

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Крапивин Владимир Борисович

**Молекулярное моделирование биохимических реакций
нитроксильных радикалов и динитрозильных комплексов железа**

1.4.4 – Физическая химия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Москва – 2022

Работа выполнена в отделе Кинетики химических и биологических процессов
Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт проблем
химической физики Российской академии наук»

Научный руководитель: **Лужков Виктор Борисович**
доктор химических наук, старший научный
сотрудник

Официальные оппоненты: **Немухин Александр Владимирович**
доктор химических наук, профессор, Московский
государственный университет имени М.В.
Ломоносова, Химический факультет, Кафедра
физической химии, профессор

Дьячков Павел Николаевич
доктор химических наук, профессор, Институт
общей и неорганической химии имени Н.С.
Курнакова РАН, Лаборатория квантовой химии,
главный научный сотрудник

Палюлин Владимир Александрович
кандидат химических наук, старший научный
сотрудник, Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова,
Химический факультет, Кафедра медицинской
химии и тонкого органического синтеза, ведущий
научный сотрудник

Защита диссертации состоится «28» октября 2022 г. в 17:00 часов на
заседании диссертационного совета МГУ.014.3 (МГУ.02.04) Московского
государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, г. Москва,
Ленинские Горы, д. 1, стр. 3, Химический факультет МГУ, аудитория СХА (преп.).

E-mail: mish@kinet.chem.msu.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной
библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте
ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/493253177/>

Автореферат разослан « » сентября 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
МГУ.014.3 (МГУ.02.04),
к.х.н., доцент

М.И. Шилина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Свободные радикалы представляют собой химические соединения, содержащие неспаренные электроны на внешней оболочке. Большинство радикалов являются активными частицами, способными инициировать различные биохимические процессы, в том числе вызывать окислительный стресс. Ведущую роль в процессах окисления биомолекул играют свободные радикалы, в первую очередь, активные формы кислорода (АФК), формирующиеся в процессе метаболизма. Важным представителем класса биологических свободных радикалов является монооксид азота ($\text{NO}^\bullet$). В отличие от большинства АФК, монооксид азота достаточно стабилен и проявляет уникальные окислительно-восстановительные свойства. $\text{NO}^\bullet$ выполняет функции нейромедиатора и нейромодулятора, регулятора сердечно-сосудистой системы. Поэтому создание новых лекарственных средств, биологическая активность которых основана на свойствах $\text{NO}^\bullet$, является актуальной задачей медицинской химии.

Стабильные нитроксильные радикалы (НР) можно рассматривать как органические производные монооксида азота. В последние 20 лет проведены исследования, доказывающие антиоксидантное действие нитроксидов на клеточных культурах и животных. НР способны обратимо подвергаться процессам как окисления до оксоаммониевого катиона, так и восстановления до гидроксиламина. Мерой активности в данных процессах являются электрохимические потенциалы, поэтому расчет потенциалов нитроксидов является важной задачей для прогнозирования их антиоксидантных свойств.

Широкое применение в биохимии находит модификация различных биологических объектов нитроксильными радикалами. В частности, большой интерес представляет создание нитроксил-содержащих производных хитозана. Хитозан является биосовместимым аминсахаридом, получаемым щелочным гидролизом хитина – одного из самых распространенных углеводов. В последние десятилетия хитозан и его производные наиболее активно используются как носители для доставки лекарственных средств. К настоящему времени в ИПХФ РАН получены олигомерные водорастворимые хитозан-нитроксилы, а также мицеллообразующие высокомолекулярные производные. Моделирование структуры и свойств данных соединений является актуальной проблемой при разработке лекарственных средств.

Еще одним классом биологически активных соединений, содержащих группу $\text{NO}^\bullet$, являются нитрозильные комплексы железа, которые относятся к перспективному классу доноров монооксида азота, поскольку связывают большое количество $\text{NO}^\bullet$ и не требуют дополнительной активации для его высвобождения. Наибольший интерес представляют динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с функциональными серосодержащими лигандами как синтетические аналоги активного центра негемовых

железо-серных белков. Соединения данного класса являются универсальными и в то же время селективными регуляторами физиологических процессов. Молекулярное моделирование позволяет лучше понять механизм химических превращений ДНКЖ и предсказать свойства новых синтезируемых комплексов.

Цель работы: изучение связи химического строения нитроксил-содержащих функциональных групп и их окислительно-восстановительных свойств в спин-меченых биологически активных соединениях; изучение механизмов превращений серонитрозильных комплексов железа в бескислородном водном растворе и их взаимодействия с сывороточным альбумином.

Для достижения поставленных целей необходимо решение следующих **задач:**

- Квантово-химический расчет потенциалов одноэлектронного окисления ряда пяти- и шестичленных нитроксильных радикалов и определение влияния уровня теоретических расчетов на точность воспроизведения экспериментальных данных;

- Изучение конформационных свойств низкомолекулярных олигомеров хитозана и их нитроксильных производных в водном растворе методами квантовой химии, молекулярной механики и молекулярной динамики;

- Вычисление методами теории функционала плотности (ТФП) окислительно-восстановительных потенциалов нитроксильных производных хитозана и фуллерена C_{60} в воде;

- Изучение реакций распада тиокарбонильных и тиолатных нитрозильных комплексов железа в бескислородном водном растворе методами квантовой химии и оценка зависимости устойчивости ДНКЖ от структуры лиганда.

- Определение параметров силового поля НР и ДНКЖ с тиокарбонильными лигандами из данных расчетов методами ТФП;

- Определение структуры комплексов белок – лиганд бычьего сывороточного альбумина с тиомочевинным ДНКЖ методом молекулярного докинга и исследование молекулярной динамики найденных белок-лигандных комплексов.

Объектами исследования в работе являются циклические нитроксильные радикалы на основе пиперидин-, пирролидин- и пирролин-N-оксида, их производные на основе хитозана и фуллерена C_{60} , динитрозильные комплексы железа с тиокарбонильными и тиолатными лигандами.

Предметом исследования являются реакции одноэлектронного окисления и восстановления нитроксильных радикалов и реакции распада динитрозильных комплексов железа в анаэробном водном растворе.

Научная новизна работы:

В ряду квантово-химических методов описания электронной структуры химических соединений функционалы плотности в сочетании с континуумными моделями растворителя позволяют напрямую определить термодинамические характеристики молекул в растворе. В диссертационной работе проведен анализ

влияния уровня теоретических моделей на результаты расчетов электрохимических потенциалов нитроксильных радикалов с использованием метода термодинамического цикла (ТЦ) и оптимизации геометрии в растворе. Показано, при оптимизации в растворе могут появляться устойчивые конформации нитроксильных радикалов, которые не являются энергетическими минимумами в газовой фазе. Впервые показано, что данный эффект может вносить систематическую ошибку при расчетах редокс-потенциалов методом ТЦ. В работе показано существенное влияние растворителя на структуру конформационно гибких биологически активных производных пиперидин- и пирролиноксила и проведены расчеты их редокс-потенциалов. Впервые выполнено молекулярно-динамическое моделирование нитроксильных производных низкомолекулярного хитозана и получены оценки окислительно-восстановительных свойств данных соединений методами квантовой химии.

Квантово-химическими методами изучены реакции гидролиза различных ДНКЖ в бескислородном водном растворе, определены структуры промежуточных комплексов и переходных состояний. Рассчитаны свободные энергии замещения лигандов на молекулы растворителя для ряда новых ДНКЖ с тиокарбонильными и тиолатными лигандами. Предсказано влияние природы тио-лиганда на устойчивость ДНКЖ в воде.

Изучено взаимодействие динитрозильного комплекса железа на основе тиомочевины с альбумином, найдены возможные сайты связывания для данного соединения на поверхности белка. Впервые определены параметры силового поля для железо-нитрозильных комплексов и проведена молекулярная динамика белок-лигандных комплексов. На основе полученных результатов предложен механизм стабилизации ДНКЖ в присутствии альбумина за счет электростатических и неполярных взаимодействий с поверхностью белка.

Теоретическая и практическая значимость работы состоит в определении оптимальных подходов (функционалов, наборов базисных функций, выбора приближений модели) для расчета электрохимических потенциалов циклических нитроксильных радикалов. Конформационный анализ дал наиболее полные представления о механизмах гибкости хитозана в водном растворе. Найденные параметры силового поля позволяют проводить моделирование новых нитроксил-содержащих производных хитозана, а также изучать взаимодействие перспективных ДНКЖ с биомолекулами методами молекулярной механики. Расчеты гидролиза ДНКЖ позволяют предсказывать NO-донорную активность новых комплексов в зависимости от структуры серосодержащего лиганда.

Методология и методы исследования

В диссертационной работе был использован ряд вычислительных подходов, включающий методы квантовой и молекулярной механики, молекулярной динамики

и стыковки (докинга) лигандов с белками-мишенями. Метод ТФП сочетает строгость подхода к описанию химических систем и высокую скорость вычислений. А в сочетании с континуумными моделями растворителя и подходами статистической термодинамики ТФП позволяет рассчитывать такие параметры как свободная энергия химических реакций и электрохимический потенциал. Методы молекулярной механики (ММ) и молекулярной динамики (МД) позволяют моделировать системы из большого количества атомов и оценивать изменение систем во времени.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Квантово-химические расчеты на уровне B3LYP/6-31+G(d,p)//M052X/6-311+G(2df,2p) PCM(SMD) и в многоконформационном описании определяют электрохимические потенциалы циклических нитроксильных радикалов со статистической погрешностью до 10 мВ. Электрохимические потенциалы окисления пиперидин- и пирролин-N-оксида повышаются на 70-90 мВ при их включении в олигомеры хитозана.

2. В газовой фазе скрученные конформации низкомолекулярных олигомеров хитозана стабильнее линейной на 1-7 кДж/моль на звено, в то время как в водной среде линейная конформация стабилизирована на 4-12 кДж/моль на звено по сравнению со скрученными.

3. Барьер реакции гидролиза катионного ДНКЖ на основе тиоформальдегида в анаэробном растворе в случае ассоциативного механизма составляет 3-7 кДж/моль со структурой переходного состояния в виде тригональной бипирамиды, в то время как для диссоциативного механизма барьер реакции равен 26-27 кДж/моль.

4. Связывание тиомочевинного ДНКЖ с бычьим сывороточным альбумином происходит по шести сайтам, локализованным на IA, IIA и IIB субъединицах белка.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Достоверность результатов обеспечена использованием вычислительных методов, рекомендуемых или специально разработанных для моделирования конкретных классов химических соединений, а также дублированием расчетов несколькими методами. Большинство результатов расчетов было сопоставлено с экспериментальными данными по структуре и свойствам рассматриваемых веществ. Надежность использованных методик подтверждается также общим высоким уровнем публикуемости результатов расчетов по программам квантовой химии, докинга и молекулярной динамики, использованных в диссертационной работе.

Апробация работы

Основные результаты диссертационной работы представлены на конференциях, таких как: Международный молодежный научный форум «Ломоносов» (Москва, МГУ, 2019, 2021, 2022 г.); Конференция с международным участием «Физическая химия в России и за рубежом: от квантовой химии до эксперимента» (Черноголовка, 2019 г.); Междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые

материалы и перспективные технологии» (Москва, 2019); Всероссийская научная конференции МФТИ, 2020 г.; Школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (Казань, 2020 г.); Всероссийская школа молодых ученых «Научные школы большой химической физики» (Черноголовка, 2021 г.); XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2021» (St. Petersburg University, 2021), X Всероссийская молодежная школа-конференция «Квантово-химические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул» (Иваново, 2022 г.); X International Voevodsky Conference «Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes» (Novosibirsk, 2022).

Личный вклад автора

Соискателем проведена работа по поиску и анализу литературы по теме диссертационной работы. Все результаты вычислительного моделирования получены лично автором или при его непосредственном участии. Автор проводил расчеты окислительно-восстановительных потенциалов нитроксильных радикалов, совместно с д.х.н. Лужковым В. Б. тестировал различные функционалы и сольватационные модели для наилучшего соответствия экспериментальным данным. Самостоятельно разрабатывал параметры силового поля для молекулярной динамики хитозан-нитроксидов и динитрозильных комплексов железа, проводил молекулярно-механическое и молекулярно-динамическое моделирование данных соединений, а также создавал алгоритмы и программы для анализа полученных данных. Принимал участие в написании статей и тезисов докладов на конференциях. Диссертационная работа написана лично соискателем.

Публикации

Основное содержание диссертации опубликовано в 10 научных работах, из них 5 статей в журналах из перечня рецензируемых научных журналов (Web of Science, Scopus и RSCI) и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.4. – физическая химия и 5 тезисов докладов. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, методов расчетов, обсуждения результатов, заключения и списка цитируемой литературы, включающего 221 наименование. Работа изложена на 155 страницах машинописного текста, содержит 60 рисунков и 28 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснована актуальность темы диссертационной работы, сформулированы цель и задачи научного исследования, изложены научная новизна и практическая значимость полученных результатов, выделены положения, выносимые на защиту.

В первой главе дан аналитический обзор литературы по теме исследования: рассмотрены свойства циклических нитроксильных радикалов, проанализированы механизмы биологической активности нитроксидов; представлены данные по применению полисахарида хитозана как средства доставки лекарственных средств и носителя биологически активных функциональных групп; проанализировано строение и биохимические свойства динитрозильных комплексов железа. По итогам аналитического обзора литературы дано обоснование актуальности исследований, сформулированы цель, задачи, научная новизна и практическая значимость диссертационной работы.

Во второй главе описана методика квантово-химических и молекулярно-механических расчетов, указаны используемые программные комплексы и основные настройки моделирования.

В третьей главе приводятся результаты квантово-химических расчетов окислительно-восстановительных потенциалов циклических нитроксильных радикалов и их обсуждение.

Структура моделируемых нитроксильных радикалов

Для расчета электрохимических потенциалов был выбран ряд циклических 5-ти и 6-тичленных нитроксильных радикалов с различной структурой цикла и строением заместителей (рис. 1). Нитроксилы **n1-n10**, выбранные из полного набора изученных в работе, характеризуются широким интервалом потенциалов одноэлектронного окисления, для большинства из них определены потенциалы реакции восстановления при различных pH.

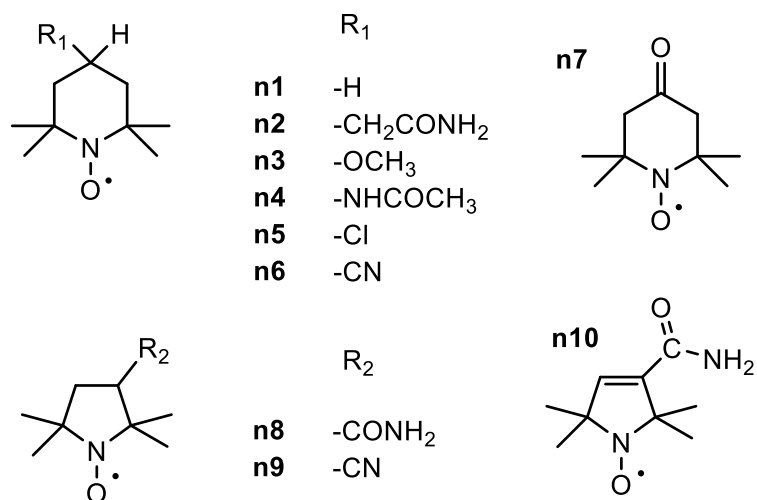


Рисунок 1 – Химическая структура исследуемых нитроксильных радикалов

Для нитроксилов **n1-n10** были рассчитаны потенциалы реакций одноэлектронного окисления до оксоаммониевого катиона (E_{Ox}) и восстановления до гидроксиламина (E_{Red}). Расчеты проводились с использованием различных функционалов и базисных наборов с оптимизацией геометрии в вакууме и воде.

Результаты расчетов электрохимических потенциалов реакции окисления нитроксильных радикалов

Оптимизация геометрии в вакууме с последующим пересчетом потенциальной энергии в растворе является распространенным методом определения термодинамических характеристик химических процессов. Проведенные расчеты методом ТЦ воспроизводят экспериментальные потенциалы одноэлектронного окисления большинства рассматриваемых нитроксилов с точностью до 10 мВ, что сопоставимо с ошибкой экспериментальных измерений¹. Однако полученные результаты показывают, что для гибких органических молекул, таких как нитроксил **n2**, данный подход приводит к существенной ошибке, связанной с влиянием полярной среды (растворителя) на геометрию молекулы.

Для более точных расчетов оптимизация геометрии реактантов и расчет гармонических частот проводились как в газовой, так и в водной фазе в модели PCM(SMD) с использованием функционала M062X, учитывающего вклады дисперсионных взаимодействий, в базисе 6-31+G(d,p). В данных расчетах учитывались множественные конформации реагирующих частиц. Свободная энергия сольватации дополнительно пересчитывалась с использованием функционала PBE0. Полученные корреляции приведены на рис. 2. Оптимизация в воде приводит к существенно лучшему соответствию с экспериментальными данными (коэффициент корреляции достигает 0,94). Наиболее ярко влияние растворителя выражено для соединений **n2**, **n4** и **n8**, имеющих гибкие заместители.

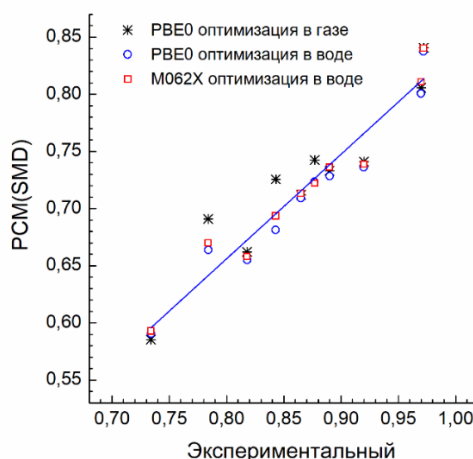


Рисунок 2 – Сопоставление экспериментальных и рассчитанных в модели PCM(SMD) значений потенциалов E_{Ox} (В) нитроксилов **n1-n10**

¹Krapivin V. B., Mendkovich A. S., Sen V. D., Luzhkov V. B. Quantum chemical calculations of hydration electrostatics and electrochemical oxidation potential of cyclic nitroxide radicals // Mendelevov Communications. 2019. V. 29. № 1. P. 77-79.

Также были вычислены барьеры конформационных переходов в циклах. Свободные энергии активации для переходов *кресло* ↔ *твист* в нитроксиде **n7** и *твист* + ↔ *твист* - в нитроксиде **n8** находятся в пределах 14-19 кДж/моль. Полученные значения обеспечивают среднее время конформационных переходов порядка 10^{-12} с при температуре 298 К, что значительно меньше характерного времени конверсии циклогексана (10^{-5} с).

Результаты расчетов электрохимических потенциалов реакции восстановления нитроксильных радикалов

Хотя наилучшую корреляцию с экспериментальными данными по потенциалам реакции окисления показал метод оптимизации геометрии в воде (см. рис. 2), однако данный способ требует достаточно высоких вычислительных затрат. Кроме того, использование численных методов при построении сольватируемой поверхности молекул приводит к проблемам сходимости процедуры самосогласования для систем, включающих большое количество атомов. Поэтому для возможности сравнения электрохимических потенциалов нитроксильных производных хитозана с рядом индивидуальных нитроксидов расчеты E_{Red} были проведены в модели термодинамического цикла. Оптимизация геометрии и расчет термодинамического вклада были выполнены в газовой фазе методом B3LYP/6-31+G(d,p), а расчет электронной энергии и свободной энергии сольватации был проведен в M052X/6-311+G(2df,2p). Поскольку в реакции восстановления нитроксида участвуют протоны, для определения полного потенциала E_{Red} требуется расчет констант кислотности соответствующих гидроксилamina и гидроксилammonия. Однако восстановительную активность нитроксильного радикала можно оценить упрощенно, рассчитав свободную энергию реакции восстановления до аниона, без учета протонирования, и соответствующее ей значение потенциала E_{Red}^0 . Экспериментальные значения потенциала E_{Red} линейно коррелируют с расчетными значениями потенциала восстановления нитроксильного радикала до соответствующего аниона без учета протонирования с коэффициентом корреляции 0,897. Полученные результаты могут быть использованы для оценки окислительно-восстановительной активности нитроксильных производных хитозана

В четвертой главе приводятся результаты молекулярно-механического и молекулярно-динамического моделирования структуры олигомеров хитозана и их нитроксильных производных, а также квантово-химический расчет электрохимических потенциалов хитозан-нитроксидов.

Конформационный анализ олигомеров хитозана

Хитозан представляет собой полисахарид, состоящий из звеньев D-глюкозамина (G) и N-ацетил-D-глюкозамина (GAc), связанных $\beta(1 \rightarrow 4)$ гликозидной связью. Конформация основной цепи полисахарида определяется двумя двугранными углами $\varphi(\text{O}_5\text{-C}_1\text{-O}_1\text{-C}_4')$ и $\psi(\text{C}_1\text{-O}_1\text{-C}_4'\text{-C}_3')$ гликозидной связи (рис. 3). Как и для

многих полисахаридов, в линейной кристаллической структуре хитозана присутствует внутримолекулярная водородная связь $O_3'-H \cdots O_5$, в которой водород при атоме O_3' ориентирован в сторону O_1 .

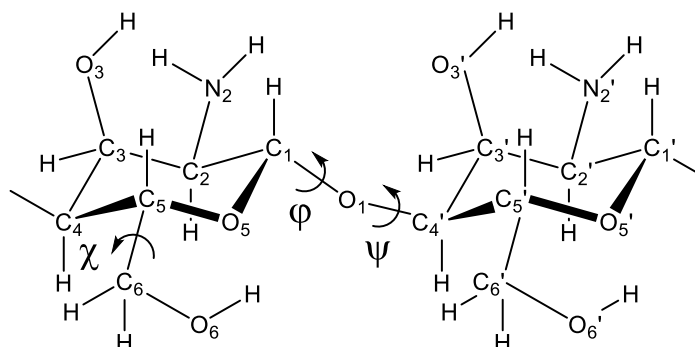


Рисунок 3 – Химическая структура димера хитозана

Для определения механизма гибкости хитозана были рассмотрены все возможные вращения гликозидной связи с изменением углов φ и ψ на примере непротонированного димера G_2 с концевыми гидроксильными группами. Оптимизация геометрии выполнялась методом силового поля в газовой фазе и воде. В результате минимизации найдены 7 конформаций, отвечающих локальным энергетическим минимумам. Наиболее устойчивыми оказались три структуры. Конформация 1 близка кристаллической структуре хитозана и отвечает глобальному энергетическому минимуму в водном растворе. Конформация 2 получается поворотом второго звена вокруг связи C_1-O_1 с изменением угла φ , при этом угол ψ практически не меняется. Наоборот, при переходе из конформации 1 к конформации 3 происходит вращение вокруг связи O_1-C_4' с изменением только угла ψ . Квантово-химический расчет дал близкие результаты для геометрии конформеров.

Далее устойчивость конформаций 1-7 была изучена методом МД. Карта распределения конформаций димера хитозана по углам, полученная из коротких траекторий МД длиной 100 пс, представлена на рис. 4. Результаты моделирования позволяют предположить, что гибкость хитозана в водном растворе определяется существованием наименее энергозатратных конформационных переходов $1 \leftrightarrow 2$ и $1 \leftrightarrow 3$.

Для изучения влияния растворителя и количества звеньев глюкозамина на устойчивость изогнутых конформеров были проведены расчеты конформаций 1, 2 и 3 для тримеров и тетрамеров глюкозамина. При этом все углы φ и ψ соответствовали заданной конформации. В газовой фазе изогнутые конформации 2 и 3 оказываются более устойчивыми, чем линейная конформация 1. В водном растворе квантово-химический расчет предсказывает наибольшую устойчивость конформации 2 для димера хитозана, в то время как для тетрамера линейная конформация 1 отвечает минимуму энергии. Метод силового поля предсказывает наибольшую устойчивость конформации 1 для всех рассмотренных молекул.

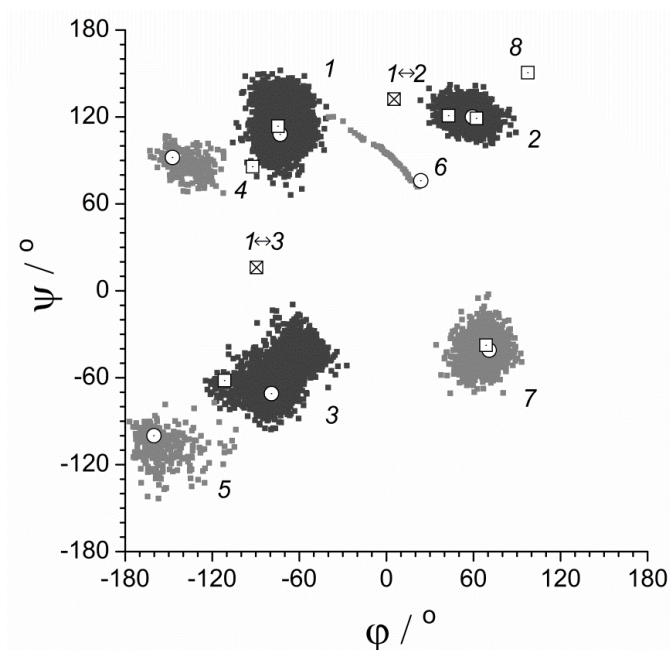


Рисунок 4 – Карта распределения конформаций нейтрального димера хитозана по углам ϕ и ψ из расчетов МД. Отдельно обозначены положения минимумов, найденные методами MM/GBSA ($\circ$) и ТФП в водном растворе ($\square$), а также координаты переходных состояний ($\boxtimes$).

Также была изучена конформационная подвижность гексамеров хитозана с различной степенью протонирования аминогрупп методами силового поля и молекулярной динамики. Результаты моделирования показывают, что в воде линейная конформация 1 оказывается наиболее устойчивой во всех случаях, однако протонирование одной из шести аминогрупп повышает амплитуду колебаний соседних звеньев. В случае чередования заряженных и нейтральных аминогрупп структура олигомера обладает наибольшей гибкостью за счет увеличения частоты переходов $1 \leftrightarrow 3$. При полном протонировании структура оказывается наиболее жесткой, и переходы $1 \leftrightarrow 2$ и $1 \leftrightarrow 3$ маловероятны.

Моделирование структуры нитроксильных производных хитозана

Рассматриваемые нитроксильные производные хитозана представляют собой олигосахариды с присоединенным по аминогруппе центрального звена карбоксил-содержащим нитроксильным радикалом (рис. 5). В качестве стартовых структур использовались геометрии, в которых ориентации звеньев основной цепи соответствовали конформациям 1, 2 и 3. Ориентации заместителей отвечали наиболее энергетически выгодным конформациям соответствующих нитроксильных радикалов, найденным ранее методом функционала плотности². Исследование конформационной подвижности нитроксильных заместителей показало, что углы α и

² Krapivin V. B., Sen V. D., Luzhkov V. B. Quantum chemical calculations of the one-electron oxidation potential of nitroxide spin labels in biologically active compounds // Chemical Physics. 2019. V. 522. P. 214-219.

β обладают большей свободой и в ходе моделирования меняются в широких пределах, в то время как углы ω и γ колеблются в узком диапазоне значений.

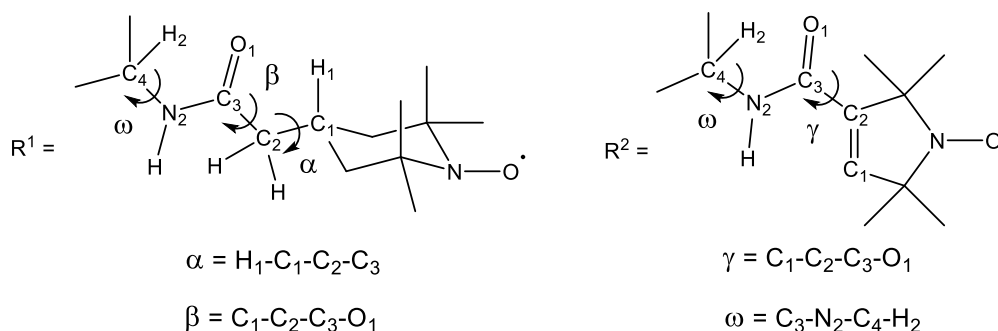


Рисунок 5 – Химическая структура нитроксильных заместителей

Расчеты показали, что линейная структура 1 по-прежнему обладает наибольшей устойчивостью. Тем не менее, для протонированных производных HG-GR¹-HG и HG-GR²-HG наблюдаются самопроизвольные конформационные переходы $1 \leftrightarrow 3$ для одного из двух крайних звеньев тримера. Бóльшая устойчивость конформации 3 в этом случае, как и для незамещенного хитозана, связана с тем, что в случае линейной конформации положительно заряженные NH_3^+ -группы крайних звеньев располагаются на одной стороне основной цепи, в то время как при повороте аминогруппы оказываются по разные стороны и на большем расстоянии.

Далее было проведено молекулярно-динамическое моделирование гексамеров хитозана с нитроксильным заместителем по третьему звену (рис. 6) и разной степенью протонирования. Во всех случаях преобладает линейная структура 1. Для полностью или частично протонированных аминогрупп наиболее высокой подвижностью обладает гликозидная связь между 3-м и 4-м звеньями по месту присоединения нитроксила.

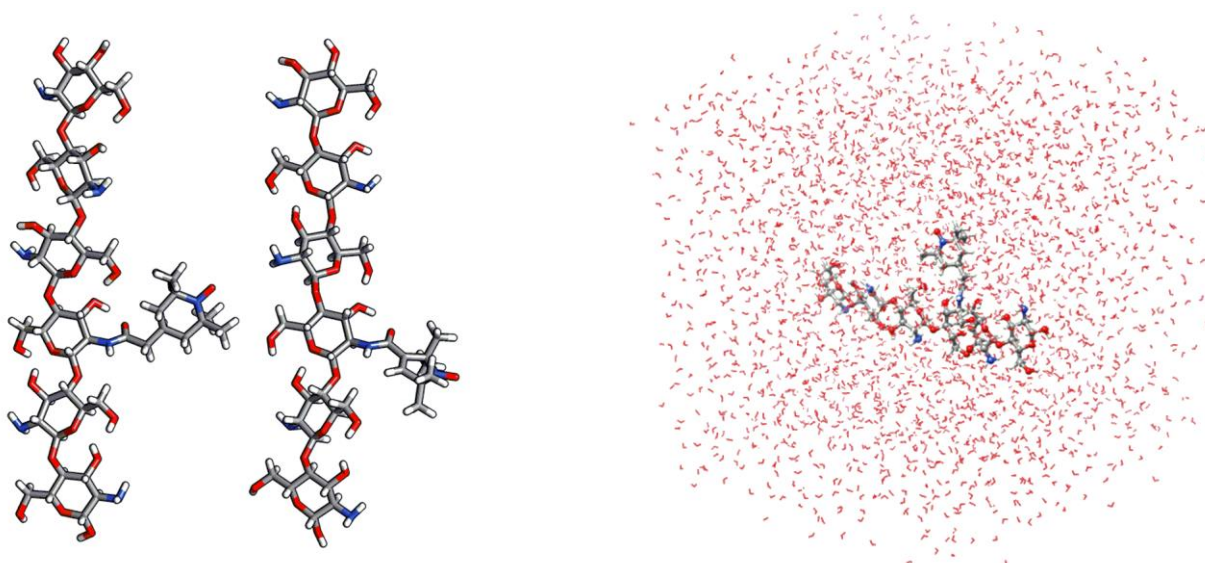


Рисунок 6 – Линейная структура гексамеров хитозана с присоединенным НР: индивидуальная и в окружении молекул воды (TIP3P) в кубической ячейке

Нитроксил R^1 содержит метиленовую группу и обладает большей подвижностью, что делает возможными гидрофобные взаимодействия между CH_3 -группами нитроксила и соседними звеньями хитозана. В то же время полярная NO -группа экранирована и не образует близких контактов с основной цепью. Нитроксил R^2 соединен с хитозаном жесткой системой двойных связей и практически не взаимодействует с основной цепью.

Полученные в результате моделирования данные позволяют сделать вывод о невовлеченности нитроксильной группы во внутримолекулярные взаимодействия хитозан-нитроксидов. Поэтому окислительно-восстановительные свойства таких производных должны определяться в первую очередь активностью самих нитроксидов. Для подтверждения данного предположения были выполнены квантово-химические расчеты электрохимических потенциалов для тримеров $G-GR^1-G$ и $G-GR^2-G$ и их форм с протонированными аминогруппами.

Окислительно-восстановительные потенциалы нитроксильных производных хитозана

Для расчета электрохимических потенциалов нитроксильных производных тримеров хитозана были использованы наиболее устойчивые конформации, полученные по результатам молекулярно-механического моделирования. Структуры рассматриваемых соединений были оптимизированы в вакууме методом B3LYP/6-31+G(d,p), а свободные энергии сольватации определялись из односточечных расчетов в M052X/6-311+G(2df,2p) в воде в модели PCM(SMD).

Были определены свободные энергии соответствующих радикалов, оксоаммониевых катионов, анионов, гидроксиламинов и катионов гидроксиламмония. В расчетах производных с незаряженными аминогруппами хитозана концентрация ионов водорода соответствовала $pH = 7$, в то время как для производных $H_2G_3R^1$ и $H_2G_3R^2$ принималось $pH = 6$. Константы кислотности NH_2 -групп глюкозаминов не рассчитывались.

Проведенные расчеты показывают, что присоединение нитроксильного радикала к хитозану приводит к повышению редокс-потенциала окисления и понижению редокс-потенциала восстановления. Это связано с увеличением эффективного размера молекулы и как следствие меньшей стабилизацией заряженных частиц в водном растворе. В то же время с понижением pH от 7 до 6 полный потенциал восстановления E_{Red} для индивидуальных нитроксидов возрастает на ~60 мВ, что согласуется с результатами экспериментальных измерений. Для производных G_3R^1 и G_3R^2 потенциал E_{Red} возрастает на 46 и 99 мВ соответственно при понижении pH .

В пятой главе приводятся результаты квантово-химических расчетов реакций распада динитрозильных комплексов железа в анаэробном водном растворе.

Структуры исследуемых динитрозильных комплексов железа с серосодержащими лигандами

Катионные динитрозильные комплексы железа с серосодержащими лигандами представляют интерес как перспективные лекарственные препараты, обладающие NO-донорной активностью. В водном растворе данные комплексы разлагаются с высвобождением NO[•], при этом донорная активность зависит как от структуры комплекса, так и от окружающих условий (температуры, pH, присутствия кислорода). Для понимания общих закономерностей превращений ДНКЖ в воде проведены квантово-химические расчеты гидролиза ряда катионных и анионных комплексов (рис. 7) в анаэробных условиях. В качестве модельного объекта исследований был выбран комплекс на основе тиоформальдегида $[\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{SCH}_2)_2]^+$ (I) как простейший представитель ряда катионных тиокарбонильных ДНКЖ. Комплексы II – IV синтезированы и исследованы в ИПХФ РАН, и для них были проведены расчеты свободных энергий продуктов гидролиза. Также были рассмотрен ряд анионных тиолатных комплексов V-VIII.

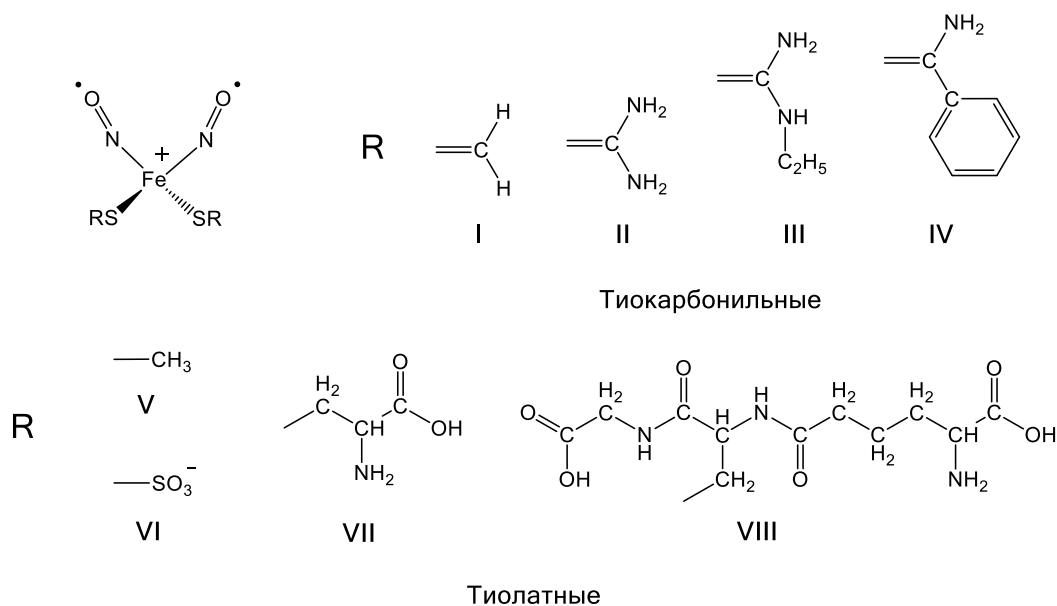


Рисунок 7 – Структуры лигандов рассматриваемых ДНКЖ

Реакции распада железо-нитрозильного комплекса на основе тиоформальдегида

Структура комплекса I аналогична тиомочевинному ДНКЖ, полученному и охарактеризованному экспериментально. Сравнение различных функционалов плотности показало, что наиболее близкие к экспериментальным значения длин связей Fe-S и Fe-N дает TPSSH. Также для данного функционала наблюдается наименьшее спиновое загрязнение, т.е. собственное значение оператора $\hat{S}^2$ наиболее близко точному значению, которое определяется как $S(S+1)$ и составляет 0,75 для системы с полным спином $S = 1/2$. Функционал M06 завышает длины связей на 4-5 %, однако по литературным данным известно, что данный метод приводит к наименьшей

ошибке в энергии по сравнению с «золотым стандартом» CASPT2 при расчетах гидролиза тиолатного комплекса $[\text{Fe}(\text{SCH}_3)_4]^-$. Поэтому для дальнейших расчетов были выбраны функционалы TPSSH и M06.

Одним из возможных путей превращения ДНКЖ в водном растворе является замещение серосодержащих лигандов на H_2O . При ассоциативном механизме гидролиза молекула воды может координироваться к тетраэдрическому комплексу **1** (симметричная конформация, структура **1**) по одному из двух положений с образованием пентакоординационных интермедиатов **2a** и **2b** (рис. 8). Отщепление тиоформальдегида от комплексов **2a** и **2b** протекает с низким барьером (~ 5 кДж/моль) и приводит к образованию постреакционного комплекса **3**. Продукт первой ступени гидролиза **4** имеет геометрию тригональной пирамиды с атомом Fe, лежащим в плоскости основания. Таким образом, в координационной сфере железа появляется свободное место, в которое присоединяется вторая молекула H_2O с образованием пентакоординационного комплекса **5**. Отщепление второго тиоформальдегида происходит аналогично первой стадии. Конечным продуктом замещения является тетраэдрический динитрозильный аквакомплекс **7**.

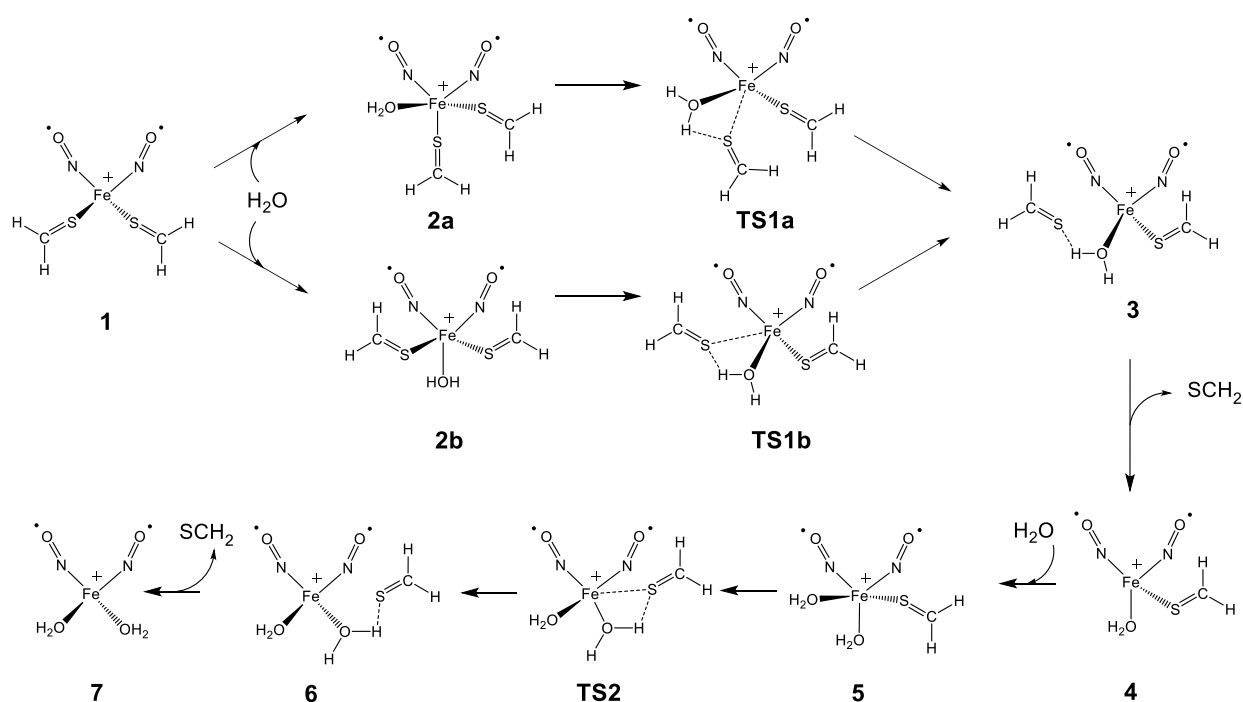


Рисунок 8 – Схема ассоциативного механизма замещения тиоформальдегида молекулами воды для комплекса **1**

Расчеты показывают, что замещение тиоформальдегидного лиганда молекулами воды в комплексе **1** носит экзотермический характер. Относительная свободная энергия продукта первой ступени гидролиза **4** составляет ~ -30 кДж/моль, наблюдается хорошее согласование результатов для функционалов TPSSH и M06. Продукт полного замещения **7** имеет относительную свободную энергию -60

кДж/моль в TPSSH и -70 кДж/моль в M06. Наблюдается аддитивный эффект отщепления лигандов (таблица 1).

Таблица 1. Относительные энергии (кДж/моль) структур **1-7** для комплекса **I**, полученные с использованием функционалов TPSSH и M06 в базисе def2-TZVP

Комплекс	${}^aE_{el}$		bE_0		${}^cG^0$	
	TPSSH	M06	TPSSH	M06	TPSSH	M06
1 + 2H ₂ O	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2a + H ₂ O	-10,3	-33,4	-3,8	-23,2	15,2	2,7
2b + H ₂ O	-23,1	-43,4	-14,4	-33,1	11,8	-7,1
TS1a + H ₂ O	-9,0	-28,7	-2,9	-20,4	21,9	5,7
TS1b + H ₂ O	-16,8	-35,7	-10,0	-28,5	16,9	-4,2
3 + H ₂ O	-35,5	-31,9	-27,7	-23,4	-5,4	-1,4
4 + SCH ₂ + H ₂ O	-22,0	-28,1	-19,7	-25,2	-30,2	-33,4
5 + SCH ₂	-28,0	-50,9	-17,7	-38,3	-9,5	-30,8
TS2 + SCH ₂	-22,6	-51,0	-14,0	-38,8	-3,9	-29,5
6 + SCH ₂	-42,6	-61,9	-32,9	-48,3	-26,5	-39,1
7 + 2SCH ₂	-30,4	-43,1	-28,4	-37,6	-60,0	-70,3

${}^aE_{el}$ - электронная энергия; bE_0 - энергия с учетом нулевых колебаний; ${}^cG^0$ - свободная энергия для температуры 298,15 К и стандартной концентрации 1 М (55,5 М для H₂O).

Альтернативным процессом может являться замещение NO[•] молекулами воды с сохранением связи Fe-S. Расчеты показывают, что продукты данной реакции лежат значительно выше по энергии, чем исходный комплекс **I**, что говорит об устойчивости железо-нитрозильного фрагмента.

Была также рассмотрена возможность диссоциативного механизма гидролиза, когда молекулы H₂O в явном виде не принимают участия в отщеплении тиоформальдегида. Свободная энергия активации для данного процесса составляет 23 – 29 кДж/моль, что значительно выше, чем в случае ассоциативного механизма. В целом диссоциативный механизм оказывается значительно менее выгодным по сравнению с механизмом с участием явных молекул воды.

Гидролиз тиолатного железо-нитрозильного комплекса на основе метилсульфида

В отличие от тиокарбонильных катионных ДНКЖ железо-нитрозильный комплекс на основе метилсульфида наиболее устойчив в форме биядерного ТНКЖ с формулой [Fe₂(μ-SCH₃)₂(NO)₄], известного также как красный эфир Руссена. Тем не менее, образование моноядерных тиолатных НКЖ в растворе возможно в присутствии избытка лиганда. Поэтому для сравнения особенностей гидролиза тиокарбонильных и тиолатных комплексов были определены структуры продуктов замещения ⁻SCH₃ на H₂O, а также промежуточных и переходных состояний для комплекса [Fe(NO)₂(SCH₃)₂]⁻ (**V**).

Схема ассоциативного механизма гидролиза аналогична изображенной на рис. 9, однако существенно различаются относительные энергии продуктов гидролиза

и значения энергетических барьеров. Поскольку лиганд SCH_3 отрицательно заряжен, связь Fe-S в этом случае будет значительно прочнее, чем в тиоформальдегидном комплексе. Барьер активации для замещения метилсульфида на H_2O составляет порядка 100 кДж/моль для первого лиганда и 90 кДж/моль для второго.

Также были проведены расчеты димера комплекса **V** в синглетном состоянии. По результатам расчетов в TPSSH/def2-TZVP с учетом протонирования метилсульфида, данный комплекс на 9,4 кДж/моль устойчивее, чем удвоенный ДНКЖ **V**. Полученные результаты согласуются с экспериментальными данными о стабильности красного эфира Руссена

Расчет устойчивости моноядерных железо-нитрозильных комплексов с тиокарбонильными и тиолатными лигандами

Общая схема гидролиза моноядерных ДНКЖ с тиокарбонильными и тиолатными лигандами представлена на рис. 9. Возможными продуктами реакций являются комплексы, в которых молекула H_2O замещает один или два серосодержащих лиганда, либо монооксид азота.

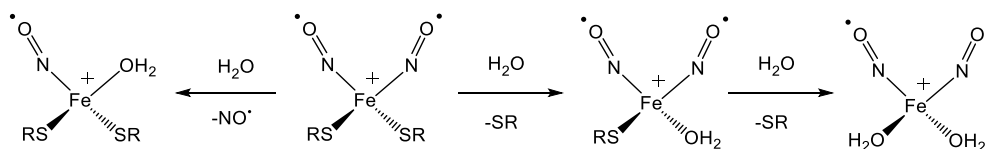


Рисунок 9 – Общая схема гидролиза ДНКЖ в анаэробных условиях

Результаты расчетов относительных энергий продуктов гидролиза для ДНКЖ **I-VIII** позволяют судить об устойчивости рассматриваемых комплексов и о прочности связывания $\text{NO}^\bullet$. В ряду тиокарбонильных комплексов устойчивость связи Fe-S возрастает в ряду **I<IV<II<III**. Комплекс на основе тиобензамида оказывается более стабильным, чем тиоформальдегидный ДНКЖ, тем не менее, его гидролиз носит экзотермический характер: свободная энергия замещения двух тио-лигандов на H_2O составляет -12,7 кДж/моль. В то время как комплексы на основе тиомочевины характеризуются небольшими положительными (1-5 кДж/моль) свободными энергиями замещения лигандов на H_2O .

Для рассматриваемых комплексов с использованием теории NBO были рассчитаны натуральные заряды на атомах и индексы Виберга, характеризующие прочность связей Fe-S и Fe-N. По результатам расчетов с увеличением прочности связи повышается также свободная энергия замещения лиганда молекулами воды. Причем чем большей устойчивостью обладает связь железо-сера, тем более устойчивым оказывается и связывание монооксида азота. Полученный результат можно объяснить акцепторным действием $\text{NO}^\bullet$ и донорными свойствами атома серы.

В шестой главе приводятся результаты моделирования связывания ДНКЖ на основе тиомочевины с бычьим сывороточным альбумином (БСА) методами

молекулярного докинга и молекулярной динамики. Для белка использована трехмерная структура 4f5s.pdb.

Докинг тиомочевинного железо-нитрозильного комплекса с альбумином

При взаимодействии ДНКЖ с альбумином могут образовываться как высокомолекулярные координационные железо-нитрозильные соединения с аминокислотными остатками в качестве лигандов, так и белок-лигандные комплексы, обусловленные межмолекулярными взаимодействиями. Метод докинга позволяет определить положения связывания ДНКЖ, выступающего в качестве лиганда, на поверхности альбумина. Структура лиганда (комплекса II) была получена по результатам квантово-химических расчетов. Докинг тиомочевинного комплекса II выявил 6 наиболее выгодных сайтов связывания на поверхности БСА, лежащих в пределах 12,5 кДж/моль. Во всех случаях связывание происходит с анионными участками белка. Наиболее выгодными оказались сайты 1 и 4, локализованные вблизи остатка Cys34, способного замещать тиомочевину в координационной сфере железа. Стабилизация белок-лигандных комплексов осуществляется не только за счет электростатического притяжения к отрицательно заряженным карбоксильным группам, но преимущественно за счет неполярных взаимодействий с другими остатками альбумина.

Отдельно было исследовано взаимодействие железо-нитрозильного фрагмента $\text{Fe}(\text{NO})_2^+$ с остатком Cys34, располагающимся в гидрофобном кармане альбумина. Расчеты подтвердили координацию фрагмента $\text{Fe}(\text{NO})_2^+$ к отрицательно заряженному атому S остатка Cys34. Поскольку при докинге не учитывается возможность специфических химических связей, взаимодействие Fe-S в данном случае обусловлено только электростатическим притяжением, а вторую координационную позицию занимает отрицательно заряженная карбоксильная группа остатка Glu38. При этом в экспериментах *in vitro* установлено, что в образовании высокомолекулярного белкового ДНКЖ принимают участие остатки Cys34 и His39.

Одна молекула альбумина способна связывать до пяти комплексов II, поэтому для доказательства устойчивости связывания ДНКЖ в сайтах 1-6 было проведено молекулярно-динамическое моделирование белок-лигандных комплексов

Молекулярная динамика тиомочевинного железо-нитрозильного комплекса во взаимодействии с альбумином

Структуры БСА с комплексом II, находящимся в сайтах 1-6, были помещены в кубическую ячейку из молекул воды, а нескомпенсированный заряд белка был нейтрализован добавлением ионов Na^+ . В результате анализа траекторий МД установлено, что комплекс II оказывается устойчиво связанным с поверхностью белка для всех найденных сайтов. При этом наблюдается конформационная подвижность тиомочевинных лигандов. БСА сохраняет доменную структуру на протяжении траектории для всех случаев.

Заключение

Таким образом, проведенные в работе расчеты электрохимических потенциалов ряда нитроксильных радикалов показывают, что модель PCM(SMD) в сочетании с различными функционалами плотности с точностью до 10 мВ воспроизводит потенциалы одноэлектронного окисления соединений этого класса в водном растворе. На основании выполненных расчетов может быть оценена окислительно-восстановительная активность нитроксильных производных хитозана.

Проведен систематический конформационный анализ олигомеров хитозана. Установлено определяющее влияние полярности окружающей среды (растворителя) на устойчивость линейной и изогнутых конформаций основной цепи. Впервые проведено молекулярно-динамическое моделирование нитроксильных производных хитозана. Установлено, что нитроксильная группа заместителя не участвует во внутримолекулярных взаимодействиях со звеньями основной цепи, которая сохраняет линейную структуру в воде. На основе полученных результатов по структуре данных производных выполнен расчет электрохимических потенциалов окисления и восстановления их нитроксильной группы.

Выполнены квантово-химические расчеты реакции гидролиза динитрозильных комплексов железа с тиокарбонильными и тиолатными лигандами. Для комплексов на основе тиоформальдегида и метилсульфида определены структуры и свободные энергии промежуточных продуктов и переходных состояний. Показано, что координационные связи железо-сера более лабильны, чем железо-нитрозильный фрагмент, а способность высвобождать $\text{NO}^{\bullet}$ в бескислородных условиях будет определяться донорными свойствами атома S лигандов.

Впервые проведены молекулярный докинг и молекулярная динамика связывания ДНКЖ на основе тиомочевины с альбумином. Найдены возможные сайты связывания на поверхности белка. Показано, что альбумин не только образует высокомолекулярные ДНКЖ, но также способен взаимодействовать с синтетическими комплексами за счет электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий и продлевать их донорную активность.

По результатам проведенной работы можно сделать следующие **выводы:**

1. Проведенные расчеты в теории функционала плотности в сочетании с континуумными моделями растворителя воспроизводят экспериментально измеренные значения окислительно-восстановительных потенциалов в ряду изученных циклических НР со статистической погрешностью до 10 мВ. Модель ТЦ дает хорошие корреляции при использовании одной наиболее устойчивой в растворе конформации НР. Приближение по учету лишь электростатического вклада в энергию сольватации также дает хорошее соответствие рассчитанных E_{Ox} с

экспериментальными значениями. Важным методическим моментом является проведение оптимизации геометрии НР в водной среде, поскольку расчеты в газовой фазе приводят к потере некоторых конформаций, что вносит систематическую погрешность в расчет E_{Ox} в рамках модели термодинамического цикла.

2. Наилучшую корреляцию с экспериментальными данными для потенциалов одноэлектронного окисления циклических нитроксильных радикалов дает функционал M062X в сочетании с оптимизацией геометрии в водной среде в модели PCM(SMD).

3. По результатам МД расчетов в полярной водной среде введение нитроксильных заместителей повышает конформационную подвижность биополимера хитозана.

4. Присоединение рассмотренных пятичленного и шестичленного НР к тримеру хитозана приводит к повышению потенциала окисления и понижению потенциала восстановления. Протонирование аминогрупп соседних звеньев хитозана приводит к увеличению потенциалов окисления и восстановления нитроксидов.

5. Отщепление тиоформальдегида от модельного комплекса $Fe(NO)_2(SCH_2)_2^+$ носит экзотермический характер и протекает через стабильные пентакоординационные интермедиаты по ассоциативному механизму. Барьеры замещения тио-лиганда молекулами воды составляют ~ 5 кДж/моль. В ряду изученных тиокарбонильных ДНКЖ свободная энергия гидролиза возрастает от -60 кДж/моль для тиоформальдегида до -13 кДж/моль для тиобензамида и +4 кДж/моль для тиомочевины.

6. Отщепление метилсульфида от комплекса $Fe(NO)_2(SCH_3)_2^-$ происходит по ассоциативному механизму через тетраэдрические интермедиаты, а барьеры реакции составляют 90-100 кДж/моль. Для рассмотренных тиолатных ДНКЖ замещение тио-лиганда на молекулы воды энергетически невыгодно, и свободная энергия гидролиза составляет от 25 до 73 кДж/моль.

7. Низшие по энергии центры связывания тиомочевинного ДНКЖ с БСА располагаются на IA, IIA и IIB субъединицах белка, при этом наиболее энергетически выгодные сайты связывания располагаются вблизи остатка Cys34.

Основное содержание диссертации изложено в следующих работах:

Публикации в рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 1.4.4

1. **Krapivin V. B.**, Mendkovich A. S., Sen V. D., Luzhkov V. B. Quantum chemical calculations of hydration electrostatics and electrochemical oxidation potential of cyclic nitroxide radicals // Mendelev Communications. 2019. V. 29. № 1. P. 77-79. DOI:10.1016/j.mencom.2019.01.026 (IF=1,837 Web of Science). Вклад Крапивина В. Б. составляет 40 %.

2. **Krapivin V. B.**, Sen V. D., Luzhkov V. B. Quantum chemical calculations of the one-electron oxidation potential of nitroxide spin labels in biologically active compounds // Chemical Physics. 2019. V. 522. P. 214-219. DOI:10.1016/j.chemphys.2019.02.021 (IF=2,552 Web of Science). Вклад Крапивина В. Б. составляет 40 %.

3. Pokidova O. V., Luzhkov V. B., Emel'yanova N. S., **Krapivin V. B.**, Kotelnikov A. I., Sanina, N. A., Aldoshin S. M. Effect of albumin on the transformation of dinitrosyl iron complexes with thiourea ligands // Dalton Transactions. 2020. V. 49. № 36. P. 12674-12685. DOI:10.1039/D0DT02452J (IF=4,569 Web of Science). Вклад Крапивина В. Б. составляет 20 %.

4. **Крапивин В. Б.**, Лужков В. Б. Молекулярное моделирование конформационной динамики нитроксильных производных хитозана в водном растворе // Известия Академии наук. Серия химическая. 2021. № 8. С. 1523-1532. DOI:10.1007/s11172-021-3247-7 (IF=1,682 RSCI). Вклад Крапивина В. Б. составляет 70 %.

5. **Krapivin V. B.**, Luzhkov V. B., Sanina N. A., Aldoshin S. M. Decomposition of dinitrosyl iron complex with thioformaldehyde ligands in water: reaction mechanisms and the role of chemical hardness of ligands // Mendelev Communications. 2022. V. 32. P. 457-459. DOI:10.1016/j.mencom.2022.07.010 (IF=1,837 Web of Science). Вклад Крапивина В. Б. составляет 50 %.

Публикации в сборниках материалов и тезисов конференций

6. Квантово-химические расчеты потенциалов одноэлектронного окисления нитроксильных радикалов в биологически активных молекулах / В.Б. Лужков, **В.Б. Крапивин**, В.Д. Сень // Книга тезисов 1-й Конференции с международным участием «Физическая химия в России и за рубежом: от квантовой химии до эксперимента». Москва. 2019. С. 16-17.

7. Электрохимические редокс-потенциалы нитроксильных производных биополимера хитозана по данным молекулярно-динамического моделирования и

квантово-химических расчетов / **В.Б. Крапивин**, В.Б. Лужков // сборник трудов 63-й Всероссийской научной конференции МФТИ. Москва. 2020. С. 137-139.

8. Определение параметров силового поля серанитрозильных комплексов железа / **В.Б. Крапивин**, В.Б. Лужков, // сборник тезисов Всероссийской школы молодых ученых «Научные школы большой химической физики». Черноголовка. 2021. С. 192-193.

9. Molecular dynamics and docking simulations of binding of the thiourea dinitrosyl iron complex to bovine serum albumin / **V.B. Krapivin**, V.B. Luzhkov // Book of Abstracts XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2021». St. Petersburg. 2021. P. 134.

10. Изучение реакций распада серанитрозильных комплексов железа в водном растворе квантово-химическими методами / **В.Б. Крапивин**, В.Б. Лужков // сборник материалов Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2022». Секция «Химия». Москва. 2022. С. 725.