтез из изотиоцианатоэтилацетата и замещенного амина):

Растворяли 1 экв. соответствующего амина в 5 мл этилового эфира, изотиоцианатоэтилацетат **1** – в 2 мл эфира. К раствору амина в эфире при перемешивании прибавляли полученный раствор изотиоцианатоэтилацетата и перемешивали в течение суток, контролируя протекание реакции методом ТСХ. После завершения реакции эфир удаляли при пониженном давлении, к полученному производному тиомочевины прибавляли 3 мл этилового спирта и 3 мл концентрированной соляной кислоты и кипятили в течение 2-х часов до образования осадка. Осадок отфильтровывали, промывали этиловым эфиром.

4.2.2.4. Синтез 3-гексил-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она (**5**).

В результате реакции 1.5 мл (1.15 г, 11 ммоль) гексиламина и 1.36 мл (1.6 г, 11 ммоль) изотиоцианатоэтилацетата **1** получили 1.7 г (77 %) 3-гексил-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она **5**.

$T_{пл} = 98-100\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.05 (уш.с., 1H, NH), 4.08 (с, 2H, CH_2), 3.82 (т., $J=7.56$ Гц, 2H, CH_2N), 1.68 (м., 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.34 (м., 6H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 0.90 (т., $J=6.58$ Гц, 3H, CH_3).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 3280 (NH), 1750(C=O).

Элементный анализ: $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{OS}$ вычислено С – 53.97% Н – 8.05% N – 13.99%; найдено С – 54.16% Н – 7.90% N – 13.79%.

4.2.2.5. Синтез 3-гексаундецил-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она (**6**).

В результате реакции 0.3 г (1.2 ммоль) гексаундециламина и 0.15 мл (0.18 г, 1.2 ммоль) изотиоцианатоэтилацетата **1** получили 0.35 г (90 %) 3-гексаундецил-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она **6**.

$T_{пл} = 97-99\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д.): 10.14 (уш.с., 1H, NH), 4.11 (с, 2H, CH_2), 3.62 (т., $J=7.23$ Гц, 2H, CH_2N), 1.54 (м., 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.24 (м., 26H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 0.86 (т., $J=6.58$ Гц, 3H, CH_3).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 3280 (NH), 1755(C=O).

Элементный анализ: $\text{C}_{19}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{OS}$ вычислено С – 67.01% Н – 10.59% N – 8.23% S – 9.41%; найдено С – 67.49% Н – 10.92% N – 7.35% S – 8.44%.

4.2.2.6. Синтез 3-карбэтокси-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она (**7**) [192].

В результате реакции 0.5 г (3.6 ммоль) гидрохлорида глицинового эфира, 2 мл (14 ммоль) триэтиламина и 0.44 мл (0.52 г, 3.6 ммоль) изотиоцианатоэтилацетата **1** в 18 мл сухого

ацетонитрила получили 0.36 г (49 %) 3-карбозтокси-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она **7**.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 10.45 (уш.с., 1H, NH), 4.44 (с, 2H, CH_2), 4.28 (с., 2H, CH_2N), 4.14 (т., $J=7.07$ Гц, 2H, CH_2O), 1.20 (т., $J=7.07$ Гц, 3H, CH_3).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3280 (NH), 1750 (C=O) 1700 (C=O).

Элементный анализ: $\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$ вычислено С – 41.58% Н – 4.98% N – 13.85% S – 9.41%; найдено С – 41.79% Н – 4.77% N – 13.59% S – 16.19%.

4.2.2.7. Синтез 3,3'-этан-1,2-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) (8)

В результате реакции 0.19 мл (0.17 г, 2.8 ммоль) этилендиамина и 0.7 мл (0.82 г, 5.6 ммоль) изотиоцианатоэтилацетата **1** получили 0.15 г (21 %) 3,3'-этан-1,2-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **8**.

$T_{\text{пл}} = 304-306$ °C (с разл).

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 10.16 (уш.с., 2H, NH), 3.99 (с., 4H, CH_2), 3.93 (с., 4H, CH_2).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3280 (NH), 1760 (C=O).

4.2.2.8. Синтез 3,3'-пропан-1,3-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) (9)

В результате реакции 0.34 мл (0.3 г, 4 ммоль) 1,3-диаминопропана и 1,0 мл (1.9 г, 8 ммоль) изотиоцианатоэтилацетата **1** получили 0.49 г (54 %) 3,3'-пропан-1,3-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **9**.

$T_{\text{пл}} = 253-255$ °C.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 10.20 (уш.с., 2H, NH), 4.12 (с., 4H, CH_2), 3.67 (т., $J=7.34$ Гц, 4H, CH_2N), 1.85 (м., 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3280 (NH), 1750 (C=O).

Элементный анализ: $\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_2$ вычислено С – 39.70% Н – 4.41% N – 20.59% S – 23.53%; найдено С – 39.60% Н – 4.61% N – 20.91% S – 23.48%.

4.2.2.9. Синтез 3,3'-пентан-1,5-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) (10)

В результате реакции 0.34 мл (0.3 г, 2.9 ммоль) 1,5-диаминопентана и 0.73 мл (0.85 г, 5.9 ммоль) изотиоцианатоэтилацетата **1** получили 0.25 г (28 %) 3,3'-пентан-1,5-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **10**.

$T_{\text{пл}} = 202-204$ °C.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 10.16 (уш.с., 2H, NH), 4.12 (с., 4H, CH₂), 3.62 (т., J=7.24 Гц, 4H, CH₂N), 1.57 (м., 4H, CH₂), 1.25 (м., 2H, CH₂).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 3280 (NH), 1755 (C=O).

Элементный анализ: C₁₁H₁₆N₄O₂S₂ вычислено С – 44.00% Н – 5.33% N – 18.66% S – 21.33%; найдено С – 44.04% Н – 5.26% N – 18.52% S – 21.38%.

4.2.2.10. Синтез 3,3'-гексан-1,6-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) (11)

В результате реакции 0.3 г (2.6 ммоль) 1,6-диаминогексана и 0.6 мл (0.75 г, 5.0 ммоль) изотиоцианатоэтилацетата **1** получили 0.37 г (45 %) 3,3'-гексан-1,6-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **11**.

$T_{\text{пл}} = 228-230$ °С.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 10.15 (уш.с., 2H, NH), 4.12 (с., 4H, CH₂), 3.62 (т., J=7.09 Гц, 4H, CH₂N), 1.54 (м., 4H, CH₂), 1.27 (м., 4H, CH₂).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 3270 (NH), 1750 (C=O).

Элементный анализ: C₁₂H₁₈N₄O₂S₂ вычислено С – 45.86% Н – 5.73% N – 17.83% S – 20.38%; найдено С – 45.57% Н – 6.11% N – 17.00% S – 20.12%.

4.2.2.11. Синтез 3,3'-октан-1,8-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) (12)

В результате реакции 0.3 г (2.0 ммоль) 1,8-диаминооктана и 0.52 мл (0.6 г, 4.0 ммоль) изотиоцианатоэтилацетата **1** получили 0.36 г (51 %) 3,3'-октан-1,8-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **12**.

$T_{\text{пл}} = 145-147$ °С.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 10.15 (уш.с., 2H, NH), 4.12 (с., 4H, CH₂), 3.62 (т., J=7.09 Гц, 4H, CH₂N), 1.54 (м., 4H, CH₂), 1.26 (м., 8H, CH₂).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 3285 (NH), 1755 (C=O).

Элементный анализ: C₁₄H₂₂N₄O₂S₂ вычислено С – 49.12% Н – 6.43% N – 16.37% S – 18.71%; найдено С – 48.90% Н – 6.52% N – 16.29% S – 18.47%.

4.2.2.12. Синтез 3,3'-[этан-1,2-диилбис(оксиэтан-2,1-диил)]бис(2-тиоксоимидазолин-4-она) (13)

В результате реакции 0.3 г (2 ммоль) 2,2'-[этан-1,2-диилбис(окси)]диэтанамин 0.5 мл (0.58 г, 4 ммоль) изотиоцианатоэтилацетата получили 0.26 г (25 %) 3,3'-[этан-1,2-диилбис(оксиэтан-2,1-диил)]бис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **13**.

$T_{\text{пл}} = 184-186$ °С.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 10.19 (уш.с., 2H, NH), 4.14 (с., 4H, CH₂), 3.80 (т., J=6.25 Гц, 4H, CH₂N), 3.57 (т., J=6.14 Гц, 4H, CH₂CH₂O), 1.06 (т., J=7.02 Гц, 4H, CH₂O).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3280 (NH), 1750 (C=O).

Элементный анализ: C₁₂H₁₈N₄O₄S₂ вычислено C – 41.62% H – 5.20% N – 16.18% S – 18.50%; найдено C – 41.46% H – 5.42% N – 15.92% S – 18.38%.

4.2.2.13. Синтез 3,3'-[бутан-1,4-диилбис(окси)]бис(2-тиоксоимидазолин-4-она) (14)

В результате реакции 0.3 г (1.3 ммоль) 4,4'-[бутан-1,4-диилбис(окси)]дибутан-1-амина и 0.32 мл (0.375 г, 1.6 ммоль) изотиоцианатоэтилацетата **1** получили 0.27 г (49 %) 3,3'-[бутан-1,4-диилбис(окси)]бис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **14** в виде красного масла.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 10.05 (уш.с., 2H, NH), 4.10 (с., 4H, CH₂), 3.71 (т., J=7.04 Гц, 4H, CH₂N), 3.35 (м., 8H, CH₂O), 1.78 (м., 6H, CH₂), 1.52 (м., 6H, CH₂).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3270 (NH), 1750(C=O).

4.2.2.14. Синтез 3,3'-(дисульфандиилдиэтан-2,1-диил)бис(2-тиоксоимидазолин-4-она) (15)

К 0.3 г (1 ммоль) дигидрохлорида цистамина при перемешивании прибавляли раствор 0.12 г (2 ммоль) КОН в 1 мл этанола. Выпавший осадок KCl отфильтровывали, к полученному фильтрату прибавляли 0.25 мл (0.29 г, 2 ммоль) изотиоцианатоэтилацетата **1** и перемешивали в течение 3-х часов, контролируя протекание реакции методом ТСХ. Затем к полученному раствору прибавляли 1 мл концентрированной соляной кислоты и кипятили в течение 2-х часов до образования осадка. Полученный осадок отфильтровывали, промывали этиловым эфиром. В результате реакции получили 0.085 г (24 %) 3,3'-(дисульфандиилдиэтан-2,1-диил)бис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **15**.

$T_{\text{пл}} = 208-209\text{ }^\circ\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 10.24 (уш.с., 2H, NH), 4.14 (с., 4H, CH₂), 3.96 (т., J=6.03 Гц, 4H, CH₂N), 2.98 (т., J=6.03 Гц, 4H, CH₂S).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3285 (NH), 1750 (C=O).

Элементный анализ: C₁₀H₁₄N₄O₂S₄ вычислено C – 34.28% H – 4.00% N – 16.00% S – 36.57%; найдено C – 33.99% H – 4.17% N – 15.72% S – 36.29%.

4.2.2.15. Синтез 3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис(2-тиоксоимидазолин-4-она) (16)

В результате реакции 2.48 г (10 ммоль) 4,4'-бисдиаминодифенилдисульфида и 2.9 г (20 ммоль) изотиоцианатоэтилацетата **1** получили 3.58 г (80 %) 3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **16**.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 10.24 (уш.с., 2Н, NH), 7.67 (д., $J=5.48$ Гц, 4Н, Н-Ph), 7.33 (д., $J=5.28$, 4Н, Н-Ph), 4.27 (с., 4Н, CH_2).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3275 (NH), 1760 (C=O).

Элементный анализ: $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2\text{S}_4$ вычислено С – 48.41% Н – 3.16% N – 12.55%; найдено С – 48.65% Н – 3.36% N – 12.29%.

4.2.3. СИНТЕЗ 3-ЗАМЕЩЕННЫХ 5-((Z)-2-ПИРИДИЛМЕТИЛЕН)-2-ТИОГИДАНТОИНОВ

Общая методика:

1 экв. 3-замещенного 2-тиогидантоина **2-16** растворяли в 10 мл 2%-го спиртового раствора КОН при интенсивном перемешивании. После полного растворения по каплям добавляли 1 экв. 2-пиридинкарбальдегида (для соединений **2-7**) или 2 экв. 2-пиридинкарбальдегида (для соединений **8-16**). Смесь перемешивали 12 часов. К полученной смеси при интенсивном перемешивании прибавляли разбавленную соляную кислоту до pH 7. Выпавший осадок отфильтровывали, промывали этиловым спиртом, затем этиловым эфиром.

4.2.3.1. Синтез 3-метил-5-((Z)-2-пиридилметилена)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она (17)

В результате реакции 2 г (15 ммоль) 3-метил-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол 4-она **2** и 1.56 г 2-пиридинкарбальдегида получили 2.78 г (85%) 3-метил-5-((Z)-2-пиридилметилена)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она **17**.

$T_{\text{пл}} = 229-231$ °С.

Спектр ЯМР ^1H (400МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 12.01 (уш.с, 1Н, NH), 8.75 (д., $J=3.9$, 1Н, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 7.89 (т., $J_1=7.7$ Гц, $J_2=2.2$ Гц, 1Н, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.74 (д., $J=7.8$ Гц, 1Н, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.39 (дд., $J_1=4.8$ Гц, $J_2=1.2$ Гц, 1Н, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 6.72 (с, 1Н, =CH), 3.23 (с, 3Н, $-\text{CH}_3$).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3290(NH), 1750(C=O), 1600(C=C).

4.2.3.2. Синтез 3-фенил-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она (18)

В результате реакции 4 г (20 ммоль) 3-фенил-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол 4-она **3** и 2.24 г 2-пиридинкарбальдегида получили 5.52 г (95%) 3-фенил-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она **18**.

$T_{пл} = 244-246$ °C (лит. $T_{пл} = 243$ °C).

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 11.95 (уш.с., 1H, NH), 8.79 (д., $J=4.7$ Гц, 1H, H $_{\alpha}$ -Py), 7.94 (т., $J=8.3$ Гц, 1H, H $_{\beta}$ -Py), 7.8 (д., $J=7.9$ Гц, 1H, H $_{\beta}$ -Py), 7.57 (м., 3H, H-Ph), 7.47 (м, 3H, H $_{\gamma}$ -Py, H-Ph), 6.81 (с., 1H, =CH).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 3290(NH), 1740(C=O), 1600(C=C).

4.2.3.3. Синтез 3-аллил-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она (19)

Из 4 г (25 ммоль) 3-аллил-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол 4-она **4** и 2.70 г 2-пиридинкарбальдегида получено 5.51 г (90%) 3-аллил-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она **19**.

$T_{пл} = 177-179$ °C.

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 12.0 (ушс, 1H, NH), 8.75 (д, $J=3.9$ Гц, 1H, H-Py), 7.89 (т, $J_1=7.7$ Гц, $J_2=2.2$ Гц, 1H, H-Py), 7.74 (д, $J=7.8$ Гц, 1H, H-Py), 7.39 (дд, $J_1=4.8$ Гц, $J_2=1.2$ Гц, 1H, H-Py), 6.75 (с, 1H, CH=), 5.85 (м, 1H, CH=), 5.3 (м, 2H, CH₂=), 4.4 (д, $J=5.8$ Гц, 2H, CH₂).

ИК-спектр (cm^{-1}): 3280(NH), 1750(C=O), 1650(C=C) 1605(C=C).

Элементный анализ: C₁₂H₁₁N₃OS вычислено C-58.76% H-4.52% N-17.13%, найдено C-58.97% H-4.73% N-17.66%.

4.2.3.4. Синтез 3-гексил-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она (20)

В результате реакции 0.5 г (2.5 ммоль) 3-гексил-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она **5** и 0.24 мл (0.27 г, 2.5 ммоль) 2-пиридинкарбальдегида получили 0.48 г (67 %) 3-гексил-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она **20**.

$T_{пл} = 126-128$ °C.

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, ДМСО-d₆, δ , м.д.): 11.67 (уш.с, 1H, NH), 8.75 (д., $J=4.67$ Гц, 1H, H $_{\alpha}$ -Py), 7.89 (тд., $J_1=7.71$, $J_2=1.77$ Гц, 1H, H $_{\beta}$ -Py), 7.76 (д., $J=7.78$ Гц, 1H, H $_{\beta}$ -Py), 7.40 (дд., $J_1=4.80$ Гц, $J_2=1.01$ Гц, 1H, H $_{\gamma}$ -Py), 6.75 (с, 1H, =CH), 3.80 (т., $J=7.33$ Гц, 2H, CH₂N), 1.63 (м., 2H, -CH₂CH₂CH₂-), 1.28 (м., 6H, -CH₂CH₂CH₂-), 0.86 (т., $J=6.95$ Гц, 3H, CH₃).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3280(NH), 1750(C=O), 1600(C=C).

Элементный анализ: $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{OS}$ вычислено С – 62.28% Н – 6.57% N – 14.53% S – 11.07%; найдено С – 62.01% Н – 6.80% N – 14.40% S – 11.35%.

4.2.3.5. Синтез 3-гексаундецил-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она (21)

В результате реакции 0.37 г (1 ммоль) 3-гексаундецил-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она **6** и 0.1 мл (0.115 г, 1 ммоль) 2-пиридинкарбальдегида получили 0.39 г (83 %) 3-гексаундецил-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она **21**.

$T_{\text{пл}} = 99-101\text{ }^\circ\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.66 (уш.с, 1H, NH), 8.75 (д., $J=4.67$ Гц, 1H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 7.90 (тд., $J_1=7.71$, $J_2=1.77$ Гц, 1H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.74 (д., $J=7.78$ Гц, 1H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.41 (дд., $J_1=4.80$ Гц, $J_2=1.01$ Гц, 1H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 6.75 (с, 1H, =CH), 3.78 (т., $J=7.23$ Гц, 2H, CH_2N), 1.62 (м., 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.27 (м., 26H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 0.87 (т., $J=6.58$ Гц, 3H, CH_3).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3285(NH), 1755(C=O), 1600(C=C).

Элементный анализ: $\text{C}_{25}\text{H}_{39}\text{N}_3\text{OS}$ вычислено С – 69.93% Н – 9.09% N – 9.79% S – 7.46 %; найдено С – 69.43% Н – 9.08% N – 9.45% S – 7.52%.

4.2.3.6. Синтез 3-карбоэтокси-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она (22)

В результате реакции 0.35 г (1.7 ммоль) 3-карбоэтокси-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она **7** и 0.17 мл (0.19 г, 1.7 ммоль) 2-пиридинкарбальдегида получили 0.31 г (62 %) 3-карбоэтокси-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она **22**.

$T_{\text{пл}} = 292-294\text{ }^\circ\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.68 (уш.с, 1H, NH), 8.76 (д., $J=4.30$ Гц, 1H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 7.91 (тд., $J_1=7.82$ Гц, $J_2=1.76$ Гц, 1H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.78 (д., $J=7.82$ Гц, 1H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.42 (дд., $J_1=4.70$ Гц, $J_2=1.17$ Гц, 1H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 6.85 (с, 1H, =CH), 4.62 (с., 2H, CH_2N), 4.17 (м., 2H, CH_2O), 1.21 (т., 3H, CH_3).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3280(NH), 1750(C=O), 1700 (C=O), 1600(C=C).

4.2.3.7. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-этан-1,2-диилбис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] (23)

В результате реакции 0.152 г (0.6 ммоль) 3,3'-этан-1,2-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **8** и 0.11 мл (0.13 г, 1.2 ммоль) 2-пиридинкарбальдегида получили 0.055 г (21 %) (5Z,5'Z)-3,3'-этан-1,2-диилбис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **23**.

$T_{пл} = >330$ °C (с разл.).

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.95 (уш.с., 2H, NH), 8.74 (д., $J=5.4$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 7.89 (т., $J=7.6$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.74 (д., $J=7.8$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.38 (дд., $J_1=5$ Гц, $J_2=1.2$ Гц, 2H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 6.85 (с, 2H, =CH), 3.95 (с., 4H, CH_2N).

Масс-спектр (m/z (I, %)): 436 (2%) (M^+).

4.2.3.8. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-пропан-1,3-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-тиоксоимидазолин-4-она] (24)

В результате реакции 0.3 г (1.1 ммоль) 3,3'-пропан-1,3-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **9** 0.21 мл (0.24 г, 2,2 ммоль) 2-пиридинкарбальдегида получили 0.39 г (79 %) (5Z,5'Z)-3,3'-пропан-1,3-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **24**.

$T_{пл} = 275\text{-}277$ °C.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.72 (уш.с., 2H, NH), 8.75 (д., $J=4.5$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 7.90 (тд., $J_1=7.82$ Гц, $J_2=1.76$ Гц 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.76 (д., $J=7.82$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.40 (дд., $J_1=4.70$ Гц, $J_2=1.17$ Гц, 2H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 6.75 (с, 2H, =CH), 3.87 (т., $J=7.04$ Гц, 4H, CH_2N), 2.04 (м., 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3275(NH), 1755(C=O), 1600(C=C).

Элементный анализ: $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ вычислено С – 56.00% Н – 4.00% N – 18.66% S – 14.22%; найдено С – 55.82% Н – 4.08% N – 17.98% S – 13.93%.

4.2.3.9. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-пентан-1,5-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-тиоксоимидазолин-4-она] (25)

В результате реакции 0.2 г (0.67 ммоль) 3,3'-пентан-1,5-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **10** и 0.13 мл (0.143 г, 1.3 ммоль) 2-пиридинкарбальдегида получили 0.3 г (96 %) (5Z,5'Z)-3,3'-пентан-1,5-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **25**.

$T_{пл} = 282\text{-}284$ °C.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.68 (уш.с., 2H, NH), 8.75 (д., $J=4.50$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 7.89 (тд., $J_1=7.82$ Гц, $J_2=1.76$ Гц 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.71 (д., $J=7.82$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.40 (дд., $J_1=4.70$ Гц, $J_2=1.37$ Гц, 2H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 6.72 (с, 2H, =CH), 3.80 (т., $J=6.85$ Гц, 4H, CH_2N), 1.68 (м., 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 1.32 (м., 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3270(NH), 1750(C=O), 1605(C=C).

Элементный анализ: $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ вычислено С – 57.74% Н – 4.60% N – 15.57% S – 13.39%; найдено С – 57.35% Н – 4.20% N – 17.51% S – 12.94%.

4.2.3.10. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-гексан-1,6-диилбис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] (26)

В результате реакции 0.25 г (0.8 ммоль) 3,3'-гексан-1,6-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **11** и 0.16 мл (0.18 г, 1.6 ммоль) 2-пиридинкарбальдегида получили 0.32 г (82 %) (5Z,5'Z)-3,3'-гексан-1,6-диилбис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **26**.

$T_{пл} = 295-297\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.69 (уш.с., 2H, NH), 8.75 (д., $J=4.6$ Гц, 2H, H_{α} -Py), 7.89 (т., $J=1.86$ Гц, 2H, H_{β} -Py), 7.74 (д., $J=7.78$ Гц, 2H, H_{β} -Py), 7.39 (дд., $J_1=4.49$ Гц, $J_2=1.21$ Гц, 2H, H_{γ} -Py), 6.74 (с, 2H, =CH), 3.79 (т., $J=6.91$ Гц, 4H, CH_2N), 1.63 (м., 4H, CH_2), 1.33 (м., 4H, CH_2).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3280(NH), 1750(C=O), 1600(C=C).

Элементный анализ: $\text{C}_{24}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ вычислено С – 58.54% Н – 4.88% N – 17.07% S – 13.00%; найдено С – 58.31% Н – 4.16% N – 17.16% S – 12.78%.

4.2.3.11. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-октан-1,8-диилбис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] (27)

В результате реакции 0.25 г (0.73 ммоль) 3,3'-октан-1,8-диилбис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **12** и 0,14 мл (0.16 г, 1.5 ммоль) 2-пиридинкарбальдегида получили 0.3 г (80 %) (5Z,5'Z)-3,3'-октан-1,8-диилбис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **27**.

$T_{пл} = 228-230\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.67 (уш.с., 2H, NH), 8.75 (д., $J=4.6$ Гц, 2H, H_{α} -Py), 7.89 (т., $J=7.56$ Гц, 2H, H_{β} -Py), 7.74 (д., $J=7.45$ Гц, 2H, H_{β} -Py), 7.39 (т., $J_1=5.04$ Гц, 2H, H_{γ} -Py), 6.74 (с, 2H, =CH), 3.79 (т., $J=6.69$ Гц, 4H, CH_2N), 1.63 (м., 4H, CH_2), 1.29 (м., 8H, CH_2).

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 3280(NH), 1750(C=O), 1600(C=C).

Элементный анализ: $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ вычислено С – 60.00% Н – 5.38% N – 16.15%; найдено С – 59.86% Н – 5.01% N – 16.06% S – 12.09%.

4.2.3.12. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-[этан-1,2-диилбис(оксиэтан-2,1-диил)]бис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] (28)

В результате реакции 0.2 г (0.56 ммоль) 3,3'-[этан-1,2-диилбис(оксиэтан-2,1-диил)]бис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **13** и 0.11 мл (0.123 г, 1.15 ммоль) 2-пиридинкарбальдегида получили 0.25 г (83 %) (5Z,5'Z)-3,3'-[этан-1,2-диилбис(оксиэтан-2,1-диил)]бис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **28**.

$T_{пл} = 238-240\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.68 (уш.с., 2H, NH), 8.76 (д., $J=8.02$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 8.64 (д., $J=4.11$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.89 (тд., $J_1=7.82$ Гц, $J_2=1.57$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.38 (дд., $J_1=4.69$ Гц, $J_2=1.17$ Гц, 2H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 6.76 (с, 2H, =CH), 3.70 (т., $J=5.28$ Гц, 4H, CH_2N), 3.59 (т., $J=5.28$ Гц, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.10 (т., $J=5.28$ Гц, 4H, CH_2O).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 3280(NH), 1755(C=O), 1605(C=C).

Элементный анализ: $\text{C}_{25}\text{H}_{26}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2$ вычислено С – 55.75% Н – 4.87% N – 15.60% S – 11.90%; найдено С – 55.99% Н – 4.62% N – 15.21% S – 11.35%.

4.2.3.13. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-[бутан-1,4-диилбис(окси)]бис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] (29)

В результате реакции 0.1 г (0.23 ммоль) 3,3'-[бутан-1,4-диилбис(окси)]бис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **14** и 0.04 мл (0.05 г, 0.46 ммоль) 2-пиридинкарбальдегида получили 0.093 г (33 %) (5Z,5'Z)-3,3'-[бутан-1,4-диилбис(окси)]бис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **29**.

$T_{\text{пл}} = 264\text{-}266$ °C.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.67 (с., 1H, NH), 8.74 (д., $J=4.50$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 7.90 (тд., $J_1=7.63$ Гц, $J_2=1.76$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.73 (д., $J=7.63$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.40 (дд., $J_1=4.69$ Гц, $J_2=1.17$ Гц, 2H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 6.73 (с, 2H, =CH), 3.87 (т., $J=6.85$ Гц, 4H, CH_2N), 3.36 (т., $J=4.89$ Гц, 8H, CH_2O), 1.84 (м., 12H, CH_2CH_2).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 3280(NH), 1750(C=O), 1705 (C-O), 1605(C=C).

4.2.3.14. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-(дисульфандиилдиэтан-2,1-диил)бис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] (30)

В результате реакции 0.05 г (0.14 ммоль) 3,3'-(дисульфандиилдиэтан-2,1-диил)бис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **15** и 0.027 мл (0.03 г, 0.28 ммоль) 2-пиридинкарбальдегида получили 0,055 г (73 %) (5Z,5'Z)-3,3'-(дисульфандиилдиэтан-2,1-диил)бис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **30**.

$T_{\text{пл}} = 235\text{-}236$ °C.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.75 (с., 1H, NH), 8.75 (д., $J=4.11$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 7.90 (тд., $J_1=7.63$ Гц, $J_2=1.76$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.74 (д., $J=7.43$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.40 (дд., $J_1=4.89$ Гц, $J_2=1.17$ Гц, 2H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 6.75 (с, 2H, =CH), 4.13 (т., $J=6.26$ Гц, 4H, CH_2N), 3.09 (т., $J=6.26$ Гц, 4H, CH_2S).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 3275(NH), 1750(C=O), 1600(C=C).

4.2.3.15. Синтез (5*Z*,5'*Z*)-3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] (31)

В результате реакции 0.3 г (0.7 ммоль) 3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис(2-тиоксоимидазолин-4-она) **16** и 0,13 мл (0.14 г, 1.3 ммоль) 2-пиридинкарбальдегида получили 0.34 г (81 %) (5*Z*,5'*Z*)-3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **31**.

$T_{пл} = 293-295\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, ДМСО- d_6 , δ , м.д.): 11.90 (с., 1H, NH), 8.79 (д., $J=5.28$ Гц, 2H, H_{α} -Py), 7.92 (тд., $J_1=7.82$ Гц, $J_2=1.76$ Гц, 2H, H_{β} -Py), 7.74 (д., $J=7.82$ Гц, 2H, H_{β} -Py), 7.43 (м., 10H, H_{γ} -Py, H-Ph), 6.81 (с, 2H, =CH).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 3280(NH), 1760(C=O), 1605(C=C).

4.2.4. АЛКИЛИРОВАНИЕ 3,5-ДИЗАМЕЩЕННЫХ 2-ТИОГИДАНТОИНОВ

4.2.5. АЛКИЛИРОВАНИЕ ПРОИЗВОДНЫХ ЗАМЕЩЕННЫХ В 3-М И 5-М ПОЛОЖЕНИИ 2-ТИОГИДАНТОИНОВ МЕТИЛИОДИДОМ

Общая методика:

К 1 экв. замещенного 2-тиогидантоина добавляли 1-2 мл воды, 1-2 мл этилового спирта и 1 экв. (для соединений **19**, **21**, **22**) или 2 экв. (для соединений **24-28**, **31**) 10%-ого водного раствора КОН. После полного растворения 2-тиогидантоина добавляли метилиодид и перемешивали при комнатной температуре в течение 2 часов. Полученную смесь охлаждали до $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Выпавший осадок отфильтровывали и промывали этиловым спиртом и диэтиловым эфиром.

4.2.5.1. Синтез 3-аллил-5-((*Z*)-2-пиридилметилен)-2-метилтио-имидазолин-4-она (32)

В результате реакции 2 г (0.8 ммоль) 3-аллил-5-((*Z*)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она **19** и 1,38 мл (3.68 г, 0.026 моль) метилиодида получили 1.45 г (74%) 3-аллил-5-((*Z*)-2-пиридилметилен)-2-метилтио-имидазолин-4-она **32**.

$T_{пл} = 183-185\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 - d_6 , δ , м.д.): 8.86(д, $J=8.0$ Гц, 1H, H_{α} -Py), 8.71(д, $J=3.9$ Гц, 1H, H_{β} -Py), 7.80(тд, $J_1=8.2$ Гц, $J_2=4.8$ Гц, 1H, H_{γ} -Py), 7.41(м, 5H, H_{β} -Py), 7.25(м, 2H, CH=), 6,05 (м, 1H, =CH-) 5.21 (м, 2H, CH₂=), 4.02 (д, $J=7.0$ Гц, 2H, -CH₂-N), 2.81(с, 3H, -CH₃).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 1730 (C=O), 1650 (C=N), 1660 (C=C), 1600 (C=C).

Элементный анализ: $C_{13}H_{13}N_3OS$ вычислено С% 60.21% Н 5.05% N 16.20%; найдено С 59.87% Н 5.34% N 16.40%.

4.2.5.2. Синтез 3-гексадецил-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-метилтио-имидазолин-4-она (33)

В результате реакции 0.2 г (0.46 ммоль) 3-гексадецил-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она **21**, 0.07 г (0.46 ммоль) KOH в 0.7 мл воды и 0.03 мл (0.08 г, 0.55 ммоль) метилиодида получили 0.19 г (92 %) 3-гексадецил-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-метилтио-имидазолин-4-она **33**.

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 8.81 (д., $J=8.02$ Гц, 1H, H_α -Py), 8.69 (м., 1H, H_β -Py), 7.76 (тд., $J_1=8.02$ Гц, $J_2=1.76$ Гц, 1H, H_β -Py), 7.23 (дд., $J_1=4.89$ Гц, $J_2=1.17$ Гц, 1H, H_γ -Py), 7.13 (с, 1H, =CH), 3.61 (т., $J=7.43$ Гц, 2H, CH_2N), 2.78 (с., 3H, CH_3S), 1.27 (м., 28H, $-CH_2CH_2CH_2-$), 0.90 (т., $J=6.65$ Гц, 3H, CH_2CH_3).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 1740(C=O), 1670(C=N), 1600(C=C).

4.2.5.3. Синтез 3-карбоэтокси-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она (34)

В результате реакции 0.15 г (0.5 ммоль) 3-карбоэтокси-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4H-имидазол-4-она **22**, 0.04 г (0.5 ммоль) KOH в 0.4 мл воды и 0.04 мл (0.09 г, 0.6 ммоль) метилиодида получили 0.016 г (31 %) 3-карбоэтокси-5-((Z)-2-пиридилметилен)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она **34**.

Спектр ЯМР 1H (400 МГц, $CDCl_3$, δ , м.д.): 9.81 (д., $J=6.44$ Гц, 1H, H_α -Py), 9.30 (д., $J=8.34$ Гц, 1H, H_β -Py), 8.51 (тд., $J_1=8.21$ Гц, $J_2=1.52$ Гц, 1H, H_γ -Py), 8.03 (т., $J=6.57$ Гц, 1H, H_β -Py), 6.90 (с, 1H, =CH), 4.31 (кв., $J=7.07$ Гц, 2H, CH_2O), 2.85 (с., 3H, CH_3S), 1.34 (т., $J=7.07$ Гц, 3H, CH_2CH_3).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 1760(C=O), 1650(C=N), 1605(C=C).

4.2.5.4. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-пропан-1,3-диилбис[5-(2-пиридилметилен)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она] (35)

В результате реакции 0.2 г (0.44 ммоль) (5Z,5'Z)-3,3'-пропан-1,3-диилбис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **24**, 0.05 г (0.88 ммоль) KOH в 0.5 мл воды и 0.03 мл (0.07 г, 0.53 ммоль) метилиодида получили 0.18 г (84 %) (5Z,5'Z)-3,3'-пропан-1,3-диилбис[5-(2-пиридилметилен)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она] **35**.

$T_{пл} = 247-249$ °C.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.78 (д., $J=8.02$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 8.69 (д., $J=4.70$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.88 (тд., $J_1=8.02$ Гц, $J_2=1.96$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.23 (м., 2H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 7.14 (с, 2H, =CH), 3.71 (т., $J=7.43$ Гц, 4H, CH_2N), 2.77 (с., 6H, CH_3S), 2.12 (м., 2H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 1750(C=O), 1640(C=N), 1600(C=C).

Элементный анализ: $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ вычислено С – 57.74% Н – 4.60% N – 17.57%;
найдено С – 57.88% Н – 4.22% N – 17.85%.

4.2.5.5. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-пентан-1,5-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она)] (36)

В результате реакции 0.2 г (0.42 ммоль) (5Z,5'Z)-3,3'-пентан-1,5-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-тиоксоимидазолин-4-она)] **25**, 0.05 г (0.85 ммоль) KOH в 0.5 мл воды и 0.03 мл (0.07 г, 0.5 ммоль) метилиодида получили 0.154 г (72 %) (5Z,5'Z)-3,3'-пентан-1,5-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она)] **36**.

$T_{\text{пл}} = 119\text{-}121$ °C.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.79 (д., $J=8.02$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 8.69 (д., $J=3.91$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.76 (тд., $J_1=8.02$ Гц, $J_2=1.76$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.22 (дд., $J_1=3.72$ Гц, $J_2=1.17$ Гц, 2H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 7.12 (с, 2H, =CH), 3.63 (т., $J=7.04$ Гц, 4H, CH_2N), 2.78 (с., 6H, CH_3), 1.75 (м., 6H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 1760(C=O), 1650(C=N), 1605(C=C).

4.2.5.6. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-гексан-1,6-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она)] (37)

В результате реакции 0.3 г (0.6 ммоль) (5Z,5'Z)-3,3'-гексан-1,6-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-тиоксоимидазолин-4-она)] **26**, 0.07 г (1.2 ммоль) KOH в 0.7 мл воды и 0.09 мл (0.2 г, 1.5 ммоль) метилиодида получили 0.205 г (65 %) (5Z,5'Z)-3,3'-гексан-1,6-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она)] **37**.

$T_{\text{пл}} = 181\text{-}183$ °C.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.79 (д., $J=7.82$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 8.69 (д., $J=4.70$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.76 (тд., $J_1=7.63$ Гц, $J_2=1.76$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.22 (дд., $J_1=4.89$ Гц, $J_2=1.17$ Гц, 2H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 7.12 (с, 2H, =CH), 3.62 (т., $J=7.24$ Гц, 4H, CH_2N), 2.77 (с., 6H, CH_3), 1.71 (м., 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.41 (м., 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 1740(C=O), 1650(C=N), 1605(C=C).

4.2.5.7. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-октан-1,8-диилбис[5-(2-пиридилметилен)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она] (38)

В результате реакции 0.25 г (0.96 ммоль) 3(5Z,5'Z)-3,3'-октан-1,8-диилбис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **27**, 0.1 г (1.9 ммоль) КОН в 1 мл воды и 0.14 мл (0.33 г, 2.3 ммоль) метилиодида получили 0.131 г (25 %) (5Z,5'Z)-3,3'-октан-1,8-диилбис[5-(2-пиридилметилен)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она] **38**.

$T_{пл} = 105-106\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.79 (д., $J=8.11$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 8.69 (д., $J=4.93$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.75 (тд., $J_1=8.00$ Гц, $J_2=1.75$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.23 (дд., $J_1=4.93$ Гц, $J_2=1.21$ Гц, 2H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 7.12 (с, 2H, =CH), 3.62 (т., $J=7.13$ Гц, 4H, CH_2N), 2.77 (с., 6H, CH_3), 1.71 (м., 6H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.40 (м., 6H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 1760(C=O), 1640(C=N), 1600(C=C).

4.2.5.8. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-[этан-1,2-диилбис(оксиэтан-2,1-диил)]бис[5-(2-пиридилметилен)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она] (39)

В результате реакции 0.1 г (0.2 ммоль) (5Z,5'Z)-3,3'-[этан-1,2-диилбис(оксиэтан-2,1-диил)]бис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **28**, 0.02 г (КОН в 0.2 мл воды и 0.02 мл (0.05 г, 0.38 ммоль) метилиодида получили 0.053 г (50 %) (5Z,5'Z)-3,3'-[этан-1,2-диилбис(оксиэтан-2,1-диил)]бис[5-(2-пиридилметилен)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она] **39**.

$T_{пл} = 102-104\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.76 (д., $J=8.00$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 8.64 (д., $J=4.89$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.88 (тд., $J_1=7.82$ Гц, $J_2=1.56$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.34 (дд., $J_1=4.89$ Гц, $J_2=1.17$ Гц, 2H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 6.76 (с, 2H, =CH), 3.70 (т., $J=5.28$ Гц, 4H, CH_2N), 3.59 (т., $J=5.28$ Гц, 4H, CH_2O), 3.52 (с., 4H, CH_2O), 2.71 (с., 6H, CH_3).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 1750(C=O), 1650(C=N), 1600(C=C).

4.2.5.9. Синтез (5Z,5'Z)-3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис[5-(2-пиридилметилен)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она] (40)

В результате реакции 0.05 г (0.08 ммоль) (5Z,5'Z)-3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис[5-(2-пиридилметилен)-2-тиоксоимидазолин-4-она] **31**, 0.09 г (0.2 ммоль) КОН в 0.9 мл воды и 0.01 мл (0.03 г, 0.2 ммоль) метилиодида получили 0.016 г (31 %) (5Z,5'Z)-3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис[5-(2-пиридилметилен)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она] **40**.

$T_{пл} = 173-175\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.79 (д., $J=5.28$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 7.92 (тд., $J_1=7.82$ Гц, $J_2=1.76$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.74 (д., $J=7.82$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.43 (м., 10H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$, H-Ph), 7.22 (с, 2H, $=\text{CH}$), 2.74 (с., 6H, CH_3).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 1755($\text{C}=\text{O}$), 1650($\text{C}=\text{N}$), 1600($\text{C}=\text{C}$).

Элементный анализ: $\text{C}_{32}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_4$ вычислено С – 58.88% Н – 3.71% N – 12.87%; найдено С – 58.75% Н – 3.22% N – 12.64%.

4.2.6. АЛКИЛИРОВАНИЕ 3,5-ДИЗАМЕЩЕННЫХ 2-ТИОГИДАНТОИНОВ 1,2-ДИБРОМЭТАНОМ И 9,10-БИС(ХЛОРМЕТИЛ)-АНТРАЦЕНОМ

Общая методика:

К смеси 2 экв. производных 2-тиогидантоинов **17-21** и 3 экв. сухого K_2CO_3 в диметилформамиде при комнатной температуре при перемешивании добавляли 1 экв. дигалогенида. Реакционную смесь перемешивали в течение двух часов при комнатной температуре. После этого смесь выливали на лед. Образовавшийся осадок отфильтровывали и промывали водой, затем диэтиловым эфиром.

4.2.6.1. Синтез (5*Z*, 5'*Z*)-2,2'-(этан-1,2-диилдитиодирил)бис(5-(2-пиридилметилден)-3-гексил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она) (**42**)

В результате реакции 0.2 г (0.7 ммоль) 3-гексил-5-((*Z*)-2-пиридилметилден)-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она **20**, 0.03 мл (0.06 г, 0.34 ммоль) 1,2-дибромэтана и 0.14 г (1 ммоль) карбоната калия получили 0.22 г (51 %) (5*Z*, 5'*Z*)-2,2'-(этан-1,2-диилдитиодирил)бис(5-(2-пиридилметилден)-3-гексил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она) **42**.

$T_{\text{пл}} = 122\text{-}124$ °C.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.69 (д., $J=8.02$ Гц, 2H, $\text{H}_\alpha\text{-Py}$), 8.65 (дд., $J_1=4.89$ Гц, $J_2=1.76$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.64 (тд., $J_1=8.02$ Гц, $J_2=1.76$ Гц, 2H, $\text{H}_\beta\text{-Py}$), 7.20 (дд., $J_1=4.89$ Гц, $J_2=1.76$ Гц, 2H, $\text{H}_\gamma\text{-Py}$), 7.12 (с, 2H, $=\text{CH}$), 3.92 (с, 4H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 3.63 (т., $J=7.43$ Гц, 4H, CH_2N), 1.63 (м., 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.34 (м., 12H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 0.91 (т., $J=7.04$ Гц, 6H, CH_3).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 1710($\text{C}=\text{O}$), 1670($\text{C}=\text{N}$), 1640($\text{C}=\text{C}$).

4.2.6.2. Синтез (5*Z*, 5'*Z*)-2,2'-(этан-1,2-диилдитиодирил)бис(5-(2-пиридилметилден)-3-гексаундецил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она) (**43**)

В результате реакции 0.2 г (0.46 ммоль) 3-гексаундецил-5-((*Z*)-2-пиридилметилден)-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она **21**, 0.018 мл (0.04 г, 0.23 ммоль) 1,2-дибромэтана и 0.096

г (0.7 ммоль) карбоната калия получили 0.066 г (32 %) (5*Z*, 5'*Z*)-2,2'-(этан-1,2-диилдитиодиил)бис(5-(2-пиридилметилен)-3-гексадецил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она) **43**.

$T_{пл} = 75-77\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.69 (д., $J=8.02$ Гц, 2H, $\text{H}_{\alpha}\text{-Py}$), 8.62 (дд., $J_1=4.93$ Гц, $J_2=1.96$ Гц, 2H, $\text{H}_{\beta}\text{-Py}$), 7.63 (тд., $J_1=8.02$ Гц, $J_2=1.96$ Гц, 2H, $\text{H}_{\beta}\text{-Py}$), 7.20 (дд., $J_1=4.93$ Гц, $J_2=1.76$ Гц, 2H, $\text{H}_{\gamma}\text{-Py}$), 6.71 (с, 2H, =CH), 3.91 (с, 4H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 3.64 (т., $J=7.04$ Гц, 4H, CH_2N), 1.63 (м., 4H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1.30 (м., 52H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 0.84 (т., $J=7.04$ Гц, 6H, CH_3).

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 1710(C=O), 1670(C=N), 1640(C=C).

4.2.6.3. Синтез (5*Z*, 5'*Z*)-2,2'-(антрацен-9,10)-диилбис(метилен)]бис(тиодиил)бис(5-(2-пиридилметилен)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она) (44)

В результате реакции 0.7 г (3 ммоль) 3-метил-5-((*Z*)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она **17**, 0.423 г (1.5 ммоль) 9,10-бис(хлорметил)-антрацена и 0.64 г (4.6 ммоль) карбоната калия получили 0.85 г (88%) (5*Z*, 5'*Z*)-2,2'-(антрацен-9,10)-диилбис(метилен)]бис(тиодиил)бис(5-(2-пиридилметилен)-3-метил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она) **44**.

$T_{пл} = 251-253\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.94 (д., $J=8.02$ Гц, 2H, $\text{H}_{\alpha}\text{-Py}$), 8.64 (д., $J=3.91$ Гц, 2H, $\text{H}_{\beta}\text{-Py}$), 8.42 (д., $J=7.04$ Гц, 4H, H-ant), 7.75 (м., 2H, $\text{H}_{\beta}\text{-Py}$), 7.55 (д., $J=7.04$ Гц, 4H, H-ant), 7.21 (т., $J=8.02$ Гц, 2H, $\text{H}_{\gamma}\text{-Py}$), 7.09 (с, 2H, =CH), 5.66 (с, 4H, $\text{CH}_2\text{-S}$), 3.64 (с., 6H, CH_3N),.

ИК-спектр (ν/cm^{-1}): 1720(C=O), 1675(C=N), 1640(C=C).

Элементный анализ: $\text{C}_{36}\text{H}_{30}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2$ вычислено С – 67,18% Н – 4,66% N – 13,06% S – 9,95%; найдено С – 67,44% Н – 4,37% N – 12,65% S – 9,45%.

4.2.6.4. Синтез (5*Z*, 5'*Z*)-2,2'-(антрацен-9,10)-диилбис(метилен)]бис(тиодиил)бис(5-(2-пиридилметилен)-3-фенил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она) (45)

В результате реакции 0.15 г (0.53 ммоль) 3-фенил-5-((*Z*)-2-пиридилметилен)-2-тиоксотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она **18**, 0.07 г (0.53 ммоль) 9,10-бис(хлорметил)-антрацена и 0.112 г (0.8 ммоль) карбоната калия получили 0.2 г (97 %) (5*Z*, 5'*Z*)-2,2'-(антрацен-9,10)-диилбис(метилен)]бис(тиодиил)бис(5-(2-пиридилметилен)-3-фенил-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-она) **45**.

$T_{пл} = 271\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Спектр ЯМР ^1H (400 МГц, CDCl_3 , δ , м.д.): 8.95 (д., $J=8.02$ Гц, 2H, $\text{H}_{\alpha}\text{-Py}$), 8.66 (д., $J=3.91$ Гц, 2H, $\text{H}_{\beta}\text{-Py}$), 8.42 (д., $J=7.04$ Гц, 4H, H-ant), 7.75 (м., 2H, $\text{H}_{\beta}\text{-Py}$), 7.56 (м., 10H, H-ant, H-Ph),

7.47 (м, 4H, H-Ph) 7.22 (т., J=8.02 Гц, 2H, H_γ-Py), 7.07 (с, 2H, =CH), 5.66 (с, 4H, CH₂-S), 3.65 (с., 6H, CH₃N),.

ИК-спектр ($\nu/\text{см}^{-1}$): 1710(C=O), 1670(C=N), 1640(C=C).

Элементный анализ: C₄₆H₃₂N₆O₂S₂ вычислено C – 72,23% H – 4,22% N – 10,99% S – 8,38%; найдено C – 71,98% H – 4,64% N – 10,56% S – 8,63%.

4.2.7. ПОЛУЧЕНИЕ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ЛИГАНДОВ С ХЛОРИДОМ МЕДИ(II)

Общая методика:

К раствору лиганда **32**, **35-41**, **45** (концентрация 10⁻³ М) в 2-3 мл дихлорметана прибавляли 2 мл метанола для достижения расслоения. Затем медленно прибавляли раствор дигидрата хлорида меди(II) той же концентрации в 2-3 мл метанола. Реакционную смесь плотно закрывали и оставляли до выпадения осадка.

4.2.7.1. Взаимодействие 3-аллил-5-((Z)-2-пиридилметилден)-2-метилтио-имидазолин-4-она с дихлоридом меди(II) (**32a**)

В результате реакции 0.05 г (0.19 ммоль) (3-аллил-5-((Z)-2-пиридилметилден)-2-метилтио-имидазолин-4-она и 0.03 г (0.19 ммоль) CuCl₂·2H₂O получили 0.05 г (68%) соединения **32a**.

T_{пл}=267-269°C.

Элементный анализ: C₂₄H₂₀ClCu₂N₆O₂S₂ вычислено C - 44.27%, H - 3.10%, N - 12.91%; найдено C - 44.56%, H - 2.81%, N - 12.34%.

4.2.7.2. Синтез [(5Z,5'Z)-3,3'-пропан-1,3-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-он]] медь(II) дихлорида (**35a**)

В результате реакции 0.01 г (0.02 ммоль) (5Z,5'Z)-3,3'-пропан-1,3-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она] **35** с 0.007 г (0.038 ммоль) CuCl₂·2H₂O получили 0.003 г (20 %) [(5Z,5'Z)-3,3'-пропан-1,3-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-он]] медь(II) дихлорида **35a**.

Элементный анализ: C₂₅H₂₆N₆O₂S₂Cu₂Cl₄ вычислено C - 38.72% H - 3.58% N - 10.84% S - 8.27%; найдено C - 38.40% H - 3.26% N - 10.14% S - 8.89%.

4.2.7.3. Синтез [(5Z,5'Z)-3,3'-пентан-1,5-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-он]] медь(II) дихлорида (**36a**)

В результате реакции 0.01 г (0.019 ммоль) (5Z,5'Z)-3,3'-пентан-1,5-диилбис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она] **36** с 0.007 г (0.038 ммоль)

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ получили 0.003 г (18 %) [(5*Z*,5'*Z*)-3,3'-пентан-1,5-диилбис[5-(2-пиридилметиле)-2-метилтиотетрагидро-4*H*-имидазол-4-он)] медь(II) дихлорида **36a**.

Элементный анализ: $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2\text{Cu}_2\text{Cl}_4$ вычислено С - 36.96% Н - 2.97% N - 11.24% S, 8.58; найдено С - 36.79% Н - 3.17% N - 10.99 % S - 8.72%.

4.2.7.4. Синтез [(5*Z*,5'*Z*)-3,3'-гексан-1,6-диилбис[5-(2-пиридилметиле)-2-метилтиотетрагидро-4*H*-имидазол-4-он)] медь(II) дихлорида (**37a**)

В результате реакции 0.01 г (0.019 ммоль) (5*Z*,5'*Z*)-3,3'-гексан-1,6-диилбис[5-(2-пиридилметиле)-2-метилтиотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она] **37** с 0.007 г (0.038 ммоль) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ получили 0.002 г (13 %) [(5*Z*,5'*Z*)-3,3'-гексан-1,6-диилбис[5-(2-пиридилметиле)-2-метилтиотетрагидро-4*H*-имидазол-4-он)] медь(II) дихлорида **37a**.

Элементный анализ: $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2\text{Cu}_2\text{Cl}_4$ вычислено С - 39.49% Н - 3.54% N - 10.63% S - 8.10%; найдено С - 39.75% Н - 3.47% N - 10.84% S - 7.89%.

4.2.7.5. Синтез [(5*Z*,5'*Z*)-3,3'-октан-1,8-диилбис[5-(2-пиридилметиле)-2-метилтиотетрагидро-4*H*-имидазол-4-он)] медь(II) дихлорида (**38a**)

В результате реакции 0.01 г (0.018 ммоль) (5*Z*,5'*Z*)-3,3'-октан-1,8-диилбис[5-(2-пиридилметиле)-2-метилтиотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она] **38** с 0.006 г (0.036 ммоль) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ получили 0.002 г (14 %) [(5*Z*,5'*Z*)-3,3'-октан-1,8-диилбис[5-(2-пиридилметиле)-2-метилтиотетрагидро-4*H*-имидазол-4-он)] медь(II) дихлорида **38a**.

Элементный анализ: $\text{C}_{28}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_2\text{S}_2\text{Cu}_2\text{Cl}_4$ вычислено С - 41.07% Н - 3.92% N - 10.27% S - 7.82%; найдено С - 41.37% Н - 4.11% N - 10.27% S - 7.64%.

4.2.7.6. Синтез [(5*Z*,5'*Z*)-3,3'-[этан-1,2-диилбис(оксиэтан-2,1-диил)]бис[5-(2-пиридилметиле)-2-метилтиотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она)] медь(II) дихлорида (**39a**)

В результате реакции 0.005 г (0.009 ммоль) (5*Z*,5'*Z*)-3,3'-[этан-1,2-диилбис(оксиэтан-2,1-диил)]бис[5-(2-пиридилметиле)-2-метилтиотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она] **39** с 0.003 г (0.018 ммоль) $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ получили 0.002 г (25 %) [(5*Z*,5'*Z*)-3,3'-[этан-1,2-диилбис(оксиэтан-2,1-диил)]бис[5-(2-пиридилметиле)-2-метилтиотетрагидро-4*H*-имидазол-4-она)] медь(II) дихлорида **39a**.

Элементный анализ: $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_6\text{O}_4\text{S}_2\text{Cu}_2\text{Cl}_4$ вычислено С - 38.00% Н - 3.41% N - 10.23% S - 7.79%; найдено С - 38.20% Н - 3.61% N - 10.25% S - 7.57%.

4.2.7.7. Синтез [(5Z,5'Z)-3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она]]медь(II) дихлорида (40a)

В результате реакции 0.005 г (0.007 ммоль) (5Z,5'Z)-3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она] **40** с 0.003 г (0.015 ммоль) CuCl₂·2H₂O получили 0.002 г (33 %) [(5Z,5'Z)-3,3'-(дисульфандиилдифенил-4,1-диил)бис[5-(2-пиридилметилден)-2-метилтиотетрагидро-4H-имидазол-4-она]]медь(II) дихлорида **40a**.

Элементный анализ: C₃₂H₂₄N₆O₂S₄Cu₂Cl₄ вычислено С – 41.65% Н – 2.60% N – 9.11% S – 13.88%; найдено С – 41.44% Н – 2.04% N – 9.62% S – 13.27%.

4.2.7.8. Синтез [(5Z)-3-фенил-2-(2-пропин-1-илтио)5-(2-пиридилметилен)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она]медь(II) дихлорида (41a)

В результате реакции 0.02 г (0.065 ммоль) (5Z)-3-фенил-2-(2-пропин-1-илтио)5-(2-пиридилметилен)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она **41** и 0.009 г (0,065 ммоль) CuCl₂·2H₂O получили 0.005 г (17 %) [(5Z)-3-фенил-2-(2-пропин-1-илтио)5-(2-пиридилметилен)-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она]медь(II) дихлорида **41a**.

Элементный анализ: C₁₈H₁₃N₃OSCuCl₂ вычислено С – 47.58% Н – 2.86% N – 9.25% S – 7.05%; найдено С – 50.70% Н – 2.98% N – 11.39% S – 9.23%.

4.2.7.9. Взаимодействие (5Z,5'Z)-2,2'-(антрацен-9,10)-диилбис(метилен)]бис(тиодиил)бис(5-(2-пиридилметилен)-3-фенил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она) с дихлоридом меди(II) (45a)

В результате реакции 0.03 г (0.039 ммоль) (5Z,5'Z)-2,2'-(антрацен-9,10)-диилбис(метилен)]бис(тиодиил)бис(5-(2-пиридилметилен)-3-фенил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она) **45** и 0.014 г (0.039 ммоль) CuCl₂·2H₂O получили 0.01 г (25 %) комплекса **45a** вместо ожидаемого координационного соединения [(5Z, 5'Z)-2,2'-(антрацен-9,10)-диилбис(метилен)]бис(тиодиил)бис(5-(2-пиридилметилен)-3-фенил-3,5-дигидро-4H-имидазол-4-она)]медь(II) дихлорида.

Элементный анализ: C₄₆H₃₂N₆O₂S₂Cu₂Cl₄ вычислено С – 53.44% Н – 3.12% N – 8.13% S – 6.20%; найдено С – 49.82% Н – 2.79% N – 11.62% S – 8.87%.

4.3. ПОДБОР РАСТВОРИТЕЛЯ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИГАНДОВ И КОМПЛЕКСОВ

4.3.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

Растворитель

В 6 колб объемом 20 мл помещали ДМСО и дистиллированную воду в следующих объемных соотношениях: 5:15, 6:14, 7:13, 8:12, 9:11, 10:10. Растворы тщательно перемешивали.

Растворы лигандов

Растворы лигандов готовили в максимальной концентрации путем растворения навесок в ДМСО. Максимальные концентрации **32**, **37** и **41** составили $c=2.47 \times 10^{-2}$ М, $c=3.9 \times 10^{-3}$ М и $c=1.24 \times 10^{-3}$ М соответственно. Для регистрации спектров растворы лигандов максимальной концентрации разбавляли по приведенной ниже методике. Далее в каждую из 6 пробирок добавляли по 10 мл растворителя с различным объемным соотношением ДМСО:вода и 1 мл раствора соответствующего лиганда.

Разбавление растворов лигандов

Лиганд 37: в 6 пробирок помещали по 1 мл раствора лиганда ($c=3.9 \times 10^{-3}$ М) с помощью микропипетки и доводили до 5 мл растворами ДМСО:вода в соотношениях 5:15, 6:14, 7:13, 8:12, 9:11, 10:10 соответственно. Полученная концентрация лиганда в растворе составила $c=7.1 \times 10^{-5}$ М.

Лиганды 32 и 41: в 6 пробирок помещали по 0.5 мл раствора соответствующего лиганда и доводили до 5 мл ДМСО:вода в объемных соотношениях 5:15, 6:14, 7:13, 8:12, 9:11, 10:10 соответственно. Полученная концентрация лиганда **32** в растворе составила $c=2.23 \times 10^{-4}$ М, концентрация лиганда **41** в растворе: $c=1.15 \times 10^{-4}$ М.

Растворы комплексов

Растворы комплексов готовили в максимальной концентрации. Для этого навески массами $m=0.0129$ г, $m=0.0173$ г и $m=0.0164$ г для комплексов **32а**, **37а** и **41а** соответственно растворяли в 6 мл ДМСО. Максимальные концентрации **32а**, **37а** и **41а** составили $c=5.46 \times 10^{-3}$ М, $c=3.65 \times 10^{-3}$ М и $c=3.48 \times 10^{-3}$ М соответственно.

По 1 мл полученного раствора соответствующего лиганда переносили в одну из 6 пробирок. В каждую пробирку прибавляли по 10 мл растворителя в объемных соотношениях 5:15, 6:14, 7:13, 8:12, 9:11, 10:10.

4.3.2. ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Перед регистрацией спектра поглощения раствора каждого лиганда предварительно регистрировали базовую линию соответствующего этому раствору растворителя ДМСО:вода.

Растворимость лигандов и комплексов

Из зарегистрированных спектров ($\lambda=200-600$ нм) растворов с различным соотношением ДМСО:вода, вычитали базовую линию — спектр поглощения соответствующего растворителя ДМСО:вода. В выбранном диапазоне длин волн 360-425, 365-414 и 390-463 нм для **32a**, **37a** и **41a**, соответственно, усредняли оптическую плотность по длинам волн для каждого соотношения. Строили график зависимости усредненной таким образом оптической плотности, нормированной на максимальное значение в серии от объемного соотношения ДМСО:вода.

4.4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНСТАНТЫ УСТОЙЧИВОСТИ ПО РАЗРУШЕНИЮ КОМПЛЕКСА

4.4.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

Для приготовления растворов использовали растворитель ДМСО:вода (объемные соотношения 9:11). В мерных колбах объемом 25 мл готовили растворы комплексов с концентрацией $c=2 \times 10^{-5}$ М. Для приготовления раствора ЭДТА с концентрациями $c=4 \times 10^{-5}$ М и $c=6 \times 10^{-5}$ М навески ЭДТА массами $m=0.0015$ г и $m=0.0044$ г помещали в мерные колбы объемом 100 и 200 мл соответственно и растворяли в растворителе, доводя получаемый раствор до метки. Для разрушения комплекса **32a** готовили растворы с соотношениями комплекс-ЭДТА: 1:0.5, 1:0.8, 1:1, 1:1.3, 1:1.6, 1:1.8 и 1:2. Для разрушения комплексов **37a** и **41a** готовили растворы со следующими соотношениями комплекс-ЭДТА: 1:1.8, 1:2, 1:2.3, 1:2.7, 1:3. Растворы ЭДТА с концентрациями $c=1 \times 10^{-5}$ М, $c=1.6 \times 10^{-5}$ М, $c=2 \times 10^{-5}$ М, $c=2.6 \times 10^{-5}$ М, $c=3.2 \times 10^{-5}$ М, $c=3.6 \times 10^{-5}$ М для разрушения **32a** и растворы ЭДТА с концентрациями $c=3.6 \times 10^{-5}$ М, $c=4 \times 10^{-5}$ М, $c=4.6 \times 10^{-5}$ М, $c=5.4 \times 10^{-5}$ М для разрушения **41a** и **37a** готовили из исходных $c=4 \times 10^{-5}$ М и $c=6 \times 10^{-5}$ М растворов соответственно методом разбавления. Затем в пробирках смешивали по 2 мл полученного комплекса и раствора ЭДТА. В качестве базовой линии при снятии спектров использовали растворитель ДМСО-вода в соотношении 9:11. Также сняты спектры комплексов с концентрацией 1×10^{-5} М.

4.4.2. ОБРАБОТКА ДАННЫХ

Для конкурирующей реакции по металлу в качестве лиганда был взят раствор ЭДТА, комплекс меди с которым имеет $\lg\beta(\text{CuY})=18.80$. Измерения проводились при pH 7, следовательно, $\alpha(\text{Y})=0.00048$, а условная константа $\beta'(\text{CuY})=3.03 \times 10^{15}$.

Из зарегистрированных спектров вычитали базовую линию. Спектр нормировали: значения оптических плотностей делили на величины оптических плотностей при тех же длинах волн спектра раствора комплекса той же концентрации без добавления ЭДТА.

Для расчета условной константы для комплекса **32a** выведена формула из уравнений материального баланса по меди, ЭДТА и лиганду:

$$\begin{cases} C_Y = [Y] + [\text{CuY}] \\ C_{\text{Cu}} = [\text{CuY}] + [\text{Cu}] + \{\text{CuL}\}, \\ C_L = [L] + \{\text{CuL}\} \end{cases} \quad (4.5)$$

поскольку вся медь связана в комплексы, приняли $[\text{Cu}]=0$, тогда

$$\begin{cases} [Y] = C_Y - [\text{CuY}] \\ [\text{CuY}] = C_{\text{Cu}} - [\text{CuL}] \\ [L] = C_L - [\text{CuL}] = C_L - \frac{A}{A_{\text{max}}} C_{\text{CuL}} \end{cases}, \quad (4.6)$$

Из уравнений закона действующих масс:

$$\beta'_{\text{CuY}} = \frac{[\text{CuY}]}{[\text{Cu}][Y]} = \beta(\text{CuY}) \times \alpha(\text{Y}) \beta_{\text{CuL}} = \frac{[\text{CuL}]}{[\text{Cu}][L]} \text{ и уравнения оптической плотности:}$$

$$\frac{A}{A_{\text{max}}} = \frac{[\text{CuL}]}{C_{\text{CuL}}}$$

Из последнего уравнения выразили $[\text{CuL}] = \frac{A}{A_{\text{max}}} \times C_{\text{CuL}}$ и подставили его в:

$$\beta_{\text{CuL}} = \frac{A}{A_{\text{max}}} \times \frac{C_{\text{CuL}}}{[\text{Cu}][L]} \text{ Подставили } [Y] \text{ и } [\text{CuY}] \text{ в закон действующих масс для ЭДТА:}$$

$$\beta'_{\text{CuY}} = \frac{C_{\text{Cu}} - [\text{CuL}]}{[\text{Cu}](C_Y - [\text{CuY}])} \text{ и выразили } [\text{Cu}]:$$

$$[\text{Cu}] = \frac{C_{\text{Cu}} - [\text{CuL}]}{\beta'_{\text{CuY}} \times (C_Y - [\text{CuY}])} = \frac{C_{\text{Cu}} - [\text{CuL}]}{\beta'_{\text{CuY}} \times (C_Y - C_{\text{Cu}} + [\text{CuL}])} = \frac{C_{\text{Cu}} - \frac{A}{A_{\text{max}}} \times C_{\text{CuL}}}{\beta'_{\text{CuY}} \times (C_Y - C_{\text{Cu}} + \frac{A}{A_{\text{max}}} \times C_{\text{CuL}})}, \quad (4.7)$$

Обозначили $\frac{A}{A_{\text{max}}}x$ и $C_Y = C_{\text{Cu}} = C_L = C_{\text{CuL}} = a$ и подставили $[\text{Cu}]$ в формулу для β_{CuL} :

$$\beta_{\text{CuL}} = x \times \frac{a \cdot \beta'_{\text{CuY}} \times (C_Y - a + ax)}{(a - ax)(a - ax)} \times \frac{a \times \beta_{\text{CuY}} - a^2 \beta'_{\text{CuY}} + a^2 x \beta'_{\text{CuY}}}{a^2 - 2a^2x + a^2x^2}. \quad (4.8)$$

Сократили числитель и знаменатель на a и упростили выражение:

$$\beta_{\text{CuL}} = x \times \frac{\beta'_{\text{CuY}} \times (C_Y - a \times (1 - x))}{a \times (1 - 2x + x^2)} = x \times \frac{\beta'_{\text{CuY}} \times (C_Y - a \times (1 - x))}{a \times (x - 1)^2}, \quad (4.9)$$

$$\beta_1 = \frac{A}{A_{\text{max}}} \frac{\beta'_{\text{CuY}} \times (C_Y - C_L \left(1 - \frac{A}{A_{\text{max}}}\right))}{C_{\text{Cu}} \times \left(1 - \frac{A}{A_{\text{max}}}\right)^2}. \quad (4.10)$$

где $\beta_{CuL}=\beta_1$ константа устойчивости комплекса **32а**, A – оптическая плотность, A_{max} – максимальная оптическая плотность (для раствора комплекса в отсутствие ЭДТА), β_{CuY} – условная константа устойчивости комплекса меди с ЭДТА, c_Y – концентрация раствора ЭДТА, c_L – концентрация раствора комплекса, c_{Cu} – концентрация меди.

Аналогичным образом выведена формула для расчета условных констант комплексов **37а** и **41а**, принимая во внимание, что состав комплексов $Cu:L = 2:1$. Формула из уравнений материального баланса по меди, ЭДТА и лиганду для **37а** и **41а**:

$$\begin{cases} c_Y = [Y] + [CuY] \\ c_{Cu} = [CuY] + [Cu] + 2[Cu_2L] \\ c_L = [L] + [Cu_2L] \end{cases} \quad (4.11)$$

поскольку вся медь связана в комплекс, приняли $[Cu]=0$, тогда

$$\begin{cases} [Y] = c_Y - [CuY] \\ [CuY] = c_{Cu} - 2[Cu_2L] \\ [L] = c_L - [Cu_2L] = c_L - \frac{A}{A_{max}} c_{Cu_2L} \end{cases}, \quad (4.12)$$

Из уравнений закона действующих масс: $\beta_{CuY} = \frac{[CuY]}{[Cu][Y]} = \beta(CuY) \times \alpha(Y) \beta_2 = \frac{[Cu_2L]}{[Cu]^2[L]}$ и

уравнения оптической плотности: $\frac{A}{A_{max}} = \frac{[Cu_2L]}{c_{Cu_2L}}$ получена формула:

$$\beta_2 = \frac{A}{A_{max}} \times \frac{(\beta_{CuY})^2 \times (c_Y - c_{Cu_2L}) \times \left(1 - 2 \times \frac{A}{A_{max}}\right)^2}{\left(1 - 2 \times \frac{A}{A_{max}}\right)^2 \times \left(1 - \frac{A}{A_{max}}\right)}, \quad (4.13)$$

где β_2 константа устойчивости комплексов **37а** и **41а**, A – оптическая плотность, A_{max} – максимальная оптическая плотность (для раствора комплекса в отсутствие ЭДТА), β_{CuY} – условная константа устойчивости комплекса меди с ЭДТА, c_Y – концентрация раствора ЭДТА, c_{Cu_2L} – концентрация раствора комплекса, $c_L = 0.5 c_{Cu}$.

Константы рассчитаны для каждого соотношения комплекс-ЭДТА в выбранном диапазоне длин волн (нм): 360-425, 365-414 и 390-463 для **32а**, **37а** и **41а** соответственно. Затем для каждой длины волны выбирали среднее значение константы, считали стандартное и относительное стандартное отклонения, при этом отрицательные и выпадающие результаты не принимали в расчет. По полученному графику зависимости нормированной оптической плотности A/A_{max} от длины волны (λ) выбирали участок с наименьшими значениями относительного стандартного отклонения: 360-425 нм, 365-408 нм и 390-420 нм для **32а** (Рис. 64), **37а** (Рис. 65) и **41а** (Рис. 66) соответственно. По выбранному участку усредняли значение константы.

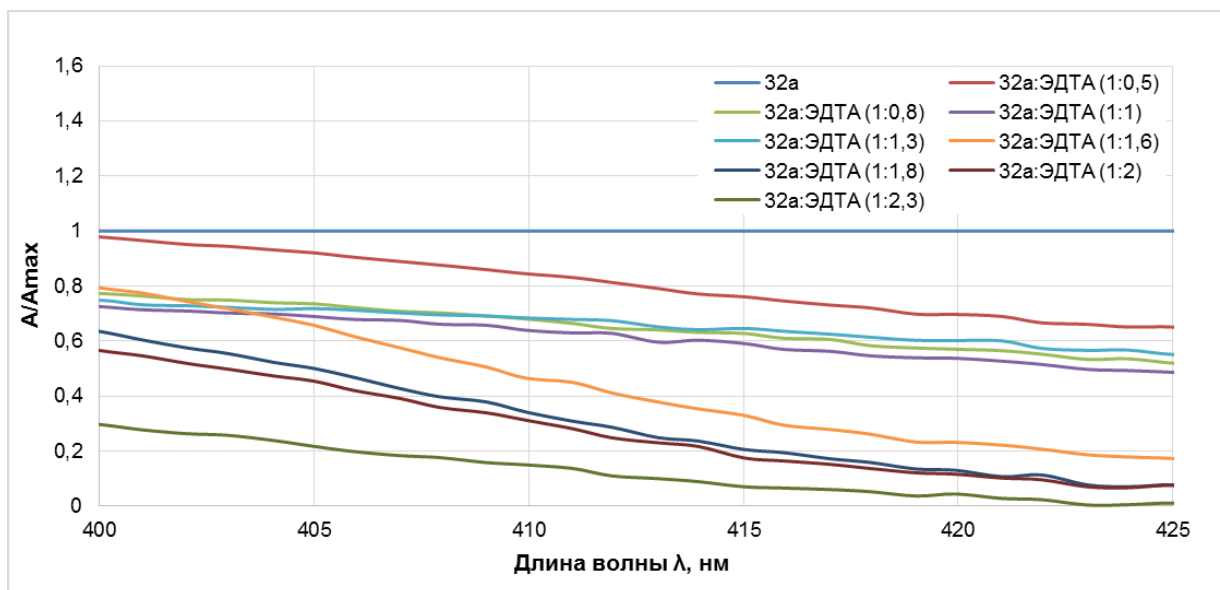


Рисунок 64. График зависимости A/A_{\max} от длины волны для различных соотношений 32а-ЭДТА.

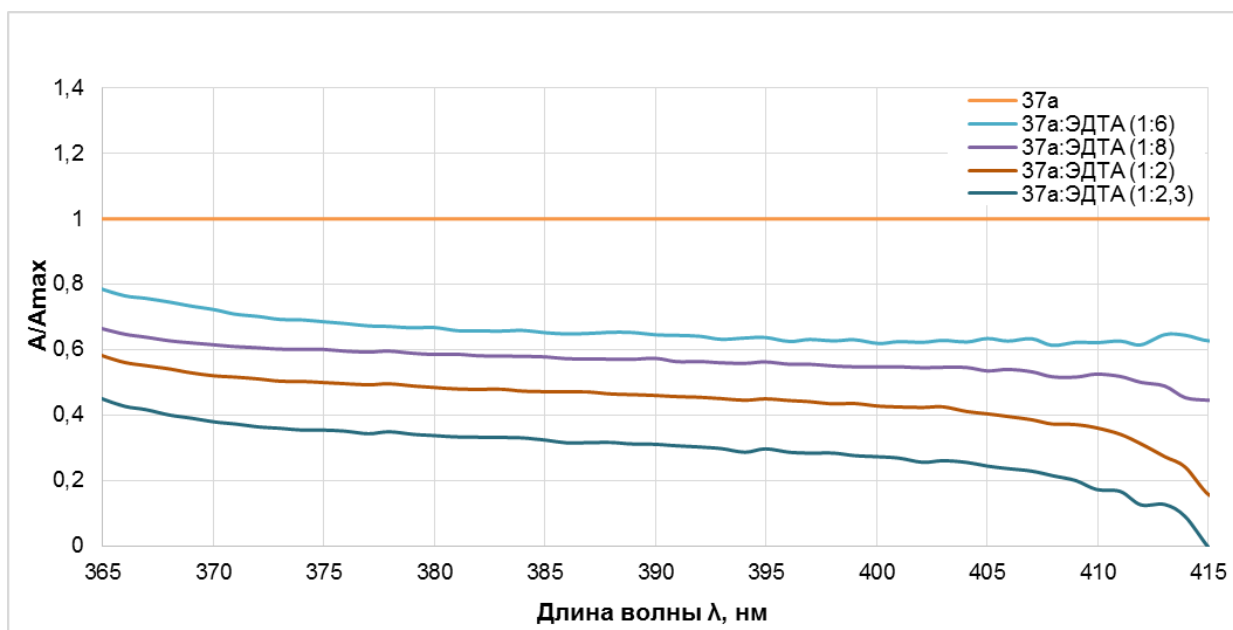


Рисунок 65. График зависимости A/A_{\max} от длины волны для различных соотношений 37а-ЭДТА.

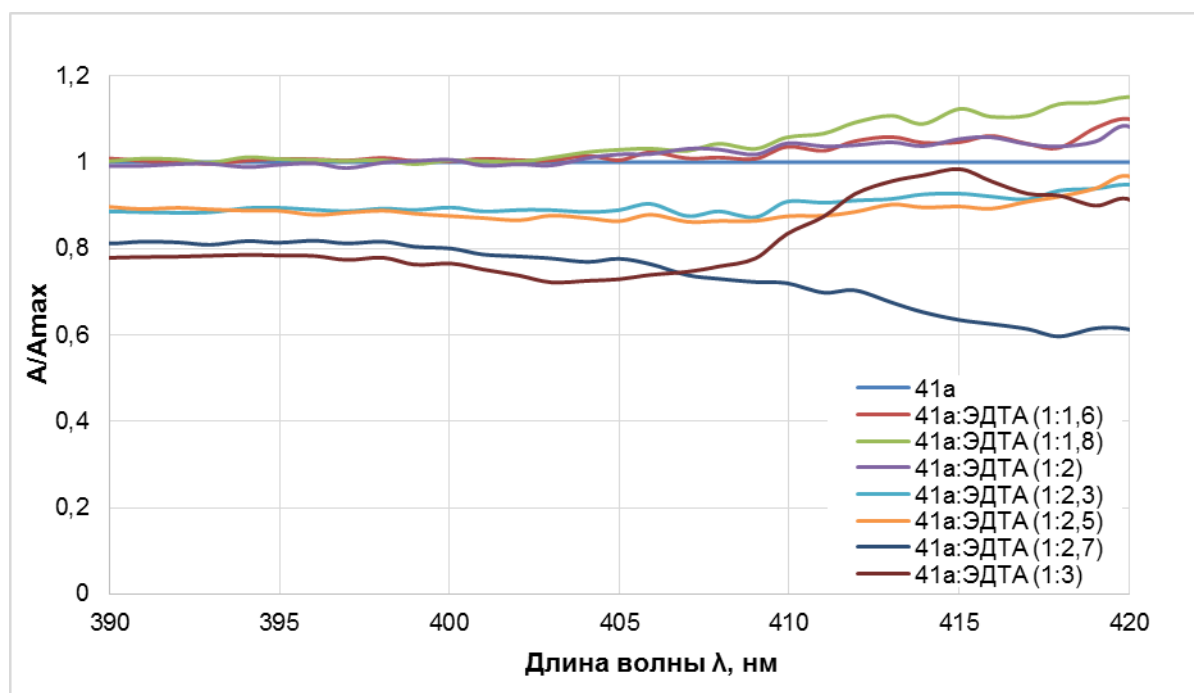


Рисунок 66. График зависимости A/A_{\max} от длины волны для различных соотношений **41а**-ЭДТА.

4.5. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕХИОМЕТРИИ КОМПЛЕКСОВ В РАСТВОРЕ (МЕТОД ИЗОМОЛЯРНЫХ СЕРИЙ)

4.5.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

Для приготовления растворов использовали растворитель ДМСО:вода (объемные соотношения 9:11). Для получения растворов лигандов **32** и **41** и раствора $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в концентрации $c=1 \times 10^{-4}$ М навески $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ массой $m=0.0009$ г, навеску лиганда **32** массой $m=0.0013$ г, лиганда **41** массой $m=0.0026$ г помещали в отдельные мерные колбы объемом 50 мл, добавляли растворитель, доводили до метки и тщательно перемешивали.

Для получения раствора лиганда **37** в мерной колбе объемом 50 мл растворяли навеску лиганда массой $m=0.0026$ г в растворителе, затем отбирали 25 мл полученного раствора. Оставшийся в колбе раствор доводили до метки ДМСО и перемешивали.

Концентрация раствора $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ для метода изомолярных серий с лигандом **37** составила $c=5 \times 10^{-5}$ М.

Полученные растворы каждого лиганда и хлорида меди смешивали в стеклянных пробирках в следующих объемных соотношениях: 2:8, 2.5:7.5, 3:7, 3.5:6.5, 4:6, 4.5:5.5, 5:5, 5.5:4.5, 6:4, 6.5:3.5, 7:3, 7.5:2.5, 8:2.

4.5.2. ОБРАБОТКА ДАННЫХ

В качестве базовой линии использовали растворитель ДМСО:вода в объемном соотношении 9:11. Перед каждым измерением раствора комплекса регистрировали спектр лиганда с такой же концентрацией. Из спектров комплексов и лигандов вычитали базовую линию. Затем для соотношений, где содержание лиганда выше содержания меди, (начиная с соотношения 4.5:5.5 медь-лиганд) вычитали оптическую плотность, соответствующую избытку лиганда из спектра комплекса. Строили график зависимости скорректированной оптической плотности при выбранной длине волны от количества лиганда в соотношении лиганд-медь. Вывод о стехиометрии комплекса делали по наивысшей точке на полученном графике.

4.6. ОПРЕДЕЛЕНИЕ СТЕХИОМЕТРИИ КОМПЛЕКСОВ ПО КРИВОЙ НАСЫЩЕНИЯ

4.6.1. ПРИГОТОВЛЕНИЕ РАСТВОРОВ

Для приготовления растворов использовали растворитель ДМСО:вода (объемные соотношения 9:11).

Для приготовления раствора хлорида меди с концентрацией $c=1 \times 10^{-4}$ М в мерной колбе объемом 50 мл растворяли навеску $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ массой $m=0.0017$ г в растворителе.

Для приготовления раствора лиганда **41** с концентрацией $c=1 \times 10^{-3}$ М в мерной колбе объемом 50 мл растворяли навеску массой $m=0.0258$ г в растворителе. Растворы комплексов готовили с молярными соотношениями $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -**41**: 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10. Растворы лиганда соответствующих концентраций готовили из $c=1 \times 10^{-3}$ М раствора разбавлением.

Для приготовления раствора лиганда **32** с концентрацией $c=1 \times 10^{-3}$ М в мерной колбе объемом 50 мл растворяли навеску массой $m=0.013$ г в растворителе. Растворы комплексов готовили с молярными соотношениями $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ -**32**: 1:1, 1:1.2, 1:1.5, 1:2, 1:3, 1:4.5, 1:5, 1:5.5, 1:6, 1:6.5, 1:7, 1:8. Растворы лиганда соответствующих концентраций готовили из $c=1 \times 10^{-3}$ М раствора разбавлением.

4.7. ОКИСЛЕНИЕ ТРИФЕНИЛФОСФИНА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМПЛЕКСНЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Через раствор, содержащий 0.05 г (0.18 ммоль) Ph_3P и 5%/моль комплекса, в 10 мл ацетонитрила пропускали ток N_2O в течение 4 ч при комнатной температуре. Затем растворитель упаривали при пониженном давлении.

Выход трифенилфосфиноксида рассчитывали по соотношению сигналов в спектре ЯМР ^{31}P трифенилфосфина (с, при -5 м.д.) и трифенилфосфиноксида (с, при 29 м.д.). Данные представлены в разделе **3.3.3**.

5. ВЫВОДЫ

1. Предложены новые и оптимизированы ранее описанные методы синтеза моно- и бис-5-(2-пиридилметилена)замещенных 2-тиогидантоинов и их S-алкилированных производных.
2. Разработаны методы получения новых классов органических лигандов – бис-5-(2-пиридилметилена)-2-тиогидантоинов и бис-5-(2-пиридилметилена)-2-алкилтио-3,5-дигидро-4*H*-имидазол-4-онов с полиметиленовыми, полиэтиленгликолевыми, диалкил- и диарилдисульфидными линкерами между атомами азота N(3) имидазолоновых фрагментов.
3. Синтезированные лиганды – производные 5-(2-пиридилметилена)замещенных 2-тиогидантоинов исследованы в реакциях комплексообразования с хлоридом меди(II). Показано, что в зависимости от структуры органического лиганда в качестве продуктов образуются либо биядерные координационные соединения Cu(II), либо смешанновалентные комплексы $[Cu^{1.5}Cu^{1.5}]$, представляющие собой низкомолекулярные модели фермента N₂O редуктаза.
4. Впервые исследована стабильность медьсодержащих координационных соединений с производными 2-тиоксо-тетрагидро-4*H*-имидазолонов **32**, **37**, **41** в водно-органической среде и стехиометрия координационных соединений **32a**, **37a**, **41a** в растворе ДМСО:вода. Определены константы устойчивости комплексных соединений **32a**, **37a**, **41a**.
5. Установлена возможность адсорбции лиганда **40** на поверхности золота с последующим образованием координационного соединения хлорида меди(II) с адсорбированным лигандом. Рассчитана степень заполнения поверхности золота адсорбционным слоем.
6. Показана каталитическая активность смешанновалентных комплексов $[Cu^{1.5}Cu^{1.5}]$ с лигандами **32a** и **45a** в реакциях восстановления оксида азота(I) до азота и окисления фосфинов.

6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. A. I. Khodair. Glycosylation of 2-thiohydantoin derivatives. Synthesis of some novel S-alkylated and S-glucosylated hydantoins // *Carbohydrate research*. - 2001. - V. 331. - P. 445-453.
2. D. R. Maxwell, "1-Substituted phenyl-4-alkyl hydantoin piperazine compounds as antihypertensive agents," ed: Google Patents, 1984.
3. S. Baluja, S. Chanda, H. Padalia, and P. Ramavat. SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF SOME NEW 2-THIOXOIMIDAZOLIDIN-4-ONE DERIVATIVES // *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*. - 2015. - V. 5. -.
4. M. E. Jung, S. Ouk, D. Yoo, C. L. Sawyers, C. Chen, C. Tran, *et al.* Structure– activity relationship for thiohydantoin androgen receptor antagonists for castration-resistant prostate cancer (CRPC) // *Journal of medicinal chemistry*. - 2010. - V. 53. - P. 2779-2796.
5. N. Trišović, N. Banjac, N. Valentić, and G. Ušćumlić. Solvent effects on the structure-activity relationship of phenytoin-like anticonvulsant drugs // *Journal of solution chemistry*. - 2009. - V. 38. - P. 199-208.
6. H. I. El-Subbagh, S. M. Abu-Zaid, M. A. Mahran, F. A. Badria, and A. M. Al-Obaid. Synthesis and biological evaluation of certain α , β -unsaturated ketones and their corresponding fused pyridines as antiviral and cytotoxic agents // *Journal of medicinal chemistry*. - 2000. - V. 43. - P. 2915-2921.
7. C. Nitsche, V. N. Schreier, M. A. Behnam, A. Kumar, R. Bartenschlager, and C. D. Klein. Thiazolidinone–peptide hybrids as dengue virus protease inhibitors with antiviral activity in cell culture // *Journal of medicinal chemistry*. - 2013. - V. 56. - P. 8389-8403.
8. P. Marinova, M. Marinov, Y. Feodorova, M. Kazakova, D. Georgiev, E. Trendafilova, *et al.* Synthesis, antimicrobial and in vitro antiproliferative activity of 4'-bromo-(9'-fluorene)-spiro-5-(2, 4-dithiohydantoin) against tumor cells // *Scientific Works: University of Ruse "Angel Kanchev"*. - 2013. - V. 52. - P. 33-37.
9. V. Rajendiran, R. Karthik, M. Palaniandavar, H. Stoeckli-Evans, V. S. Periasamy, M. A. Akbarsha, *et al.* Mixed-ligand copper (II)-phenolate complexes: effect of coligand on enhanced DNA and protein binding, DNA cleavage, and anticancer activity // *Inorganic chemistry*. - 2007. - V. 46. - P. 8208-8221.
10. A. W. Prestayko. *Cisplatin: current status and new developments* //: Academic Press, 2013.
11. S. S. Bhat, A. A. Kumbhar, H. Heptullah, A. A. Khan, V. V. Gobre, S. P. Gejji, *et al.* Synthesis, Electronic Structure, DNA and Protein Binding, DNA Cleavage, and Anticancer Activity of

- Fluorophore-Labeled Copper(II) Complexes // *Inorganic Chemistry*. - 2011. - V. 50. - P. 545-558.
12. E. Beloglazkina, A. Majouga, A. Moiseeva, M. Tsepkov, and N. Zyk. 5-[2-(Methylthio)ethyl]-3-phenyl-2-thioxoimidazolidin-4-one and its complexes with transition metals (CoII, NiII, and CuII). Synthesis and electrochemical investigation // *Russian Chemical Bulletin*. - 2007. - V. 56. - P. 351-355.
 13. A. Majouga, E. Beloglazkina, O. Shilova, A. Moiseeva, and N. Zyk. Tetradentate nitrogen-containing ligands bis-5-(2-pyridylmethylidene)-3, 5-dihydro-4H-imidazol-4-ones and their coordination compounds with CuI and CuII // *Russian Chemical Bulletin*. - 2009. - V. 58. - P. 1392-1399.
 14. A. Yudina, A. Mazhuga, E. Beloglazkina, I. Yudin, I. Rodin, and N. Zyk. Unusual result of the reaction of 4-(1-methyl-1H-imidazol-2-yl) methylene-substituted 2-alkylthioimidazol-5(4H)-one with copper (ii) chloride // *Russian Chemical Bulletin*. - 2011. - V. 60. - P. 2120-2123.
 15. E. Beloglazkina, A. Majouga, I. Yudin, N. Frolova, N. Zyk, V. Dolzhikova, *et al.* 5-(Pyridylmethylidene)-substituted 2-thiohydantoin and their complexes with CuII, NiII, and CoII: Synthesis, electrochemical study, and adsorption on the cystamine-modified gold surface // *Russian chemical bulletin*. - 2006. - V. 55. - P. 1015-1027.
 16. A. G. Majouga, M. I. Zvereva, M. P. Rubtsova, D. A. Skvortsov, A. V. Mironov, D. M. Azhibek, *et al.* Mixed valence copper (I, II) binuclear complexes with unexpected structure: synthesis, biological properties and anticancer activity // *Journal of medicinal chemistry*. - 2014. - V. 57. - P. 6252-6258.
 17. A. G. Majouga, E. K. Beloglazkina, A. A. Moiseeva, O. V. Shilova, E. A. Manzheliy, M. A. Lebedeva, *et al.* Cleavage of the C–S bond with the formation of a binuclear copper complex with 2-thiolato-3-phenyl-5-(pyridine-2-ylmethylene)-3, 5-dihydro-4 H-imidazole-4-one. A new mimic of the active site of N₂O reductase // *Dalton Transactions*. - 2013. - V. 42. - P. 6290-6293.
 18. Ю. В. Чистяков. Основы бионеорганической химии: [учеб. пособие по специальности 020101 "Химия"] // Москва: Химия. КолосС, 2007, p. 554.
 19. J. P. Klinman. Mechanisms Whereby Mononuclear Copper Proteins Functionalize Organic Substrates // *Chemical Reviews*. - 1996. - V. 96. - P. 2541-2562.
 20. E. I. Solomon, U. M. Sundaram, and T. E. Machonkin. Multicopper Oxidases and Oxygenases // *Chemical Reviews*. - 1996. - V. 96. - P. 2563-2606.

21. C. G. Holmberg and C.-B. Laurell. Investigations in Serum Copper. I. Nature of Serum Copper and its Relation to the Iron-Binding Protein in Human Serum. // *Acta Chemica Scandinavica*. - 1948. - V. 2. - P. 550-556.
22. E. I. Solomon, R. Sarangi, J. S. Woertink, A. J. Augustine, J. Yoon, and S. Ghosh. O₂ and N₂O Activation by Bi-, Tri-, and Tetranuclear Cu Clusters in Biology // *Accounts of Chemical Research*. - 2007. - V. 40. - P. 581-591.
23. I. S. MacPherson and M. E. P. Murphy. Type-2 copper-containing enzymes // *Cellular and Molecular Life Sciences*. - 2007. - V. 64. - P. 2887-2899.
24. P. Gamez, P. G. Aibel, W. L. Driessen, and J. Reedijk. Homogeneous bio-inspired copper-catalyzed oxidation reactions // *Chemical Society Reviews*. - 2001. - V. 30. - P. 376-385.
25. L. M. Mirica, X. Ottenwaelder, and T. D. P. Stack. Structure and Spectroscopy of Copper–Dioxygen Complexes // *Chemical Reviews*. - 2004. - V. 104. - P. 1013-1046.
26. A. Chaudhari, M. Mahfouz, A. M. Fialho, T. Yamada, A. T. Granja, Y. Zhu, *et al.* Cupredoxin–Cancer Interrelationship: Azurin Binding with EphB2, Interference in EphB2 Tyrosine Phosphorylation, and Inhibition of Cancer Growth† // *Biochemistry*. - 2007. - V. 46. - P. 1799-1810.
27. N. M. Marshall, D. K. Garner, T. D. Wilson, Y.-G. Gao, H. Robinson, M. J. Nilges, *et al.* Rationally tuning the reduction potential of a single cupredoxin beyond the natural range // *Nature*. - 2009. - V. 462. - P. 113-116.
28. F. Tisato, C. Marzano, M. Porchia, M. Pellei, and C. Santini. Copper in diseases and treatments, and copper-based anticancer strategies // *Medicinal Research Reviews*. - 2010. - V. 30. - P. 708-749.
29. C. Duncan and A. R. White. Copper complexes as therapeutic agents // *Metallomics*. - 2012. - V. 4. - P. 127-138.
30. Y.-M. Jiang, S.-H. Zhang, Q. Xu, and Y. Xiao. Synthesis, crystal structure and bioactivity of a binuclear copper (II) complex // *ACTA CHIMICA SINICA-CHINESE EDITION*-. - 2003. - V. 61. - P. 573-577.
31. I. Iakovidis, I. Delimaris, and S. M. Piperakis. Copper and Its Complexes in Medicine: A Biochemical Approach // *Molecular Biology International*. - 2011. - V. 2011. -.
32. M. Choi and V. L. Davidson. Cupredoxins-A study of how proteins may evolve to use metals for bioenergetic processes // *Metallomics*. - 2011. - V. 3. - P. 140-151.
33. E. Kim, M. E. Helton, I. M. Wasser, K. D. Karlin, S. Lu, H.-w. Huang, *et al.* Superoxo, μ -peroxo, and μ -oxo complexes from heme/O₂ and heme-Cu/O₂ reactivity: Copper ligand

- influences in cytochrome c oxidase models // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2003. - V. 100. - P. 3623-3628.
34. R. L. Lieberman and A. C. Rosenzweig. The quest for the particulate methane monooxygenase active site // *Dalton Transactions*. - 2005. - P. 3390-3396.
35. M. Sosna, J.-M. Chretien, J. D. Kilburn, and P. N. Bartlett. Monolayer anthracene and anthraquinone modified electrodes as platforms for *Trametes hirsuta* laccase immobilisation // *Physical Chemistry Chemical Physics*. - 2010. - V. 12. - P. 10018-10026.
36. A. Pomowski, W. G. Zumft, P. M. H. Kroneck, and O. Einsle. N₂O binding at a [4Cu:2S] copper-sulphur cluster in nitrous oxide reductase // *Nature*. - 2011. - V. 477. - P. 234-237.
37. I. A. Koval, P. Gamez, C. Belle, K. Selmeczi, and J. Reedijk. Synthetic models of the active site of catechol oxidase: mechanistic studies // *Chemical Society Reviews*. - 2006. - V. 35. - P. 814-840.
38. A. Messerschmidt. *Ascorbate Oxidase* //: Springer New York, 2013, pp. 195-201.
39. J. S. Valentine and E. B. Gralla. *Copper-Containing Molecules* // vol. 60: Elsevier Science, 2002.
40. G. W. Canters and G. Gilardi. Engineering type 1 copper sites in proteins // *FEBS Letters*. - 1993. - V. 325. - P. 39-48.
41. C. Remenyi, R. Reviakine, and M. Kaupp. Density Functional Study of EPR Parameters and Spin-Density Distribution of Azurin and Other Blue Copper Proteins // *The Journal of Physical Chemistry B*. - 2007. - V. 111. - P. 8290-8304.
42. D. Baniulis, E. Yamashita, H. Zhang, S. S. Hasan, and W. A. Cramer. Structure–Function of the Cytochrome b₆f Complex† // *Photochemistry and Photobiology*. - 2008. - V. 84. - P. 1349-1358.
43. Л. Кабашникова. Фотосинтетический аппарат и потенциал продуктивности хлебных злаков // Минск: Беларус. навука, 2011, р. 327.
44. С. Д. Варфоломеев and С. В. Зайцев. Кинетические методы в биохимических исследованиях // Москва: Изд. Московского Университета, 1982, р. 344 с.
45. T. E. Jones, D. B. Rorabacher, and L. A. Ochrymowycz. Simple models for blue copper proteins. Copper-thiaether complexes // *Journal of the American Chemical Society*. - 1975. - V. 97. - P. 7485-7486.
46. P. L. Holland and W. B. Tolman. A Structural Model of the Type 1 Copper Protein Active Site: N₂S(thiolate)S(thioether) Ligation in a Cu(II) Complex // *Journal of the American Chemical Society*. - 2000. - V. 122. - P. 6331-6332.

47. A. Romero, C. W. G. Hoitink, H. Nar, R. Huber, A. Messerschmidt, and G. W. Canters. X-ray Analysis and Spectroscopic Characterization of M121Q Azurin: A Copper Site Model for Stellacyanin // *Journal of Molecular Biology*. - 1993. - V. 229. - P. 1007-1021.
48. B. G. Karlsson, L.-C. Tsai, H. Nar, J. Sanders-Loehr, N. Bonander, V. Langer, *et al.* X-ray Structure Determination and Characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* Azurin Mutant Met121Glu // *Biochemistry*. - 1997. - V. 36. - P. 4089-4095.
49. A. Messerschmidt, L. Prade, S. J. Kroes, J. Sanders-Loehr, R. Huber, and G. W. Canters. Rack-induced metal binding vs. flexibility: Met121His azurin crystal structures at different pH // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 1998. - V. 95. - P. 3443-3448.
50. F. E. Dodd, J. Van Beeumen, R. R. Eady, and S. S. Hasnain. X-ray structure of a blue-copper nitrite reductase in two crystal forms. The nature of the copper sites, mode of substrate binding and recognition by redox partner1 // *Journal of Molecular Biology*. - 1998. - V. 282. - P. 369-382.
51. P. L. Holland and W. B. Tolman. Three-Coordinate Cu(II) Complexes: Structural Models of Trigonal-Planar Type 1 Copper Protein Active Sites // *Journal of the American Chemical Society*. - 1999. - V. 121. - P. 7270-7271.
52. A. J. Di Bilio, T. K. Chang, B. G. Malmström, H. B. Gray, B. Göran Karlsson, M. Nordling, *et al.* Electronic absorption spectra of M(II)(Met121X) azurins (M • Co, Ni, Cu; X • Leu, Gly, Asp, Glu): charge-transfer energies and reduction potentials // *Inorganica Chimica Acta*. - 1992. - V. 198 - 200. - P. 145-148.
53. C. Gerdemann, C. Eicken, and B. Krebs. The Crystal Structure of Catechol Oxidase: New Insight into the Function of Type-3 Copper Proteins // *Accounts of Chemical Research*. - 2002. - V. 35. - P. 183-191.
54. S. Ferguson-Miller and G. T. Babcock. Heme/Copper Terminal Oxidases // *Chemical Reviews*. - 1996. - V. 96. - P. 2889-2908.
55. Y.-H. Zhou, H. Fu, W.-X. Zhao, W.-L. Chen, C.-Y. Su, H. Sun, *et al.* Synthesis, Structure, and Activity of Supramolecular Mimics for the Active Site and Arg141 Residue of Copper, Zinc-Superoxide Dismutase // *Inorganic Chemistry*. - 2007. - V. 46. - P. 734-739.
56. I. Bertini, R. S. Drago, and C. Luchinat. The Coordination Chemistry of Metalloenzymes: The Role of Metals in Reactions Involving Water, Dioxygen and Related Species //: Springer Netherlands, 2012.
57. K. D. Karlin and Z. Tyeklar. *Bioinorganic Chemistry of Copper* //: Springer Netherlands, 2012.

58. P. F. Knowles, R. D. Brown, S. H. Koenig, S. Wang, R. A. Scott, M. A. McGuirl, *et al.* Spectroscopic Studies of the Active Site of Galactose Oxidase // *Inorganic Chemistry*. - 1995. - V. 34. - P. 3895-3902.
59. J. Stubbe and W. A. van der Donk. Protein Radicals in Enzyme Catalysis // *Chemical Reviews*. - 1998. - V. 98. - P. 705-762.
60. J. M. Murray, C. G. Saysell, C. M. Wilmot, W. S. Tambyrajah, J. Jaeger, P. F. Knowles, *et al.* The Active Site Base Controls Cofactor Reactivity in *Escherichia coli* Amine Oxidase: X-ray Crystallographic Studies with Mutational Variants // *Biochemistry*. - 1999. - V. 38. - P. 8217-8227.
61. В. с. п. микроэлементам and Я. В. Пейве. Микроэлементы в сельском хозяйстве и медицине //: Бурятское Книжное изд-во, 1968.
62. K. Takahashi and J. P. Klinman. Relationship of Stopped Flow to Steady State Parameters in the Dimeric Copper Amine Oxidase from *Hansenula polymorpha* and the Role of Zinc in Inhibiting Activity at Alternate Copper-Containing Subunits† // *Biochemistry*. - 2006. - V. 45. - P. 4683-4694.
63. D. M. Dooley, R. A. Scott, P. F. Knowles, C. M. Colangelo, M. A. McGuirl, and D. E. Brown. Structures of the Cu(I) and Cu(II) Forms of Amine Oxidases from X-ray Absorption Spectroscopy // *Journal of the American Chemical Society*. - 1998. - V. 120. - P. 2599-2605.
64. G. d. Gonzalo, D. E. T. Pazmiño, G. Ottolina, M. W. Fraaije, and G. Carrea. Oxidations catalyzed by phenylacetone monooxygenase from *Thermobifida fusca* // *Tetrahedron: Asymmetry*. - 2005. - V. 16. - P. 3077-3083.
65. D. E. Torres Pazmiño, M. Winkler, A. Glieder, and M. W. Fraaije. Monooxygenases as biocatalysts: Classification, mechanistic aspects and biotechnological applications // *Journal of Biotechnology*. - 2010. - V. 146. - P. 9-24.
66. J. C. Murrell, I. R. McDonald, and B. Gilbert. Regulation of expression of methane monooxygenases by copper ions // *Trends in Microbiology*. -. - V. 8. - P. 221-225.
67. J. D. Semrau, A. A. DiSpirito, and S. Yoon. Methanotrophs and copper // vol. 34, 2010, pp. 496-531.
68. R. L. Lieberman and A. C. Rosenzweig. Biological Methane Oxidation: Regulation, Biochemistry, and Active Site Structure of Particulate Methane Monooxygenase // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. - 2004. - V. 39. - P. 147-164.
69. R. A. Steiner, W. Meyer-Klaucke, and B. W. Dijkstra. Functional Analysis of the Copper-Dependent Quercetin 2,3-Dioxygenase. 2. X-ray Absorption Studies of Native Enzyme and

- Anaerobic Complexes with the Substrates Quercetin and Myricetin† // *Biochemistry*. - 2002. - V. 41. - P. 7963-7968.
70. F. Fusetti, K. H. Schröter, R. A. Steiner, P. I. van Noort, T. Pijning, H. J. Rozeboom, *et al.* Crystal Structure of the Copper-Containing Quercetin 2,3-Dioxygenase from *Aspergillus japonicus* // *Structure*. - 2002. - V. 10. - P. 259-268.
71. R. A. Steiner, K. H. Kalk, and B. W. Dijkstra. Anaerobic enzyme-substrate structures provide insight into the reaction mechanism of the copper-dependent quercetin 2,3-dioxygenase // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2002. - V. 99. - P. 16625-16630.
72. H. Reinhard, R. Kappl, J. Huettermann, and M.-S. Viezzoli. ENDOR of Superoxide Dismutase: Structure Determination of the Copper Site from Randomly Oriented Specimen // *The Journal of Physical Chemistry*. - 1994. - V. 98. - P. 8806-8812.
73. I. Szilagyi, I. Labadi, K. Hernadi, I. Palinko, I. Fekete, L. Korecz, *et al.* Superoxide dismutase activity of a Cu-Zn complex-bare and immobilised // *New Journal of Chemistry*. - 2005. - V. 29. - P. 740-745.
74. E. D. Getzoff, J. A. Tainer, M. M. Stempien, G. I. Bell, and R. A. Hallewell. Evolution of CuZn superoxide dismutase and the Greek Key β -barrel structural motif // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. - 1989. - V. 5. - P. 322-336.
75. J. M. McCord and I. Fridovich. Superoxide Dismutase: AN ENZYMIC FUNCTION FOR ERYTHROCUPREIN (HEMOCUPREIN) // *Journal of Biological Chemistry*. - 1969. - V. 244. - P. 6049-6055.
76. H. Ohtsu, Y. Shimazaki, A. Odani, O. Yamauchi, W. Mori, S. Itoh, *et al.* Synthesis and Characterization of Imidazolate-Bridged Dinuclear Complexes as Active Site Models of Cu,Zn-SOD // *Journal of the American Chemical Society*. - 2000. - V. 122. - P. 5733-5741.
77. S. Fukuzumi, M. Patz, T. Suenobu, Y. Kuwahara, and S. Itoh. ESR Spectra of Superoxide Anion-Scandium Complexes Detectable in Fluid Solution // *Journal of the American Chemical Society*. - 1999. - V. 121. - P. 1605-1606.
78. W. Jiang, Y. Han, Q. Pan, T. Shen, and C. Liu. Roles of exogenous divalent metals in the nucleolytic activity of Cu,Zn superoxide dismutase // *Journal of Inorganic Biochemistry*. - 2007. - V. 101. - P. 667-677.
79. E. A. Lewis and W. B. Tolman. Reactivity of Dioxygen-Copper Systems // *Chemical Reviews*. - 2004. - V. 104. - P. 1047-1076.
80. L. M. Mirica, D. J. Rudd, M. A. Vance, E. I. Solomon, K. O. Hodgson, B. Hedman, *et al.* μ - η^2 : η^2 -Peroxodicopper(II) Complex with a Secondary Diamine Ligand: A Functional Model of Tyrosinase // *Journal of the American Chemical Society*. - 2006. - V. 128. - P. 2654-2665.

81. L. M. Mirica, M. Vance, D. J. Rudd, B. Hedman, K. O. Hodgson, E. I. Solomon, *et al.* A Stabilized μ - η^2 : η^2 Peroxodicopper(II) Complex with a Secondary Diamine Ligand and Its Tyrosinase-like Reactivity // *Journal of the American Chemical Society*. - 2002. - V. 124. - P. 9332-9333.
82. S. Palavicini, A. Granata, E. Monzani, and L. Casella. Hydroxylation of Phenolic Compounds by a Peroxodicopper(II) Complex: Further Insight into the Mechanism of Tyrosinase // *Journal of the American Chemical Society*. - 2005. - V. 127. - P. 18031-18036.
83. M. D. P. T. Sotomayor, A. A. Tanaka, and L. T. Kubota. Tris (2,2' -bipyridil) copper (II) chloride complex: a biomimetic tyrosinase catalyst in the amperometric sensor construction // *Electrochimica Acta*. - 2003. - V. 48. - P. 855-865.
84. M. Fontecave and J.-L. Pierre. Oxidations by copper metalloenzymes and some biomimetic approaches // *Coordination Chemistry Reviews*. - 1998. - V. 170. - P. 125-140.
85. A. E.-M. M. Ramadan, M. M. Ibrahim, and S. Y. Shaban. Synthesis, characterization, and tyrosinase biomimetic catalytic activity of copper(II) complexes with schiff base ligands derived from α -diketones with 2-methyl-3-amino-(3H)-quinazolin-4-one // *Journal of Molecular Structure*. - 2011. - V. 1006. - P. 348-355.
86. L. Bubacco, M. van Gastel, E. J. J. Groenen, E. Vijgenboom, and G. W. Canters. Spectroscopic Characterization of the Electronic Changes in the Active Site of *Streptomyces antibioticus* Tyrosinase upon Binding of Transition State Analogue Inhibitors // *Journal of Biological Chemistry*. - 2003. - V. 278. - P. 7381-7389.
87. E. I. Solomon, M. J. Baldwin, and M. D. Lowery. Electronic structures of active sites in copper proteins: contributions to reactivity // *Chemical Reviews*. - 1992. - V. 92. - P. 521-542.
88. A. P. Tommerdahl, K. G. Burnett, and L. E. Burnett. Respiratory Properties of Hemocyanin From Wild and Aquacultured Penaeid Shrimp and the Effects of Chronic Exposure to Hypoxia // *The Biological Bulletin*. - 2015. - V. 228. - P. 242-252.
89. L. Casella, O. Carugo, M. Gullotti, S. Garofani, and P. Zanello. Hemocyanin and tyrosinase models. Synthesis, azide binding, and electrochemistry of dinuclear copper(II) complexes with poly(benzimidazole) ligands modeling the met forms of the proteins // *Inorganic Chemistry*. - 1993. - V. 32. - P. 2056-2067.
90. E. Monzani, L. Quinti, A. Perotti, L. Casella, M. Gullotti, L. Randaccio, *et al.* Tyrosinase Models. Synthesis, Structure, Catechol Oxidase Activity, and Phenol Monooxygenase Activity of a Dinuclear Copper Complex Derived from a Triamino Pentabenzimidazole Ligand // *Inorganic Chemistry*. - 1998. - V. 37. - P. 553-562.

91. C. Fernandes, A. Neves, A. J. Bortoluzzi, A. S. Mangrich, E. Rentschler, B. Szpoganicz, *et al.* A new dinuclear unsymmetric copper(II) complex as model for the active site of catechol oxidase // *Inorganica Chimica Acta*. - 2001. - V. 320. - P. 12-21.
92. N. Santhanam, J. M. Vivanco, S. R. Decker, and K. F. Reardon. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style // *Trends in Biotechnology*. - 2011. - V. 29. - P. 480-489.
93. P. J. Strong and H. Claus. Laccase: A Review of Its Past and Its Future in Bioremediation // *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. - 2011. - V. 41. - P. 373-434.
94. C. F. Thurston. The structure and function of fungal laccases // *Microbiology*. - 1994. - V. 140. - P. 19-26.
95. V. Madhavi and S. S. Lele. LACCASE: PROPERTIES AND APPLICATIONS // vol. 4, 2009.
96. Г. П. Ш. М.А. Горбачева, О.В. Морозова, А.В. Стрельцов, Е.А. Зайцева, С.В. Шлеев. Сравнительное изучение биокаталитических реакций с участием высоко- и низкопотенциальных грибных и древесной лакказ в гомогенных и гетерогенных реакциях // *Вестник Московского Университета. Серия 2. Химия*. - 2008. - V. 49. - P. 117-121.
97. R. C. Kuhad and A. Singh. *Lignocellulose Biotechnology: Future Prospects* //: I.K. International Publishing House, 2007.
98. F. d'Acunzo, C. Galli, and B. Masci. Oxidation of phenols by laccase and laccase-mediator systems // *European Journal of Biochemistry*. - 2002. - V. 269. - P. 5330-5335.
99. R. Lu and T. Miyakoshi. Studies on Acetone Powder and Purified Rhus Laccase Immobilized on Zirconium Chloride for Oxidation of Phenols // *Enzyme Research*. - 2012. - V. 2012. - P. 8.
100. M. H. Lee and C. R. Dawson. Ascorbate Oxidase: SPECTRAL CHARACTERISTICS OF THE ENZYME // *Journal of Biological Chemistry*. - 1973. - V. 248. - P. 6603-6609.
101. B. Reinhammar, R. Aasa, T. Vänngård, S. Maritano, and A. Marchesini. The type 2 copper of ascorbate oxidase // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. - 1997. - V. 1337. - P. 191-197.
102. М. С. Семенович. *Физиология растений* // Санкт-Петербург: БХВ-Петербург, 2012, р. 512 с.
103. Б. Т. Т. and К. Б.Ф. *Биологическая химия: учебник*. - 3-е изд. // Москва: Медицина, 1998, р. 704 с.
104. М. Д. *Биохимия. Химические реакции в живой клетке* // vol. 3. Москва.: Мир, 1980, р. 487 с.

105. T. Kubiak, R. Krzymiński, and B. Dobosz, "EPR Study of Paramagnetic Centers in Human Blood," in *Current Topics in Biophysics* vol. 36, ed, 2013, p. 7.
106. В. И. Ващенко and Т. Н. Ващенко. Церулоплазмин от метаболита до лекарственного средства // *Психофармакология и биологическая наркология*. - 2006. - V. 6. - P. 1254-1269.
107. L. Santagostini, M. Gullotti, R. Pagliarin, E. Bianchi, L. Casella, and E. Monzani. Functional mimics of copper enzymes. Synthesis and stereochemical properties of the copper(II) complexes of a trinucleating ligand derived from l-histidine // *Tetrahedron: Asymmetry*. - 1999. - V. 10. - P. 281-295.
108. H. Lopez-Sandoval, R. Contreras, A. Escuer, R. Vicente, S. Bernes, H. Noth, *et al.* Synthesis, crystal structure and magnetic properties of the triangulo-tricopper(ii) complex $[\text{Cu}_3(\text{cpse})_3(\text{H}_2\text{O})_3] \cdot 8.5\text{H}_2\text{O}$ // *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. - 2002. - P. 2648-2653.
109. H. Adams, N. A. Bailey, M. J. S. Dwyer, D. E. Fenton, P. C. Hellier, P. D. Hempstead, *et al.* Synthesis and crystal structure of a first-generation model for the trinuclear copper site in ascorbate oxidase and of a dinuclear silver precursor // *Journal of the Chemical Society, Dalton Transactions*. - 1993. - P. 1207-1216.
110. A. Mukherjee, I. Rudra, S. G. Naik, S. Ramasesha, M. Nethaji, and A. R. Chakravarty. Covalent Linkage of the Type-2 and Type-3 Structural Mimics to Model the Active Site Structure of Multicopper Oxidases: Synthesis and Magneto- Structural Properties of Two Angular Trinuclear Copper(II) Complexes // *Inorganic Chemistry*. - 2003. - V. 42. - P. 5660-5668.
111. S. Gupta, A. Mukherjee, M. Nethaji, and A. R. Chakravarty. An angular trinuclear copper(II) complex as a model for the active site of multicopper oxidases // *Polyhedron*. - 2004. - V. 23. - P. 643-647.
112. W. Rammal, C. Belle, C. Béguin, C. Duboc, C. Philouze, J.-L. Pierre, *et al.* Multifrequency EPR and Redox Reactivity Investigations of a Bis(μ -thiolato)-dicopper(II,II) Complex // *Inorganic Chemistry*. - 2006. - V. 45. - P. 10355-10362.
113. W. Tolman. Using synthetic chemistry to understand copper protein active sites: a personal perspective // *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*. - 2006. - V. 11. - P. 261-271.
114. V. Zickermann, M. Verkhovskiy, J. Morgan, M. Wikström, S. Anemüller, E. Bill, *et al.* Perturbation of the CuA Site in Cytochrome-c Oxidase of *Paracoccus denitrificans* by Replacement of Met227 with Isoleucine // *European Journal of Biochemistry*. - 1995. - V. 234. - P. 686-693.

115. C. Koutsoupakis, T. Soulimane, and C. Varotsis. Ligand Binding in a Docking Site of Cytochrome c Oxidase: A Time-Resolved Step-Scan Fourier Transform Infrared Study // *Journal of the American Chemical Society*. - 2003. - V. 125. - P. 14728-14732.
116. J.-G. Liu, Y. Naruta, and F. Tani. Synthetic Models of the Active Site of Cytochrome c Oxidase: Influence of Tridentate or Tetradentate Copper Chelates Bearing a His-Tyr Linkage Mimic on Dioxygen Adduct Formation by Heme/Cu Complexes // *Chemistry – A European Journal*. - 2007. - V. 13. - P. 6365-6378.
117. J. P. Collman, M. Rapta, M. Bröring, L. Raptova, R. Schwenninger, B. Boitrel, *et al.* Close Structural Analogues of the Cytochrome c Oxidase Fea3/CuB Center Show Clean 4e-Electroreduction of O₂ to H₂O at Physiological pH // *Journal of the American Chemical Society*. - 1999. - V. 121. - P. 1387-1388.
118. T. Kamachi, N. Kihara, Y. Shiota, and K. Yoshizawa. Computational Exploration of the Catalytic Mechanism of Dopamine β -Monooxygenase: Modeling of Its Mononuclear Copper Active Sites // *Inorganic Chemistry*. - 2005. - V. 44. - P. 4226-4236.
119. T. Haltia, K. Brown, M. Tegoni, C. Cambillau, M. Saraste, K. Mattila, *et al.* Crystal structure of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* at 1.6 Å resolution // *Biochemical Journal*. - 2003. - V. 369. - P. 77-88.
120. D.-H. Lee, L. Q. Hatcher, M. A. Vance, R. Sarangi, A. E. Milligan, A. A. Narducci Sarjeant, *et al.* Copper(I) Complex O₂-Reactivity with a N₃S Thioether Ligand: a Copper-Dioxygen Adduct Including Sulfur Ligation, Ligand Oxygenation, and Comparisons with All Nitrogen Ligand Analogues // *Inorganic Chemistry*. - 2007. - V. 46. - P. 6056-6068.
121. A. Kapoor, M. Shandilya, and S. Kundu. Structural Insight of Dopamine β -Hydroxylase, a Drug Target for Complex Traits, and Functional Significance of Exonic Single Nucleotide Polymorphisms // *PLoS ONE*. - 2011. - V. 6. - P. e26509.
122. D. Maiti, J. S. Woertink, M. A. Vance, A. E. Milligan, A. A. Narducci Sarjeant, E. I. Solomon, *et al.* Copper(I)/S₈ Reversible Reactions Leading to an End-On Bound Dicopper(II) Disulfide Complex: Nucleophilic Reactivity and Analogies to Copper-Dioxygen Chemistry // *Journal of the American Chemical Society*. - 2007. - V. 129. - P. 8882-8892.
123. K. Brown, K. Djinovic-Carugo, T. Haltia, I. Cabrito, M. Saraste, J. G. Moura, *et al.* Revisiting the Catalytic CuZ Cluster of Nitrous Oxide (N₂O) Reductase: EVIDENCE OF A BRIDGING INORGANIC SULFUR // *Journal of Biological Chemistry*. - 2000. - V. 275. - P. 41133-41136.
124. T. Rasmussen, B. C. Berks, J. N. Butt, and A. J. Thomson. Multiple forms of the catalytic centre, CuZ, in the enzyme nitrous oxide reductase from *Paracoccus pantotrophus* // *Biochemical Journal*. - 2002. - V. 364. - P. 807-815.

125. E. C. Brown, I. Bar-Nahum, J. T. York, N. W. Aboeella, and W. B. Tolman. Ligand Structural Effects on Cu₂S₂ Bonding and Reactivity in Side-On Disulfido-Bridged Dicopper Complexes // *Inorganic Chemistry*. - 2007. - V. 46. - P. 486-496.
126. S. I. Gorelsky, S. Ghosh, and E. I. Solomon. Mechanism of N₂O Reduction by the μ_4 -S Tetranuclear Cu₂Z Cluster of Nitrous Oxide Reductase // *Journal of the American Chemical Society*. - 2006. - V. 128. - P. 278-290.
127. V. S. Oganessian, T. Rasmussen, S. Fairhurst, and A. J. Thomson. Characterisation of [Cu₄S], the catalytic site in nitrous oxide reductase, by EPR spectroscopy // *Dalton Transactions*. - 2004. - P. 996-1002.
128. J. P. Collman, C. J. Sunderland, K. E. Berg, M. A. Vance, and E. I. Solomon. Spectroscopic Evidence for a Heme-Superoxide/Cu(I) Intermediate in a Functional Model of Cytochrome c Oxidase // *Journal of the American Chemical Society*. - 2003. - V. 125. - P. 6648-6649.
129. J. P. Collman, P. C. Herrmann, B. Boitrel, X. Zhang, T. A. Eberspacher, L. Fu, *et al.* Synthetic Analog for the Oxygen Binding Site in Cytochrome c Oxidase // *Journal of the American Chemical Society*. - 1994. - V. 116. - P. 9783-9784.
130. L. Yang, T. U. o. O. D. o. Chemistry, and Biochemistry. Synthesis and Characterization of Model Complexes of the Copper(Z) Center from Nitrous Oxide Reductase //: University of Oklahoma, 2008, p. 281.
131. J. T. York, I. Bar-Nahum, and W. B. Tolman. Copper-sulfur complexes supported by N-donor ligands: Towards models of the Cu₂Z site in nitrous oxide reductase // *Inorganica Chimica Acta*. - 2008. - V. 361. - P. 885-893.
132. A. G. Majouga, E. K. Beloglazkina, A. A. Moiseeva, O. V. Shilova, E. A. Manzheliy, M. A. Lebedeva, *et al.* Cleavage of the C-S bond with the formation of a binuclear copper complex with 2-thiolato-3-phenyl-5-(pyridine-2-ylmethylene)-3,5-dihydro-4H-imidazole-4-one. A new mimic of the active site of N₂O reductase // *Dalton Transactions*. - 2013. - V. 42. - P. 6290-6293.
133. E. C. Brown, J. T. York, W. E. Antholine, E. Ruiz, S. Alvarez, and W. B. Tolman. [Cu₃(μ -S)₂]³⁺ Clusters Supported by N-Donor Ligands: Progress Toward a Synthetic Model of the Catalytic Site of Nitrous Oxide Reductase // *Journal of the American Chemical Society*. - 2005. - V. 127. - P. 13752-13753.
134. B. J. Johnson, S. V. Lindeman, and N. P. Mankad. Assembly, Structure, and Reactivity of Cu₄S and Cu₃S Models for the Nitrous Oxide Reductase Active Site, Cu₂Z* // *Inorganic Chemistry*. - 2014. - V. 53. - P. 10611-10619.

135. J. T. York, I. Bar-Nahum, and W. B. Tolman. Structural Diversity in Copper–Sulfur Chemistry: Synthesis of Novel Cu/S Clusters through Metathesis Reactions // *Inorganic Chemistry*. - 2007. - V. 46. - P. 8105-8107.
136. Y. Lee, A. A. N. Sarjeant, and K. D. Karlin. A molecular pinwheel multicopper(i) cluster, [(LS-)6CuI13(S2-)2]3+ with [μ]4-sulfido, [μ]3-thiolato and nitrogen ligands // *Chemical Communications*. - 2006. - P. 621-623.
137. E. C. Brown, J. T. York, W. E. Antholine, E. Ruiz, S. Alvarez, and W. B. Tolman. [Cu3(μ -S)2]3+ Clusters Supported by N-Donor Ligands: Progress Toward a Synthetic Model of the Catalytic Site of Nitrous Oxide Reductase // *Journal of the American Chemical Society*. - 2005. - V. 127. - P. 13752-13753.
138. Y. Li, M. Cheng, J. Hao, C. Wang, G. Jia, and C. Li. Terpyridine–Cu (ii) targeting human telomeric DNA to produce highly stereospecific G-quadruplex DNA metalloenzyme // *Chemical Science*. - 2015. - V. 6. - P. 5578-5585.
139. J. Lin, Y.-Y. Yan, T.-M. Ou, J.-H. Tan, S.-L. Huang, D. Li, *et al.* Effective Detection and Separation Method for G-Quadruplex DNA Based on Its Specific Precipitation with Mg2+ // *Biomacromolecules*. - 2010. - V. 11. - P. 3384-3389.
140. W. M. Al-Asbahy, M. Usman, F. Arjmand, M. Shamsi, and S. Tabassum. A dinuclear copper (II) complex with piperazine bridge ligand as a potential anticancer agent: DFT computation and biological evaluation // *Inorganica Chimica Acta*. - 2016. - V. 445. - P. 167-178.
141. S. Gama, I. Rodrigues, F. Mendes, I. C. Santos, E. Gabano, B. Klejevska, *et al.* Anthracene-terpyridine metal complexes as new G-quadruplex DNA binders // *Journal of inorganic biochemistry*. - 2016. - .
142. S. Ramakrishnan, V. Rajendiran, M. Palaniandavar, V. S. Periasamy, B. S. Srinag, H. Krishnamurthy, *et al.* Induction of Cell Death by Ternary Copper(II) Complexes of l-Tyrosine and Diimines: Role of Coligands on DNA Binding and Cleavage and Anticancer Activity // *Inorganic Chemistry*. - 2009. - V. 48. - P. 1309-1322.
143. B. S. Creaven, B. Duff, D. A. Egan, K. Kavanagh, G. Rosair, V. R. Thangella, *et al.* Anticancer and antifungal activity of copper (II) complexes of quinolin-2 (1H)-one-derived Schiff bases // *Inorganica Chimica Acta*. - 2010. - V. 363. - P. 4048-4058.
144. F. Sączewski, E. Dziemidowicz-Borys, P. J. Bednarski, R. Grünert, M. Gdaniec, and P. Tabin. Synthesis, crystal structure and biological activities of copper (II) complexes with chelating bidentate 2-substituted benzimidazole ligands // *Journal of inorganic biochemistry*. - 2006. - V. 100. - P. 1389-1398.

145. S. Tardito, O. Bussolati, M. Maffini, M. Tegoni, M. Giannetto, V. Dall'Asta, *et al.* Thioamido coordination in a thioxo-1, 2, 4-triazole copper (II) complex enhances nonapoptotic programmed cell death associated with copper accumulation and oxidative stress in human cancer cells // *Journal of medicinal chemistry*. - 2007. - V. 50. - P. 1916-1924.
146. D. Monchaud and M.-P. Teulade-Fichou. A hitchhiker's guide to G-quadruplex ligands // *Organic & biomolecular chemistry*. - 2008. - V. 6. - P. 627-636.
147. F. Arjmand and M. Aziz. Synthesis and characterization of dinuclear macrocyclic cobalt (II), copper (II) and zinc (II) complexes derived from 2, 2, 2', 2' -S, S [bis (bis-N, N-2-thiobenzimidazolyloxalato-1, 2-ethane)]: DNA binding and cleavage studies // *European journal of medicinal chemistry*. - 2009. - V. 44. - P. 834-844.
148. R. B. Romashkina, E. K. Beloglazkina, A. N. Khlobystov, A. G. Majouga, D. A. Pichugina, V. I. Terenin, *et al.* Copper (ii) coordination compounds as building blocks for the formation of gold nanoparticle dimers // *Mendeleev Communications*. - 2011. - V. 21. - P. 129-131.
149. E. Boisselier and D. Astruc. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity // *Chemical society reviews*. - 2009. - V. 38. - P. 1759-1782.
150. J. F. Hainfeld, D. N. Slatkin, T. M. Focella, and H. M. Smilowitz. Gold nanoparticles: a new X-ray contrast agent // *The British journal of radiology*. - 2014. - .
151. E. K. Beloglazkina, A. G. Majouga, I. V. Yudin, R. D. Rakhimov, B. N. Tarasevich, S. V. Zatonsky, *et al.* Bis [4-(methylthio) phenylmethyleneaminophenyl] disulfide, 2-[4-(methylthio) phenyl]-2, 3-dihydro-1, 3-benzothiazole, and its nickel (II) and cobalt (II) complexes: Synthesis, adsorption on gold surface and electrochemical characterization // *Journal of Sulfur Chemistry*. - 2007. - V. 28. - P. 201-210.
152. Р. Ромашкина, В. Должикова, Е. Белоглазкина, А. Мажуга, and Н. Зык. Модифицирование поверхности золота производными 2-тиогидантоинов и их комплексами с кобальтом (II) // *Поверхность*. - 2008. - V. 18. - P. 19.
153. J. Schmeyers and G. Kaupp. Heterocycles by cascade reactions of versatile thioureidoacetamides // *Tetrahedron*. - 2002. - V. 58. - P. 7241-7250.
154. S. S. Bhat, A. A. Kumbhar, H. Heptullah, A. A. Khan, V. V. Gobre, S. P. Gejji, *et al.* Synthesis, electronic structure, DNA and protein binding, DNA cleavage, and anticancer activity of fluorophore-labeled copper (II) complexes // *Inorganic chemistry*. - 2010. - V. 50. - P. 545-558.

155. S. Z. Vatsadze, A. G. Majouga, E. K. Beloglazkina, A. V. Mironov, and N. V. Zyk. First organic-inorganic hybrid material based on AgNO₃ and 3-pyridine containing 2-thiohydantoin // *Mendeleev Communications*. - 2007. - V. 17. - P. 77-79.
156. A. G. Majouga, E. K. Beloglazkina, A. V. Yudina, A. V. Mironov, and N. V. Zyk. Oxidative dehydrogenation of 5-(pyridine-2-yl-methyl)-2-thioxo-4-imidazolidinones in complexation reaction with copper (II) chloride // *Inorganic Chemistry Communications*. - 2015. - V. 51. - P. 114-117.
157. K. Tishchenko, E. Beloglazkina, A. Mazhuga, and N. Zyk. Copper-containing enzymes: Site types and low-molecular-weight model compounds // *Review Journal of Chemistry*. - 2016. - V. 6. - P. 49-82.
158. P. Chen, S. DeBeer George, I. Cabrito, W. E. Antholine, J. J. G. Moura, I. Moura, *et al.* Electronic Structure Description of the μ_4 -Sulfide Bridged Tetranuclear CuZ Center in N₂O Reductase // *Journal of the American Chemical Society*. - 2002. - V. 124. - P. 744-745.
159. W. Rammal, C. Belle, C. Béguin, C. Duboc, C. Philouze, J.-L. Pierre, *et al.* Multifrequency EPR and Redox Reactivity Investigations of a Bis (μ -thiolato)-dicopper (II, II) Complex // *Inorganic chemistry*. - 2006. - V. 45. - P. 10355-10362.
160. A. G. Majouga, E. K. Beloglazkina, O. V. Shilova, A. A. Moiseeva, and N. V. Zyk. Tetradentate nitrogen-containing ligands bis-5-(2-pyridylmethylidene)-3, 5-dihydro-4H-imidazol-4-ones and their coordination compounds with CuI and CuII // *Russian Chemical Bulletin*. - 2009. - V. 58. - P. 1392-1399.
161. P. Aslanidis, S. Kyritsis, M. Lalia-Kantouri, B. Wicher, and M. Gdaniec. Copper (I) halide complexes of 2-thiohydantoin and 5, 5-diphenyl-2-thiohydantoin // *Polyhedron*. - 2012. - V. 48. - P. 140-145.
162. R. M. El-Bahnasawy, M. M. Shoukry, and M. M. Hussein. Structure and stability of complexes of thiohydantoin derivative // *Journal of Chemical Sciences*. - 1986. - V. 96. - P. 309-313.
163. M. T. M. González, J. L. G. Ariza, F. Pino, and R. G. Villanova. Derivatives of 2-thiohydantoin as spectrophotometric analytical reagents // *Talanta*. - 1978. - V. 25. - P. 331-337.
164. S. S. Kandil, G. B. El-Hefnawy, E. A. Bakr, and A. Z. A. El-Ezz. Cobalt (II), nickel (II) and copper (II) complexes of 5-(2-carboxyphenylazo)-2-thiohydantoin // *Transition metal chemistry*. - 2003. - V. 28. - P. 168-175.

165. R. L. Dixon, R. H. Adamson, M. Ben, and D. P. Rall. Apparent Lack of Interaction Between Dimethyl Sulfoxide (DMSO) and a Variety of Drugs // *Experimental Biology and Medicine*. - 1965. - V. 118. - P. 756-759.
166. S. W. Jacob, R. Herschler, and H. Schmellenkamp. DMSO: Die Anwendung in der Medizin The Use of DMSO in Medicine //: Springer-Verlag, 2013.
167. V. A. Stoy and M. Chvapil, "Injectable physiologically-acceptable polymeric composition," ed: Google Patents, 1986.
168. A. E. Martell and R. J. Motekaitis. Determination and use of stability constants //: VCH publishers, 1992.
169. R. M. Izatt, K. Pawlak, J. S. Bradshaw, and R. L. Bruening. Thermodynamic and kinetic data for macrocycle interactions with cations and anions // *Chemical Reviews*. - 1991. - V. 91. - P. 1721-2085.
170. D. P. Riley, S. L. Henke, P. J. Lennon, R. H. Weiss, W. L. Neumann, W. J. Rivers, *et al.* Synthesis, characterization, and stability of manganese (II) C-substituted 1, 4, 7, 10, 13-pentaazacyclopentadecane complexes exhibiting superoxide dismutase activity // *Inorganic Chemistry*. - 1996. - V. 35. - P. 5213-5231.
171. T. B. Field, J. L. McCourt, and W. A. E. McBryde. Composition and stability of iron and copper citrate complexes in aqueous solution // *Canadian Journal of Chemistry*. - 1974. - V. 52. - P. 3119-3124.
172. S. S. Jambhekar and C. M. Thomas. Cyclodextrins in pharmacy: background and introduction // *J Chronother Drug Deliv*. - 2013. - V. 4. - P. 1-13.
173. А. Змитревич and А. Пупышев. Атомно-эмиссионный спектральный анализ ферросплавов: монография. Екатеринбург: УГТУ-УПИ, 2009. 270 с // АИК. - 2009. - P. 65.
174. G. Anderegg. Critical Survey of Stability Constants of EDTA Complexes: Critical Evaluation of Equilibrium Constants in Solution: Stability Constants of Metal Complexes //: Elsevier, 2013.
175. I. Svanedal, S. Boija, A. Almesåker, G. Persson, F. Andersson, E. Hedenström, *et al.* Metal ion coordination, conditional stability constants, and solution behavior of chelating surfactant metal complexes // *Langmuir*. - 2014. - V. 30. - P. 4605-4612.
176. A. M. Craven, G. R. Aiken, and J. N. Ryan. Copper(II) Binding by Dissolved Organic Matter: Importance of the Copper-to-Dissolved Organic Matter Ratio and Implications for the Biotic Ligand Model // *Environmental Science & Technology*. - 2012. - V. 46. - P. 9948-9955.

177. L. M. Laglera and C. M. van den Berg. Copper complexation by thiol compounds in estuarine waters // *Marine Chemistry*. - 2003. - V. 82. - P. 71-89.
178. Б. Еремин and А. Борщевский. Основы общей и физической химии // Долгопрудный: Издательский Дом «Интеллект». - 2012. -.
179. Ю.П. Галактионов and К. В. Астахов. Спектрофотометрия комплексов // *Журнал физической химии*. - 1963. - V. 12. -.
180. E. M. Johnston, S. Dell'Acqua, S. R. Pauleta, I. Moura, and E. I. Solomon. Protonation state of the Cu₄S₂CuZ site in nitrous oxide reductase: redox dependence and insight into reactivity // *Chemical Science*. - 2015. - V. 6. - P. 5670-5679.
181. T. Haltia, K. Brown, M. Tegoni, C. Cambillau, M. Saraste, K. Mattila, *et al.* Crystal structure of nitrous oxide reductase from *Paracoccus denitrificans* at 1.6 Å resolution // *Biochemical Journal*. - 2003. - V. 369. - P. 77-88.
182. Y. G. Budnikova, A. G. Kafiyatullina, Y. M. Kargin, and O. G. Sinyashin. Kinetic Regularities of Electrochemical Reduction of Organic Halides under the Action of Cobalt Complexes with 2, 2'-Bipyridine // *Russian Journal of General Chemistry*. - 2001. - V. 71. - P. 231-233.
183. I. Taniguchi, T. Shimpuku, K. Yamashita, and H. Ohtaki. Electrocatalytic reduction of nitrous oxide to dinitrogen at a mercury electrode using nickel complexes of macrocyclic polyamines // *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*. - 1990. - P. 915-917.
184. S. Ghosh, S. I. Gorelsky, P. Chen, I. Cabrito, J. J. G. Moura, I. Moura, *et al.* Activation of N₂O reduction by the fully reduced μ_4 -sulfide bridged tetranuclear CuZ cluster in nitrous oxide reductase // *Journal of the American Chemical Society*. - 2003. - V. 125. - P. 15708-15709.
185. Ю. Богданова, В. Должикова, Г. Белов, О. Голодков, and А. Чалых. Прогнозирование биосовместимости полиолефинкетонов на основании энергетических характеристик их поверхностей // *Вестник Московского Университета*. - 2008. - V. 49. - P. 319-322.
186. Б. Д. Сумм and Ю. В. Горюнов. Физико-химические основы смачивания и растекания //: *Химия*, 1976.
187. А. Адамсон. Физическая химия поверхностей // - 1979. -.
188. J. Genzer and K. Efimenko. Recent developments in superhydrophobic surfaces and their relevance to marine fouling: a review // *Biofouling*. - 2006. - V. 22. - P. 339-360.
189. G. B. Sigal, M. Mrksich, and G. M. Whitesides. Effect of surface wettability on the adsorption of proteins and detergents // *Journal of the American Chemical Society*. - 1998. - V. 120. - P. 3464-3473.

190. Л. Титце and Т. Айхер. Препаративная органическая химия: Реакции и синтезы в практикуме органической химии и научно-исследовательской лаборатории: Пер. с нем // vol. 704: мир М., 1999.
191. A. H. Coons and M. H. Kaplan. Localization of antigen in tissue cells II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody // The Journal of experimental medicine. - 1950. - V. 91. - P. 1-13.
192. X. Huang, D. Wu, J. Ding, X. Zhang, M. Liu, H. Wu, *et al.* Synthesis and Biological Activities of New Chiral Imidazolinone Derivatives // Phosphorus, Sulfur, and Silicon. - 2009. - V. 185. - P. 117-128.