Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт проблем химической физики Российской академии наук

На правах рукописи

Крапивин Владимир Борисович

МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ И ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА

1.4.4 – физическая химия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д. х. н., старший научный сотрудник
Лужков Виктор Борисович

Черноголовка – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ……..5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ……..17

1.1 Строение и биологическая активность циклических нитроксильных радикалов……..17

1.2 Хитозан и его нитроксильные производные как биологически активные соединения……...22

1.3 Серосодержащие динитрозильные комплексы железа как доноры монооксида азота…….27

1.4 Структура и свойства динитрозильных комплексов железа…….30

1.5 Альбумин как мишень для связывания нитрозильных комплексов железа……...34

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ РАСЧЕТОВ……..37

2.1 Квантово-химические расчеты реакционной способности и физико-химических свойств молекул в растворе…….37

2.1.1 Методы квантовой химии для описания электронной структуры молекул……...37

2.1.2 Составляющие вклады для расчета свободной энергии……...39

2.1.3 Методы расчета свободных энергий в растворе……...40

2.1.4 Определение стандартного электрохимического потенциала окисления……...44

2.1.5 Влияние протонирования на величину стандартного потенциала восстановления……..45

2.1.6 Детали квантово-химических расчетов нитроксильных радикалов……...46

2.1.7 Детали квантово-химических расчетов нитрозильных комплексов железа ……...47

2.2 Расчеты методами молекулярной механики и молекулярной динамики……..48

2.2.1 Моделирование хитозана и его нитроксильных производных…49

2.2.2 Моделирование динитрозильных комплексов железа……..50

2.3 Метод молекулярного докинга……52

ГЛАВА 3. РАСЧЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ЦИКЛИЧЕСКИХ НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ…….54

3.1 Структура моделируемых нитроксильных радикалов……...54

3.2 Результаты расчетов электрохимических потенциалов реакции окисления нитроксильных радикалов……...56

3.3 Изучение кинетики конформационных переходов в циклических нитроксильных радикалах……..63

3.4 Расчеты электрохимических потенциалов реакции окисления нитроксильных производных фуллерена C_{60}……65

3.5 Расчеты электрохимических потенциалов реакции восстановления нитроксильных радикалов……..67

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-МЕХАНИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ НИТРОКСИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА……...71

4.1 Конформационный анализ димеров хитозана……71

4.2 Молекулярное моделирование олигомеров хитозана……78

4.3 Моделирование структуры нитроксильных производных хитозана……81

4.4 Окислительно-восстановительные потенциалы нитроксильных производных хитозана……87

ГЛАВА 5. КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ РЕАКЦИЙ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ…….90

5.1 Структуры исследуемых динитрозильных комплексов железа с серосодержащими лигандами……90

5.2 Реакции распада железо-нитрозильного комплекса на основе тиоформальдегида……...91

5.3 Гидролиз тиолатного железо-нитрозильного комплекса на основе метилсульфида……...102

5.4 Расчет устойчивости моноядерных железо-нитрозильных комплексов с тиокарбонильными и тиолатными лигандами……106

ГЛАВА 6. МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С АЛЬБУМИНОМ……..111

6.1 Определение параметров силового поля для динитрозильных комплексов железа с тиокарбонильными лигандами……111

6.2 Исследование взаимодействие тиомочевинного железо-нитрозильного комплекса с альбумином методом молекулярного докинга……116

6.3 Молекулярная динамика тиомочевинного железо-нитрозильного комплекса в растворе и в комплексе с альбумином……...120

ЗАКЛЮЧЕНИЕ……126

Список сокращений и условных обозначений……131

Список литературы……..132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Свободные радикалы представляют собой химические соединения, содержащие неспаренные электроны на внешней оболочке. Большинство свободных радикалов являются активными частицами, способными инициировать различные биохимические процессы, в том числе вызывать окислительный стресс. Окислительный стресс является причиной большого количества патологий в живых организмах, таких как ишемическая болезнь сердца, атеросклероз, заболевания сосудов, нейродегенеративные и аутоиммунные процессы, онкологические заболевания. Ведущую роль в процессах окисления биомолекул играют свободные радикалы, в первую очередь, активные формы кислорода (АФК), формирующиеся в процессе метаболизма. В небольших количествах АФК регулируют такие функции как транспорт электронов в дыхательной цепи, пролиферация и дифференциация клеток, фагоцитоз, метаболизм и синтез катехоламинов, ионный транспорт через клеточные мембраны. Важным представителем класса биологических свободных радикалов является монооксид азота ($NO^{\bullet}$). В отличие от большинства АФК, монооксид азота достаточно стабилен и проявляет уникальные окислительно-восстановительные свойства. $NO^{\bullet}$ выполняет функции нейромедиатора и нейромодулятора, регулятора сердечно-сосудистой системы. Поэтому создание новых лекарственных средств, биологическая активность которых основана на свойствах $NO^{\bullet}$, является актуальной задачей медицинской химии.

Стабильные нитроксильные радикалы можно рассматривать как органические производные монооксида азота. В последние 20 лет проведены исследования, доказывающие антиоксидантное действие нитроксилов на клеточных культурах и животных при таких заболеваниях как болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона, нейродегенерация, сахарный диабет, рассеянный склероз, ишемическая болезнь сердца,

гиперлипидемия, ожирение [1-5]. Введение нитроксильных радикалов способствовало увеличению продолжительности жизни различных организмов от кольчатых червей до мушек дрозофил и мышей [6-7]. Также показано, что нитроксилы способны быть мощными ингибиторами ферропоптоза, за счет возможности подавления пероксидного окисления липидов [8]. Мерой активности при окислительно-восстановительных процессах являются электрохимические потенциалы, поэтому расчет редокс-потенциалов нитроксилов является важной задачей для прогнозирования их антиоксидантных свойств.

Широкое применение в биохимии находит модификация биологически активных соединений нитроксильными радикалами. В этом случае нитроксилы могут выступать в качестве спиновых меток для исследования структуры соединений методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). В то же время благодаря уникальным антиоксидантным свойствам нитроксилы способны оказывать синергетическое действие в составе биологически активных молекул. В частности, большой интерес представлет создание нитроксил-содержащих производных хитозана. Хитозан является биосовместимым аминосахаридом, 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 [9-11]. Однако хитозан не является инертным вспомогательным веществом при разработке лекарственной формы, а представляет собой биологически активный полимер, способный усиливать или изменять фармакологические свойства действующего вещества [12]. Известно, что конъюгаты антиоксидантов, таких как полифенолы, с хитозаном более стабильны, биодоступны и терапевтически эффективны, чем соответствующие низкомолекулярные соединения [13,14]. Недавние исследования показали, что хитозан способен адсорбироваться на поверхности слизистых оболочек и эритроцитов за счет электростатического притяжения и водородных связей [15,16]. Еще 80-е годы XX века нитроксильные радикалы использовали для получения спин-меченых производных хитозана [17]. К настоящему времени в ИПХФ РАН получены олигомерные водорастворимые

хитозан-нитроксилы [18], а также мицеллообразующие высокомолекулярные производные [19]. Моделирование структуры и свойств данных соединений является актуальной задачей при разработке лекарственных средств.

Еще одним классом биологически активных соединений, содержащих группу NO˙, являются нитрозильные комплексы железа (НКЖ). НКЖ относятся к перспективному классу доноров монооксида азота, поскольку связывают большое количество NO˙ 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. На основе ДНКЖ могут быть разработаны лекарственные препараты нового поколения для лечения сердечно-сосудистых, онкологических и других социально значимых заболеваний [20-23]. Тем не менее, к настоящему времени свойства ДНКЖ изучены недостаточно, что связано с их лабильностью и высокой скоростью взаимодействия с активными формами кислорода [24]. За последние 10 лет синтезирован ряд железо-нитрозильных комплексов с тиокарбонильными лигандами. В отличие от тиолатных комплексов, образующих устойчивые парамагнитные димеры, подобные красному эфиру Руссена, такие моноядерные ДНКЖ обладают парамагнитными свойствами, что позволяет изучать их взаимодействие с биологическими мишенями методом ЭПР. Молекулярное моделирование позволит лучше понять механизм химических превращений ДНКЖ и предсказать свойства новых синтезируемых комплексов.

Актуальность проведенных исследований также определяется обращением в работе к методам вычислительного моделирования. Современные методы вычислительной химии позволяют решать широкий круг научных задач, среди которых моделирование молекулярной структуры индивидуальных соединений, расчет термодинамических функций физико-химических систем, в том числе и конденсированных фаз, изучение взаимодействий биологически активных соединений с биомолекулами-мишенями, поиск и разработка новых

лекарственных соединений [25-29]. Разработано и используется большое количество подходов для расчета свободных энергий связывания в процессе образования белок-лигандных комплексов [30,31], а также для определения влияния молекул воды на физико-химические свойства системы [32-34]. В диссертационной работе использованы современные вычислительные методы и внесены необходимые изменения в методики расчетов, диктуемые поставленными задачами.

Цель диссертационной работы

Диссертационная работа посвящена изучению свойств биологически активных соединений, содержащих группу $NO^{\bullet}$ – циклических нитроксильных радикалов и серонитрозильных комплексов железа, – методами вычислительной химии. Цель работы состоит в изучении связи химического строения нитроксил-содержащих функциональных групп и их окислительно-восстановительных свойств в спин-меченых биологически активных соединениях, а также в изучении механизмов превращений серонитрозильных комплексов железа в бескислородном водном растворе и их взаимодействия с сывороточным альбумином.

Задачи диссертационной работы

К задачам диссертационной работы относится:

1) Квантово-химический расчет потенциалов одноэлектронного окисления ряда пяти- и шестичленных нитроксильных радикалов и определение влияния уровня теоретических расчетов на точность воспроизведения экспериментальных данных;
2) Изучение конформационных свойств низкомолекулярных олигомеров хитозана и их нитроксильных производных в водном растворе методами квантовой химии, молекулярной механики и молекулярной динамики;

3) Вычисление методами теории функционала плотности (ТФП) окислительно-восстановительных потенциалов нитроксильных производных хитозана и фуллерена C_{60} в воде;
4) Изучение реакций распада тиокарбонильных и тиолатных нитрозильных комплексов железа в бескислородном водном растворе методами квантовой химии и оценка зависимости устойчивости ДНКЖ от структуры лиганда.
5) Определение параметров силового поля нитроксильных радикалов и ДНКЖ с тиокарбонильными лигандами из данных расчетов методами ТФП;
6) Определение структуры комплексов белок – лиганд бычьего сывороточного альбумина с тиомочевинным ДНКЖ методом молекулярного докинга и исследование молекулярной динамики найденных белок-лигандных комплексов.

Объект исследования

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

Предмет исследования

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

Научная новизна

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 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 термодинамического цикла. 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

Проведенные расчеты позволили выявить оптимальные подходы (функционалы, наборы базисных функций, уровень приближения 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. Методы расчета потенциальной энергии молекул можно разделить на квантово-химические, основанные на решении уравнения Шредингера для системы из электронов и атомных ядер, и молекулярно-механические, в которых используются аналитические формулы потенциалов взаимодействия. Одним из подходов квантовой химии является теория функционала плотности, основанная на теореме Хоэнберга-Кона [35]. 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 и молекулярной динамики позволяют моделировать системы из большого количества атомов и оценивать изменение систем во времени. В настоящей работе были использованы как классические (B3LYP), так

и более новые (M06, TPSSH) функционалы плотности, а также последние модификации силовых полей для расчета углеводов и металлоорганических соединений. Данные методы находят широкое применение в теоретических работах, однако выбор оптимального функционала или силового поля для конкретного класса соединений остается важной и актуальной задачей.

Положения, 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-оксила 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

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.

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., проф. Лужковым В. Б. тестировал различные функционалы и сольватационные модели для наилучшего соответствия экспериментальным данным. Самостоятельно разрабатывал параметры силового поля для молекулярной динамики хитозан-нитроксилов и динитрозильных комплексаов железа, проводил молекулярно-механическое и молекулярно-динамическое моделирование данных соединений, а также составлял алгоритмы и программы для анализа полученных данных. Принимал участие в написании статей и тезисов докладов на конференциях. Диссертационная работа написана лично соискателем.

Публикации и апробация результатов

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.

Статьи:

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 // Mendeleev 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 // Mendeleev 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.

Результаты диссертационной работы представлены на конференциях, таких как международный молодежный научный форум «Ломоносов» (Москва, МГУ, 2019, 2021 и 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 International Voevodsky Conference «Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes» (Novosibirsk, 2022).

Благодарности

Автор выражает глубокую признательность научному руководителю диссертационной работы д.х.н. В. Б. Лужкову за помощь в проведении исследований и написании работы. Также выражает благодарность заведующему Вычислительным центром ИПХФ РАН Г. А. Покатовичу за помощь в использовании ресурсов центра и программ.

Работа выполнена в рамках госзадания по тем.карте АААА-А19-119071890015-6 «Дизайн, фундаментальные исследования строения, свойств и механизмов биологического действия новых малых молекул и супрамолекулярных систем для создания инновационных лекарственных препаратов адресного действия для лечения социально значимых заболеваний». Исследования проведены при финансовой поддержке РФФИ, проект 20-03-00950 А, и Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение о предоставлении грантов из федерального бюджета в виде субсидий в соответствии с пунктом 4 статьи 78.1 Бюджетного кодекса Российской Федерации, Москва, 1 октября 2020 г., № 075-15-2020-777).

Структура и объем диссертации

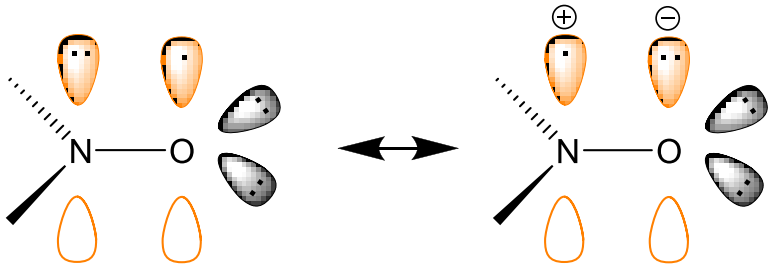
Диссертация изложена на 155 страницах, состоит из введения, шести глав, включающих обзор литературы, методы расчетов и результаты исследований, заключения, списка сокращений и списка литературы (221 ссылка). Работа содержит 60 рисунков и 28 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Строение и биологическая активность циклических нитроксильных радикалов

Нитроксильные радикалы (НР), или нитроксилы, представляю собой класс органических соединений, содержащих парамагнитный фрагмент >N–O˙ и способных вступать в химические реакции без участия неспаренного электрона. С момента открытия в 1961 г. было синтезировано и исследовано большое количество нитроксилов, являющихся производными ди-трет-бутиламина, дифениламина, пиперидина, пирролина и других вторичных аминов. Наиболее широко распространены циклические нитроксильные радикалы на основе 2,2’,6,6’-тетраметилпиперидина (триацетонамина), что связано с доступностью и простотой синтеза данного соединения [36].

Электронное строение нитроксильной группы соответствует резонансу структур **A** ↔ **B** (Рисунок 1), причем атом азота находится в близкой к sp^2–гибридизации, а фрагмент >N–O˙ почти плоский. Неспаренный электрон нитроксильной группы находится на разрыхляющей π*-орбитали, образованной p_z-орбиталями азота и кислорода. Длина связи N–O равна 1,23–1,28 Å, что соответствует порядку связи равному 1,5 [37,38].



A **B**

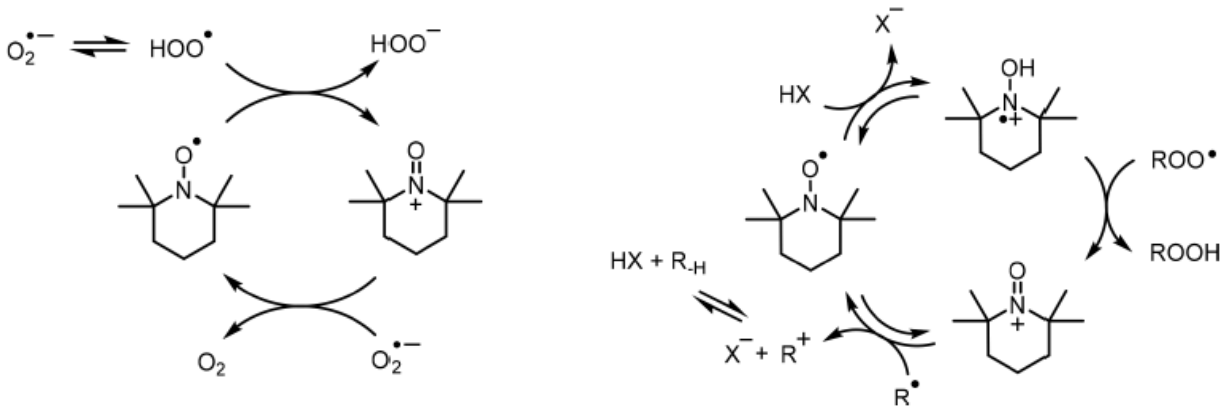
Рисунок 1 – Резонансные формы нитроксильной группы [38]

Основными факторами, обуславливающими устойчивость НР, являются делокализация неспаренного электрона между атомами азота и кислорода, что приводит к стабилизации связи N–O на ~120 кДж/моль по сравнению с

соответствующими гидроксиламинами [39,40], а также невозможность диспропорционирования на нитроны и гидроксиламины. Структура нитроксильного фрагмента в циклических НР зависит от конформации цикла: для шестичленных нитроксилов в конформации «кресло» он имеет пирамидальную форму, в то время как для конформации «твист» нитроксильный фрагмент плоский [40]. Структура нитроксила и наличие заместителей будут определять его реакционную способность.

Нитроксильные радикалы находят широкое применение в химии и биологии благодаря парамагнитным свойствам. Использование НР в качестве спиновых меток позволяет исследовать различные объекты методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) [41]. Наличие неспаренного электрона обуславливает уникальные окислительно-восстановительные свойства НР. Радикалы и их редокс-партнеры – оксоаммониевые катионы и гидроксиламины, способны подвергаться реакциям одно- или двухэлектронного переноса. Окисление и восстановление нитроксилов происходит практически обратимо, что позволяет использовать НР в качестве медиаторов редокс-потенциала для солнечных батарей [42]. Однако наибольший интерес для исследователей, вероятно, представляет биологическая активность нитроксильных радикалов. Являясь органическими производными монооксида азота, НР участвуют во многих биохимических процессах в живых организмах. Нитроксилы действуют как антиоксиданты, эффективны при окислительном стрессе, используются для радиационной защиты организмов, проявляют сосудорасширяющее действие [43-45]. Антиоксидантная активность нитроксилов связана с ингибированием процессов пероксильного окисления биомолекул [46,47]. В данных процессах НР действуют подобно супероксиддисмутазе (СОД), регулируя концентрацию активных форм кислорода в клетках (Рисунок 2).

Предложено несколько механизмов биологической активности нитроксилов. В водной среде нитроксильный радикал может восстанавливать гидропероксил-радикалы с образованием оксоаммониевого катиона, который в свою очередь окисляет супероксид-анион радикал до кислорода (Рисунок 2, *а*).



а *б*

Рисунок 2 – Схема каталитического восстановления нитроксилом ТЕМПО гидропероксильных радикалов в воде (*а*) и алкилпероксильных радикалов в присутствии кислоты в органическом растворителе (*б*) [46].

Протекание данных реакций в клетках живых организмов надежно установлено [48-51], однако присутствие высоких концентраций СОД позволяет усомниться в физиологической значимости этого механизма. В то же время в органических растворителях НР способны реагировать с алкилпероксильными радикалами в присутствии кислот, а восстановление исходного нитроксила происходит с участием алкильного радикала (Рисунок 2, *б*) [52,53]. В водном растворе данный процесс протекает достаточно медленно, за счет значительно более высокой концентрации активных форм кислорода по сравнению с алкилами [54-56]. В работе [46] было показано, что для физиологических условий наиболее вероятным будет трехстадийный процесс, в котором на втором шаге образующийся оксоаммониевый катион будет подвергадься двухэлектронному восстановлению с образованием соответствующего гидроксиламина, а донорами гидрида может служить молекула НАДФ-Н. При этом скорости реакций коррелируют с величинами электрохимических потенциалов нитроксилов.

В связи с этим окислительно-восстановительные реакции нитроксильных радикалов являются ключевыми для понимания биологической активности данного класса соединений. Одноэлектронное окисление НР протекает равновесно, с количественным выходом образуется оксоаммониевый катион [36]. Мерой активности служит электрохимический потенциал окисления (E_{Ox}),

который зависит, прежде всего, от природы нитроксила и растворителя. Так наиболее распространенный 2,2',6,6'-тетраметилпиперидин-N-оксил (ТЕМПО) имеет наиболее низкий из всех известных НР E_{Ox} равный 734 мВ (относительно СВЭ). В неполярных средах потенциалы окисления нитроксилов примерно на 50-100 мВ выше, чем в воде [57]. Чем ниже потенциал окисления, тем выше антиоксидантная активность нитроксильного радикала.

Влияние заместителя на окислительно-восстановительные свойства нитроксильных радикалов одной природы можно описать с использованием константы Гаммета [58]. Гаммет предложил определять константу заместителя как $\sigma_X = \ln(K_X/K_H)$, где K_H – константа диссоциации бензойной кислоты в воде при 25 °C, а K_X – константа диссоциации для *мета*- или *пара*-замещенной бензойной кислоты с заместителем *X*. Данный подход можно обобщить и на другие классы химических соединений и типы реакций. Константа σ_X отражает суммарный электронный эффект заместителя, который можно разделить на индуктивную (σ_I) и резонансную (σ_R) составляющие. Зависимость потенциала E_{Ox} от константы σ_I , полученная по данным работы [59] для ряда производных ТЕМПО, показана на рисунке 3.

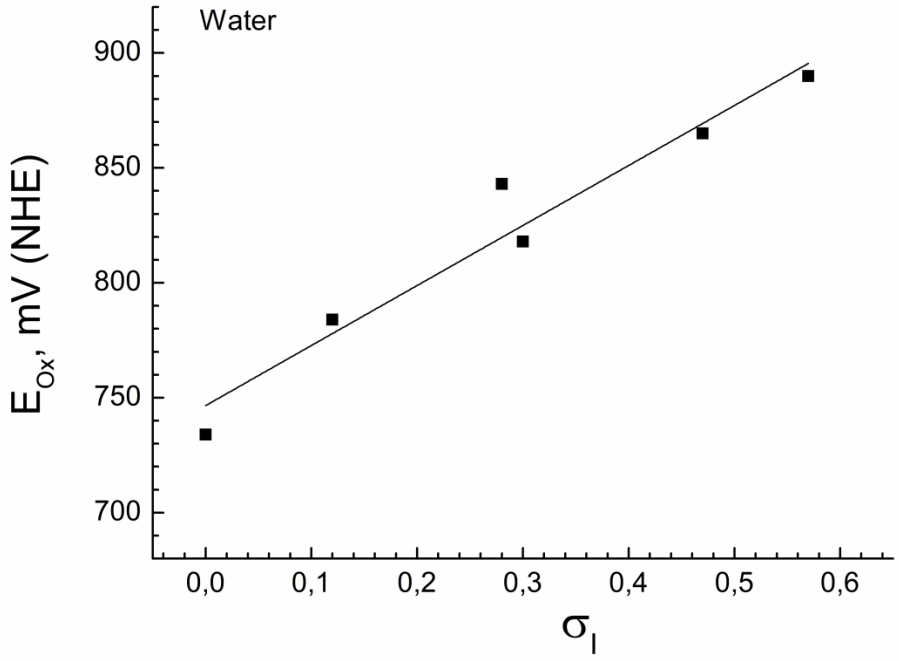


Рисунок 3 – Зависимость потенциалов одноэлектронного окисления для ряда производных ТЕМПО от константы заместителя σ_I в воде [59].

Для шестичленных циклических нитроксилов, содержащих заместитель в 4-м положении, можно предположить однозначную связь электрохимического потенциала окисления с постоянной σ_I, поскольку заместитель достаточно изолирован от нитроксильной группы, чтобы оказывать резонансное или поляризационное воздействие. Как видно по графику, для воды наблюдается хорошая линейная корреляция. Аналогичная зависимость присутствует и для органического растворителя (ДМФА).

В отличие от окисления, процесс одноэлектронного восстановления НР происходит с участием протонов, и конечным продуктом является гидроксиламин (Рисунок 4).

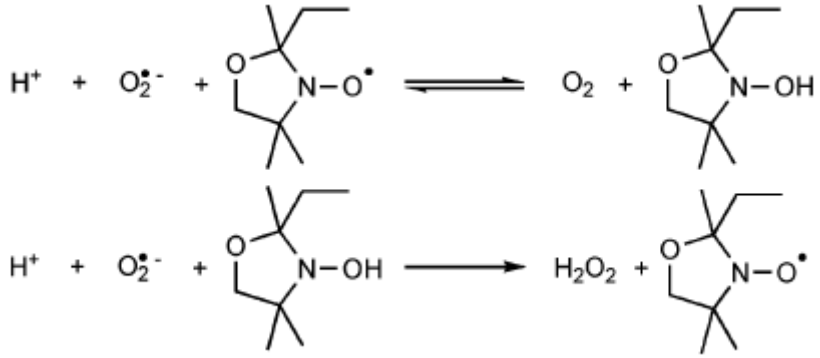


Рисунок 4 – Схема антиоксидантной активности нитроксильного радикала с образованием гидроксиламина [60]

Гидроксиламины представляют собой средней силы основания с pK_a соответствующих гидроксиламмониевых катионов, лежащих в диапазоне от 3 до 7 [38]. Электрохимический потенциал восстановления (E_{Red}) нитроксилов будет зависеть от pH, и для его расчета требуется определить константы протонирования. Для ТЕМПО измеренный потенциал E_{Red} составляет ~200 мВ (СВЭ) [61].

Прогнозирование окислительно-восстановительных свойств НР является важной задачей при разработке новых лекарственных средств и биологически активных соединений. Экспериментальное измерение электрохимических потенциалов часто бывает затруднено из-за высокой реакционной способности соединений или частичной необратимости процессов. Поэтому вычислительная химия представляет собой ценную альтернативу эксперименту. Быстрое развитие

расчетных методов в последние десятилетия позволяет с высокой точностью предсказывать термодинамические и кинетические характеристики химических процессов как в газовой, так и в конденсированной фазе. На сегодняшний день разработано и проверено большое количество теоретических моделей для количественных прогнозов окислительно-восстановительных потенциалов нитроксилов и их производных [27,32,42,60].

Одним из возможных способов создания новых биологически активных производных является присоединение НР к фуллерену C_{60}. Молекула фуллерена является эффективным акцептором электронов [62], однако радикалы, имеющие неспаренный электрон на каркасе фуллерена, оказываются очень реакционноспособными частицами [63]. Модификация C_{60} стабильным нитроксильным радикалом позволяет создать устойчивую спиновую метку на основе фуллерена. Исследования, проведенные в ИПХФ РАН, показали, что нитроксил-содержащие производные C_{60} могут проявлять необычные биохимические свойства [64].

Другим интересным и перспективным направлением в химии нитроксильных радикалов является создание новых нитроксил-содержащих полимерных материалов, обладающих антиоксидантным действием. Подходящим объектом для получения таких производных может служить природный нетоксичный и биосовместимый полисахарид хитозан, который также обладает антиоксидантными и противомикробными свойствами.

1.2 Хитозан и его нитроксильные производные как биологически активные соединения

Хитозан представляет собой полисахарид, состоящий из звеньев D-глюкозамина (G) и N-ацетил-D-глюкозамина (GAc), связанных β(1→4) гликозидной связью (Рисунок 5). Хитозаны с различной молекулярной массой и степенью ацилирования (СА) получают щелочным гидролизом хитина,

природного полимера, являющегося основным компонентом клеточных стенок грибов, членистоногих и некоторых водорослей [65].

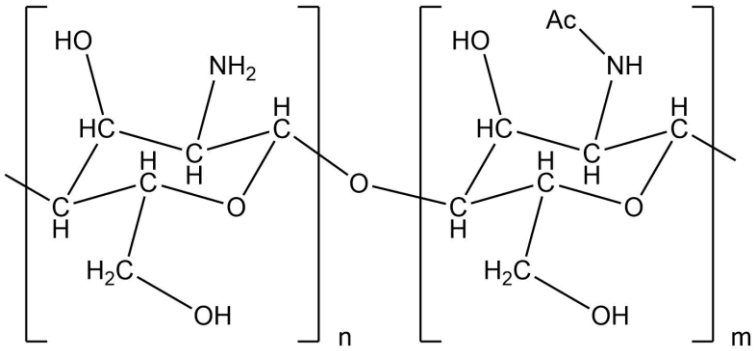


Рисунок 5 – Структурная формула хитозана

В отличие от хитина, хитозан с СА < 20 % хорошо растворим в подкисленных водных растворах [66]. Благодаря наличию свободных аминогрупп хитозан ведет себя как полиэлектролит, и его растворимость зависит от степени ацилирования, pH и ионной силы раствора. pK_a хитозана составляет от 6,2 до 7,4 [67,68]. В кислых растворах хитозан образует устойчивые комплаксы с анионами, а в щелочных или нейтральных средах хелатирует ионы металлов [69,70]. Кроме того, хитозан обладает широким спектром биологической активности, включающим антимикробную и антиоксидантную активность, регенерацию поврежденных тканей, усиление иммунитета, способность поглощать свободные радикалы, биосовместимость с клетками человека и биоразлагаемость [71-74]. Данные физико-химические и биологические свойства обуславливают использование хитозана в качестве средства адресной доставки лекарств для противоопухолевой терапии, заживляющего средства для обработки ран, а также в пищевой промышленности и водоочистных сооружениях [12,75,76].

Важным свойством хитозана и его производных является способность образовывать мицеллы в водном растворе. Поэтому особый интерес представляет возможность модификации свободных аминогрупп хитозана биологически активными соединениями. Присоединяя полярные гидрофильные или гидрофобные функциональные группы, можно регулировать размер мицелл и критическую концентрацию мицеллообразования (ККМ). Так в работе [77]

показано, что олигомеры хитозана, содержащие до 17 звеньев глюкозамина, модифицированные дексаметазоном, способны образовывать ассоциаты. Дексаметазон представляет собой глюкокортикоид, обладающий противовоспалительной активностью. Благодаря гидрофобным свойствам, он способствует самоассоциации водорастворимого хитозана. При этом наибольшей склонностью к мицеллообразованию обладают производные со степенью замещения 11,5 %.

Также мицеллы на основе хитозана могут быть использованы для транспорта и адресной доставки лекарственных средств за счет способности к инкапсуляции и контролируемому высвобождению молекул активного вещества, ковалентно не связанного со звеньями сахарида [78]. Для получения таких мицелл хитозан обычно модифицируют остатками насыщенных или ненасыщенных жирных кислот. Так N-пальмитоил-хитозан со степенью замещения 2 – 14 % показал способность связывать 10 % ибупрофена и высвобождать его в условиях кислого pH и повышенной температуры. Хитозан, модифицированный взаимодействием с олеиновой кислотой, был использован для связывания и доставки противоинфекционного препарата сульфадиазина серебра [79]. Концентрация препарата в мицеллах оказалась в ~100 раз выше, чем в насыщенном растворе. Кроме того, инкапсулирование уменьшало цитотоксическое действие лекарственного средства на фибробласты и его несовместимость с фактором роста тромбоцитов PDGF-AB.

Помимо гидрофобных углеводородов в качестве заместителей могут быть использованы полярные сульфатные группы для повышения растворимости мицелл хитозана в воде. Так в ИПХФ РАН получены нитроксил-содержащие амфифильные производные хитозана, содержащие сульфатированные аминогруппы [19] (Рисунок 6). ККМ таких производных варьируется в диапазоне 0,02 – 0,05 мг/мл, что сопоставимо со значениями ККМ для производных, содержащих только углеводородные заместители. Сульфатированные производные показали лучшую растворимость и способность связывать и удерживать противоопухолевый антибиотик даунорубицин. Также нагруженные

мицеллы продемонстрировали 4-кратное усиление цитотоксичности даунорубицина в отношении нескольких линий опухолевых клеток [19].

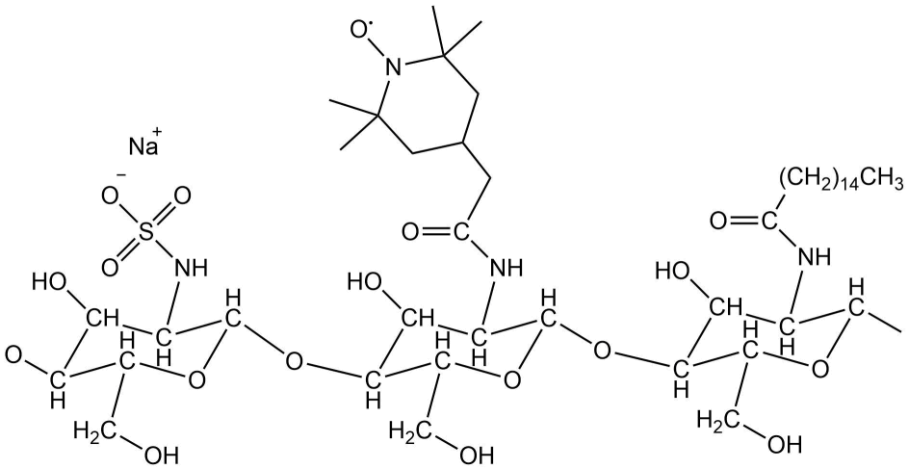


Рисунок 6 – Структура мицеллообразующего водорастворимого нитроксил-содержащего производного хитозана [19]

Модификация стабильными нитроксильными радикалами является перспективным направлением в химии хитозана, поскольку НР успешно используются в качестве модифицирующих агентов [80-82]. Присоединение НР к аминогруппам хитозана улучшает его транспортные свойства при прохождении через биологические мембраны, повышает биологическую активность и добавляет новые пути биотрансформации [82,83]. Так хитозан-полиаминоксилы продемонстрировали антиоксидантное действие против активных форм кислорода различной природы. Помимо биологической активности, нитроксильный фрагмент обладает неспаренным электроном, что позволяет исследовать структуру и механизмы действия мицелл нитроксил-содержащих производных методом ЭПР.

Окислительно-восстановительная активность нитроксильной группы в составе хитозан-полинитроксила будет определяться ее доступностью для окисляющих агентов, таких как активные формы кислорода, а значит структурой макромолекулы. Хитозан, как хитин и большинство углеводов, имеет линейную структуру. Конформация основной цепи хитозана в водном растворе соответствует модели полужесткой пружины или полужесткого стержня, а персистентная длина зависит от степени ацилирования и составляет 8-15 нм [84,

85]. Полностью деацилированный кристаллический хитозан обладает высокой степенью кристалличности и, в отличие от хитина, имеет несколько полиморфных модификаций с разным количеством звеньев в повторяющемся блоке цепи и их относительным расположением. Наиболее распространенной является структура, образованная двумя повторяющимися звеньями, которая наблюдается для безводного хитозана (тип I) и для гидратированного хитозана и его солей (тип II) [86-88]. В некоторых солях и комплексах хитозан образует цепь с периодом 4 (тип IIa) и 5 (тип III) звеньев [89]. Кроме того, методами молекулярной динамики обнаружен пятый тип структуры с периодом повторения в 3 звена [90].

Конформационная подвижность основной цепи хитина и хитозана исследовалась методами Монте-Карло и стохастической динамики [91]. Обнаружены 4 возможные конформации гликозидной связи в олигомерах, содержащих звенья протонированного глюкозамина (HG) и N-ацетилглюкозамина в разных комбинациях. Показано, что наибольшей гибкостью обладает фрагмент HG-GAc, в то время как полностью деацилированный хитозан $(HG)_2$, как и хитин $(GAc)_2$, обладает большей жесткостью. Данные четыре типа конформаций также выявлены при молекулярно-динамическом моделировании производных хитозана с ксантановой камедью и лактитом [92,93]. В работе [94] охарактеризованы 3 типа конформаций для олигомеров хитозана и амилозы, содержащих 6 и 12 звеньев. На основе представленных данных можно сделать вывод о влиянии структурных особенностей производных хитозана на их физико-химические свойства.

На сегодняшний день синтезированы и исследованы олигомерные производные хитозана с 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-N-оксилом и 2,2,5,5-тетраметилпирролин-N-оксилом, содержащие от 2 до 6 звеньев глюкозамина [18]. Показано, что данные соединения способны связываться с клеточной мембраной и обеспечивать одинаковое время задержки гемолиза при концентрациях в ~100 раз меньших, чем аналогичные низкомолекулярные нитроксилы. Причем производное пиперидиноксила более эффективно ингибирует гемолиз, поскольку потенциал окисления ТЕМПО значительно ниже, чем у производных пирролиноксила. Предполагается, что механизм действия хитозан-нитроксилов

аналогичен реакциям индивидуальных НР, а увеличение биологической активности связано с синергетическим эффектом хитозана.

Как было отмечено выше, нитроксильные радикалы можно рассматривать как производные монооксида азота (NO˙). Другим классом химических соединений, биологическая активность которых также определяется наличием группы NO˙, являются нитрозильные комплексы железа (НКЖ). В отличие от нитроксилов, НКЖ способны высвобождать монооксид азота, относясь таким образом к широкому классу доноров NO˙.

1.3 Серосодержащие динитрозильные комплексы железа как доноры монооксида азота

Оксид азота (II) и его производные являются сигнальными молекулами, участвующими в передаче нервных импульсов, регуляции функций сердечно-сосудистой системы, иммунной защите и апоптозе [95-97]. Благодаря свободно-радикальной природе и высокой скорости диффузии, монооксид азота является короткоживущей молекулой, способной нанести ущерб клеткам организма. Повышенное содержание NO˙ может быть вызвано различными физиологическими нарушениями, в том числе социально значимыми заболеваниями. Избыточная концентрация NO˙ сопровождает заболевания нервной системы, ишемию, воспалительные процессы [98,99]. В то же время препараты на основе монооксида азота, находят применение для лечения данных групп заболеваний.

Доноры монооксида азота представляют собой фармакологически активные соединения, способные порождать NO˙ или его окисленные или восстановленные формы в результате метаболизма или спонтанного разложения. Механизмы образования NO˙ сильно различаются для разных классов соединений. Поскольку в биохимических реакциях NO˙ ведущую роль играют активные формы кислорода, данные процессы чувствительны к локальной концентрации кислорода в системе. Кроме того, в процессе метаболизма могут возникать различные

побочные продукты и промежуточные состояния в количествах, превышающих концентарцию высвободившегося монооксида азота [100-102]. Переносчиками NO• в организмах являются гемовые и негемовые нитрозильные комплексы железа, а также высоко- и низкомолекулярные нитрозотиолы (Рисунок 7).

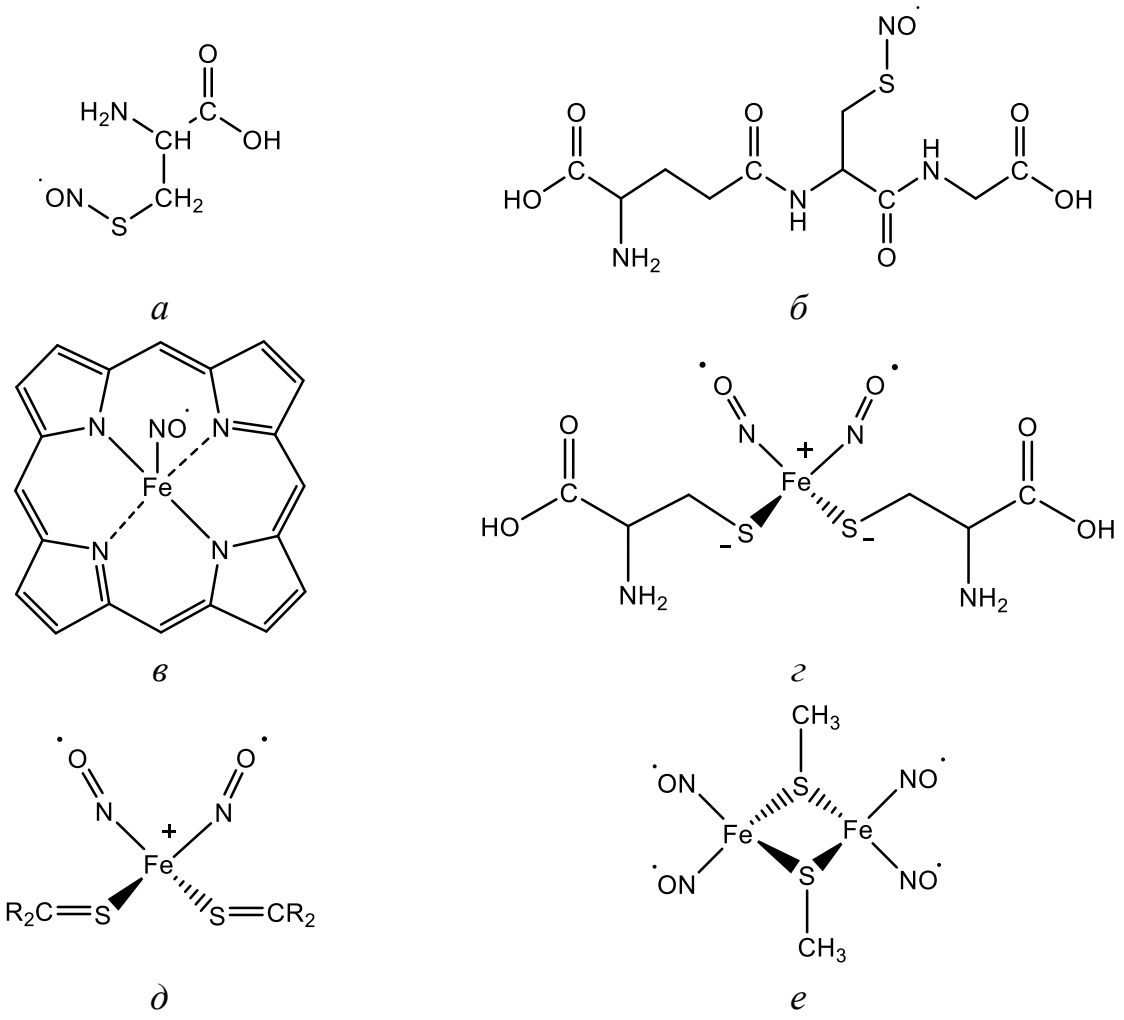


Рисунок 7 – Примеры доноров монооксида азота: природные нитрозотиолы на основе L-Цистеина (*а*) и глутатиона (*б*), гемовый железо-нитрозильный комплекс (*в*) и моноядерный анионный ДНКЖ на основе L-Цистеина (*г*); синтетический катионный ДНКЖ с тиокарбонильными лигандами (*д*) и биядерный красный эфир Руссена (*е*)

Классическими представителями доноров NO• являются органические эфиры нитратов и нитритов, используемые в сердечно-сосудистой терапии с XIX века. Эти вещества оказывают прямое вазоактивное действие и много лет используются для лечения ишемической болезни сердца, сердечной

недостаточности и артериальной гипертензии. К недостаткам данного класса соединений относятся быстрый период полувыведения, неблагоприятные гемодинамические эффекты и развитие лекарственной толерантности [100,103]. Для преодоления данных ограничений разработаны новые классы доноров NO˙, обладающие биосовместимостью, селективным действием, длительным периодом полувыведения. Примерами таких соединений служат природные носители монооксида азота.

Препараты на основе N-нитрозотиолов являются более новыми представителями доноров NO˙. К природным молекулам из данного класса относятся N-нитрозо-цистеин, N-нитрозо-глутатион (Рисунок 7 *а, б*) и N-нитрозо-альбумин. Нитрозотиолы обладают преимуществами по сравнению с органическими нитратами и могут быть использованы для лечения сердечно-сосудистых заболеваний [104,105]. Они способны также проникать во внутриклеточную среду за счет каталитического действия фермента протеиндисульфидизомеразы.

Динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ), наряду с нитрозотиолами, являются устойчивой формой в живых организмах [106,107]. В образовании негемовых железо-нитрозильных комплексов принимают участие биомолекулы, содержащие свободную SH-группу, такие как альбумин, глутатион и цистеин [108,109]. Формирование таких комплексов приводит к стабилизации монооксида азота и защите клеток от его разрушительного действия. В связи с этим дизайн новых синтетических ДНКЖ является перспективным направлением создания лекарственных препаратов, обладающих NO-донорной активностью. Преимуществами ДНКЖ перед другими классами доноров NO˙ являются эффективное действие при низких терапевтических дозах, низкий барьер высвобождения NO˙ и синергетическое действие серосодержащих лигандов [110,111].

Донорная активность ДНКЖ зависит как от структуры комплекса, так и от состава окружающей среды. Так в водных растворах в анаэробной среде энергия связи Fe-NO достаточно высока, и диссоциация комплекса протекает

преимущественно с отщеплением серосодержащих лигандов. Продуктами реакции могут быть комплексы с участием молекул растворителя или биядерные тетранитрозильные комплексы железа (ТНКЖ). ТНКЖ, содержащие мостиковые атомы серы, впервые получены и описаны Руссеном [см. 106]. Димерная форма наиболее устойчива в случае лигандов, содержащих сульфидную группу. На сегодняшний день синтезирован и исследован ряд комплексов железа с тиокарбонильными лигандами [112,113]. Такие комплексы более устойчивы в форме моноядерных ДНКЖ и в растворах находятся в равновесии с серосодержащими лигандами. В то же время в присутствии кислорода ДНКЖ распадаются за время порядка 10 мин с выделением $NO^{\bullet}$. Взаимодействие с биомолекулами способно стабилизировать железо-нитрозильный фрагмент и продлевать NO-донорную активность.

1.4 Структура и свойства динитрозильных комплексов железа

Для оценки реакционной способности монооксида азота, выделяющегося в результате распада ДНКЖ, важной задачей является определение формальных степеней окисления и зарядов на атоме железа и группах $NO^{\bullet}$. Несмотря на то, что строение ряда моноядерных ДНКЖ хорошо изучено с использованием как экспериментальных, так и теоретических методов, на сегодняшний день не существует единого способа описания электронной структуры железо-нитрозильного центра. Оксид азота может присутствовать в составе комплекса в формах NO^{+}, NO^{-} и нейтрального радикала $NO^{\bullet}$, а электронная конфигурация фрагмента $\{Fe(NO)_2\}^9$ может быть представлена как резонанс форм $\{Fe^{3+}(NO^{-})_2\}^9 \leftrightarrow \{Fe^{1+}(NO^{\bullet})_2\}^9 \leftrightarrow \{Fe^{1-}(NO^{+})_2\}^9$ (Рисунок 8). Первая форма представляет собой трехвалентное железо в низкоспиновом состоянии (S = 1/2) с лигандами NO^{-}; вторая структура может являться низкоспиновым Fe(I) с S = 1/2 или высокоспиновым Fe(I) с S = 3/2 и антиферромагнитным взаимодействием с лигандами $NO^{\bullet}$; наконец, третья форма представляет простое состояние (S = 1/2) восстановленного железа Fe^{1-} с лигандами NO^{+} [114]. Экспериментально

определить степень окисления железа в нитрозильных комплексах затруднительно из-за очень малого зазора между d-орбиталью Fe и π*-орбиталью NO.

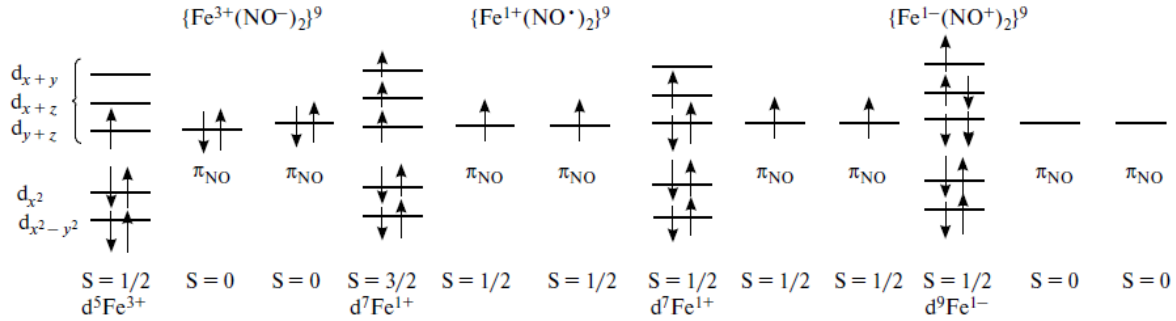


Рисунок 8 – Возможные электронные конфигурации парамагнитного железо-нитрозильного центра [114]

Одним из широко используемых методов определения эффективных зарядов в железо-нитрозильном фрагменте является измерение частоты колебания валентной связи N–O в ИК-спектрах комплексов. Заряженные фрагменты NO^+ дают полосу поглощения в диапазоне 1650—1985 $см^{-1}$, в то время как для комплексов NO^- полоса наблюдается при 1525—1590 $см^{-1}$. Тем не менее, ИК-спектроскопия не позволяет однозначно определять заряд на атоме железа [114].

Другим распространенным методом исследования структуры ДНКЖ является ЭПР-спектроскопия. Впервые парамагнитные железо-нитрозильные комплексы были обнаружены в биологических системах методом ЭПР по наличию характеристического сигнала с g-фактором 2,03 [109]. В живых организмах и клеточных культурах нитрозильные комплексы железа образуются прежде всего с участием белков, содержащих свободные сульфидные группы, а также низкомолекулярных веществ, таких как глутатион и цистеин. Природу ДНКЖ можно установить путем сравнения ЭПР спектров замороженных растворов при температуре жидкого азота и комнатной температуре. Низкомолекулярные комплексы при 25 °C демонстрируют изотропный синглет с g = 2,03, полушириной 0,7 мТл и 13-компонентной сверхтонкой структурой, в то время как при -196 °C спектр характеризуется аксиально симметричным g-

фактором со значениями $g_{\perp}$=2,041 и $g_{\parallel}$ = 2,014 (Рисунок 9). Спектр белковых комплексов практически не зависит от температуры и близок спектру замороженных растворов низкомолекулярных ДНКЖ [109,115]. Основываясь на данных ЭПР, большинство исследователей склоняются к использованию d^7-конфигурации иона Fe^{1+} для описания нитрозильного фрагмента в ДНКЖ [114].

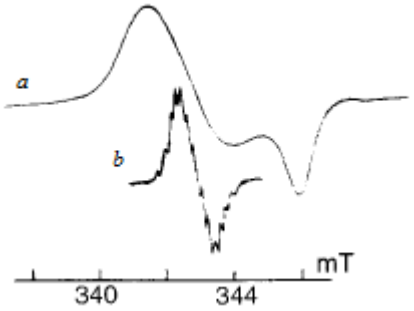


Рисунок 9 – ЭПР спектры 0,1 мМ растворов ДНКЖ на основе цистеина при -196 °С (*a*) и комнатной температуре (*b*) [109].

Помимо экспериментальных методов для анализа электронной плотности в железо-нитрозильном фрагменте широко используются квантово-химические расчеты. Так в работах [116-118] с использованием ТФП изучено распределение зарядов и спиновых плотностей для различных ТНКЖ, их мономеров, а также окисленных и восстановленных форм. Сравнение состояний с различной мультиплетностью показало, что в случае ДНКЖ наиболее выгодным оказывается состояние $\{Fe^{1+}(NO^{\bullet})_2\}^9$. Однако получить корректную электронную структуру для ТНКЖ в синглетном состоянии не удалось из-за сильного отклонения $<S^2>$ от точного значения. В то же время в работах [119,120] сообщается, что для ДНКЖ с тиол-содержащими лигандами преимущественными являются формы $\{Fe^{2+}(NO^{\bullet})(NO^{-})\}^9$ и $\{Fe^{3+}(NO^{-})_2\}^9$.

Образование серонитрозильных комплексов происходит в присутствии двухвалентного железа и молекул $NO^{\bullet}$. При этом в водной фазе существует равновесие белковых и низкомолекулярных комплексов (Рисунок 10). В физиологических условиях наиболее устойчивыми оказываются белковые ДНКЖ [121,122]. Проведенные исследования показывают, что железо-серные центры на

поверхности протеинов связывают на порядок большее количество молекул NO• в клетках и тканях по сравнению с нитрозотиолами [123].

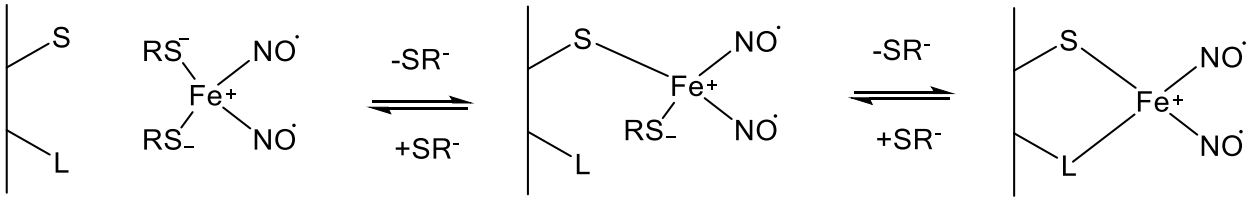


Рисунок 10 – Схема замещения низкомолекулярных лигандов на функциональные группы белка

В недавних исследованиях установлено, что низкомолекулярные тиол-содержащие НКЖ в большинстве устойчивы в форме диамагнитных биядерных тетранитрозильных комплексов [124-126] (Рисунок 11). Поскольку ТНКЖ связывает в два раза больше молекул оксида азота, чем моноядерный аналог, наличие таких комплексов в живых организмах может свидетельствовать о еще более важной роли NO• в регуляции биохимических процессов.

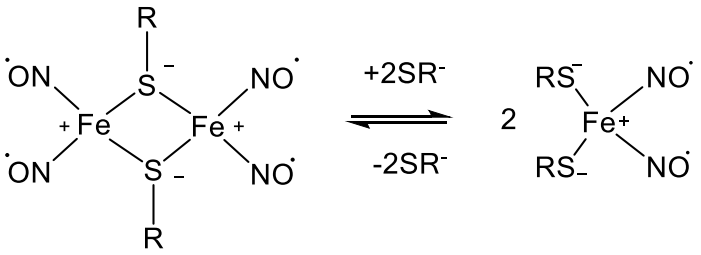


Рисунок 11 – Равновесие моно- и биядерного серонитрозильных комплексов железа

Помимо анионных тиолсодержащих могут быть получены катионные ДНКЖ на основе тиокарбонильных лигандов. Такие комплексы являются более лабильными и быстро разлагаются при повышении температуры или в присутствии кислорода. В ИПХФ РАН синтезирован ряд комплексов на основе тиомочевины и тиобензамида. В работе [127] показано, что тиомочевинный ДНКЖ реагирует с восстановленным глутатионом в водном буферном растворе при нейтральном pH. Конечным продуктом реакции является нейтральный биядерный ТНКЖ на основе глутатиона. *In vivo* нитрозильные комплексы железа

взаимодействуют с белками плазмы крови, а также эритроцитами [128]. Основной мишенью для действия железо-нитрозильных комплексов является альбумин [129].

1.5 Альбумин как мишень для связывания нитрозильных комплексов железа

Сывороточный альбумин представляет собой транспортный белок массой 67 кДа, который присутствует в организмах позвоночных. Альбумин – один из самых распространенных белков в плазме млекопитающих, концентрация которого составляет 35-55 г/л [130]. Основной функцией альбумина является транспорт метаболитов, гормонов и лекарственных средств [131-134]. Кроме того, сывороточный альбумин является физиологическим переносчиком ионов металлов, таких как Zn(II), Cu(II), Cd(II) и Ni(II) [135-138], а также способен связывать координационные комплексы металлов [139-142]. Для связывания молекул различной природы, таких как короткие и длинные жирные кислоты, билирубин, различные лекарственные средства, у альбумина имеется ряд специфических сайтов [143]. При этом последовательность аминокислотных остатков альбуминов млекопитающих может различаться на 35 % для разных видов, что влияет на афинность белка к его лигандам, однако большинство альбуминов способно эффективно связывать различные группы лигандов. Клетки печени человека вырабатывают около 12 г альбумина в день, а период полувыведения белка достигает 19 дней. За это время одна молекула альбумина проходит через систему кровообращения почти 15 000 раз, перенося различные лиганды к разным частям тела [131].

Модельной системой для изучения связывания лекарственных средств в плазме крови является бычий сывороточный альбумин (БСА). Как и все типы альбуминов БСА имеет преимущественно спиральную структуру и состоит из 3-х доменов (Рисунок 12) [143]. Границы домена находятся в середине самых длинных спиралей (остатки 193 и 382). Каждый домен состоит из двух субдоменов: субдомен А, содержащий шесть спиралей, и субдомен В,

содержащий четыре спирали. Альбумин является одним из наиболее эволюционно изменчивых белков, что может быть причиной его уникальных связывающих свойств. Тем не менее имеется две особенности, сохраняющиеся у альбуминов всех видов млекопитающих: спиральность и отсутствие β-листов, а также характерная структура дисульфидных мостиков. Молекула альбумина достаточно конформационно подвижна, что обеспечивает возможность связывания с большим числом лигандов. Специфические сайты связывания лекарственных средств расположены в доменах IIA и IIIA, которые имеют схожую химическую структуру и обозначаются также как сайты лекарств I и II соответственно.

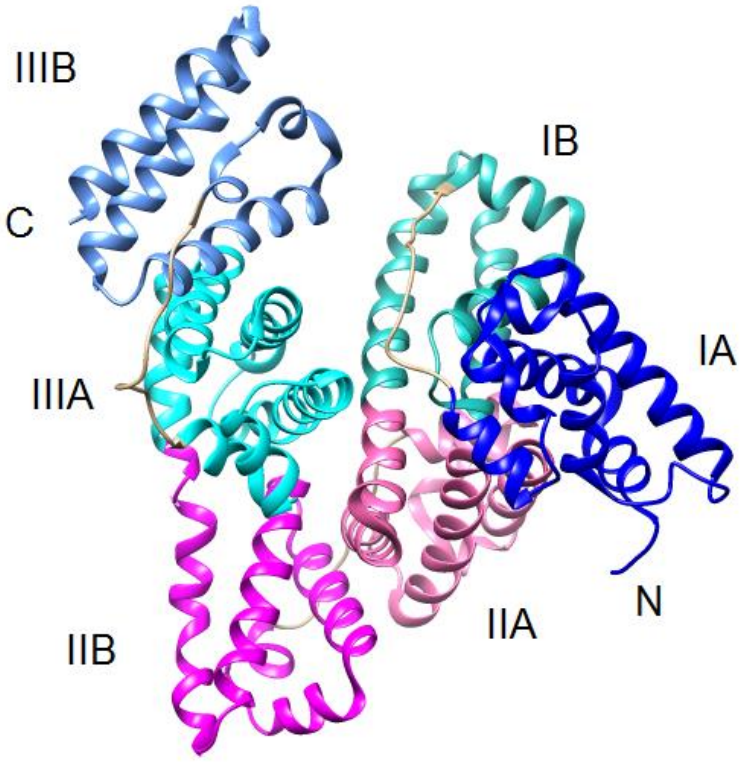


Рисунок 12 – Доменная структура БСА

Экспериментально установлено, что связывание нитрозильного фрагмента ДНКЖ происходит с остатками цистеина (Cys34) или гистидина, находящихся в гидрофобном кармане альбумина, с образованием белковых железо-нитрозильных комплексов [115]. Нитрозилирование альбумина играет важную роль в метаболизме млекопитающих. Установлено, что небольшая часть сывороточного альбумина у людей нитрозирована в физиологических условиях [144]. Кроме

того, экспериментальные данные свидетельствуют о том, что S-нитрозирование модулирует функцию протеаз, белков цитоскелета, мембранных рецепторов, ионных каналов, GTP-связывающих белков, протеинкиназ, фосфотирозинпротеинфосфатаз, факторов транскрипции и глутатионредуктазы [145-148]. При этом основной формой нитрозилированного альбумина является координационный комплекс с динитрозилом железа.

Однако помимо образования белковых нитрозильных комплексов, альбумин может связывать НКЖ на поверхности за счет наличия большого количества сайтов связывания. Так в работе [129] установлено, что БСА способен стабилизировать биядерный тетранитрозильный комплекс на основе тиосульфата. Время распада ТНКЖ, определяемое по наличию двух характеристических полос в спектре поглощения видимого света, увеличивается в 27 раз в присутствии альбумина. Связывание в данном случае, вероятно, будет происходить за счет электростатических взаимодействий между положительно заряженными аминокислотными остатками БСА и отрицательно заряженными тиосульфатными группами ТНКЖ. Таким образом, альбумин способен не только выступать в качестве лиганда для образования железо-нитрозильных комплексов, но и связывать НКЖ на своей поверхности. Поэтому одной из задач работы было установление возможных сайтов связывания моноядерных ДНКЖ на поверхности БСА.

ГЛАВА 2. МЕТОДЫ РАСЧЕТОВ

В работе были использованы различные методы вычислительной химии для предсказания строения и свойств исследуемых соединений. Для расчета окислительно-восстановительных потенциалов, а также электронной структуры низкомолекулярных веществ применялись методы квантовой химии. Моделирование поведения олигомеров хитозана в водном растворе и исследование связывания ДНКЖ с альбумином проводились с использованием подходов молекулярной механики (ММ) и молекулярной динамики (МД).

2.1 Квантово-химические расчеты реакционной способности и физико-химических свойств молекул в растворе

2.1.1 Методы квантовой химии для описания электронной структуры молекул

В квантовой химии для описания свойств атомных и молекулярных систем используются методы квантовой механики. В основе такого описания находится стационарное уравнение Шредингера, в котором в качестве переменных используются координаты и спины электронов, а также координаты атомных ядер. Одним из базовых приближений является приближение Борна-Оппенгеймера, согласно которому движением ядер можно пренебречь и волновая функция системы зависит только от координат электронов при фиксированном положении ядер. Исторически важным подходом, позволяющим решать квантово-химические задачи, является метод Хартри-Фока, в котором спиновые переменные отделяются от пространственных и молекулярная волновая функция представляется антисимметризованным произведением одноэлектронных орбиталей. Каждая орбиталь в свою очередь может быть представлена линейной комбинацией базисных функций, что позволяет перейти от дифференциальных уравнений Хартри-Фока к алгебраическим уравнениям Рутаана [149]. Решение таких уравнений позволяет определить коэффициенты разложения орбиталей по

базисным функциям и относительные энергии орбиталей. Полная электронная энергия системы будет определяться как сумма энергий занятых молекулярных орбиталей.

В приближении Хартри-Фока многоэлектронная задача сводится к движению одного электрона в усредненном поле других электронов, при этом не учитывается электронная корреляция. Для более точного квантово-химического описания многоэлектронной системы разработаны более строгие методы, которые можно разделить на неэмпирические (теория возмущений Меллера-Плессета, методы связанных кластеров и методы конфигурационного взаимодействия), полуэмпирические и теорию функционала плотности. Последний метод сочетает в себе строгость теоретического подхода и высокую вычислительную эффективность.

В основе метода ТФП лежит теорема Хоэнберга-Кона [35], согласно которой энергия основного состояния многоэлектронной системы однозначно определяется электронной плотностью этой системы. То есть вместо волновой функции ψ и уравнения Шредингера используются аналогичные функция плотности ρ и уравнение Кона-Шема. Чтобы привести электронную энергию основного состояния к выражению, зависящему только от электронной плотности, используется приближение Хартри-Фока. Гамильтониан уравнения Кона-Шема содержит обменно-корреляционный потенциал E_{xc}, учитывающий электронную корреляцию. В зависимости от вида E_{xc} различают приближение локальной плотности (LDA-функционалы), в котором электронная энергия зависит только от функции электронной плотности, обобщенное градиентное приближение (GGA-функционалы), когда энергия зависит от электронной плотности и ее градиента, гибридные функционалы, содержащие комбинацию различных обменных потенциалов, взятых с определенными весами, и мета-гибридные функционалы, в которых функционалом плотности является не только потенциальная, но и кинетическая энергия электронов. Точные аналитические выражения обменно-корреляционных потенциалов заранее не известны, поэтому для их описания требуется ряд параметров, определяемых из экспериментальных

данных. В связи с этим расчеты в теории функционала плотности не относятся к методам *ab initio*.

Описанные методы позволяют рассчитать полную электронную энергию многоатомных систем, включая молекулы, ионы и свободные радикалы. Однако для определения термодинамических свойств необходимо получить значения свободных энергий компонентов системы.

2.1.2 Составляющие вклады для расчета свободной энергии

Свободная энергия компонента *i* складывается из внутренней энергии при 0 К, состоящей из электронной энергии молекулы в основном состоянии E_{el} и энергии нулевых колебаний E_{ZPV} ($E_0 = E_{el} + E_{ZPV}$), и термического вклада G_T^0

$$G_i^0 = E_{el} + E_{ZPV} + G_T^0 \quad (1)$$

Полная электронная энергия молекулы E_{el}, равная сумме энергий всех занятых молекулярных орбиталей ε_i, получаемых как собственные значения оператора Гамильтона электронной системы, определялась в приближении Борна-Оппенгеймера методами ТФП. Расчеты в растворе проводились с использованием континуумных моделей, когда электростатические и кавитационные взаимодействия с растворителем включались в уравнение Шредингера.

Энергия нулевых колебаний рассчитывалась как $E_{ZPV} = N\sum \frac{h\nu_i}{2}$, а термическая составляющая была получена методами статистической термодинамики в приближении идеальный газ – жесткий ротатор – гармонический осциллятор [150].

$$\Delta G_T^0 = -RT\frac{\ln Q}{N}, \quad (2)$$

где $Q = Q_{пост}Q_{эл}Q_{вр}Q_{кол}$ – статистическая сумма по состояниям для единичной молекулы, включающая независимые поступательный, электронный, вращательный и колебательный вклады; N – число частиц; поступательная сумма

$Q_{пост} = \left(\frac{2\pi mkT}{h^2}\right)^{3/2} V$, где $V = \frac{RT}{P}$ – молярный объем идеального газа; $Q_{эл} = 1$ – вырожденность основного электронного состояния; вращательная сумма $Q_{вр} = \frac{\sqrt{\pi}}{\sigma}\prod_{l=1}^{3}\left(\frac{8\pi^2 I_l kT}{h^2}\right)^{1/2}$, где I_l – проекции момента инерции молекулы, σ – параметр симметрии, равный 1 или 2; колебательная сумма $Q_{кол} = \prod_i \left(1 - e^{-\frac{h\nu_i}{kT}}\right)^{-1}$, где $\nu_i -$ гармонические частоты всех возможных колебаний в молекуле.

2.1.3 Методы расчета свободных энергий в растворе

Для расчета электрохимических потенциалов необходимо определить разность свободных энергий ΔG_r^0 продуктов и реагентов в растворе:

$$\Delta G_r^0 = G_{sol}^0(\text{продукты}) - G_{sol}^0(\text{реагенты}) \quad (3)$$

Свободные энергии G_{sol}^0 рассчитываются с учетом наиболее термодинамически стабильных конформаций реагирующих частиц с использованием распределения Больцмана:

$$G_{sol}^0 = G_{sol,1}^0 - RT\ln\left(a_1 + \sum_{i=2}^{N} a_i e^{-\frac{G_{sol,i}^0 - G_{sol,1}^0}{RT}}\right) \quad (4)$$

Здесь a_i – статистический вес конформации i, N – число рассматриваемых конформаций, а индекс 1 отвечает конформеру с наименьшей свободной энергией. Значимый вклад дают конформации, для которых отличие по энергии от наиболее устойчивой $G_{sol,i}^0 - G_{sol,1}^0 \leq 5RT$.

Стандартным подходом для расчета энергетики химических реакций в конденсированной фазе является модель термодинамического цикла (ТЦ). Пример ТЦ для окисления нитроксильного радикала представлен на рисунке 13. Аналогом абсолютного потенциала окисления в газе является потенциал ионизации, который может быть определен как изменение энтальпии реакции при 0 K [151]. Переход к раствору осуществляется за счет прибавления свободных

энергий сольватации ΔG_s реагентов и продуктов. Электрон всегда рассматривается как газофазный компонент [152].

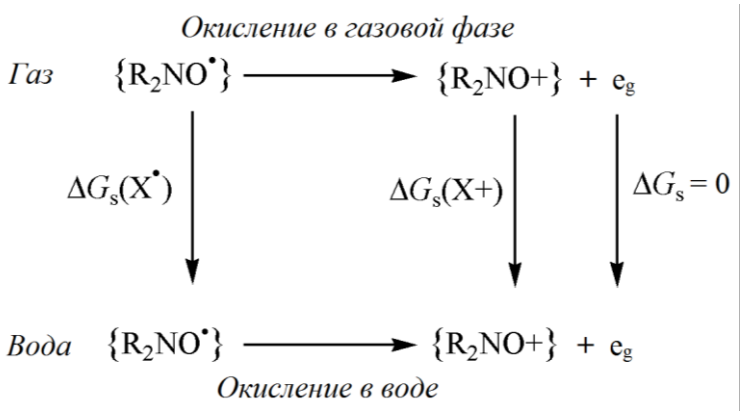


Рисунок 13 – Термодинамический цикл окисления нитроксильного радикала. Фигурные скобки обозначают рассмотрение одной конформации из возможных [153]

Согласно модели ТЦ свободная энергия компонента i в растворе определяется как сумма свободной энергии в газовой фазе ($G^0_{gas,i}$) и свободной энергии сольватации ($\Delta G_{s,i}$):

$$G^0_{sol,i} = G^0_{gas,i} + \Delta G_{s,i} \quad (5)$$

$\Delta G_{s,i}$ определяется как разность полных электронных энергий в растворе и в газовой фазе. В континуумных моделях сольватации электронная энергия в растворе включает электростатические и неполярные взаимодействия с поляризуемой средой (растворителем).

Абсолютный потенциал стандартного водородного электрода также может быть вычислен с использованием термодинамического цикла (Рисунок 14). Для этого необходимо определить свободные энергии атомизации и ионизации для водорода, а также свободную энергию сольватации протона. Исходя из представленной модели, потенциал $E^0_{abs}(СВЭ)$ будет определяться как

$$E^0_{abs}(СВЭ) = -\frac{\Delta G_{rxn}}{F} = \frac{1}{F}\left(\Delta G_{ion} + \Delta G_{atom} + \Delta G_s(H^+)\right), \quad (6)$$

где ΔG_{rxn} – энергия образования молекулярного водорода из раствора; ΔG_{ion} и ΔG_{atom} – свободные энергии ионизации и атомизации водорода соответственно; $\Delta G_s(H^+)$ - свободная энергия сольватации протона.

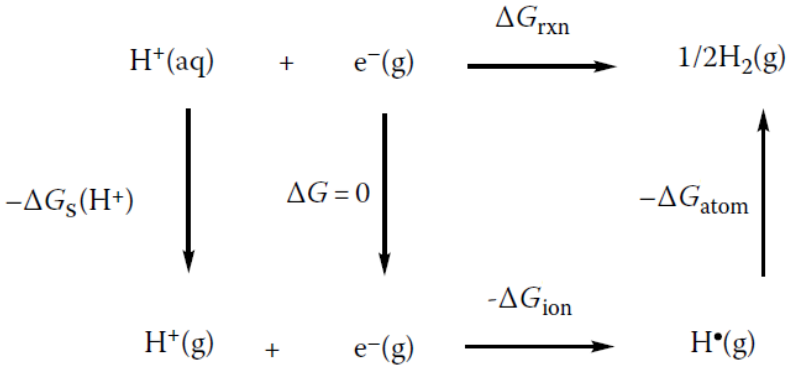


Рисунок 14 – Термодинамический цикл для стандартного водородного электрода [154]

В литературе предложено несколько значений для энергетических вкладов, влияющих на потенциал СВЭ (см. [155-157]). В данной работе для расчетов будет использовано значение E^0_{abs}(СВЭ) = 4,44 В, рекомендованное ИЮПАК [158].

Модель ТЦ находит широкое применение в определении термодинамических характеристик химических реакций, поскольку позволяет проводить расчет электронной структуры и колебательных частот молекул в газовой фазе с последующим моделированием взаимодействия с растворителем. Однако на сегодняшний день развитие методов квантовой химии и вычислительной техники делает возможным учитывать влияние растворителя на структуру соединения на этапе оптимизации геометрии. Поэтому альтернативным методом определения энергий Гиббса является расчет электронной и термической энергии в растворе, без явного выделения свободной энергии сольватации.

Можно выделить три подхода для оценки влияния растворителя на свойства реагирующих частиц [см. 159]: континуумные (макроскопические) модели, рассматривающие растворитель как непрерывную поляризуемую среду, дискретные (микроскопические), учитывающие молекулы растворителя в явном виде, и полуконтинуумные, в которых в явном виде присутствуют только молекулы растворителя, расположенные вблизи от молекулы растворенного вещества. Дискретные модели широко используются в рамках метода силового поля, который позволяет моделировать системы с большим количеством атомов, однако применимы и в сочетании с квантово-химическими подходами [32].

Континуумные модели сольватации можно разделить на модели виртуального заряда, в которых на атомы растворенного вещества помещают дополнительный поляризующий заряд, обеспечивающий взаимодействие с поляризуемой средой, а также модели, в которых взаимодействия с растворителем учитываются в явном виде в уравнении Шредингера. В последнем случае для описания системы вводится потенциал φ, называемый полем реакции, который эквивалентен разности полного потенциала Ф и электростатического потенциала $Ф^0$ молекулы в газовой фазе [160]. Поэтому такие модели имеют общее название метода поля реакции. Во всех континуумных моделях молекула растворенного вещества рассматривается погруженной в непрерывную поляризуемую среду (континуум), образуя полость с размерами, определяющимися ван-дер-ваальсовыми радиусами атомов. И для определения свободной энергии сольватации необходимо рассчитать электростатические и неполярные взаимодействия с континуумом.

Удачной реализацией метода поля реакции является модель поляризуемого континуума (PCM), разработанная для расчетов энергий сольватации для широкого спектра молекул и растворителей [161]. Вариантами модели PCM, использующих различные подходы для описания неполярных взаимодействий, являются модель объединенных атомов для метода Хартри-Фока (UAHF) и сольватационная модель плотности (SMD). В модели UAHF неполярная составляющая свободной энергии сольватации G_{vdW} вычисляется как сумма энергий отдельных атомов растворенного вещества $G_{vdW,i}$. При этом атомная энергия $G_{vdW,i}$ зависит от типа атома и его радиуса, который в свою очередь определяется не только ван-дер-ваальсовым радиусом атома i, но и его химическим окружением [162]. Модель SMD также рассматривает молекулу растворенного вещества как суперпозицию сфер, однако энергия каждой сферы будет определяться распределением электронной плотности в молекуле [163]. В настоящей работе будут сравниваться результаты расчетов свободных энергий гидратации нитроксильных радикалов, полученные методами PCM(UAHF) и PCM(SMD).

После определения свободных энергий компонентов реакции можно перейти к расчету электрохимических потенциалов, если рассматриваемые окислительно-восстановительные процессы протекают равновесно. Данное утверждение справедливо для циклических нитроксильных радикалов.

2.1.4 Определение стандартного электрохимического потенциала окисления

Одноэлектронное окисление нитроксильного радикала протекает согласно уравнению

$$R_2NO^{\cdot} \leftrightarrows R_2NO^{+} + e^{-} \quad (7)$$

Электрохимический потенциал реакции (7) определяется уравнением Нернста

$$E_{Ox} = E^0_{Ox} + \frac{RT}{F} \ln \frac{a(R_2NO^{+})}{a(R_2NO^{\cdot})}, \quad (8)$$

где a – активности компонентов реакции, М; Т – абсолютная температура, К; R = 8,314 Дж/(моль·К) – универсальная газовая постоянная; F = 96 485 Кл/моль – постоянная Фарадея; E^0_{Ox} – стандартный электрохимический потенциал реакции (7), В.

Стандартный потенциал равен электрохимическому потенциалу, когда активности всех реагирующих частиц равны 1 М. Значение стандартного потенциала обычно приводится относительно стандартного водородного электрода (СВЭ) и определяется как

$$E^0_{Ox} = E^0_{abs} - E^0_{abs}(СВЭ), \quad (9)$$

где E^0_{abs} – абсолютный стандартный потенциал реакции (7), а $E^0_{abs}(СВЭ)$ – абсолютный потенциал стандартного водородного электрода, значение которого обычно оценивается в диапазоне 4,05 – 4,47 В [151,154,158].

Измеряемый электрохимический потенциал реакции (7), называемый также потенциалом полуволны ($E_{1/2,Ox}$), связан со стандартным потенциалом согласно уравнению

$$\mathrm{E_{1/2,Ox}} = \mathrm{E^0_{Ox}} + \frac{\mathrm{RT}}{\mathrm{F}} \ln \frac{\gamma(\mathrm{R_2NO^+})}{\gamma(\mathrm{R_2NO^\cdot})} + \frac{\mathrm{RT}}{2\mathrm{F}} \ln \frac{D(\mathrm{R_2NO^+})}{D(\mathrm{R_2NO^\cdot})}, \qquad (10)$$

где γ – коэффициенты активности, а D – коэффициенты диффузии продуктов и реагентов. Поскольку в реальных условиях достичь стандартного состояния практически невозможно, первое и второе слагаемые правой части уравнения (10) определяют формальный потенциал $\mathrm{E^{0\prime}_{Ox}}$ [164]. В случае, когда коэффициенты диффузии окисленной и восстановленной форм близки, формальный потенциал равен измеренному потенциалу полуреакции, если концентрации продуктов и реагентов равны 1 М. Поскольку нитроксильный радикал ($\mathrm{R_2NO^\cdot}$) и соответствующий оксоаммониевый катион ($\mathrm{R_2NO^+}$) имеют близкую структуру, а полуреакция (7) обратима, мы имеем возможность сравнивать вычисленные стандартные потенциалы окисления с экспериментально измеренными относительными потенциалами.

Квантово-химические расчеты позволяют определить свободную энергию Гиббса реакции окисления НР ($\mathrm{\Delta G^0_{Ox}}$). Тогда электрохимический потенциал будет определяться соотношением

$$\mathrm{E_{Ox}} = \frac{\mathrm{\Delta G^0_{Ox}}}{\mathrm{F}} - \mathrm{E^0_{abs}(СВЭ)} \qquad (11)$$

Стоит отметить, что в электрохимической практике принято указывать значение потенциала полуреакции восстановления, поэтому знаки $\mathrm{E_{Ox}}$ и $\mathrm{\Delta G^0_{Ox}}$ для реакции (7) совпадут.

2.1.5 Влияние протонирования на величину стандартного потенциала восстановления

Одноэлектронное восстановление нитроксильных радикалов протекает с участием протона с образованием гидроксиламина. Для данного процесса предложен следующий механизм [60,165]

$$\mathrm{R_2NO^\cdot} + e^- \xrightarrow{\mathrm{E^0_{Red}}} \mathrm{R_2NO^-} \qquad (12)$$

$$R_2NO^- + H^+ \overset{1/K_2}{\Longleftrightarrow} R_2NOH \quad (13)$$

$$R_2NOH + H^+ \overset{1/K_1}{\Longleftrightarrow} R_2NHOH^+ \quad (14)$$

В этом случае за реакцией восстановления (12) следуют две стадии обратимого протонирования (13) и (14). Для сравнения с экспериментальными значениями потенциала $E_{1/2,Red}$ необходимо определить потенциал реакции (12), а также константы диссоциации K_1 и K_2. Поскольку структура гидроксиламина близка к структуре нитроксильного радикала, можно использовать стандартный потенциал E^0_{Red}. Тогда полный абсолютный потенциал восстановления будет определяться уравнением

$$E_{Red} = -\frac{\Delta G^0_{Red}}{F} - \frac{RT}{F} ln(K_1K_2) + \frac{RT}{F} ln(K_1K_2 + K_1[H^+] + [H^+]^2) \quad (15)$$

При нейтральном pH равновесие в реакции (13) сдвинуто вправо и pK_2 >> pH, поэтому без потери точности относительный потенциал восстановления может быть рассчитан как

$$E_{Red} = -\frac{\Delta G^0_{Red}}{F} - \frac{RT}{F} ln(K_1K_2) + \frac{RT}{F} ln(K_1[H^+] + [H^+]^2) - E^0_{abs}(СВЭ) \quad (16)$$

Формула (16) позволяет сравнивать расчетные данные с экспериментальными, однако определение констант K_1 и K_2 требует больших вычислительных затрат. Поэтому для оценки реакционной способности нитроксилов в реакциях восстановления может быть использован потенциал переноса одного электрона $E^0_{Red} = -\frac{\Delta G^0_{Red}}{F} - E^0_{abs}(СВЭ)$.

2.1.6 Детали квантово-химических расчетов нитроксильных радикалов

Квантово-химические расчеты нитроксильных радикалов и их редокс-партнеров проводились с использованием гибридных обменно-корреляционных функционалов B3LYP [166,167] и M062X [168]. Оптимизация геометрии и расчет гармонических частот выполнялись в стандартном валентно-расщепленном базисе 6-31+G(d,p). Электронная энергия для оптимизированных структур пересчитывалась в расширенном базисе 6-311+G(2df,2p). Для расчета частиц с

неспаренным электроном применялся неограниченный метод ТФП с открытыми оболочками. Влияние растворителя учитывалось с использованием сольватационных моделей UAHF [162] и SMD [163], основанных на модели поляризуемого континуума PCM [161]. Термический вклад рассчитывался при температуре 298,15 К и давлении 1 атм; переход к стандартной концентрации в растворе 1 М осуществлялся прибавлением концентрационной поправки 7,93 кДж/моль [152]. Все квантово-химические расчеты проводились в программном пакете Gaussian 09 [169] (лицензионная программа ИПХФ РАН).

2.1.7 Детали квантово-химических расчетов нитрозильных комплексов железа

Квантово-химические расчеты исходных комплексов, продуктов гидролиза и переходных состояний проводились в теории функционала плотности с использованием гибридных GH-mGGA функционалов TPSSH [170] и M06 [168] в трехэкспонентном базисе def2-TZVP. Функционал TPSSH зарекомендовал себя как содержащий оптимальное соотношение точного HF и KS обменного интегралов, что обеспечивает хорошее соответствие длин связей и электронной структуры экспериментальным данным [171]. В то же время функционал M06 показал минимальное отклонение для энергии диссоциации железо-тиолатного комплекса в сравнении с методом CASPT2 [172]. Оптимизация геометрии и расчет гармонических частот выполнялись в водной фазе с использованием континуумной модели растворителя PCM(SMD). Седловые точки переходных состояний контролировались по наличию одной мнимой частоты колебаний. Полная внутренняя энергия E_0 реагирующих частиц складывалась из электронной энергии E_{el}, включающей свободную энергию сольватации и энергии нулевых колебаний E_{ZPV}. Свободная энергия складывалась из E_{el} и термического вклада G_T^0, рассчитанного при температуре 298,15 К и давлении 1 атм. Для перехода к стандартной концентрации 1 М использовалась концентрационная поправка 7,93 кДж/моль для всех частиц, кроме молекул воды. Для молекул воды концентрационная поправка отвечала стандартной концентрации 55,5 М и

составляла 17,91 кДж/моль [173]. Расчеты биядерных ТНКЖ в синглетном состоянии проводились методом нарушенной симметрии [174,175].

2.2 Расчеты методами молекулярной механики и молекулярной динамики

В отличие от квантовой химии в методах молекулярной механики и молекулярной динамики используются представления классической физики для описания структуры молекул. При этом движение электронов не рассматривается, а энергия системы определяется только расположением ядер атомов в пространстве. Внутренняя энергия молекулы в ММ расчетах описывается потенциалом, содержащим колебательные вклады химических связей (E_{bond}) и валентных углов (E_{angle}), внутренних вращений (E_{tors}), а также несвязанных взаимодействий – электростатических (E_{es}) и ван-дер-ваальсовых (E_{vdw}). Вклады E_{es} и E_{es} обычно не учитываются для химически связанных атомов. Аналитические выражения для этих потенциалов содержат ряд параметров, полностью охватывающих возможные комбинации атомов в молекуле. Такой набор потенциалов и атомных параметров называют силовым полем. Поскольку многообразие химических соединений и их свойств очень велико, СП разрабатываются под конкретный класс соединений. В частности, для углеводов распространение получили такие поля как ММ3, OPLS, CHARMM, Amber [176-179].

Молекулярная механика использует аналитические потенциалы и параметры СП для изучения свойств системы в равновесии. Тогда как молекулярная динамика позволяет моделировать изменение системы во времени. С точки зрения классической физики, микросостояние частицы описывается ее координатами (x) и скоростями (v). Изменение x и v во времени будет означать движение частицы вдоль траектории, причем начальная точка полностью определяет траекторию [см. 26]. В основе МД моделирования лежит решение механических уравнений, связывающих последующую точку траектории с предыдущей:

$$x(t + \Delta t) = x(t) + v(t)\Delta t$$
$$v(t + \Delta t) = v(t) + a(t)\Delta t\,' \qquad (17)$$

где $a = -\frac{1}{m}\frac{\partial E}{\partial x}$ – ускорение, определяемое потенциалом E и массой частицы m.

Поскольку получить непрерывное по времени аналитическое решение системы (17) обычно не представляется возможным, в МД используются разностные схемы с фиксированным Δt. Так прямое решение уравнений (17) называется схемой Эйлера, однако данный метод не обладает устойчивостью, т.е. ошибка вычислений экспоненциально возрастает [26]. Для получения более устойчивых решений в существующих программах для молекулярной динамики используют метод Верле [180] и схему «прыжка лягушки» как его модификацию, а также более точные алгоритмы Рунге-Кутта и Гера. Кроме того, МД моделирование химических систем требует контроля термодинамических характеристик, таких как температура, давление и объем. Поэтому в программные комплексы включены различные соответствующие алгоритмы.

2.2.1 Моделирование хитозана и его нитроксильных производных

Расчеты методами ММ и МД проводились с использованием программ NAMD 2.13 [181], VMD [182] и AmberTools [183] (программы открытого доступа). Использовались стандартные библиотеки программ, дополненные новыми параметрами силового поля. Для моделирования олигомеров хитозана и их нитроксильных производных был использован набор параметров силового поля (СП) AmberGlycam-06 [184], разработанный специально для углеводов. Недостающие в библиотеке СП внутримолекулярные параметры для нитроксилов были определены для равновесной геометрии изолированной молекулы ТЕМРО в конформации кресла из расчетов методом B3LYP/6-31G(d). Заряды на атомах рассчитывались в приближении ограниченных атомных зарядов (RESP) [185]. Полученные заряды RESP воспроизводят электростатический потенциал, рассчитанный на уровне теории HF/6-31G(d) для равновесных геометрий нитроксилов в газовой фазе из расчетов B3LYP/6-31G(d). Заряды на атомах H,

связанных с атомами С, принимались равными 0, а их вычисленные значения складывались с зарядами на углеродах.

ММ расчеты с учетом влияния воды проводились в рамках обобщенной модели Борна GBSA [186] в программе NAMD. Минимизация геометрии в ММ расчетах выполнялась градиентным методом для 10^4 шагов, что обеспечивало сходимость по энергии в пределах 10^{-6} кДж·моль$^{-1}$. МД олигомеров хитозана проводилась с учетом явных молекул воды в модели TIP3P для периодической кубической решетки. При построении ячейки решетки минимальное расстояние между границей и растворенным веществом составляло 6 Å. Системы с заряженными производными хитозана в воде были нейтрализованы добавлением хлорид-анионов. Расчеты МД предварялись минимизацией структуры моделируемой ячейки. МД проводилась для температуры 300 К в изобарно-изотермическом (NPT) ансамбле с шагом интегрирования 2 фс. Термостатирование системы осуществлялось стохастическим методом Ланжевена, а для поддержания постоянного давления использовался модифицированный метод Нозе-Гувера в NAMD. Дальнодействующие электростатические взаимодействия рассчитывались методом Эвальда. Радиус отсечения несвязанных взаимодействий составлял 12 Å. Для атомов Н поддерживались постоянные длины связей с помощью алгоритма SHAKE.

Для анализа и обработки данных использовалась программа VMD, поддерживающая язык программирования tcl, а также программа VegaZZ [187]. Визуализация структур осуществлялась в программе молекулярной графики Chimera [188].

2.2.2 Моделирование динитрозильных комплексов железа

Для молекулярного моделирования динитрозильных комплексов железа в качестве основы использовалось силовое поле GAFF 2, разработанное для широкого набора соединений [189]. Потенциальная энергия молекулы или молекулярной системы в силовом поле GAFF вычисляется как

$$E = \sum_{bond} \frac{K_l}{2}(l - l_0)^2 + \sum_{angles} \frac{K_\theta}{2}(\theta - \theta_0)^2 + \sum_{dihed} \frac{V_n}{2}[1 + \cos(n\varphi - \gamma)] + \sum_{i<j} \left[\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^{6}} + \frac{q_i q_j}{\varepsilon R_{ij}}\right] \quad (18)$$

Здесь l_0 и θ_0 – равновесные значения длин связей и валентных углов; K_l, K_θ, V_n – силовые константы; n – мультиплетность и γ – фазовый сдвиг торсионного угла; A, B, и ε – параметры несвязанных взаимодействий.

Силовые константы и равновесные значения параметров, описывающих связи, валентные и торсионные углы, содержащие атом железа, были получены по данным квантово-химических расчетов тиомочевинного ДНКЖ в газовой фазе. Расчеты выполнялись с использованием функционала B3LYP в базисе 6-31+G(d,p).

В качестве стартовой структуры для ММ моделирования индивидуального тиомочевинного ДНКЖ использовалась геометрия комплекса, полученная из квантово-химических расчетов. Атомные заряды рассчитывались в приближении RESP. Для МД исследования устойчивости связывания ДНКЖ с БСА использовались конфигурации белок-лигандного комплекса, полученные методом докинга. Здесь в качестве лиганда выступал тиомочевинный железо-нитрозильный комплекс. Для моделирования альбумина применялся набор параметров Aff14SB [183,190]. Для нейтрализации электрического заряда в систему добавлялись ионы Na^+. Использовалась модель периодической кубической решетки с сохранением минимального расстояния 10 Å между границей и растворенным веществом. Перед началом МД моделирования система минимизировалась в течение 100 шагов, затем следовали фазы нагрева до температуры 300 К в NVT-ансамбле и релаксации в NPT-условиях при давлении в 1 атм в течение 50 пс. После чего проводилась продуктивная фаза моделирования в изобарно-изотермическом ансамбле. Радиус отсечения несвязанных взаимодействий составлял 10 Å. Остальные параметры расчетов совпадали с установками для моделирования производных хитозана.

2.3 Метод молекулярного докинга

Молекулярный докинг (стыковка) является одним из основных методов моделирования взаимодействий низкомолекулярных соединений (лигандов) с белком-мишенью. К задачам, решаемым методом докинга, относится определение сайтов связывания лиганда на поверхности белка и структуры белок-лигандного комплекса, оценка свободных энергий связывания методами СП, отбор соединений-кандидатов при разработке новых лекарственных средств в процессе скрининга. По размерам моделируемой области белка-мишени докинг подразделяется на глобальный и локальный, а по способу описания структуры лиганда – на гибкий и жесткий [25,26]. При этом структура белка, как правило, остается жесткой, в отличие от методов ММ и МД. В случае если активный сайт не известен, используется метод глобального докинга, когда связывание моделируется со всей доступной поверхностью мишени. При скрининге потенциально активных молекул в активный центр фермента стыковка проводится в локальном участке связывания. Гибкость молекулы лиганда обычно учитывается за счет использования торсионных потенциалов.

Процедура докинга включает построение поверхности белка-мишени с использованием сольватационных радиусов атомов; построение доступного для взаимодействия с лигандом внутреннего пространства, получаемого как суперпозиция сфер ограниченного радиуса; расчет параметров силового поля в узлах 3-мерной прямоугольной сетки, охватывающей пространство вокруг белка [191,192]. Затем реализуется сопоставление тяжелых атомов и функциональных групп лиганда с центрами сфер, описывающих внутреннее пространство для связывания. В случае гибкого докинга параллельно учитываются вращения гибких фрагментов относительно неподвижной части молекулы («якоря»). В конце процедуры создается матрица преобразования координат атомов лиганда.

Молекулярный докинг тиомочевинного моноядерного ДНКЖ, а также железо-нитрозильного фрагмента $Fe(NO)_2$ с бычьим сывороточным альбумином

выполнялся в программе Dock 6 [193] (программа открытого доступа). Расчеты с использованием Dock 6 по сравнению с другими программами демонстрируют хорошие результаты стыковки и высокую скорость вычислений [194]. Поверхность белка и структура сайтов связывания были построены методом перекрывающихся сфер. При расчете энергии связывания учитывалась только энергия несвязанных взаимодействий (E_{nb}), включающая электростатический и ван-дер-ваальсов вклады:

$$E_{nb} = E_{vdW} + E_{es} = \sum_{lig}\sum_{prot}\left(\frac{A_{ij}}{R_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{R_{ij}^{6}} + \frac{q_i q_j}{\varepsilon R_{ij}}\right) \quad (19)$$

Здесь суммирование ведется по всем атомам лиганда (lig) и белка (prot). Энергия связывания определялась как разность между энергией белок-лигандного комплекса и суммарной энергии индивидуальных лиганда и протеина:

$$E_{bind} = E_{prot-lig} - \left(E_{prot} + E_{lig}\right) \quad (20)$$

Для расчетов использовались параметры силового поля Amber, интегрированные в программу Dock6. Конфигурация белок-лигандных комплексов определялась с помощью процедуры глобального жесткого докинга методом сетки. Значения энергии рассчитывались в узлах сетки с шагом 0,4 Å в прямоугольном ящике размером 105×82×93 Å вокруг центра белка. При расчетах связывания нитрозильного фрагмента с остатком Cys34 шаг сетки составлял 0,2 Å.

Структура БСА была взята из базы данных PDB (ID: 4f5s, chain A) [143]. Заряды на протонируемых аминокислотных остатках альбумина определялись методом титрования *in silico* в диапазоне pH от 1 до 14 с использованием программы Rosetta [195]. Параметры расчетов для лиганда совпадали с параметрами для проведения МД моделирования. Результаты докинга обрабатывались с использованием языка программирования python.

ГЛАВА 3. РАСЧЕТ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ПОТЕНЦИАЛОВ ЦИКЛИЧЕСКИХ НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ

Результаты, описанные в данной главе, опубликованы в работах [153,196][1].

3.1 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 (Рисунок 15). Нитроксилы **n1-n10** характеризуются широким интервалом потенциалов одноэлектронного окисления, для большинства из них определены потенциалы реакции восстановления при различных pH [59]. Радикал **n2** был впервые получен группой стабильных радикалов ИПХФ РАН [197].

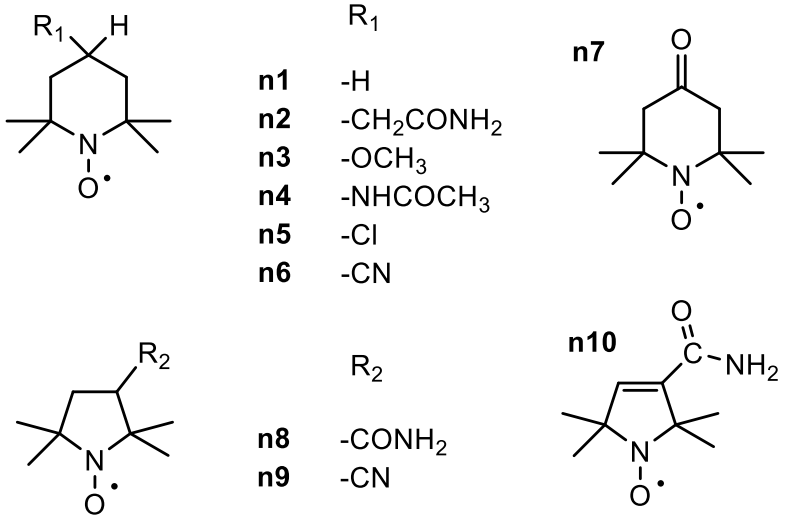


Рисунок 15 – Химическая структура исследуемых нитроксильных радикалов

[1] При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные резльтаты, положения и выводы исследования: 1) V. B. Krapivin, V. D. Sen, V. B. Luzhkov. Quantum chemical calculations of the one-electron oxidation potential of nitroxide spin labels in biologically active compounds // Chemical Physics. – 2019. – Т. 522. – С. 214-219; 2) V. B. Krapivin, A. S. Mendkovich, V. D. Sen, V. B. Luzhkov. Quantum chemical calculations of hydration electrostatics and electrochemical oxidation potential of cyclic nitroxide radicals // Mendeleev Communications. – 2019. – Т. 29, № 1. – С. 77-79. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Крапивина В. Б. составляет 40%.

Для корректной оценки термодинамических параметров химических реакций НР необходимо определить наиболее устойчивые конформации данных нитроксилов в водном растворе. Конформационная подвижность связана с возможностью перестройки структуры цикла и внутренними вращениями заместителей. Шестичленный цикл производных тетраметилпиперидин-N-оксила **n1** образует конформации конформаций *«кресло»* и *«твист»* (Рисунок 16). В случае «*кресла*» заместитель может находиться в аксиальном и экваториальном положении, а при возможности внутреннего вращения – в положении *транс* и *гош*. Для большинства шестичленных циклов конформация *«кресло»* оказывается наиболее устойчивой, однако нитроксил **n7** является исключением из-за наличия sp^2-гибридного атома углерода в четвертом положении.

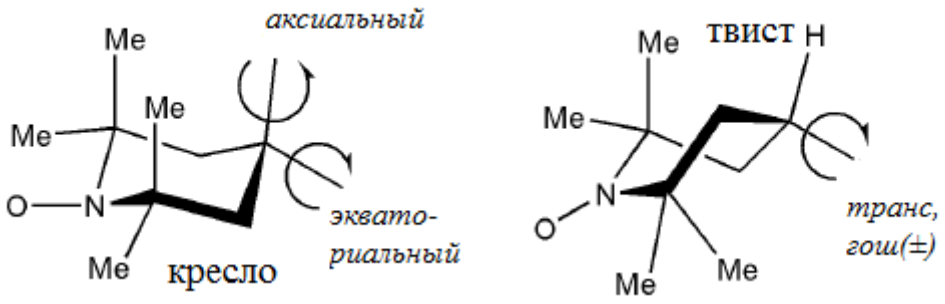


Рисунок 16 – Возможные структуры шестичленных НР

Насыщенный пятичленный цикл нитроксилов пирролидинового ряда принимает конформации *«твист»* или *«конверт».* При этом нитроксилы **n8** и **n9** оптически активны и существуют в виде R- и S- изомеров. В силу симметрии цикла (точечная группа C_2) энантиомер *твист*- (R) будет являться зеркальным отражением энантиомера *твист*+ (S), поэтому для удобства расчетов рассматривались только конформации *твист*+/*твист*- (Рисунок 17) для S-форм.

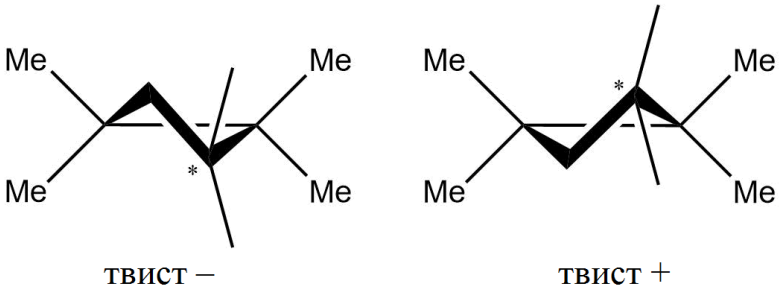


Рисунок 17 – Возможные конформации насыщенных пятичленных НР

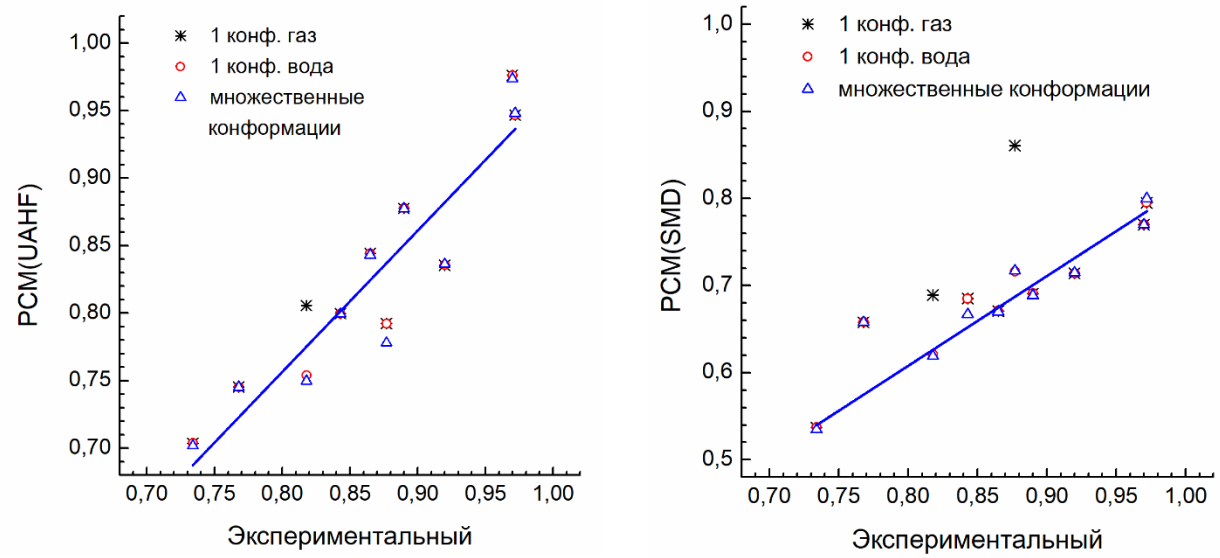
Для нитроксилов **n1-n10** был проведен полный конформационный анализ в газовой фазе. Для расчетов окислительно-восстановительных потенциалов использовались только энергетически выгодные конформации, отстоящие от наиболее выгодной не более чем на 5RT (12,4 кДж/моль при T = 298,15 K). Заселенность более высоколежащих состояний, исходя из распределения Больцмана, оценивается в 0,5 %. При данной оценке предполагается, что поверхность свободной энергии при комнатной температуре мало отличается от ППЭ, в то время как в действительности различия могут быть существенными, поэтому для нитроксилов **n5** и **n6** учитывались все найденные конформации.

3.2 Результаты расчетов электрохимических потенциалов реакции окисления нитроксильных радикалов

Реакция одноэлектронного окисления нитроксильных радикалов происходит с образованием оксоаммониевых катионов без промежуточных стадий и побочных процессов, не зависит от pH. Поэтому моделирование данного процесса хорошо подходит для сравнения различных теоретических методов. В работе были протестированы различные функционалы плотности и сольватационные модели, а также влияние растворителя на структуру рассматриваемых соединений. Так геометрия НР **n1-n10** была оптимизирована в газовой фазе методом B3LYP/6-31G(d), широко использующимся для расчетов различных органических молекул. Энергия гидратации рассчитывалась для полученных структур методом одноточечного расчета в модели поляризуемого континуума PCM и с использованием сольватационных моделей UAHF (HF/6-31G(d)) и SMD (B3LYP/6-31G(d)) для определения неполярного вклада.

На рисунке 18 представлены корреляции расчетных значений потенциалов E_{Ox} с экспериментальными (относительно СВЭ). При этом сравниваются результаты, полученные с использованием одной конформации НР, наиболее стабильной в газовой фазе и воде, а также с учетом всех устойчивых конформаций. Стоит отметить, что оптимизация геометрии в газовой фазе с

последующим пересчетом потенциальной энергии в растворе является распространенным методом определения термодинамических характеристик химических процессов. Однако полученные результаты показывают, что для гибких органических молекул, таких как нитроксил **n2**, данный подход приводит к значительной ошибке, которая, как показали наши исследования, связана с влиянием полярной среды (растворителя) на геометрию молекулы.



а *б*

Рисунок 18 – Сопоставление экспериментальных и рассчитанных в модели PCM(UAHF) (*а*) и PCM(SMD) (*б*) значений потенциалов E_{Ox} (В) нитроксилов **n1-n10**

В таблице 1 приведены экспериментальные и расчетные значения E_{Ox} для нитроксилов **n1-n10**, а также параметры линейной аппроксимации. Как видно по полученным данным, модель объединенных атомов UAHF дает более близкие к абсолютным значения потенциалов, однако корреляция характеризуется также большим разбросом данных. Усреднение свободных энергий по множественным конформациям не приводит к улучшению корреляции. Кроме того, к недостаткам модели UAHF относится необходимость вручную рассчитывать и задавать значения сольватационных радиусов атомов и групп, что усложняет вычисления. Модель SMD определяет сольватационные радиусы автоматически на основе электронной плотности и дает меньший разброс значений E_{Ox}. Сильное смещение

вниз относительно идеальной пунктирной прямой может быть связано с систематической ошибкой при использовании абсолютного значения потенциала СВЭ.

Таблица 1. Экспериментальные и расчетные значения потенциалов окисления нитроксилов **n1-n10** и параметры линейной аппроксимации y = a·x + b из расчетов B3LYP/6-31G(d)

Нитро-ксил	E_{Ox}(эксп), мВ	E_{Ox}(SMD), мВ			E_{Ox}(UAHF), мВ		
		1 конф. газ	1 конф. вода	множествен-ные конф.	1 конф. газ	1 конф. вода	множествен-ные конф.
n1	734	537	537	535	704	704	702
n2	784	658	658	658	745	745	745
n3	818	689	621	619	806	754	750
n4	843	685	685	667	800	800	800
n5	865	671	671	670	844	844	843
n6	890	691	691	689	878	878	877
n7	920	714	714	715	836	836	836
n8	877	861	716	717	792	792	778
n9	970	770	770	770	976	976	974
n10	972	795	795	800	947	947	948
*a	-	0,911	0,998	1,032	0,998	1,043	1,046
*b, мВ	-	-86	-186	-218	-31	-75	-80
*R^2	-	0,4978	0,9387	0,9534	0,8557	0,8637	0,8453

*Параметры рассчитаны без учета нитроксила **n2** для модели PCM(SMD)

Одним из результатов работы является вывод о преобладании электростатической составляющей в изменении свободной энергии сольватации при переходе от радикала $X^{\bullet}$ к оксоаммониевому катиону X^{+} (Таблица 2). Разность неполярных вкладов составляет менее 1 % от общего значения $\Delta\Delta G_s = \Delta G_s(X^{+}) - \Delta G_s(X^{\bullet})$, поэтому корреляции, представленные на рисунке 18 (*б*), воспроизводятся с высокой точностью при учете только электростатических взаимодействий с растворителем. Данный эффект связан с тем, что в процессе переноса электрона химическая структура нитроксила изменяется незначительно, в то время как существенно изменяется распределение электронной плотности [196].

Таблица 2. Разность свободных энергий сольватации и ее неполярный вклад (кДж/моль) для нитроксилов **n1-n10**. Расчеты проводились в B3LYP/6-31G(d) и модели PCM(SMD)

нитроксил	$\Delta\Delta G_s$	$\Delta\Delta G_{np}$
n1	-192,35	0,75
n2	-172,15	1,17
n3	-189,33	1,21
n4	-189,55	-0,71
n5	-205,50	-0,96
n6	-218,09	1,13
n7	-197,23	0,63
n8	-181,77	0,96
n9	-218,86	0,63
n10	-186,41	0,88

Сравнение большого количества функционалов и базисов при расчетах свободной энергии сольватации в модели PCM(SMD) показало, что наилучшую корреляцию с экспериментальными данными дает метод M052X/6-311+G(2df,2p) [196]. Однако даже в этом случае для нитроксила **n2** наблюдается существенное завышение потенциала E_{Ox}, которое может быть связано с сильным влиянием растворителя на равновесную структуру соединения. Чтобы подтвердить данное предположение, были проведены более точные расчеты потенциала одноэлектронного окисления.

Дальнейшие расчеты проводились с использованием более нового функционала M062X, учитывающего вклады дисперсионных взаимодействий, в базисе 6-31+G(d,p), содержащем диффузную функцию. Оптимизация геометрии исходных НР и соответствующих оксоаммониевых катионов и расчет гармонических частот проводились в газовой и водной фазе в модели PCM(SMD). В данных расчетах учитывались множественные конформации реагирующих частиц. Свободная энергия сольватации дополнительно вычислялась в функционале PBE0, который также продемонстрировал хорошие результаты в предшествующих расчетах [196]. На рисунке 19 приведены корреляции расчетных значений потенциала E_{Ox} для нитроксилов **n1-n10**.

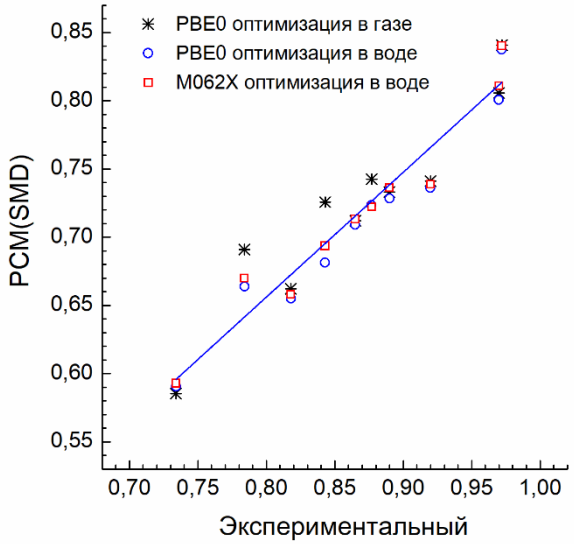


Рисунок 19 – Сопоставление экспериментальных и рассчитанных в модели PCM(SMD) значений потенциалов E_{Ox} (В) нитроксилов **n1-n10**

По графику видно, что оптимизация в водной фазе приводит к существенно лучшему соответствию с экспериментальными данными. Наиболее ярко влияние растворителя выражено для соединений **n2, n4** и **n8**, имеющих гибкие заместители. Вычисленные значения потенциалов приведены в таблице 3.

Таблица 3. Экспериментальные и расчетные значения потенциалов окисления нитроксилов **n1-n10** и параметры линейной аппроксимации $y = a \cdot x + b$ из расчетов M062X/6-31+G(d,p)

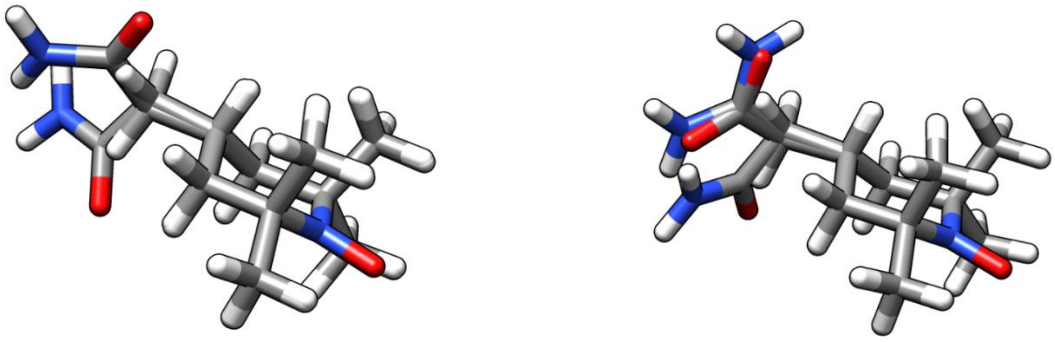
Нитроксил	E_{Ox}(эксп), мВ	E_{Ox}(SMD), мВ		
		PBE0	PBE0	M062X
		оптимизация в газе	оптимизация в воде	
n1	734	585	590	593
n2	784	691	664	670
n3	818	662	655	658
n4	843	726	681	694
n5	865	712	709	713
n6	890	733	728	736
n7	920	741	736	739
n8	877	743	723	722
n9	970	806	801	811
n10	972	841	837	840
a	-	0,877	0,908	0,915
b, мВ	-	-36,9	-75,2	-75,7
R^2	-	0,8802	0,9387	0,9392

Оптимизация геометрии в водной среде приводит к уменьшению свободной энергии сольватации ΔG_S и понижению вычисленного значения электрохимического потенциала [153]. В случае **n2** расчеты в модели ТЦ приводят к завышению потенциала E_{Ox} на ~25 мВ по сравнению с методом оптимизации в растворе (см. таблицу 3). Данный результат связан с существенным влиянием растворителя на геометрию окисленной и восстановленной форм нитроксила **n2**, которое не учитывается в методе ТЦ, что вносит погрешность в расчеты свободных энергий.

Изменение порядка стабильности конформеров наиболее выражено в случае 4-метокси-ТЕМРО (нитроксил **n3**). Для радикала наибольшей устойчивостью как в газовой фазе, так и в воде обладает конформация *кресло* с экваториальным положением заместителя в *гош*-ориентации, в то время как для катиона минимуму свободной энергии в газовой фазе отвечает аксиальный *гош*-конформер (Таблица 4). Стабилизация аксиальной конформации подтверждается данными ЯМР-спектроскопии для катиона **n3** в ацетонитриле – растворителе средней полярности [59]. При этом экваториальное положение заместителя в катионе оказывается даже выше по энергии, чем *твист*-конформеры. В связи с этим расчеты в одноконформационном приближении могут приводить к большим ошибкам при определении термодинамических параметров реакции.

Таблица 4. Заселенности различных конформаций радикала и катиона **n3** по данным расчетов в M062X/6-31+G(d,p) при температуре 298,15 К

Конформация	заселенность, %			
	радикал		катион	
	газ	вода	газ	вода
кресло акс. гош	12,37	2,00	70,82	5,28
кресло экв. гош	82,11	93,30	1,98	67,76
кресло экв. транс	0,31	0,56	0,00	0,40
твист гош-	2,59	1,94	13,06	13,47
твист гош+	2,61	2,20	14,14	13,09



а *б*

Рисунок 20 – Наиболее энергетически выгодные конформации радикала **n2** по результатам оптимизации в газовой фазе (а) и воде (б) по данным M062X/6-31+G(d,p) [153]

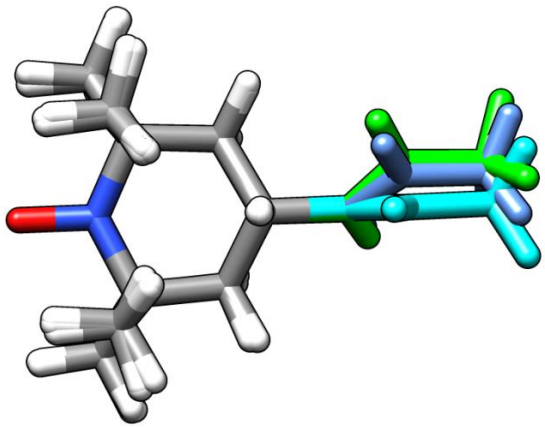


Рисунок 21 – Наложение экспериментальной структуры радикала **n5** (голубой) и полученных из оптимизации в газовой фазе (циан) и воде (зеленый) по данным M062X/6-31+G(d,p)

При использовании модели ТЦ свободная энергия сольватации может вычисляться с использованием оптимизации геометрии в воде, при этом расчет частот и термодинамического вклада может выполняться в газовой фазе. В этом случае различие в наборе стабильных конформаций в газовой и водной фазах может вносить систематическую ошибку в расчет свободных энергий по уравнению (5), поскольку невозможно однозначно установить связь между конформациями в газе и воде. Погрешность, вызванная данным эффектом, наблюдающимся для нитроксила **n2**, оценивается в несколько мВ [153].

Поскольку для некоторых шестичленных нитроксилов наблюдается стабилизация конформации *твист*, представляет интерес определить барьеры конверсии цикла. Данный процесс также может наблюдаться в насыщенных пятичленных циклах при переходе *твист*+ ↔ *твист*-. Для оценки скоростей конформационных переходов были определены структуры и свободные энергии переходных конформаций типа *полутвист* для НР **n7** и с *плоским* строением цикла для НР **n8**.

3.3 Изучение кинетики конформационных переходов в циклических нитроксильных радикалах

Оптимизация геометрии, расчет гармонических частот и свободных энергий сольватации для устойчивых конформаций и переходных состояний нитроксильных радикалов и оксоаммониевых катионов проводились в газовой фазе с использованием функционала B3LYP в базисе 6-31G(d). Электронные энергии дополнительно пересчитывались в расширенном базисе aug-cc-pVTZ. Расчеты показали, что барьеры свободных энергий перехода *кресло* ↔ *твист* (Рисунок 22) для нитроксила **n7** составляют 15-17 кДж/моль (Таблица 5).

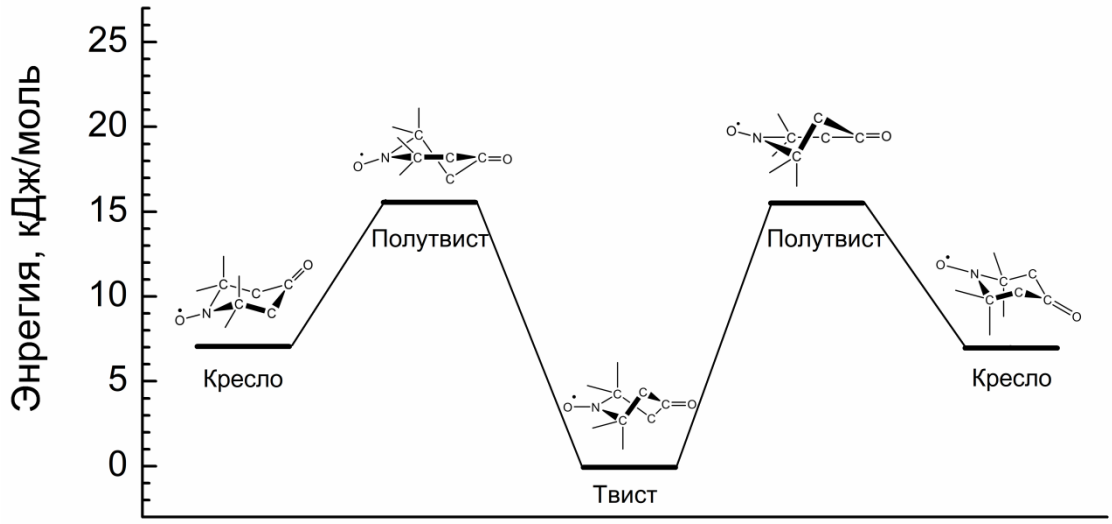


Рисунок 22 – Энергетическая диаграмма конформационных переходов для радикала **n7** для водной фазы

Среднее время конформационного перехода τ может быть рассчитано по формуле

$$\frac{1}{\tau} = \frac{kT}{h} e^{-\frac{G_{TS}}{RT}}, \quad (21)$$

где k = 1,381·10^{-23} Дж/К – постоянная Больцмана, h = 6,626·10^{-34} Дж·с – постоянная Планка, R = 8,314 Дж/(моль·К), Т – температура, К. При температуре 298 К время перехода *кресло* ↔ *твист* оказывается равным ~ 10^{-12} с, что значительно меньше характерного времени конверсии циклогексана (10^{-5} с).

Таблица 5. Относительные свободные энергии (кДж/моль) конформаций нитроксила **n7** при температуре 298 К

конформация	Радикал		Катион	
	газ	вода	газ	вода
кресло	5,11	7,07	8,98	13,04
полутвист	14,36	15,54	16,31	17,65
твист	0,00	0,00	0,00	0,00

Конформационные переходы *твист*+↔*твист*- и повороты амидной группы (Рисунок 23) в нитроксиле **n8** также характеризуются низкими энергетическими барьерами.

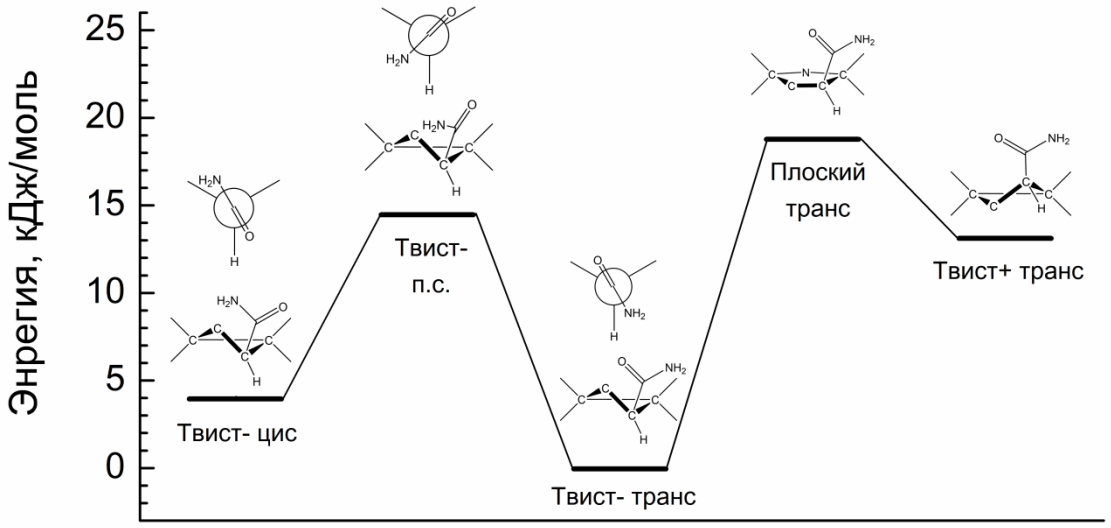


Рисунок 23 – Энергетическая диаграмма конформационных переходов для радикала **n7** для водной фазы

Барьеры конверсии пятичленного цикла в воде составляют 19 кДж/моль, а барьер поворота амидной группы равен 10 и 5 кДж/моль для радикала и катиона соответственно (Таблица 6).

Таблица 6. Относительные свободные энергии (кДж/моль) конформаций нитроксила **n8** при температуре 298 К

конформация	Радикал		Катион	
	газ	вода	газ	вода
твист- цис	5,3	4,0	5,4	5,2
твист- п.с.	14,4	14,5	10,1	10,6
твист- транс	0,0	0,0	0,0	0,0
плоский транс	18,1	18,8	15,9	18,6
твист+ транс	13,1	13,2	-3,1	14,0

Расчеты показывают, что рассматриваемые молекулы достаточно подвижны, поэтому все устойчивые конформации будут вносить вклад в термодинамические параметры системы.

3.4 Расчеты электрохимических потенциалов реакции окисления нитроксильных производных фуллерена C_{60}

Следующим шагом был расчет редокс-потенциала окисления нитроксильного радикала ТЕМПО, присоединенного к фуллерену C_{60}. Функциональные производные фуллеренов привлекают большой интерес исследователей благодаря необычным физико-химическим свойствам. В частности, фуллерены показали эффективность в процессах ингибирования протеазы ВИЧ-1 и расщепления ДНК за счет фотосенсибилизирующего эффекта в окислительных условиях [198]. Нитроксил ТЕМПО является подходящим кандидатом для получения спин-меченых производных фуллеренов, поскольку для его аддуктов >N–O˙ группа, содержащая неспаренный электрон, оказывается стерически изолирована от каркаса фуллерена и слабо влияет на его структуру и электронное строение.

Прямое ковалентное присоединение цикла нитроксила к C_{60} может быть осуществлено по реакции взаимодействия диазо-алканов с фуллереном [199]. При

этом могут образовываться 5,6- и 6,6-изомеры аддукта C_{60}-TEMPO, а промежуточным продуктом будет 4-диазо-TEMPO **n13** [200] (Рисунок 24).

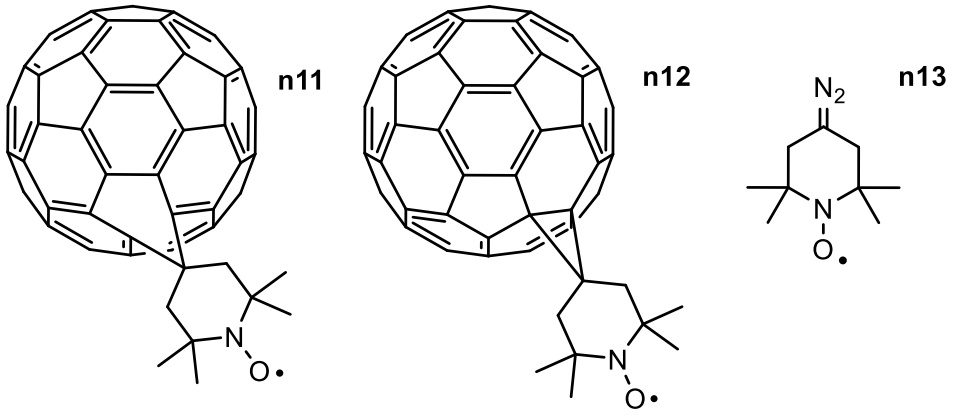


Рисунок 24 – Структурные формулы изомеров C_{60}-TEMPO и 4-диазо-TEMPO

Поскольку структура C_{60}-TEMPO достаточно жесткая, оптимизация геометрии соединений **n11-n13** проводилась в газовой фазе методом M062X/ 6-31+G(d,p) с последуюшим пересчетом электронной энергии в базисе 6-311+G(2df,2p). Термический вклад определялся методом M062X/6-31G(d), а свободная энергия сольватации рассчитывалась в PBE0/6-31+G(d,p). Рассматривались конформации *кресло* и *твист* цикла нитроксила. Результаты расчетов опубликованы в работе [153] и приведены в таблице 7.

Таблица 7. Относительные энергии (кДж/моль) и электрохимические потенциалы (мВ) производных **n11-n13**.

Нитроксил	Конформация	E_{el}	G^0_{gas}	ΔG_S		E_{Ox}	
		радикал		радикал	катион	расчет	*эксп.
n11	*кресло*	55,71	55,94	-53,13	-231,00	693	819
	твист	61,54	55,75	-53,96	-232,46		
n12	*кресло*	0,00	0,00	-54,39	-234,98	736	
	твист	11,79	6,03	-53,98	-236,41		
n13	*кресло*	-	-	-31,51	-224,91	677	759
	твист	-	-	-31,65	-228,55		

*Экспериментальные значения потенциала окисления по данным [175].

Данные таблицы 7 показывают, что 6,6-изомер оказывается на ~ 55 кДж/моль стабильнее, чем 5,6-аддукт. При этом для производного **n12** наблюдается заметная стабилизация конформации *кресло*, тогда как для **n11**

свободные энергии конформеров *кресло* и *твист* практически совпадают. Влияние растворителя не изменяет порядок стабильности изомеров и конформеров. Как сообщается в работе [200], 5,6-изомер является продуктом кинетического контроля, в то время как термодинамически более выгодно образование 6,6-изомера, что полностью подтверждается результатами расчетов. Стоит отметить, что кристаллическая структура производного C_{60} с двумя нитроксильными группами подтверждает образование 6,6-изомера [201].

По данным расчетов свободная энергия гидратации фуллерен-нитроксилов составляет ~ -54 кДж/моль, в то время как для незамещенного ТЕМПО значение ΔG_s, рассчитанное на том же уровне теории, составляет ~ -20 кДж/моль. Понижение энергии сольватации при присоединении нитроксила к сильно гидрофобной молекуле C_{60} связано с некорректной параметризацией фуллерена в модели PCM(SMD), дающей отрицательное значение ΔG_s для незамещенного фуллерена [202]. Тем не менее, при расчете E_{Ox} данная систематическая ошибка, вероятно, компенсируется при расчете разности свободных энергий катиона и радикала.

Вычисленные значения потенциалов E_{Ox} для изомеров **n11** и **n12** оказываются на 16 и 59 мВ выше, чем потенциал диазо-ТЕМПО. Экспериментально измеренное значение E_{Ox} фуллерен-нитроксила в *о*-дихлорбензоле на 60 мВ выше, чем у нитроксила **n13**. Данный результат противоречит предположению о получении 6,5-аддукта в работе [200]. Сравнение с незамещенным нитроксилом **n1** показало, что для изомера **n12** потенциал E_{Ox} на 150 мВ выше и является самым высоким в ряду шестичленных НР. Данный результат может быть связан с сильным электроноакцепторным эффектом фуллерена.

3.5 Расчеты электрохимических потенциалов реакции восстановления нитроксильных радикалов

Хотя наилучшую корреляцию с экспериментальными данными по потенциалам реакции окисления показал метод оптимизации геометрии в воде

(см. Рисунок 19), 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 (см. гл. 4) с рядом индивидуальных нитроксилов, расчеты E_{Red} были проведены в модели термодинамического цикла. Оптимизация геометрии и расчет термохимического вклада ΔG^0_{298} в газовой фазе были выполнены с использованием функционала B3LYP в базисе 6-31+G(d,p), а расчет электронной энергии и свободной энергии сольватации был проведен в M052X/6-311+G(2df,2p).

Расчеты проведены для нитроксилов **n1**, **n2**, **n4-n7**, **n10**. Для большинства данных НР известна зависимость редокс-потенциала восстановления от pH [59]. Были определены потенциалы E^0_{Red} реакции (12) и полные потенциалы E_{Red} согласно уравнению (16) при pH = 7. Результаты расчетов представлены в таблице 8 и на рисунке 25.

Таблица 8. Экспериментальные и расчетные значения электрохимических потенциалов восстановления нитроксильных радикалов в воде и параметры линейной аппроксимации y = a·x + b

Нитроксил	E_{Red}(эксп), мВ	E^0_{Red}(SMD), мВ
n1	203	-1369
n2	189	-1432
n4	205	-1328
n5	230	-1281
n6	218	-1267
n7	234	-1223
n10	-	-1339
a	-	4,161
b, мВ	-	-2204
R^2	-	0,8714

По полученным данным видно, что экспериментальные значения потенциала E_{Red}(эксп) линейно коррелируют с расчетными значениями потенциала восстановления нитроксильного радикала до соответствующего

аниона E^0_{Red}(SMD) (Рисунок 25). Учет протонирования и определение потенциала E_{Red} приводит к появлению существенной погрешности, ухудшающей корреляцию с экспериментальными данными.

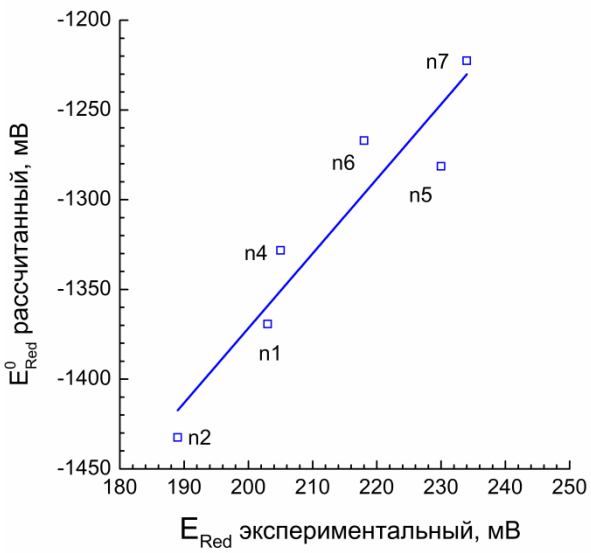


Рисунок 25 – Сопоставление экспериментальных и рассчитанных значений электрохимических потенциалов восстановления нитроксилов

Таким образом, проведенные расчеты электрохимических реакций ряда нитроксильных радикалов показывают, что модель PCM(SMD) в сочетании с различными функционалами плотности позволяет воспроизводить относительные энергии одноэлектронного переноса в водном растворе. Для относительно жестких молекул достаточно точно работает модель ТЦ, когда оптимизация геометрии проводится в газовой фазе, в то время как для более гибких нитроксилов растворитель сильно влияет на равновесную структуру соединений. Рассмотрение нескольких наиболее устойчивых конформаций позволяет улучшить корреляцию расчетных данных с экспериментальными, однако одноконформационное приближение в большинстве случаев дает близкие результаты. Особенностью нитроксилов является возможность изменения порядка устойчивости конформеров при переходе от нейтральной формы к заряженной, что необходимо учитывать при расчетах электрохимических потенциалов.

На основании выполненных расчетов может быть оценена окислительно-восстановительная активность нитроксильных производных хитозана. В работе [153] представлены данные расчетов потенциалов E_{Ox} для НР, присоединенных к аминогруппе одного звена глюкозамина. Результаты показали, что для производного нитроксила **n2** потенциал окисления возрастает на 30-40 мВ, а для производного **n10** - убывает на ~ 50 мВ. Однако в данном случае не учитывалось влияние соседних звеньев хитозана и возможность протонирования свободных аминогрупп. Для оценки данных эффектов были проведены расчеты окислительно-восстановительных потенциалов тримеров хитозана с нитроксильным радикалом, присоединенным к аминогруппе центрального звена (см. п. 4.4). Однако сначала была изучена структура самого хитозана методами квантовой химии и молекулярной механики.

ГЛАВА 4. МОЛЕКУЛЯРНО-МЕХАНИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ НИТРОКСИЛЬНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ХИТОЗАНА

Результаты, описанные в данной главе, опубликованы в работе [203][1].

4.1 Конформационный анализ димеров хитозана

Конформация основной цепи полисахарида определяется двумя двугранными углами φ(O_5-C_1-O_1-C_4') и ψ(C_1-O_1-C_4'-C_3') гликозидной связи (Рисунок 26). Также в каждом звене существует характеристический угол χ(O_5-C_5-C_6-O_6), определяющий ориентацию атома O_6, который зависит от кристаллической упаковки и может принимать три значения: χ = -60° (*гош-гош*), χ = +60° (*гош-транс*) и χ = 180° (*транс-гош*) [204]. При расчетах в качестве стартовой использовалась *гош-транс* конформация, которая наблюдается в кристаллической структуре гидратированного хитозана [87]. Как и для многих полисахаридов, в линейной структуре хитозана присутствует внутримолекулярная водородная связь O_3'−H···O_5, в которой водород при атоме O_3' ориентирован в сторону O_1.

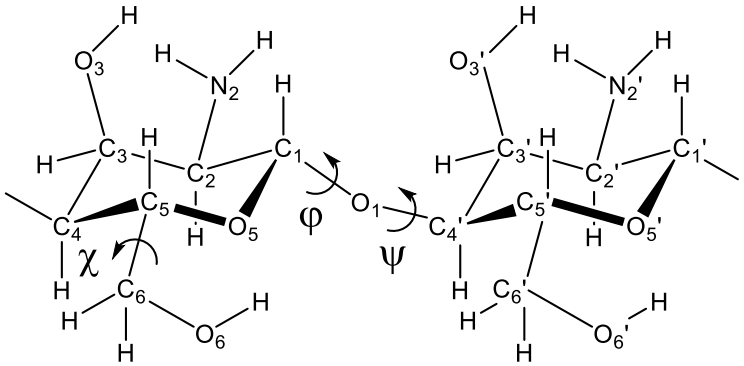
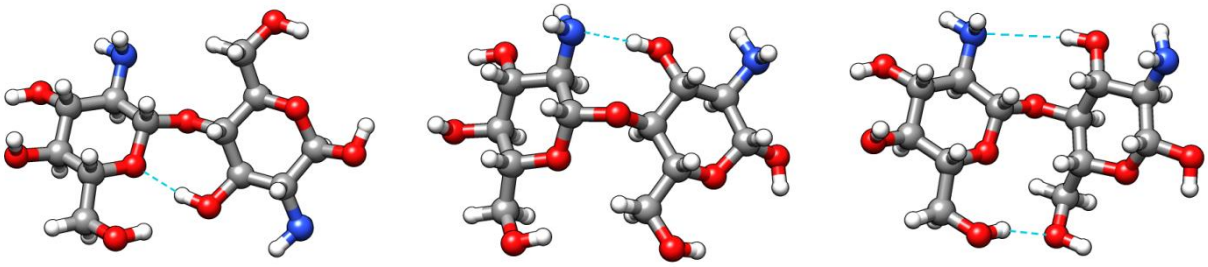


Рисунок 26 – Химическая структура димера хитозана

[1] При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные резльтаты, положения и выводы исследования: 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. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Крапивина В. Б. составляет 70%.

Экспериментально обнаружено 5 типов полиморфных модификаций хитозана, наиболее распространенными из которых являются типы I и II, в которых цепь полисахарида образована двумя повторяющимися звеньями. В этом случае значения углов φ и ψ составляет -92,1° и 94,1° соответственно [87]. Все типы обнаруженных структур отвечают линейной геометрии основной цепи, в то время как в растворе макромолекула существует в форме стохастического клубка. 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.

С использованием программы AmberTools было сгенерировано 9 стартовых конформаций, обусловленных тремя возможными значениями углов φ и ψ с шагом 120° (60°, 180°, -60°). Значение угла χ во всех случаях принималось равным +60°. Оптимизация геометрии выполнялась методом силового поля в газовой фазе и воде. В результате минимизации найдены 7 конформаций, отвечающих локальным минимумам ППЭ. Наиболее устойчивыми из данных конформаций оказались 3 (Рисунок 27). Для всех оптимизированных структур угол χ сохранил *гош-транс* конформацию с равновесными значениями от 60° до 87°.



Конформация *1* Конформация *2* Конформация *3*

Рисунок 27 – Низшие по энергии конформации 1–3 димера хитозана [203]

Конформация *1* близка кристаллической структуре хитозана. 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. Относительная стабильность конформеров G_2 зависит от полярности среды. В газовой фазе расчеты предсказывают стабилизацию двух

изогнутых структур *2* и *3*, в то время как в водной среде наиболее стабильной в большинстве случаев становится линейная структура *1* (Таблица 9). Остальные четыре конформации обладают более высокой энергией в водном растворе.

Таблица 9. Углы вращения φ, ψ (°) и относительные свободные энергии (кДж/моль) равновесных конформаций димера G_2 из расчетов в газе и воде

№	ММ [b]				ТФП [c]			
	φ ψ	ΔG_{gas}	φ ψ	ΔG_{wat}	φ ψ	ΔG_{gas} ΔG_{wat}(gas-opt)	φ ψ	ΔG_{wat}
1 [a]	–78,3 103,1	0,0	–73,2 108,4	0,0	–79,6 109,2	0,0 0,0	–74,7 113,6	0,0
2	59,6 117,5	–1,0	59,3 119,4	11,6	58,4 117,0	–1,0 2,0	62,1 119,0	–0,8
3	–82,1 –69,7	–7,3	–79,2 –71,2	6,2	–95,3 –66,5	0,9 7,4	–111,5 –62,0	3,5
4	–149,0 98,1	9,5	–147,4 92,5	21,8	–91,3 88,6	–5,2 9,1	–92,1 85,6	8,5
5	–163,4 –99,3	31,2	–160,2 –100,4	41,3	–	–	–	–
6	37,5 60,5	46,3	23,8 76,0	42,8	39,9 86,2	35,4 30,8	42,9 120,8	14,8
7	73,9 –41,0	26,9	70,8 –41,1	32,0	74,1 –39,8	33,5 34,2	68,7 –37,6	26,3
8	–	–	–	–	–	–	97,6 150,6	22,5

[a] φ = –92,1°, ψ = 94,1° в кристаллической структуре хитозана [87]; [b] расчеты в газе (Glycam-06) и водной среде (Glycam-06/GBSA); [c] расчеты в газе (B3LYP/6–31+G(d,p)) и в воде (PCM(SMD)/B3LYP/6–31+G(d,p)).

Измерение межатомных расстояний показывает, что в конформации *1* существует внутримолекулярная водородная связь O_3'−H···O_5, в конформациях *2* и *3* возможно образование двух H–связей: O_3'–H···N_2/O_3'···H–N_2 и O_6'–H···O_6/ O_6'···H–O_6. Существование трех подобных структур с низкими энергиями было также показано ранее из ММ и МД расчетов на основе СП MM3, CVFF, GROMOS для углеводов, Amber общего типа [90-94,205]. Анализ результатов расчетов из СП AmberGlycam-06 показал, что стабилизация линейной структуры *1* в воде относительно других конформаций определяется в первую очередь вкладами электростатических взаимодействий, а также энергий связей и валентных углов. В

то время как вклады торсионных углов и ван-дер-Ваальсовых взаимодействий могут иметь более низкие значения для других конформеров (Таблица 10).

Все 9 стартовых структур были также оптимизированы с использованием функционала B3LYP в базисе 6-31+G(d,p) в газовой фазе и водном растворе. Квантово-химический расчет дал близкие результаты для геометрии, за исключением конформации *5*, которая перестала отвечать энергетическому минимуму и совпала с конформацией *3*. Кроме того, при оптимизации в воде найден новый энергетический минимум: конформация *8*, близкая по структуре к конформации *2* (Таблица 9).

Таблица 10. Потенциальная энергия (кДж/моль) конформаций димера хитозана, определенная методом силового поля

Конформация	E_{tot}	E_{bond}	E_{ang}	E_{tors}	E_{es}	E_{vdw}
газ						
1	1031,9	22,9	33,5	26,2	933,5	15,8
2	1030,9	23,2	37,3	30,2	924,6	15,6
3	1024,6	23,3	40,4	26,2	920,8	13,9
4	1041,3	23,2	36,2	31,3	937,6	13,1
5	1063,1	24,5	56,0	30,2	938,1	14,2
6	1078,2	25,3	48,2	35,3	954,4	15,1
7	1058,8	24,9	56,4	23,9	941,3	12,3
вода						
1	862,3	32,0	36,6	24,3	760,7	8,6
2	873,9	32,9	41,2	28,9	762,2	8,7
3	868,5	33,4	43,4	21,6	763,1	7,0
4	884,1	33,5	38,2	31,8	774,5	6,1
5	903,6	34,2	60,0	28,6	773,8	7,0
6	905,1	34,4	46,7	39,5	775,1	9,4
7	894,3	34,3	60,3	22,9	771,9	4,9

Изменился порядок устойчивости конформеров: силовое поле предсказывает бóльшую устойчивость конформации *3* по сравнению с конформацией *2*, в то время как метод функционала плотности дал противоположный результат. Кроме того, конформация *4* оказалась значительно более устойчивой, чем предсказывает метод силового поля, и ее геометрия существенно ближе к конформации *1*. Тем не менее, оба метода предсказывают, что линейная конформация *1* отвечает глобальному минимуму. Полученные из ТФП расчетов данные указывают на существенное влияние оптимизации

геометрии в воде на относительные энергии димеров хитозана. При рассмотрении свободных энергий в воде, переход от равновесных геометрий в газе ΔG_{wat}(gas-opt) к геометриямв воде ΔG_{wat} приводит к стабилизации изогнутых конформаций и оставляет структуру *2* наиболее устойчивой в ряду *1–8* (Таблица 9). Важность использования равновесных геометрий в растворе была также отмечена ранее в конформационном анализе методом ТФП нитроксильных радикалов и оксоаммониевых катионов [153,206].

Также были рассчитаны барьеры конформационных переходов *1*↔*2* и *1*↔*3* для димера хитозана. Седловые точки находились с использованием алгоритма QST2 в водном растворе. По данным расчетов свободные энергии переходных состояний G_{TS} составляют 27,7 кДж·моль$^{-1}$ для перехода *1*↔*2* и 26,1 кДж·моль$^{-1}$ для перехода *1*↔*3*. Среднее время конформационного перехода τ для основной цепи хитозана, рассчитанное по формуле (21), составляет ~ 10^1 нс при температуре 300 К, что сопоставимо с результатами МД моделирования (см. ниже) и обеспечивает достаточно высокую кинетическую гибкость.

Далее устойчивость конформаций *1-7* была изучена методами молекулярной динамики. Карта распределения конформаций димера хитозана по углам, полученная из начальных коротких траекторий МД длиной 100 пс, представлена на рисунке 28 [203]. В качестве стартовых использовались геометрии, полученные после минимизации методом силового поля в модели GBSA. Результаты моделирования позволяют предположить, что гибкость хитозана в водном растворе определяется существованием наименее энергозатратных конформационных переходов *1*↔*2* и *1*↔*3*.

Для изучения гибкости основной цепи хитозана были выполнены МД расчеты конформаций *1-3* для более длительных траекторий 5 нс. Исследовались молекулы как с непротонированными, так и с протонированными аминогруппами. Анализ траекторий показал, что за это время изогнутые конформации *2* и *3* как для G_2, так и для $(HG)_2$ переходят в линейную конформацию *1*, которая остается устойчивой в течение всего времени моделирования (Рисунок 29).

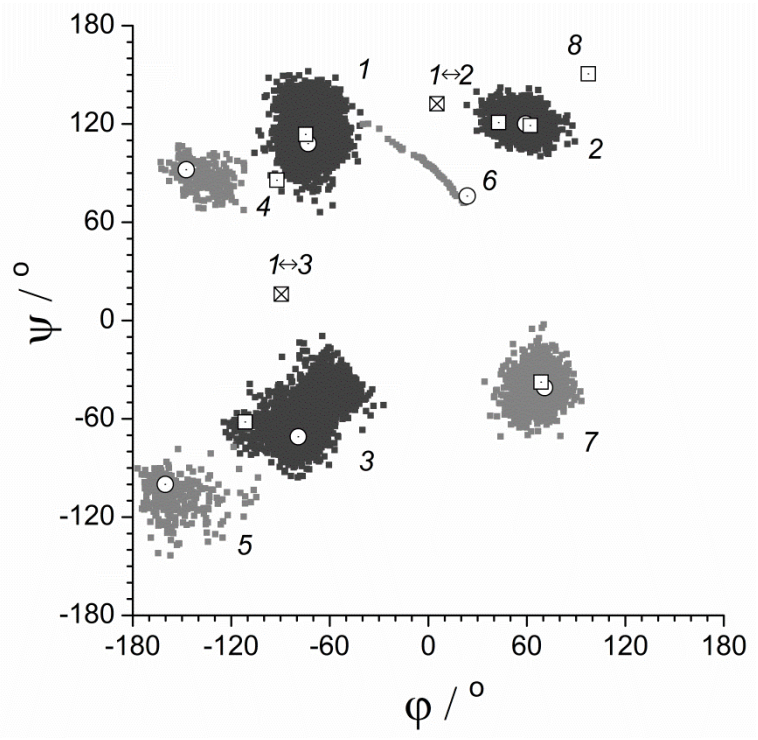
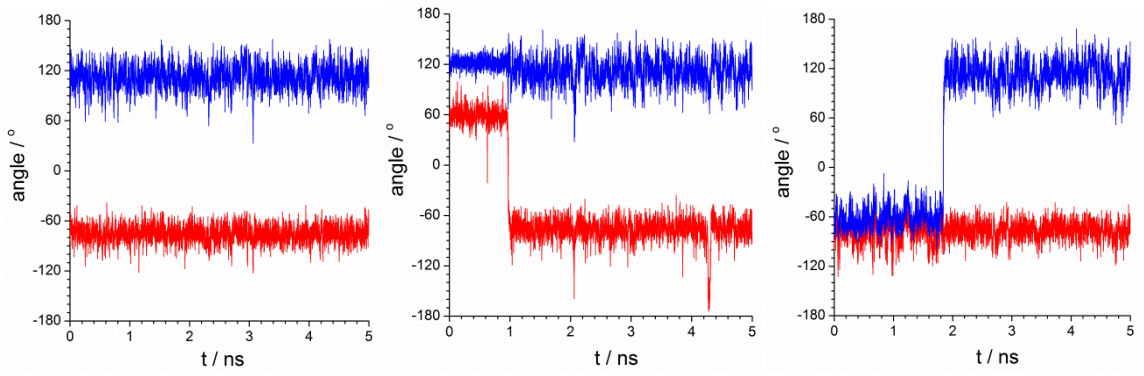


Рисунок 28 – Карта распределения конформаций нейтрального димера хитозана по углам φ и ψ. Отдельно обозначены положения минимумов, найденные методом силового поля в модели GBSA (⊙) и в теории функционала плотности в водном растворе (□), а также координаты переходных состояний (⊠) [203]



(*а*) (*б*) (*в*)

Рисунок 29 – Изменения углов φ (——) и ψ (——) для димера G_2 из 5 нс траекторий МД со стартовыми конформациями 1 (*а*), 2 (*б*) и 3 (*в*).

В случае протонированного димера, положительно заряженные аминогруппы находятся по разные стороны цепи для линейной конформации *1*. Напротив, в конформациях *2* и *3* группы $–NH_3^+$ располагаются на одной стороне

цепи (Рисунок 27) и на меньшем расстоянии между собой по сравнению с *1*. Электростатическое отталкивание между группами $–NH_3^+$ в последних случаях дополнительно уменьшает устойчивость изогнутых структур $(HG)_2$ по сравнению с нейтральным состоянием.

Существенное влияние на конформации хитозана оказывают как его внутримолекулярные Н-связи, так и межмолекулярные Н-связи с окружающими молекулами воды [90,93]. Поэтому по полученным траекториям было оценено наличие внутримолекулярных водородных связей между полярными группами звеньев непротонированного димера хитозана. Критериями сильной Н-связи D–H···A являлись расстояние между водородом и атомом акцептора $d(H\cdots A) \leq 2{,}1$ Å и угол $\theta(D–H\cdots A) > 120^o$; для слабой водородной связи $d(H\cdots A) \leq 3.1$ Å и угол $\theta(D–H\cdots A) > 120^o$. Расчеты показали, что стабилизация линейной конформации в растворе сопряжена с наличием внутримолекулярной водородной связи $O_3'–H\cdots O_5$. Данная связь образована атомами, расположенными в центральной части полисахаридной цепи и экранированными от воздействия молекул растворителя. В ходе моделирования конформации *1* молекулы G_2 в течение 5 нс сильная Н-связь наблюдалась в структуре на 52 % траектории, а слабая Н-связь – на 20 % траектории. Для данной структуры было установлено участие молекулы воды в образовании мостика из водородных связей между группами $O_3'–H$ и $O_6–H$ [90]. Проведенный анализ распределения молекул H_2O вокруг гидроксильной группы $O_3'–H$ также показал устойчивое нахождение вокруг атома O_3 от одной до четырех молекул воды в радиусе 2,1 Å и до шести молекул воды в радиусе 3,1 Å. Для изогнутых конформаций *2* и *3* возможно образование водородных связей с участием боковых групп, а именно $O_3'\cdots N_2$ и $O_6'\cdots O_6$. В случае конформации *2* наиболее устойчивой оказалась связь $O_3'\cdots N_2$, которая наблюдается на 47 % траектории (сильная) и 42 % траектории (слабая). Для конформации *3* характерно наличие как связи $O_3'\cdots N_2$ (3 % - сильная и 28 % - слабая), так и связи $O_6'\cdots O_6$ (14 % - сильная и 16 % - слабая). Здесь при расчетах анализировались только те участки траектории, на которых ориентация звеньев отвечала соответствующей конформации. Меньшая стабильность водородных связей в случае конформации *3*

может быть связана с тем, что боковые OH- и NH_2-группы расположены на большем расстоянии на внешней поверхности молекулы хитозана и открыты для взаимодействия с ближайшими молекулами воды.

4.2 Молекулярное моделирование олигомеров хитозана

Для изучения влияния растворителя и количества звеньев глюкозамина на устойчивость изогнутых конформаций олигомеров хитозана были проведены расчеты конформаций *1*, *2* и *3* для тримеров и тетрамеров глюкозамина. При этом все углы φ и ψ соответствовали заданной конформации. Результаты квантово-химических расчетов в сравнении с данными расчетов методом силового поля представлены в таблице 11.

Таблица 11. Относительные энергии (кДж/моль) конформеров *1-3* для олигомеров хитозана в газовой фазе и воде.

Молекула	Конфор-мация	ММ [a]		ТФП [b]		
		ΔG_{gas}	ΔG_{wat}	ΔG_{gas}	ΔG_S	ΔG_{wat}
G_3	1	0,0	0,0	0,0	-253,0	0,0
	2	-0,5	23,6	-3,8	-239,0	0,3
	3	-14,4	13,5	-2,7	-234,6	1,3
G_4	1	0,0	0,0	0,0	-320,6	0,0
	2	1,6	36,1	-7,3	-300,0	5,9
	3	-29,8	21,0	-19,3	-273,3	5,9

[a] расчеты методом в газе (Glycam-06) и водной среде (Glycam-06/GBSA); [b] расчеты в газе (B3LYP/6–31+G(d,p)) и в воде (PCM(SMD)/B3LYP/6–31+G(d,p)).

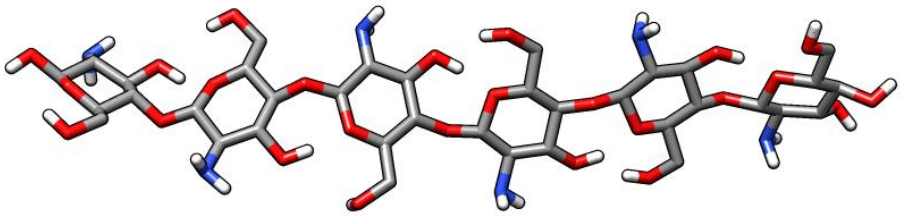
Как видно по данным таблицы 11, в газовой фазе изогнутые конформации *2* и *3* оказываются в большинстве случаев более устойчивыми, чем линейная конформация *1*. Причем с увеличением количества звеньев повышается устойчивость конформации *3*. Такая зависимость может быть обусловлена большим энергетическим выигрышем за счет образования водородных связей по боковой аминогруппе, чем по атому кислорода в пиранозном цикле. 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. Для тетрамера изогнутые конформации дестабилизированы в воде относительно линейной структуры на ~6 кДж/моль в методе ТФП и на ~21-36 кДж/моль в СП.

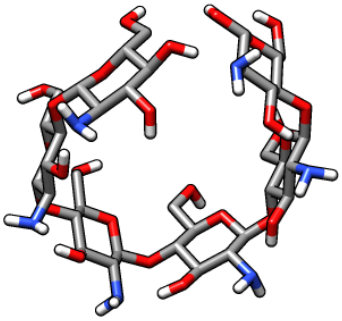
Конформационная подвижность гликозидных связей была далее оценена из МД гексамеров хитозана. Константа pK_a аминогруппы в деацилированном хитозане составляет от 5,5 до 6,4 в зависимости от ионной силы, и хитозан является слабым электролитом [67,68,85]. Хитозан растворим в воде при pH < 6, т.е. в условиях, когда значительная доля аминогрупп находится в заряженном состоянии. В связи с этим, при моделировании, наряду с нейтральным состоянием, были рассмотрены состояния с разной степенью протонирования аминогрупп. В качестве стартовых при оптимизации использовались геометрии с соответствующими конформациям *1–3* значениями всех углов φ и ψ. Такой выбор начальных структур обусловлен возможностью проверки устойчивости изогнутых конформаций на каждом участке цепи при минимальном количестве запусков МД расчетов.

Оптимизация геометрии методом ММ в газе сохраняет тип конформаций в гексамерах. В нейтральном гексамере G_6 оптимизированная структура *1* представляет линейную цепочку с постепенным поворотом пиранозных колец на ~30^o вдоль оси с периодом в два шага, конформации *2* и *3* образуют левую и правую спирали, соответственно (Рисунок 30). При этом структура *2* представляет собой замкнутое кольцо, в котором существует водородная связь между OH-группой 1-го звена и NH_2-группой 6-го звена. Таким образом, изгиб основной цепи полимерного хитозана с изменением угла φ может происходить с участием только нескольких (до 6-ти) соседних звеньев, в то время как для структуры *3* оказывается возможным дальнейшее наращивание цепи без стерических перекрываний. В конформациях *2* и *3* аминогруппы хитозана лежат по одну сторону цепи, в то время как в *1* происходит чередование сторон их расположения.

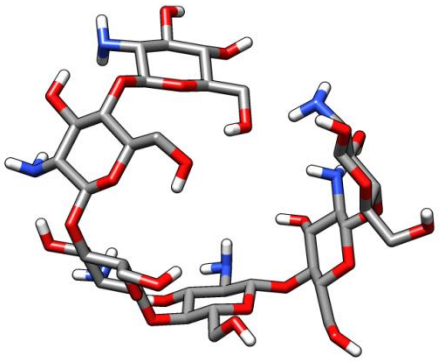
МД гексамеров в воде изучалась для траекторий в 50 нс. В ходе МД изогнутые конформации *2* и *3* переходят в линейную структуру *1* для всех рассмотренных случаев. Было оценено наличие водородных связей между полярными группами третьего и четвертого звеньев гексамеров непротонированного хитозана с теми же критериями, что и для димера.



структура *1*



структура *2*



структура *3*

Рисунок 30 – Оптимизированные методом СП конформации *1-3* гексамеров хитозана

В ходе моделирования конформации *1* молекулы G_6 сильная Н-связь наблюдалась в структуре на 50 % траектории, а слабая Н-связь – на 20 % траектории. В то время как водородные связи между боковыми ОН- и NH_2-группами для конформаций *2* и *3* значительно менее устойчивы. В случае конформации *2* сильная Н-связь присутствует на 22 %, а слабая – на 12 % траектории. Для конформации *3* сильная Н-связь присутствует на 5 %, а слабая – на 11 % траектории. Здесь при расчетах анализировались те участки траектории, на которых ориентация 3-его и 4-го звеньев отвечала соответствующей конформации. Данный результат связан с тем, что боковые ОН- и NH_2-группы

расположены на внешней поверхности молекулы хитозана и в большей степени открыты для взаимодействия с ближайшими молекулами воды.

В слабокислых растворах при pH=6 примерно половина аминогрупп в хитозане может оставаться непротонированными. В этом случае наиболее вероятно чередование протонированных звеньев глюкозамина HG с нейтральными звеньями G вдоль цепи полисахарида. Тогда положительно заряженные NH_3^+–группы оказываются на одной стороне цепи для линейной конформации. Такая структура обладает наибольшей гибкостью, поскольку при повороте нейтрального звена относительно заряженного NH_3^+–группы оказываются наиболее удалены друг от друга. Результаты молекулярной динамики подтверждают данный вывод: для молекулы H_3G_6 наиболее характерны конформационные переходы *1*↔*3*. Наиболее жесткой ожидаемо оказывается полностью протонированная линейная структура H_6G_6, поскольку для нее положительно заряженные группы оказываются максимально удалены друг от друга.

4.3 Моделирование структуры нитроксильных производных хитозана

Рассматриваемые нитроксильные производные хитозана представляют собой олигосахариды с присоединенным по аминогруппе центрального звена карбоксил-содержащим нитроксильным радикалом (Рисунок 31). При моделировании в качестве стартовых использовались геометрии, в которых ориентации звеньев основной цепи соответствовали конформацям *1*, *2* и *3*. Ориентации заместителей отвечали наиболее энергетически выгодным конформациям соответствующих нитроксильных радикалов, найденным ранее методом ТФП [153].

При моделировании молекул, содержащих нитроксилы R^1 и R^2, использовались стандартные типы атомов из библиотеки Glycam. При этом RESP заряды на атомах нитроксильных заместителей были определены для

индивидуальных радикалов с использованием методов, рекомендуемых Amber (см. методы расчетов).

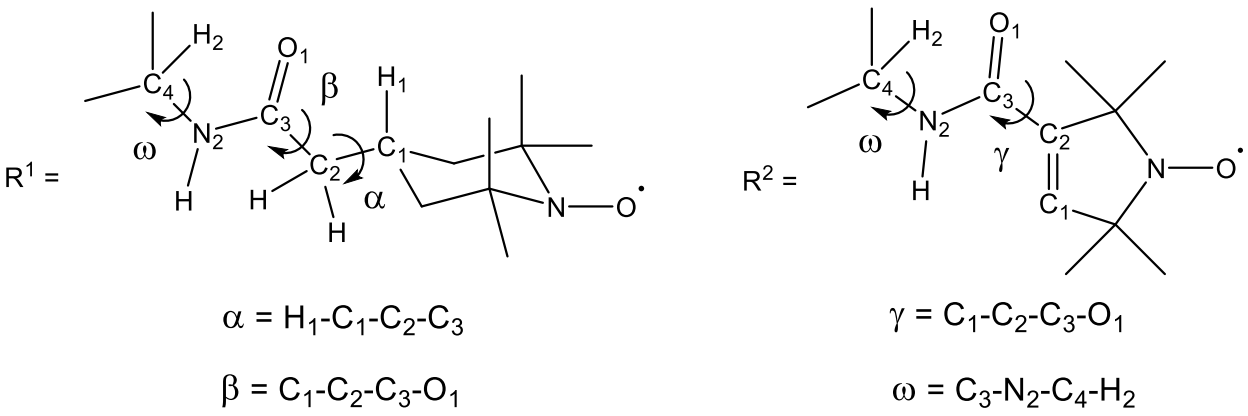


Рисунок 31 – Химическая структура нитроксильных заместителей

Для нитроксила R^1 заряды на симметричных атомах цикла усреднялись по двум зеркально симметричным конформациям. Рассчитанные значения зарядов представлены на рисунке 32. Молекулярная динамика тримеров проводилась в 2 этапа: 1 этап 5 нс с сохранением траектории каждую 1 пс проводился с целью проанализировать конформационную подвижность нитроксильного линкера и 2 этап 50 нс с сохранением траектории каждые 10 пс, в ходе которого была изучена конформационная подвижность основной цепи.

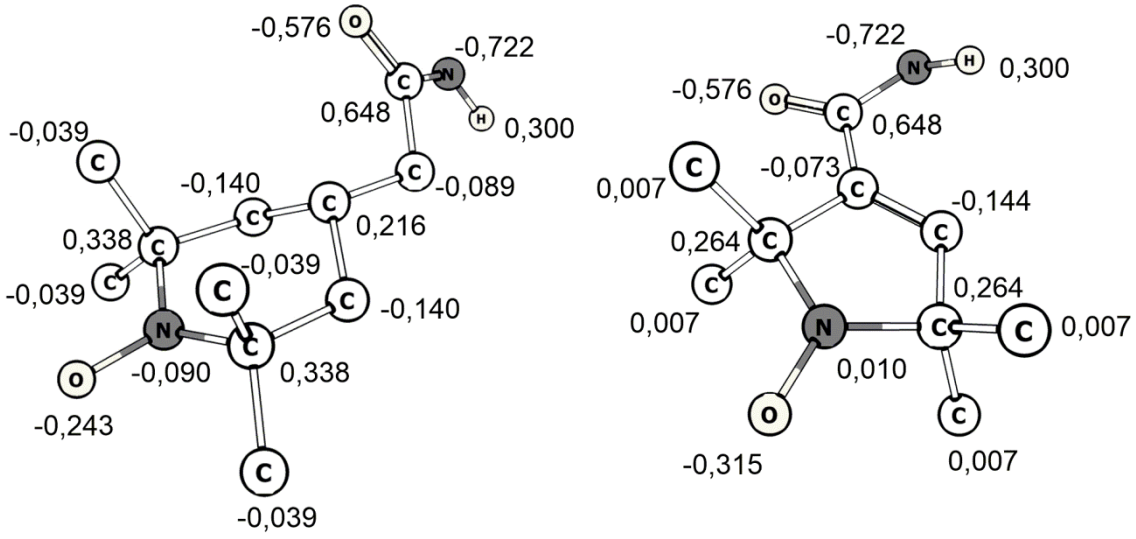
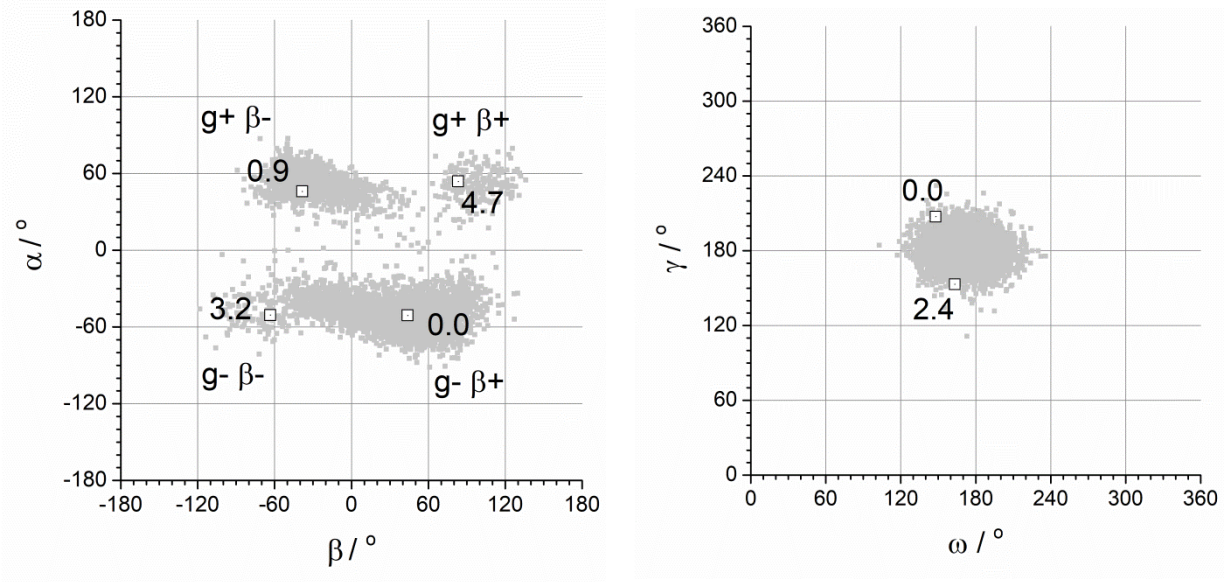


Рисунок 32 – Вычисленные RESP заряды для нитроксильных заместителей R^1 и R^2

Исследование конформационной подвижности нитроксильных заместителей на первом участке траектории (5 нс) показало, что углы α и 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. Карты распределения конформаций по торсионным углам представлены на рисунке 33 [203]. Для шестичленного нитроксила R^1 угол α может принимать три равновесных значения: -60° (конформация g-), +60° (g+) и 180° (tr), однако наиболее энергетически выгодными оказались конформации g- и g+, а конформация tr практически не реализуется за все время моделирования.



(*а*) (*б*)

Рисунок 33 – Карты распределения конформаций заместителей по торсионным углам для молекул G-GR^1-G (*а*) и G-GR^2-G (*б*) для линейной структуры глюкозамина из 5 нс траектории МД. Обозначены равновесные геометрии и их относительные энергии (кДж/моль), найденные из расчетов ТФП в воде

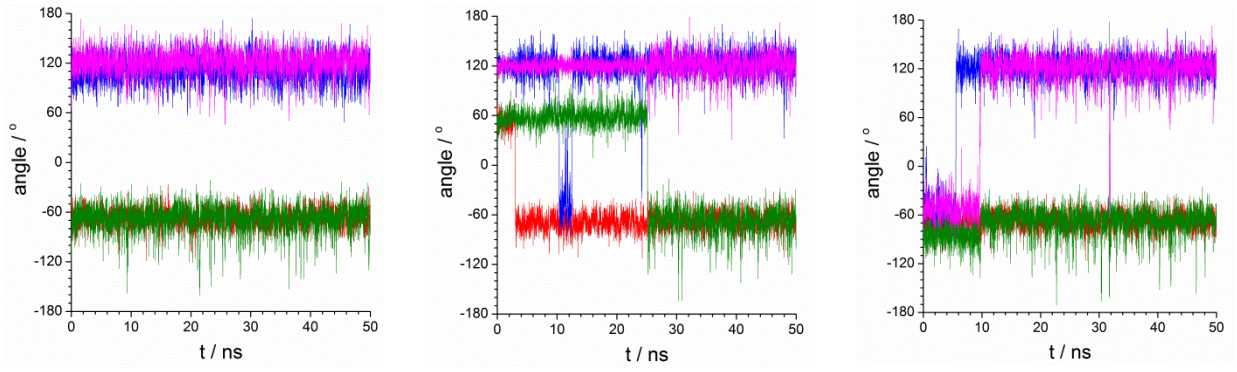
Как видно по графику (Рисунок 33, *а*), угол α колеблется около значений -60° и +60° с амплитудой ~60 градусов, в то время как угол β принимает практически непрерывный спектр значений от -120° до +120°. Конформации, связанные с вращением вокруг связи C_2–C_3 обозначим β- при $\beta < 0$ и β+ при $\beta > 0$. По данным молекулярной динамики преимущественными являются ориентации нитроксильного заместителя, в которых знаки углов α и β

различаются. Распределение конформаций для пятичленного нитроксила R^2 по углам ω и γ представлено на рисунке 33, *б*. Углы колеблются около своих равновесных значений, и конформационных переходов не наблюдается на всей траектории 55 нс. Аналогичное поведение демонстрирует угол ω и в случае производного G_3R^1.

Конформационный анализ основной цепи нитроксильных производных тримера хитозана показал, что линейная структура *1* устойчива в течение всего времени моделирования (55 нс) в случае непротонированных аминогрупп. В то время как для протонированных производных HG-GR^1-HG и HG-GR^2-HG наблюдаются самопроизвольные конформационные переходы *1*↔*3* для одного из двух крайних звеньев тримера. При этом конформация *3* сохраняет устойчивость до 5 нс. Бóльшая устойчивость конформации *3* для протонированных производных по сравнению с нейтральными, как и для незамещенного хитозана, связана с тем, что в случае линейной конформации положительно заряженные аминогруппы крайних звеньев располагаются на одной стороне основной цепи, в то время как при изгибе аминогруппы оказываются по разные стороны и на большем расстоянии. Тем не менее, линейная структура преобладает на траектории моделирования во всех случаях.

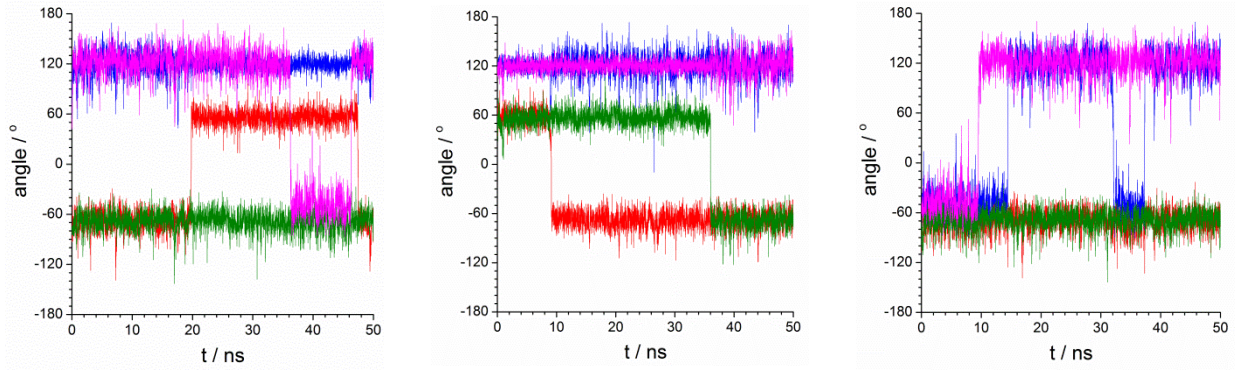
Распределение конформаций было далее изучено для гексамеров хитозана с нитроксильным заместителем по третьему звену и разной степенью протонирования. Выбор такой модели согласуется с тем, что в эксперименте один нитроксильный заместитель приходится в среднем на 6–7 свободных звеньев глюкозамина [18]. В случае незаряженных аминугрупп цепь остается достаточно жесткой и во всех случаях преобладает линейная структура *1*. Поскольку pH физиологической среды близко к 7, степень протонирования аминогрупп хитозана в этом случае будет составлять ~ 15 %. При переходе к кислой среде дальнейшее протонирование хитозана может проходить по множественным аминогруппам. Поэтому были также исследованы гексамеры, содержащие одну NH_3^+-группу на четвертом звене хитозана (HG_6, HG_6R^1 и HG_6R^2) и полностью протонированные производные (H_6G_6, $H_5G_6R^1$ и $H_5G_6R^2$). Динамика изменения углов гликозидной

связи для протонированных состояний гексамеров и показывает возможность спонтанных переходов между конформациями основной цепи (Рисунок 34).



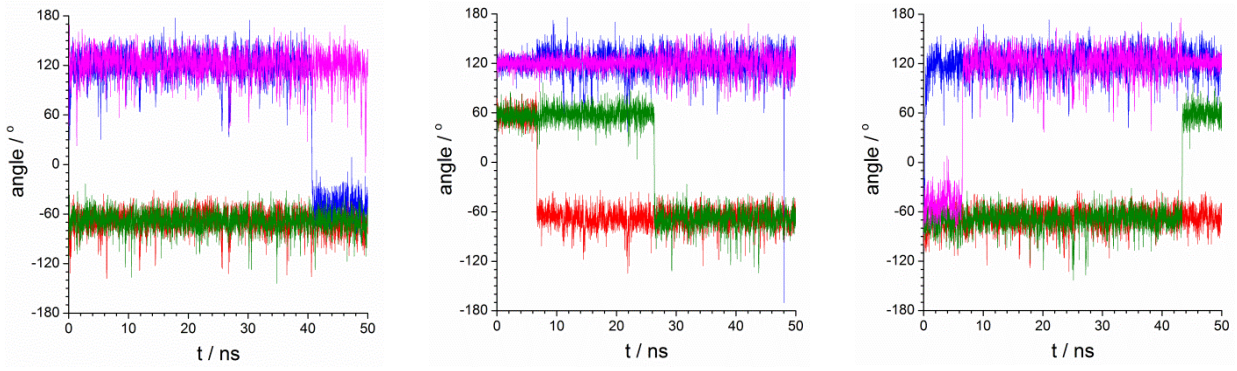
(*а*) (*б*) (*в*)

G-G-G-HG-G-G/HG-HG-HG-HG-HG-HG



(*а*) (*б*) (*в*)

G-G-GR^1-HG-G-G/HG-HG-GR^1-HG-HG-HG



(*а*) (*б*) (*в*)

G-G-GR^2-HG-G-G/HG-HG-GR^2-HG-HG-HG

Рисунок 34 – Временные зависимости углов гликозидной связи между остатками 3–4 из МД монопротонированных (φ_3 —— ,ψ_3 ——) и полностью протонированных (φ_3 —— , ψ_3 ——) гексамеров хитозана и их нитроксильных производных для стартовых конформаций *1* (*а*), *2* (*б*) и *3* (*в*).

Наиболее высокой подвижностью в рассмотренных моделях обладает гликозидная связь между 3-м и 4-м звеньями (углы φ_3 и ψ_3), т.е. по месту присоединения нитроксила. 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. Была проанализирована амплитуда колебаний углов φ и ψ для гексамеров хитозана на участках траектории, отвечающих линейной конформации *1*. Рассчитано среднеквадратичное отклонение S от равновесных значений $\varphi = -73{,}2^o$ и $\psi = 108{,}4^o$. Результаты расчетов приведены в таблице 12: среднее арифметическое отклонение по углам φ_1-φ_5, ψ_1-ψ_5 и отклонение отдельно для углов φ_3 и ψ_3. Расчеты показывают, что протонирование аминогрупп приводит к увеличению амплитуды колебаний угла ψ: отклонение $S(\overline{\psi})$ повышается с $16{,}6^o$ до $19{,}4^o$, в то время как отклонение по углам φ практически не изменяется.

Таблица 12. Среднеквадратичное отклонение от равновесных значений для углов φ и ψ для гексамеров хитозана и их нитроксильных производных.

Угол	G_6	H_6G_6	G_6R^1	$H_5G_6R^1$	G_6R^2	$H_5G_6R^2$
$^*\overline{\varphi}$	12,9	11,8	12,6	11,5	13,1	11,8
$\overline{\psi}$	16,6	19,4	16,8	20,1	16,4	19,2
φ_3	12,7	11,7	12,4	12,4	13,4	12,9
ψ_3	16,8	19,5	16,6	19,7	17,8	20,7

*Для нитроксильных производных среднее арифметическое рассчитывалось без учета φ_3 и ψ_3.

Присоединение пятичленного нитроксильного радикала к аминогруппе третьего звена повышает амплитуду колебаний угла ψ_3 как в случае нейтральной, так и протонированной формы. В то время как для производного с шестичленным нитроксилом данного эффекта не наблюдается (Таблица 12). Это может быть связано с тем, что нитроксил R^2 жестко связан с основной цепью хитозана, и его взаимодействие с молекулами растворителя оказывает влияние на геометрию

основной цепи. Тогда как нитроксил R^1 достаточно подвижен, и его взаимодействие с растворителем практически не оказывает влияния на колебания звеньев цепи хитозана.

Полученные в результате ММ и МД моделирования данные позволяют сделать вывод о невовлеченности нитроксильной группы во внутримолекулярные взаимодействия хитозан-нитроксилов. Поэтому окислительно-восстановительные свойства таких производных должны определяться в первую очередь активностью самих НР. 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.

4.4 Окислительно-восстановительные потенциалы нитроксильных производных хитозана

Для расчета электрохимических потенциалов нитроксильных производных тримеров хитозана были использованы наиболее устойчивые конформации, полученные по данным ММ и МД моделирования (Рисунок 35). Структуры рассматриваемых соединений были оптимизированы в вакууме методом B3LYP/6-31+G(d,p), а свободные энергии сольватации определялись из одноточечных расчетов в M052X/6-311+G(2df,2p) в воде в модели PCM(SMD).

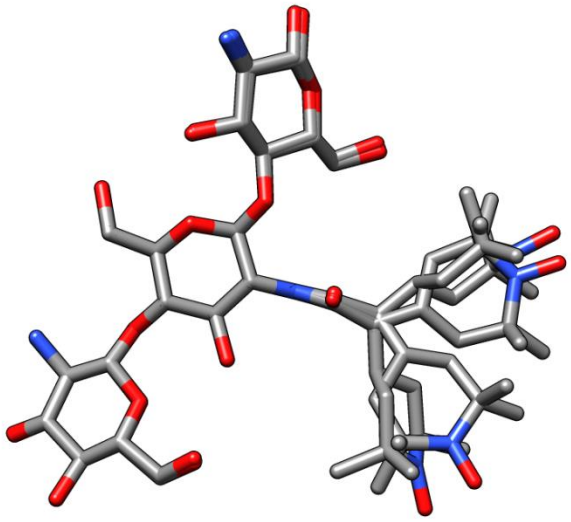


Рисунок 35 – Структуры наиболее устойчивых конформаций тримера хитозана G_3R^1 по данным расчетов B3LYP/6-31+G(d,p)

Были определены свободные энергии соответствующих радикалов, оксоаммониевых катионов, анионов, гидроксиламинов и катионов гидроксиламмония. Потенциалы окисления и восстановления вычислялись по формулам (11) и (16) соответственно. 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. Результаты расчетов представлены в таблице 13.

Таблица 13. Вычисленные редокс-потенциалы (мВ) хитозан-нитроксилов и индивидуальных НР относительно СВЭ

Соединение	pH	E_{Ox}	E^0_{Red}	E_{Red}
NH_2-R^1	7	830	-1432	-215
NH_2-R^1	6			-156
G-GR^1-G	7	899	-1353	-232
HG-GR^1-HG	6	939	-1553	-186
NH_2-R^2	7	976	-1339	-290
NH_2-R^2	6			-231
G-GR^2-G	7	1066	-1384	-328
HG-GR^2-HG	6	1117	-1510	-229

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 нитроксилов возрастает на ~60 мВ, что согласуется с результатами экспериментальных измерений [59]. Для производных G_3R^1 и G_3R^2 потенциал E_{Red} возрастает на 46 и 99 мВ соответственно при понижении pH.

Таким образом, проведенная работа содержит систематический конформационный анализ гликозидной связи хитозана методами молекулярной механики и квантовой химии. Установлено определяющее влияние полярности

окружающей среды (растворителя) на устойчивость изогнутых конформаций основной цепи полисахарида. Так для индивидуальных олигомерных молекул наиболее устойчивыми оказываются скрученные конформеры, в то время как в водном растворе хитозан имеет линейную структуру. Тем не менее, в растворе для отдельных звеньев характерны конформационные переходы между относительно низкими по энергии изогнутыми конформациями *2* и *3*, происходящие через линейную конформацию *1*. Частичное протонирование свободных аминогрупп или присоединение нитроксильных заместителей повышает гибкость основной цепи с сохранением преобладания линейной структуры. Наличие заряженных NH_3^+-групп также повышает амплитуду колебаний звеньев глюкозамина. Методом молекулярной динамики установлено, что ковалентно присоединенные нитроксильные радикалы не склонны к образованию внутримолекулярных контактов с основной цепью хитозана. На основе полученных результатов по структуре данных производных выполнен расчет электрохимических потенциалов окисления и восстановления их нитроксильной группы. Присоединение как пятичленного, так и шестичленного НР к хитозану приводит к повышению потенциала окисления и понижению потенциала восстановления. Понижение pH и протонирование аминогрупп соседних звеньев приводит к увеличению потенциалов как процесса окисления, так и процесса восстановления нитроксилов.

ГЛАВА 5. КВАНТОВО-ХИМИЧЕСКИЕ РАСЧЕТЫ РЕАКЦИЙ ДИНИТРОЗИЛЬНЫХ КОМПЛЕКСОВ ЖЕЛЕЗА В ВОДНОМ РАСТВОРЕ

Результаты, описанные в данной главе, опубликованы в работах [207,208][1].

5.1 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 отличие от анионных тиолатных комплексов, катионные ДНКЖ более лабильны и при этом не образуют диамагнитных димеров со структурой красного эфира Руссена, что дает больше возможностей для их исследования методом ЭПР. В водном растворе данные комплексы разлагаются с высвобождением $NO^{\bullet}$, при этом донорная активность зависит как от структуры комплекса, так и от окружающих условий (температуры, pH, присутствия кислорода). Экспериментальные исследования показали, что в присутствии альбумина скорость разложения ДНКЖ понижается в 10 раз [129,208]. Для понимания общих закономерностей превращений ДНКЖ в работе проведены квантово-химические расчеты гидролиза ряда катионных и анионных комплексов (Рисунок 36) в анаэробных условиях.

[1] При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные резльтаты, положения и выводы исследования: 1) V. B. Krapivin, V. B. Luzhkov, N. A. Sanina, S. M. Aldoshin. Decomposition of dinitrosyl iron complex with thioformaldehyde ligands in water: reaction mechanisms and the role of chemical hardness of ligands // Mendeleev Communications. – 2022. – Т. 32. – С. 457-459. 2) O. V. Pokidova, V. B. Luzhkov, N. S. Emel'yanova, V. B. Krapivin, A. I. Kotelnikov, N. A. Sanina, S. M. Aldoshin. Effect of albumin on the transformation of dinitrosyl iron complexes with thiourea ligands // Dalton Transactions. – 2020. – Т. 49, № 36. – Р. – 12674-12685. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Крапивина В. Б. составляет 50%.

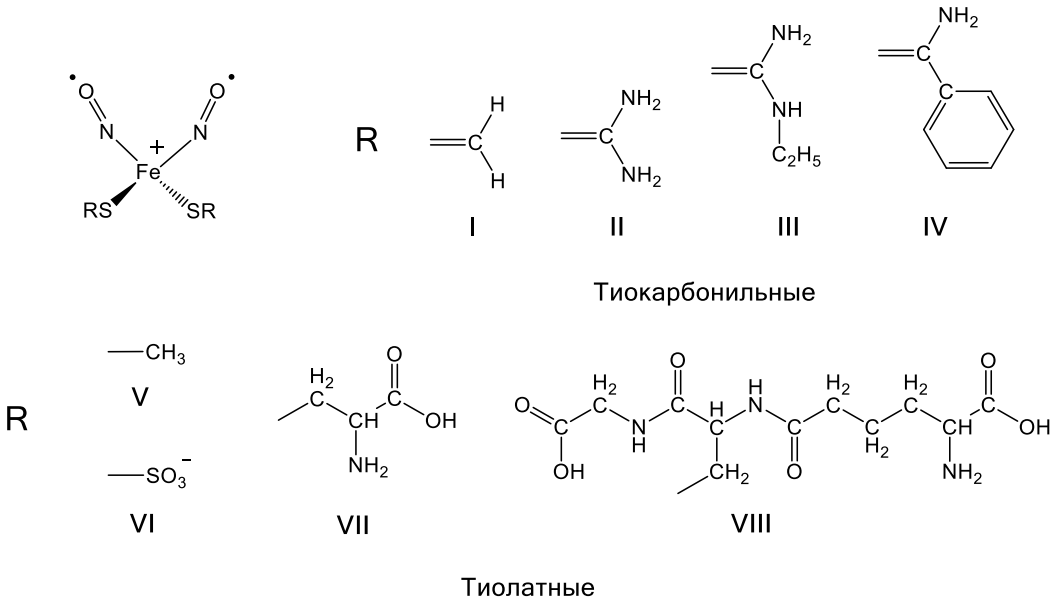


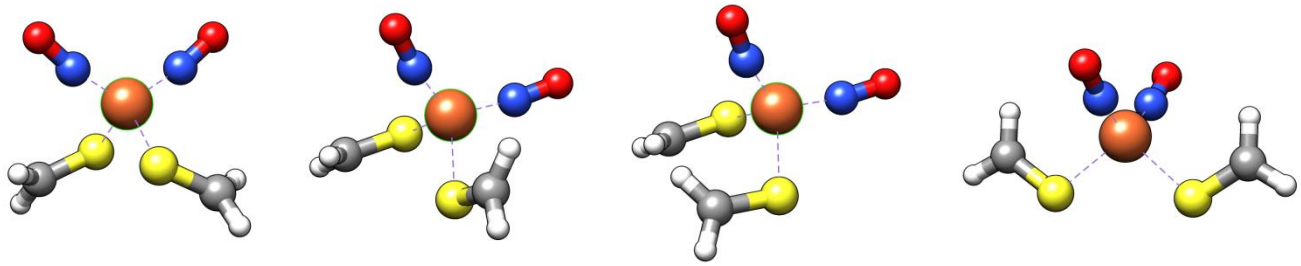
Рисунок 36 – Структуры лигандов рассматриваемых ДНКЖ

В качестве модельного объекта исследований был выбран комплекс на основе тиоформальдегида $[Fe(NO)_2(SCH_2)_2]^+$ (**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 рассмотрены анионные тиолатные комплексы с метилсульфидом (**V**), тиосульфатом (**VI**), L-цистеином (**VII**) и глутатионом (**VIII**).

5.2 Реакции распада железо-нитрозильного комплекса на основе тиоформальдегида

Для понимания влияния структуры лиганда и механизма распада комплексов были проведены квантово-химические расчеты продуктов гидролиза, промежуточных и переходных состояний модельного ДНКЖ на основе тиоформальдегида **I**. В расчетах мультиплетность всех соединений, содержащих фрагмент $[Fe(NO)_2]^+$, принималась равной 2. Конформационный анализ комплекса **I** в водном растворе выявил четыре возможных конформации, определяемые вращением тиоформальдегидных лигандов вокруг связи Fe-S (Рисунок 37). Все структуры оказались близкими по энергии, лежащими в пределах 3 кДж/моль

(таблица 14). Барьеры потенциальной энергии для вращения тиоформальдегидов составляют менее 4 кДж·моль$^{-1}$, что свидетельствует о лабильной структуре соединения.



c1 c2 c3 c4

Рисунок 37 – Конформации комплекса **I** в водном растворе

Стоит отметить, что в газовой фазе минимуму потенциальной энергии отвечает только одна конформация c4 (структура **1**), обладающая симметрией C_{2v}, которая была принята за точку отсчета при определении относительных энергий продуктов гидролиза.

Таблица 14. Энергетические вклады и относительные энергии конформаций комплекса **I**, рассчитанные методом TPSSH/def2-TZVP в воде

Конформер	E_{el}, a. u.	E_{ZPV}, a. u.	E_0 (отн), кДж/моль	
			TPSSH	M06
c1	-2398,67008823	0,069478	2,19	0,52
c2	-2398,67064566	0,069200	0,00	0,00
c3	-2398,67062701	0,069910	1,91	-0,36
c4	-2398,67059431	0,069347	0,52	0,93

Структура комплекса **I** аналогична тиомочевинному ДНКЖ, полученному и охарактеризованному экспериментально [112]. Сравнение трех функционалов показало, что наиболее близкие к экспериментальным значения длин связей Fe-S и Fe-N дает TPSSH (Таблица 15). 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 в работе [172] показано, что данный метод

приводит к наименьшей ошибке в энергии по сравнению с «золотым стандартом» CASPT2 при расчетах гидролиза тиолатного комплекса $[Fe(SCH_3)_4]^-$. Поэтому для дальнейших расчетов были выбраны функционалы TPSSH и M06.

Таблица 15. Сравнение параметров комплекса **I** в конформации c4, полученных по данным расчетов в базисе def2-TZVP в воде, с экспериментальными значениями для тиомочевинного ДНКЖ

Функционал	d(Fe-S), Å	d(Fe-N), Å	$<S^2>$
B3LYP	2,461	1,750	2,41
M06	2,440	1,753	2,60
TPSSH	2,353	1,695	1,51
$[Fe(NO)_2(SC(NH_2)_2)_2]^+$ эксперимент	2,334	1,688	0,75

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 **I** (структура **1**) по одному из двух положений с образованием пентакоординационных интермедиатов **2a** и **2b** (Рисунок 38).

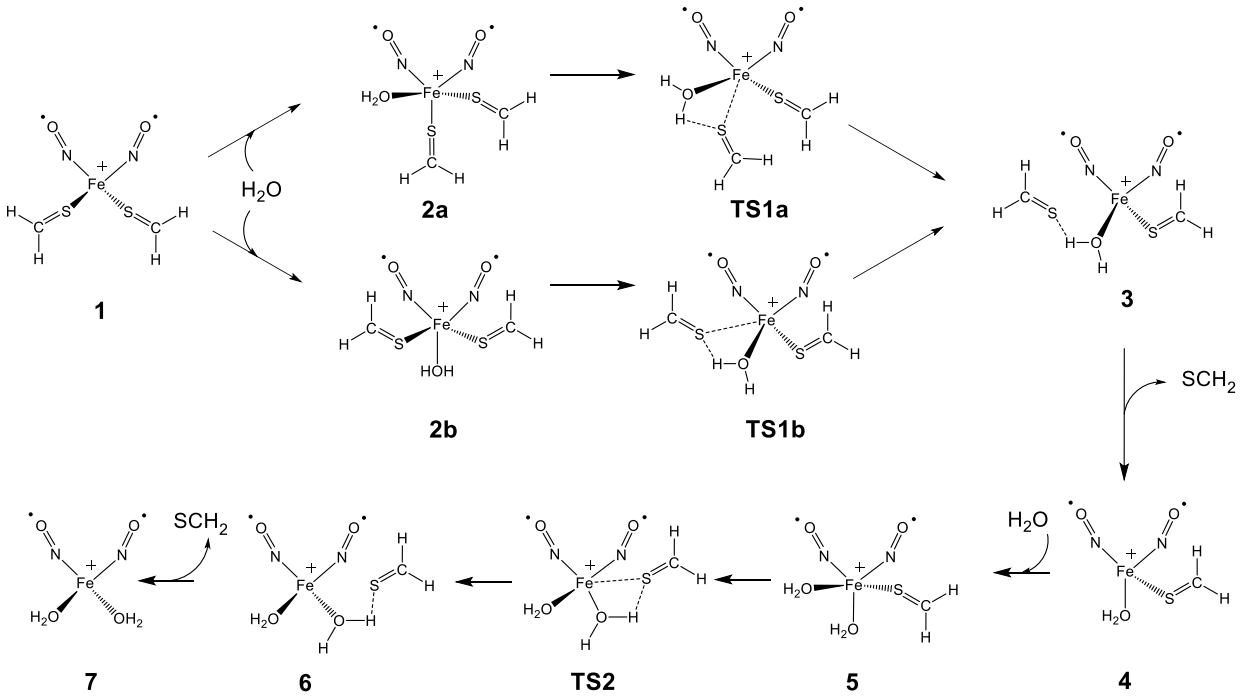


Рисунок 38 – Схема ассоциативного механизма гидролиза комплекса **I**

Стоит отметить, что соединения **2a** и **2b** являются устойчивыми и отвечают минимуму потенциальной энергии в отличие от аналогичных пятикоординационных комплексов платины, являющихся переходными состояниями в реакции гидролиза *цис*-платина [209,210].

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**. Структуры соединений, представленных на схеме на рисунке 38, приведены на рисунке 39.

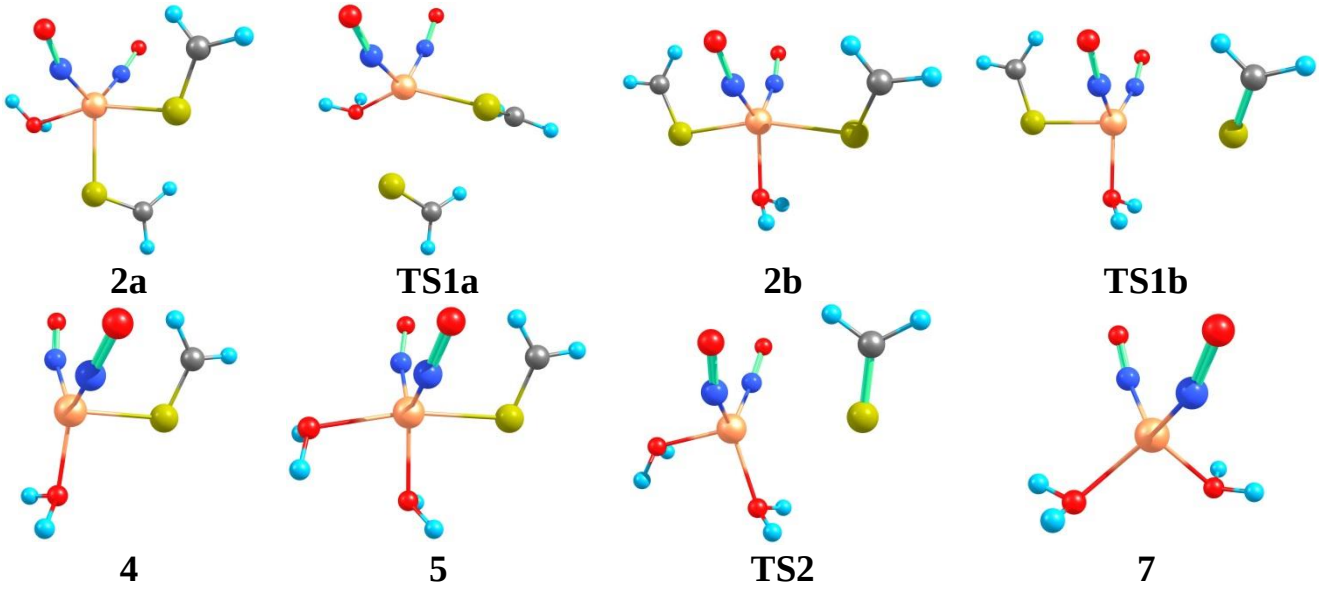


Рисунок 39 – Структуры основных реактантов для ассоциативного механизма гидролиза комплекса **I**

Результаты расчетов энергий для структур 1-7 приведены в таблицах 16-17. Расчеты показывают, что замещение тиоформальдегидного лиганда молекулами воды в комплексе **I** носит экзотермический характер. Относительная свободная

энергия продукта первой ступени гидролиза **4** составляет ~ -30 кДж/моль, наблюдается хорошее согласование результатов для функционалов TPSSH и M06.

Таблица 16. Энергетические вклады, рассчитанные в TPSSH/def2-TZVP в воде для структур **1-7** для комплекса **I**

Комплекс	E_{el}	E_{ZPV}	G_T^0
	а.е.	а.е.	а.е.
1	-2398,67059431	0,069347	0,025633
2a	-2475,14304593	0,092777	0,045437
TS1a	-2475,14254132	0,092627	0,047493
2b	-2475,14791491	0,093611	0,049022
TS1b	-2475,14550792	0,092872	0,048547
3	-2475,15262168	0,093248	0,047179
4	-2037,63609445	0,066424	0,027154
5	-2114,10688682	0,090385	0,047392
TS2	-2114,10485116	0,089778	0,047517
6	-2114,11245757	0,090162	0,046501
7	-1676,59639209	0,062477	0,023603
H_2O	-76,46852042	0,020939	0,003278
SCH_2	-437,51140460	0,024754	0,002437

Таблица 17. Относительные энергии структур **1-7** для комплекса **I**, полученные с использованием функционалов TPSSH и M06

Комплекс	E_{el}(отн), кДж/моль		E_0(отн), кДж/моль		G^0(отн), кДж/моль	
	TPSSH	M06	TPSSH	M06	TPSSH	M06
1 + $2H_2O$	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2a + H_2O	–10,3	–33,4	–3,8	–23,2	15,2	2,7
2b + H_2O	–23,1	–43,4	–14,4	–33,1	11,8	–7,1
TS1a + H_2O	–9,0	–28,7	–2,9	–20,4	21,9	5,7
TS1b + H_2O	–16,8	–35,7	–10,0	–28,5	16,9	–4,2
3 + H_2O	–35,5	–31,9	–27,7	–23,4	–5,4	–1,4
4 + SCH_2 + H_2O	–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

Продукт полного замещения **7** имеет относительную свободную энергию -60 кДж/моль в TPSSH и -70 кДж/моль в M06 (Таблица 17). Наблюдается аддитивный эффект отщепления лигандов. В то же время для пента-координационных интермедиатов **2** и **5**, а также для переходных состояний различия в энергии достигают 15-20 кДж/моль при использовании функционалов

TPSSH и M06. Такое несоответствие может быть связано с особенностями функционалов: различным содержанием HF-обменных интегралов и наличием дисперсионных вкладов в M06. Данная проблема будет обсуждаться ниже.

Тем не менее, в обоих случаях интермедиаты **2a** и **2b** по потенциальной энергии лежат ниже исходного комплекса **1**, причем структура **2b** на 10 кДж/моль стабильнее, чем **2a**. Энергия активации для переходного состояния **TS1b** составляет 3-5 кДж/моль.

Зависимость потенциальной энергии системы вдоль пути реакции для первой ступени гидролиза приведена на рисунке 40. Здесь R(Fe-S_l) и R(Fe-O_w) соответствуют расстояниям до атома серы отщепляющегося лиганда и атома кислорода присоединяющейся молекулы воды.

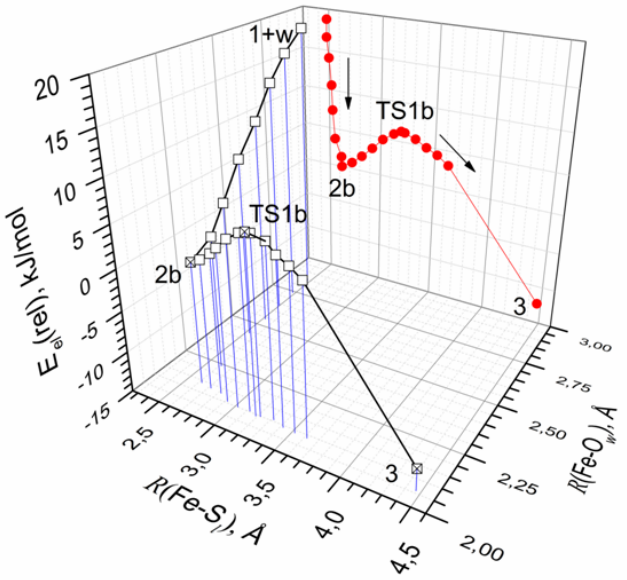


Рисунок 40 – Изменение потенциальной энергии вдоль пути реакции для ассоциативного механизма гидролиза комплекса **I** из расчетов TPSSH/def2-TZVP

Энергия E_0 постреакционного комплекса **3** оказывается на 13 кДж/моль ниже энергии предреакционного комплекса **2b** для функционала TPSSH, в то время как функционал M06 предсказывает более высокие значения энергии для **3** по сравнению с **2b**. Данный результат может быть связан с тем, что расчет дисперсионого вклада E_{disp} происходит независимо от процедуры самосогласования и процесса минимизации энергии [211]. Для комплекса **2b** учет

E_{disp} приводит к значительному понижению полной энергии, тогда как для **3** вклад E_{disp} оказывается значительно меньшим.

На второй ступени гидролиза возможно образование только одного устойчивого предреакционного интермедиата **5**. Его относительная энергия E_0 близка к энергии комплекса **4** для функционала TPSSH и на 13 кДж/моль ниже, чем у **4**, для функционала M06. В обоих случаях энергия активации для переходного состояния **TS2** оказывается низкой (4-6 кДж/моль), а образование постреакционного комплекса **6** сопровождается выигрышем в энергии. Таким образом, расчеты предсказывают неустойчивость тиоформальдегидного ДНКЖ в воде. Стоит также отметить, что молекулы SCH_2 склонны к образованию циклических тримеров, поэтому комплекс **I** должен оказаться еще менее устойчивым.

Альтернативным процессом может являться замещение $NO^{\bullet}$ молекулами воды с сохранением связи Fe-S (Рисунок 41). Продуктами данной реакции будут комплексы **8** и **9**, мультиплетность которых при расчетах принималась равной 3 и 4 соответственно. Как нулевые, так и свободные относительные энергии данных структур оказываются положительными (см. таблицу 17), что говорит об устойчивости нитрозильного фрагмента.

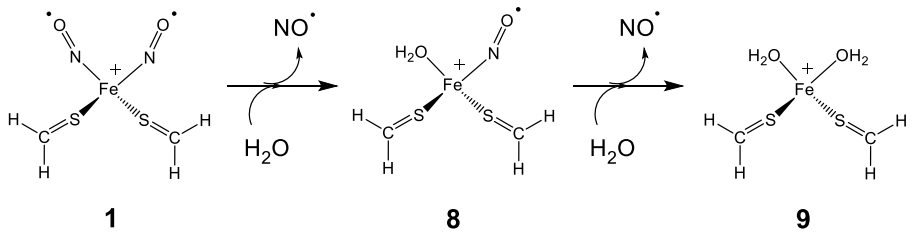
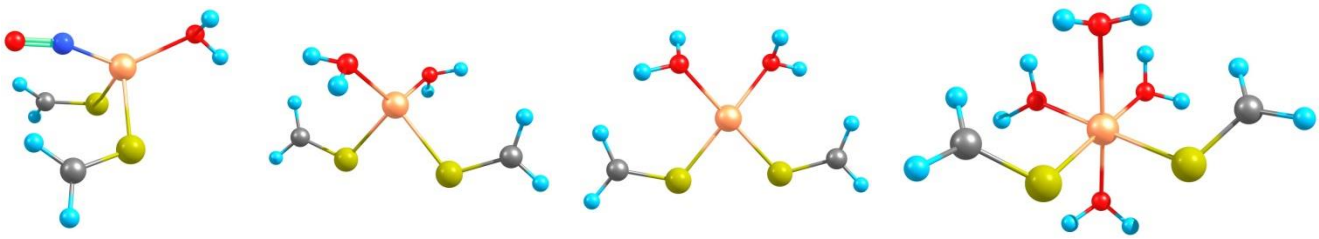


Рисунок 41 – Схема отщепления $NO^{\bullet}$ для тиоформальдегидного комплекса **I**

Стоит отметить, что комплексы **8** и **9** имеют тетраэдрическую структуру. Переход комплекса **9** из состояния с S=3/2 к состоянию с S=1/2 приводит к изменению структуры на плоско-квадратную (**9a**), а дальнейшее присоединение двух молекул воды приводит к образованию октаэдрического комплекса **9b** (Рисунок 41), однако данные структуры лежат значительно выше по энергии, чем комплекс 9 (см. таблицу 17).



8 **9** **9a** **9b**

Рисунок 41 – Структуры возможных продуктов отщепления NO$^{\bullet}$ при гидролизе комплекса **I**

Была также изучена возможность диссоциативного механизма гидролиза, когда молекулы H_2O в явном виде не принимают участия в отщеплении тиоформальдегида (Рисунок 43). В этом случае первая стадия протекает через переходное состояние **TS3** с образованием трехкоординационного интермедиата **11**. Комплекс **11** имеет геометрию треугольной пирамиды с атомом железа в вершине (Рисунок 44).

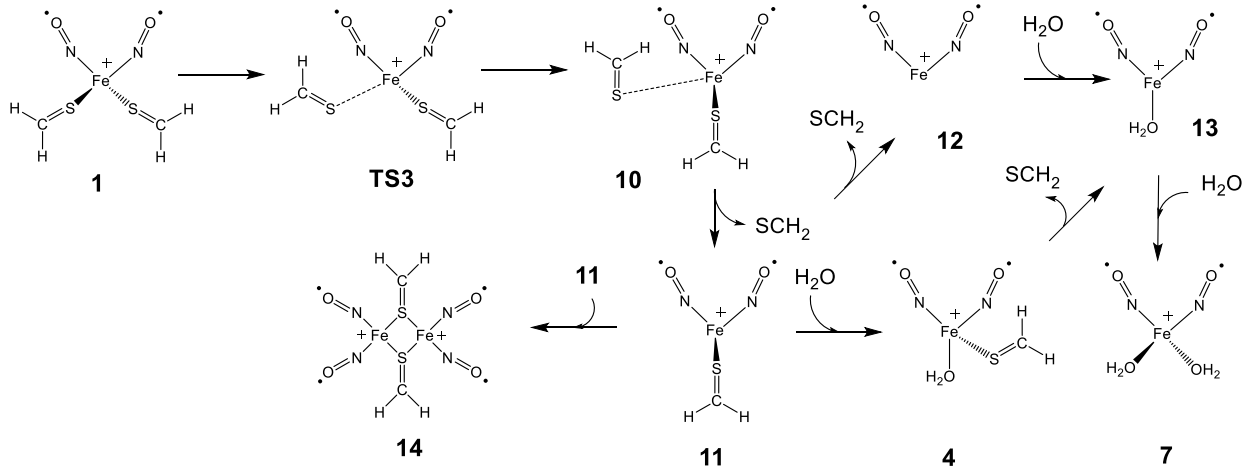
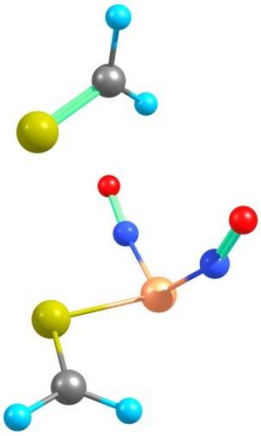


Рисунок 43 – Схема диссоциативного механизма гидролиза комплекса **I**

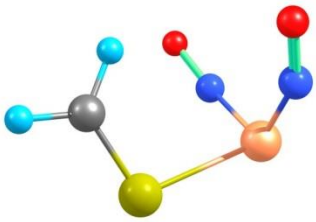
Отщепление второго тиоформальдегида ведет к образованию железо-нитрозильного фрагмента **12**, который превращается в конечный продукт гидролиза за счет присоединения двух молекул H_2O.

Энергетические вклады и относительные энергии для структур **8-14** приведены в таблицах 18-19. Как видно из расчетов энергия активации для переходного состояния **TS3** составляет 23 – 29 кДж/моль, что значительно выше, чем в случае ассоциативного механизма. Промежуточный продукт **11** также имеет более высокую энергию, чем комплекс **4**, содержащий H_2O в координации с железом. В целом диссоциативный механизм оказывается значительно менее

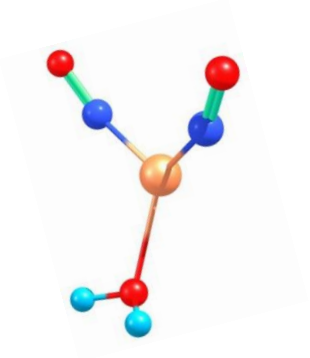
выгодным по сравнению с ассоциативным механизмом с участием явных молекул воды.



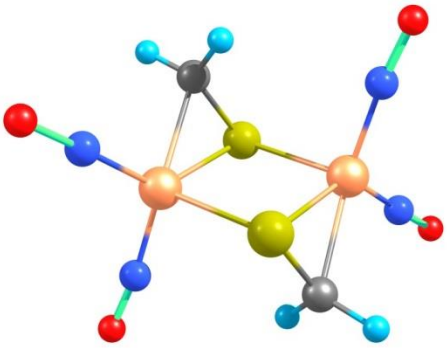
TS3



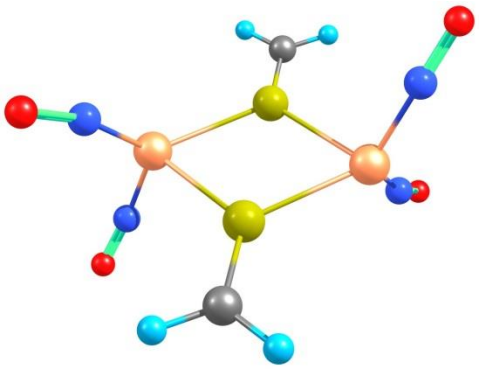
11



13



14



14a

Рисунок 44 – Структуры основных реактантов для диссоциативного механизма гидролиза комплекса **I**

Таблица 18. Энергетические вклады, рассчитанные в TPSSH/def2-TZVP в воде для структур **8-14** для комплекса **I**

Комплекс	E_{el}	E_{ZPV}	G_T^0
	a.e.	a.e.	a.e.
1	-2398,67059431	0,069347	0,025633
8	-2345,17515845	0,085980	0,045193
9	-2291,66579003	0,101820	0,059788
9a	-2291,65401471	0,105540	0,067353
9b	-2444,59836853	0,151994	0,104414
TS3	-2398,65681847	0,066715	0,021774
10	-2398,66310512	0,066976	0,022286
11	-1961,14997822	0,041428	0,005191
12	-1523,62990049	0,013052	-0,018374
13	-1600,11445335	0,038186	0,003476
14	-3922,30672072	0,091035	0,045339
$NO^{\cdot}$	-129,95461419	0,004433	-0,015556

Таблица 19. Относительные энергии структур **8-14** для комплекса **I**, полученные с использованием функционалов TPSSH и M06

Комплекс	E_{el}(отн), кДж/моль		E_0(отн), кДж/моль		G^0(отн), кДж/моль	
	TPSSH	M06	TPSSH	M06	TPSSH	M06
1 + $2H_2O$	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
8 + $NO\cdot$ + H_2O	24,5	25,7	24,9	33,7	16,5	27,8
9 + $2NO\cdot$	85,6	120,8	84,2	120,7	56,5	91,8
9a + $2NO\cdot$	116,6	-	124,9	-	107,3	-
9b + $2NO\cdot$ - $2H_2O$	97,4	-	117,7	-	132,3	-
TS3 + $2H_2O$	36,2	24,5	29,3	23,2	26,0	27,2
10 + $2H_2O$	19,7	10,3	13,4	8,0	10,9	18,7
11 + SCH_2 + $2H_2O$	24,2	26,1	15,9	19,0	-15,1	-15,5
12 + $2SCH_2$ + $2H_2O$	47,0	13,2	29,1	9,2	-39,9	-34,1
13 + $2SCH_2$ + H_2O	4,9	6,1	-1,9	3,2	-51,2	-45,0
*__14__	30,6	63,4	35,5	64,5	34,1	59,2

*Энергии комплекса **14** даны относительно **1** + **1** – $2SCH_2$

Была исследована возможность димеризации комплекса **I** с образованием биядерного катионного ТНКЖ **14**, содержащего мостиковые атомы серы. Электронная структура нейтральных тиолатных аналогов комплекса **14** в экспериментально наблюдаемом синглетном состоянии может быть описана в однодетерминантном приближении с использованием метода нарушенной симметрии и открытых оболочек [212].

Для тиоформальдегидного ТНКЖ были найдены две возможные структуры (Рисунок 43), в которых SCH_2 координируется к железу как атомом S, так и атомом C (π-комплекс, структура **14**), или группа $=CH_2$ находится в плоскости $[Fe_2S_2]$ (структура **14a**). Сравнение энергий данных структур в синглетном и триплетном состояниях приведены в таблице 20.

Таблица 20. Сравнение энрегий различных структур димера комплекса I по данным расчетов в TPSSH/def2-TZVP

Структура	Мульти-плетность	E_{el}	E_{ZPV}	G_T^0	E_0(отн)	G^0(отн)
		а.е.	а.е.	а.е.	кДж/моль	кДж/моль
14	1	-3922,30672072	0,091035	0,045339	0,0	0,0
	3	-3922,30398894	0,089891	0,041507	4,2	-1,2
14a	1	-3922,27430313	0,085084	0,032714	69,5	52,0
	3	-3922,27410520	0,084747	0,032073	69,1	52,5

По результатам расчетов плоская структура **14a** лежит существенно выше по энергии, чем структура **14**. Синглетное состояние оказывается стабильнее на 4

кДж/моль при 0 К, однако при комнатной температуре небольшой выигрыш в свободной энергии наблюдается для триплетной конфигурации. Тем не менее, данный ТНКЖ неустойчив по сравнению с моноядерным комплексом **I**.

Как отмечалось выше, функционал M06 предсказывает бóльшую стабилизацию пентакоординационных интермедиатов по сравнению с реагентами и продуктами гидролиза (см. таблицы 17, 19). M06 отличается от TPSSH бóльшим содержанием HF-обменных интегралов, а также вкладом дисперсионных взаимодействий. Для определения влияния данных факторов были проведены одноточечные расчеты электронной энергии структур **1-13** с использованием гибридных функционалов с разной долей HF-обмена, изначально не содержащих дисперсионных вкладов. Оптимизированные геометрии брались из расчетов TPSSH/def2-TZVP в воде. Сравнивались относительные электронные энергии, полученные без учета дисперсионных взаимодействий и с использованием поправок GD3 [211]. Результаты расчетов представлены в таблице 21.

Таблица 21. Сравнение относительных электронных энергий (кДж/моль) структур **1-13**, полученных методом одноточечного расчета в базисе def2-TZVP в воде

Комплекс	TPSSH	TPSSH-D3	B3LYP	B3LYP-D3	PBE0	PBE0-D3
Доля HF обмена, %	10	10	20	20	25	25
1 + $2H_2O$	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2a + H_2O	-10,3	-24,4	-13,5	-31,0	-24,3	-34,6
TS1a + H_2O	-9,0	-21,8	-18,8	-34,8	-29,0	-38,5
2b + H_2O	-23,1	-36,8	-32,0	-49,2	-40,5	-50,7
TS1b + H_2O	-16,8	-27,6	-29,6	-43,4	-34,0	-42,4
3 + H_2O	-35,5	-41,3	-52,3	-60,0	-54,6	-59,3
4 + SCH_2 + H_2O	-22,0	-22,0	-41,4	-41,3	-41,2	-40,7
5 + SCH_2	-28,0	-40,1	-48,4	-64,5	-53,8	-63,0
TS2 + SCH_2	-22,6	-32,8	-51,3	-65,0	-53,4	-61,3
6 + SCH_2	-42,6	-46,1	-78,1	-82,9	-75,9	-79,0
7 + $2SCH_2$	-30,4	-26,0	-68,6	-63,5	-62,9	-59,4
8 + $NO^{\cdot}$ + H_2O	24,5	42,9	15,8	8,4	5,8	1,8
9 + $2NO^{\cdot}$	85,6	128,7	79,5	73,2	55,4	51,8
TS3 + $2H_2O$	36,2	34,1	13,6	11,4	13,1	12,1
10 + $2H_2O$	19,7	17,3	-3,1	-5,9	-2,4	-4,1
11 + SCH_2 + $2H_2O$	24,2	31,9	-0,6	8,9	4,0	10,3
12 + $2SCH_2$ + $2H_2O$	47,0	66,9	6,1	30,8	17,1	32,3
13 + $2SCH_2$ + H_2O	4,9	18,8	-35,3	-19,2	-26,0	-15,9

Как видно по данным таблицы 21, относительная энергия большинства тетракоординационных комплексов практически не зависит от наличия поправок D3 и понижается при переходе от TPSSH к B3LYP и PBE0. В то время как для пентакоординационных интермедиатов наблюдается существенная стабилизация (на 10-15 кДж/моль) при включении дисперсионных взаимодействий.

Квантово-химические расчеты тиоформальдегидного железо-нитрозильныго комплекса показали преимущество ассоциативного механизма гидролиза с образованием пентакоординационных интермедиатов и низкими барьерами разрыва Fe-S связи. Данные результаты можно обобщить и на комплекс с тиомочевиной **II**, для которого получены структуры, аналогичные **2a** и **2b**. Однако для анионных тиолатных ДНКЖ следует ожидать большую прочность связей за счет сильных электростатических взаимодействий между отрицательно заряженной сульфидной группой и атомом железа. Кроме того, моделирование гидролиза комплекса $[Fe(SCH_3)_4]^-$ показало отсутствие пентакоординационных промежуточных продуктов [172]. Поэтому были проведены расчеты ассоциативного механизма гидролиза для динитрозильного комплекса железа с метилсульфидными лигандами.

5.3 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 $[Fe_2(\mu\text{-}SCH_3)_2(NO)_4]$, 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 SCH_3 на H_2O, а также промежуточных и переходных состояний для комплекса $[Fe(NO)_2(SCH_3)_2]^-$ (**V**). Схема

ассоциативного механизма гидролиза приведена на рисунке 45. Обозначения реактантов аналогичны ассоциативному механизму для комплекса **I**.

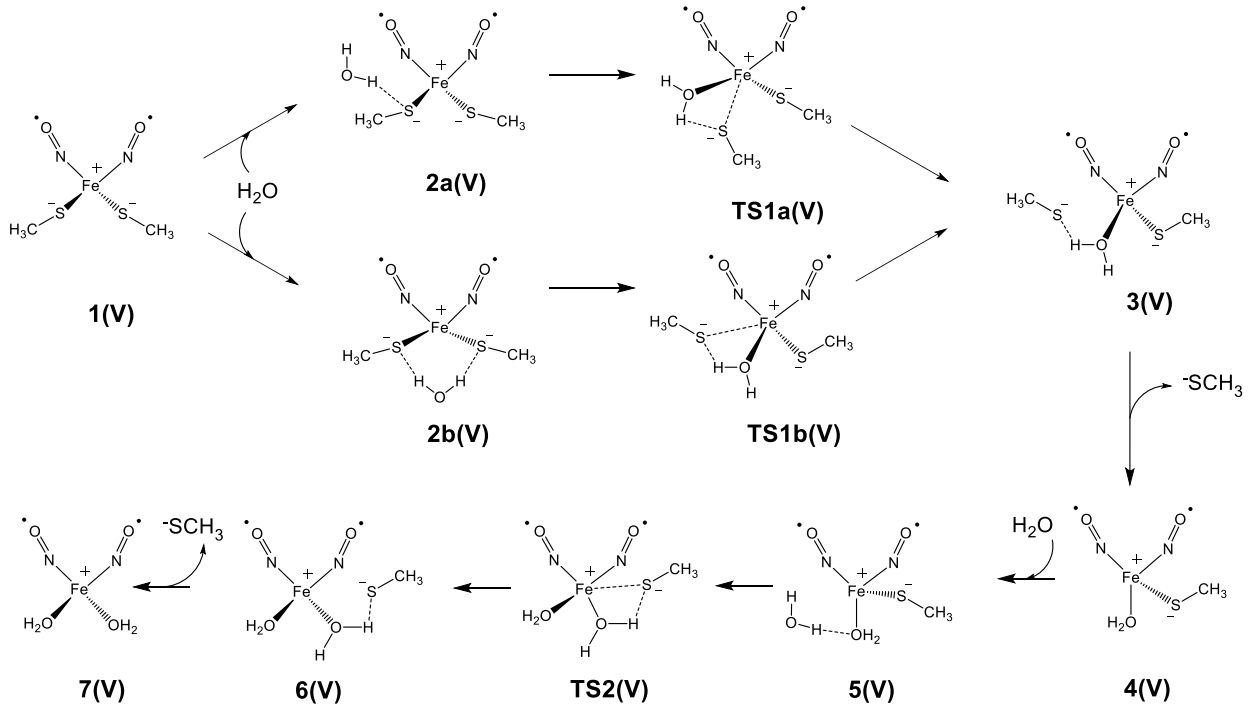


Рисунок 45 – Схема ассоциативного механизма гидролиза комплекса **V**

Единственной устойчивой конформацией комплекса **V** является структура, аналогичная конформации c1 для тиоформальдегида (Рисунок 45, **1(V)**). В отличие от **I** комплекс **V** не образует пентакоординационных интермедиатов с молекулами воды. В структурах **2a(V)** и **2b(V)** (Рисунок 46) H_2O координируется к одному или двум атомам S лигандов, а в структуре **5(V)** образуется H-связь между атомом водорода приближающейся молекулы воды и атомом кислорода координированной к железу молекулы воды. В остальном механизм аналогичен гидролизу тиоформальдегидного комплекса **I**.

Существенно различаются относительные энергии продуктов гидролиза и значения энергетических барьеров (Таблица 22). Поскольку лиганд $^{-}SCH_3$ отрицательно заряжен, связь Fe-S в таком случае будет значительно прочнее, чем в тиоформальдегидном комплексе. Отличается и порядок стабильности переходных состояний для первой ступени: структура **TS1b(V)** лежит на ~16 кДж/моль выше по энергии E_0, чем **TS1a(V)**. Свободная энергия структуры **2b(V)**

оказывается на 5 кДж/моль выше, чем для **2a(V)**. Барьер активации для разрыва связи Fe-S составляет порядка 100 кДж/моль для первого лиганда и 90 кДж/моль для второго.

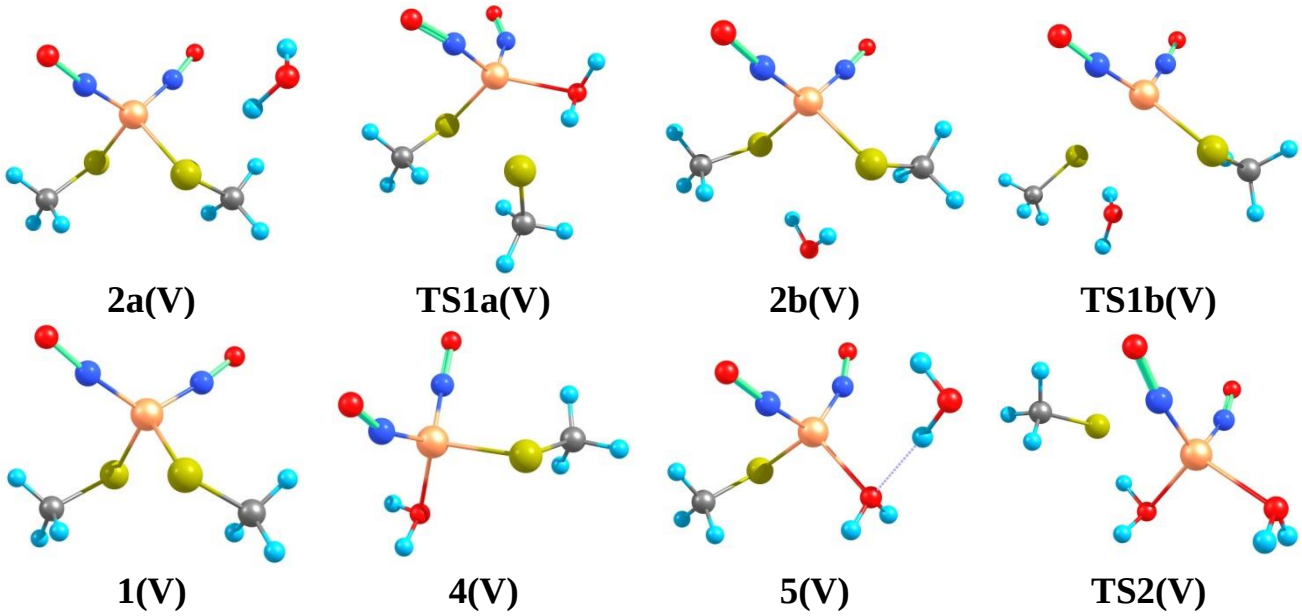


Рисунок 46 – Структуры основных реактантов для ассоциативного механизма гидролиза комплекса **V**

Таблица 22. Энергетические вклады, рассчитанные в TPSSH/def2-TZVP в воде и относительные энергии структур **1-7** для комплекса **V**.

Комплекс	E_{el}	E_{ZPV}	G_T^0	E_0(отн)	G^0(отн)
	а.е.	а.е.	а.е.	кДж/моль	кДж/моль
1(V)	-2400,26407369	0,091475	0,047637	0,0	0,0
2a(V)	-2476,73971879	0,114621	0,065142	-12,9	0,7
TS1a(V)	-2476,70535082	0,114097	0,069371	75,9	102,1
2b(V)	-2476,74199156	0,115802	0,069284	-15,8	5,6
TS1b(V)	-2476,69909891	-	-	-	-
3(V)	-2476,71267700	0,113169	0,064723	54,3	70,6
4(V)	-2038,43185226	0,077458	0,037462	111,6	96,2
4(V)				0,0	0,0
5(V)	-2114,90358219	0,100871	0,054775	28,4	10,5
TS2(V)	-2114,87544251	0,099412	0,056948	108,0	90,1
6(V)	-2114,88029482	0,099511	0,056565	94,3	76,4
7(V)	-1676,59639209	0,062477	0,023603	105,0	95,0
$^-SCH_3$	-438,25955658	0,036294	0,012689	-	-

Образование продуктов гидролиза **4(V)** и **7(V)** носит эндотермический характер. Однако в таблице 22 приведены относительные свободные энергии

реактантов без учета возможности протонирования метилсульфида в воде. Процесс гидролиза комплекса **V** описывается уравнениями

$$[Fe(NO)_2(SCH_3)_2]^- + H_2O \rightleftarrows [Fe(NO)_2(SCH_3)(H_2O)] + CH_3S^- \quad (22)$$

$$[Fe(NO)_2(SCH_3)(H_2O)] + H_2O \rightleftarrows [Fe(NO)_2(H_2O)_2]^+ + CH_3S^- \quad (23)$$

$$CH_3S^- + H^+ \rightleftarrows CH_3SH \quad (24)$$

Тогда свободная энергия гидролиза будет рассчитываться как

$$\Delta G^0_{1,2} = \Delta G^0(1,2) + \Delta G^0(3) = \Delta G^0(1,2) + \frac{RT}{2,3} pK_a(CH_3SH) \quad (25)$$

Здесь $\Delta G^0(1,2)$ – свободные энергии реакции (22) или (23), равные относительным энергиям продуктов **4(V)** и **7(V)** из таблицы 20 соответственно, а $pK_a(CH_3SH)$ – показатель константы кислотности метантиола, принятый равным 10,3 согласно справочным данным [213]. С учетом формулы (25) свободные энергии замещения метилсульфида на H_2O составляют 36,8 кДж/моль для реакции (22) и 35,6 для реакции (23). Полученный результат говорит как о значительно большей термодинамической устойчивости комплекса **V**, так и о его меньшей лабильности.

Также была оптимизирована геометрия и вычислены внутренняя и свободная энергии для димера комплекса **V** в синглетном состоянии. Его структура представлена на рисунке 47.

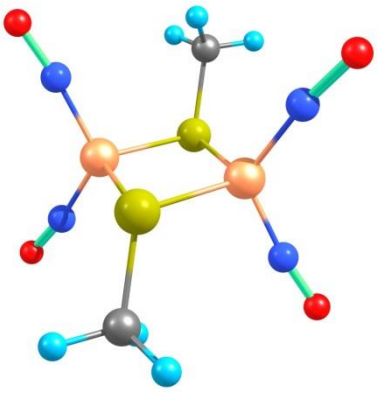


Рисунок 47 – Структура биядерного ТНКЖ на основе метилсульфида

По результатам расчетов в TPSSH/def2-TZVP с учетом протонирования метилсульфида, данный ТНКЖ на 9,4 кДж/моль устойчивее, чем удвоенный моноядерный комплекс **V**. Полученные результаты согласуются с экспериментальными данными о стабильности красного эфира Руссена.

Таким образом, методом квантово-химических расчетов исследованы механизмы гидролиза тиокарбонильных и тиолатных железо-нитрозильных комплексов в бескислородном водном растворе. В следующем параграфе приведены результаты вычисления энергий продуктов гидролиза для ДНКЖ с лигандами, структура которых приведена на рисунке 36.

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

Общая схема гидролиза моноядерных ДНКЖ с тиокарбонильными и тиолатными лигандами представлена на рисунке 48. Возможными продуктами реакций являются комплексы, в которых молекула H_2O замещает один или два серосодержащих лиганда, либо монооксид азота.

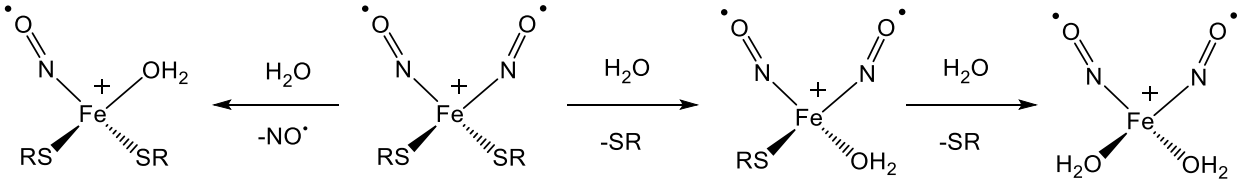


Рисунок 48 – Общая схема гидролиза ДНКЖ

Результаты расчетов относительных энергий продуктов, представленных на рисунке 48, для ДНКЖ **I-VIII** приведены в таблице 23. Полученные данные позволяют судить об устойчивости рассматриваемых комплексов и о прочности связывания $NO^{\bullet}$. Из таблицы 23 видно, что в ряду тиокарбонильных комплексов устойчивость связи Fe-S возрастает в ряду **I<IV<II<III** (см. Рисунок 36). 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 свободными энергиями замещения лигандов на H_2O.

Таблица 23. Энергии продуктов гидролиза для комплексов **I-VIII**, рассчитанные относительно исходного ДНКЖ.

Комплекс	pK_a лиганда	Продукт	E_0(отн)	$^*G^0$(отн)
			кДж/моль	кДж/моль
I	-	$Fe(NO)_2(SR)(H_2O)$	-19,7	-30,2
		$Fe(NO)_2(H_2O)_2$	-28,4	-60,0
		$Fe(NO)(SR)_2(H_2O)$	24,9	16,5
II	-	$Fe(NO)_2(SR)(H_2O)$	32,9	11,6
		$Fe(NO)_2(H_2O)_2$	51,7	1,0
		$Fe(NO)(SR)_2(H_2O)$	74,8	54,1
III	-	$Fe(NO)_2(SR)(H_2O)$	34,6	7,3
		$Fe(NO)_2(H_2O)_2$	58,4	4,4
		$Fe(NO)(SR)_2(H_2O)$	77,5	63,3
IV	-	$Fe(NO)_2(SR)(H_2O)$	22,0	3,3
		$Fe(NO)_2(H_2O)_2$	35,8	-12,7
		$Fe(NO)(SR)_2(H_2O)$	71,6	57,3
V	10,3 [213]	$Fe(NO)_2(SR)(H_2O)$	111,6	96,2 (37,4)
		$Fe(NO)_2(H_2O)_2$	229,3	191,2 (73,6)
		$Fe(NO)(SR)_2(H_2O)$	126,3	105,3
VI	0,66 1,56	$Fe(NO)_2(SR)(H_2O)$	64,9	42,5 (29,9)
		$Fe(NO)_2(H_2O)_2$	137,5	79,3 (66,0)
		$Fe(NO)(SR)_2(H_2O)$	95,5	77,8
VII	8,14 [214]	$Fe(NO)_2(SR)(H_2O)$	81,3	66,1 (19,6)
		$Fe(NO)_2(H_2O)_2$	158,8	117,6 (24,6)
		$Fe(NO)(SR)_2(H_2O)$	108,5	95,2
VIII	8,72 [215]	$Fe(NO)_2(SR)(H_2O)$	74,6	70,8 (21,1)
		$Fe(NO)_2(H_2O)_2$	153,3	140,7 (41,2)
		$Fe(NO)(SR)_2(H_2O)$	-	-

* При расчетах комплексов **V-VIII** в скобках указаны относительные свободные энергии, полученные с учетом констант SH-кислотности лигандов согласно формуле (24)

Для объяснения данной закономерности может быть использовано представление о цвиттер-ионной таутомерии тиоамидов, в результате которой отрицательный заряд локализуется на атоме S, а положительный – на амидной группе. Расчеты, проведенные в теории натурального резонанса в рамках NBO

6.0, предсказывают преобладание цвиттер-ионной формы [112]. Тиобензамид содержит только одну NH_2-группу, поэтому вклад тиоимида будет меньше, чем в случае тиомочевины. В случае тиоформальдегида возможность таутомеризации отсутствует, поэтому комплекс **I** характеризуется наименьшей устойчивостью.

Другим способом оценки корреляции между структурой лиганда и энергетикой гидролиза комплекса может быть использование химической жесткости η, которая численно определяется как половина разности между потенциалом ионизации I и сродством к электрону A для рассматриваемого соединения [216,217]. Для расчета η в системах с замкнутыми оболочками может быть использована теорема Купманса. Тогда химическая жесткость может быть определена как разность энергий LUMO и HOMO орбиталей, деленная на два. Значения η, рассчитанные для лигандов **I-VIII** в воде, приведены в таблице 24.

Таблица 24. Параметры, характеризующие устойчивость ДНКЖ **I-VIII**, рассчитанные в THSSH/Def2-TZVP в воде

Комплекс	$^{*}G^{0}$(отн), кДж/моль	Жесткость лиганда, а.е.	Натуральный заряд на лиганде	Индекс Виберга	
				Fe-S	Fe-N
I	-60,0	0,058	0,447	0,622	1,334
II	1,0	0,098	0,550	0,666	1,346
III	4,4	0,098	0,560	0,671	1,350
IV	-12,7	0,066	0,536	0,658	1,352
V	191,2	0,103	-0,255	0,770	1,418
VI	79,3	0,110	-1,356	0,708	1,386
VII	117,6	0,092	-0,337	0,721	1,388
VIII	140,7	0,066	-0,299	0,745	1,399

* Приведена свободная энергия реакции замещения двух тио-лигандов на H_2O

Полученные результаты качественно согласуются со значениями свободных энергий гидролиза для ДНКЖ с лигандами одной природы: тиомочевина обладает наибольшей жесткостью среди тиокарбонильных молекул и образует наиболее устойчивый железо-нитрозильный комплекс; тиоформальдегид оказался наиболее мягким лигандом, и комплекс **I** с наибольшей легкостью подвергается гидролизу. Аналогичная закономерность наблюдается и для тиолатных лигандов: комплекс с более жестким метилсульфидом более устойчив, чем комплексы с цистеином и

глутатионом. Данный результат подтверждает принцип, согласно которому неорганические системы имеют тенденцию образовывать пары с близкой жесткостью или стремятся достичь максимальной жесткости [218].

Для рассматриваемых комплексов с использованием теории NBO были рассчитаны натуральные заряды на атомах и индексы Виберга, характеризующие прочность связей Fe-S и Fe-N (Таблица 24). Натуральные заряды отражают локализацию молекулярных орбиталей на атомах и для соединений близкой природы могут служить мерой устойчивости координационной связи. Так для тиокарбонильных комплексов наблюдается практически количественное соответствие между свободной энергией замещения серосодержащего лиганда на H_2O и зарядом на атоме S. Такая корреляция не прослеживается в случае тиолатных лигандов, поскольку их природа существенно различается, однако в этом случае атом S обладает значительным отрицательным зарядом, что стабилизирует связывание с катионом железа.

На рисунке 49 представлены корреляции между свободными энергиями замещения лигандов на молекулы воды и индексами Виберга связей Fe-S и Fe-N.

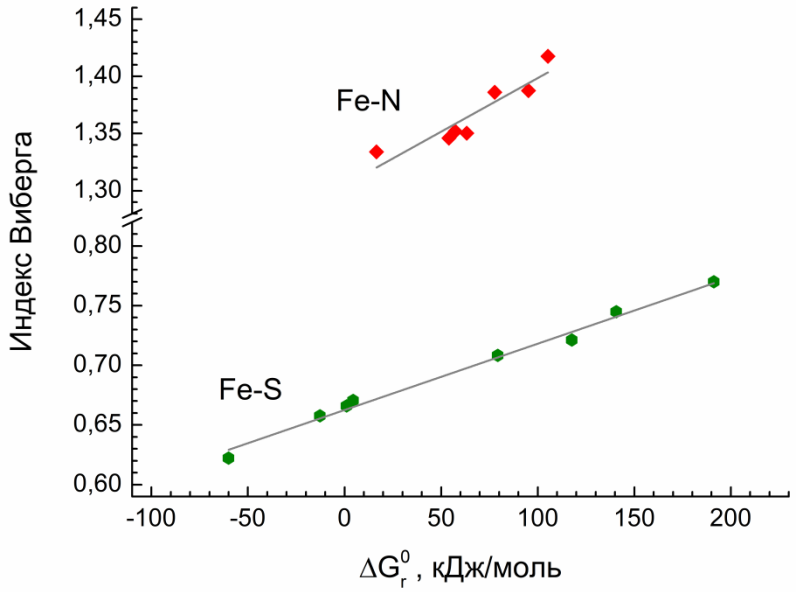


Рисунок 49 – Корреляции между индексами Виберга связей Fe-S и Fe-N и свободными энергиями гидролиза (без учета протонирования) для комплексов **I-VIII**

Ранее в работах [218,219] было показано, что связь железо-сера является ковалентной сильно полярной, но все же менее прочной, чем связь железо-азот. Полученные результаты полностью подтверждают данный вывод: значения индексов Виберга лежат в диапазоне 0,62 – 0,77 для Fe-S и 1,33 – 1,42 для Fe-N (Таблица 24). Как видно по графикам, 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 $NO^{\bullet}$ и донорными свойствами атома серы. Таким образом, на основе данных о строении лиганда можно оценить стабильность динитрозильного комплекса железа и его NO-донорную активность. Конечно, в проведенных расчетах не учитывалось влияние таких факторов как pH среды и присутствие кислорода, однако в настоящее время ведутся как теоретические, так и экспериментальные исследования, которые расширят представления о свойствах и путях превращений ДНКЖ в различных условиях. Так в работе [220] проведены расчеты взаимодействия тиомочевинного железо-нитрозильного комплекса с кислородом.

Как было ранее отмечено, в живых организмах возможной мишенью ДНКЖ является альбумин. Взаимодействие с альбумином приводит к образованию устойчивых белковых ДНКЖ либо к стабилизации исходного комплекса на поверхности протеина. В следующей главе представлены результаты моделирования связывания комплекса **II** с бычьим сывороточным альбумином методами молекулярного докинга и молекулярной динамики.

ГЛАВА 6. МОЛЕКУЛЯРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДИНИТРОЗИЛЬНОГО КОМПЛЕКСА ЖЕЛЕЗА С АЛЬБУМИНОМ

Результаты, описанные в данной главе, опубликованы в работе [208][1].

6.1 Определение параметров силового поля для динитрозильных комплексов железа с тиокарбонильными лигандами

Для описания структуры и свойств железо-нитрозильных комплексов методами молекулярной механики необходимо определить параметры силового поля для данного класса соединений: силовые константы химических связей, валентных и торсионных углов, атомные заряды и ван-дер-ваальсовы радиусы. При этом за основу был взят набор параметров GAFF2, разработанный для широкого спектра молекул. В дополнение к стандартным типам атомов был введен новый тип «fe» для атома железа. Значения равновесных структурных параметров фрагмента $[FeS_2N_2]$ были получены по оптимизированной структуре комплекса **II** (конформация типа c1) в газовой фазе методом TPSSH/6-31+G(d,p). RESP заряды на атомах были получены методом одноточечного расчета в B3LYP/6-311+G(2df,2p) в воде. Атомные параметры для комплекса **II** (Рисунок 50) представлены в таблице 25.

[1] При подготовке данного раздела диссертации использованы следующие публикации, выполненные автором лично или в соавторстве, в которых, согласно Положению о присуждении ученых степеней в МГУ, отражены основные резльтаты, положения и выводы исследования: O. V. Pokidova, V. B. Luzhkov, N. S. Emel'yanova, V. B. Krapivin, A. I. Kotelnikov, N. A. Sanina, S. M. Aldoshin. Effect of albumin on the transformation of dinitrosyl iron complexes with thiourea ligands // Dalton Transactions. – 2020. – Т. 49, № 36. – P. – 12674-12685. Подготовка к публикации полученных результатов проводилась совместно с соавторами, причем вклад Крапивина В. Б. составляет 20%.

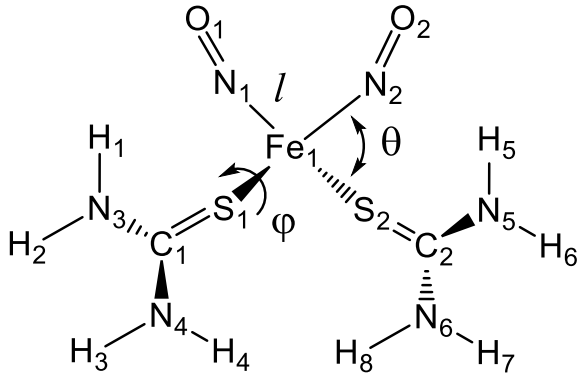


Рисунок 50 – Структура тиомочевинного ДНКЖ **II** (конформация типа c1) с пронумерованными атомами

Значения силовых констант получены путем сканирования ППЭ для комплекса **II** в газовой фазе методом B3LYP/6-31+G(d,p), рекомендованным для определения параметров металло-органических соединений в Amber [183].

Таблица 25. Атомные параметры для моделирования комплекса **II**

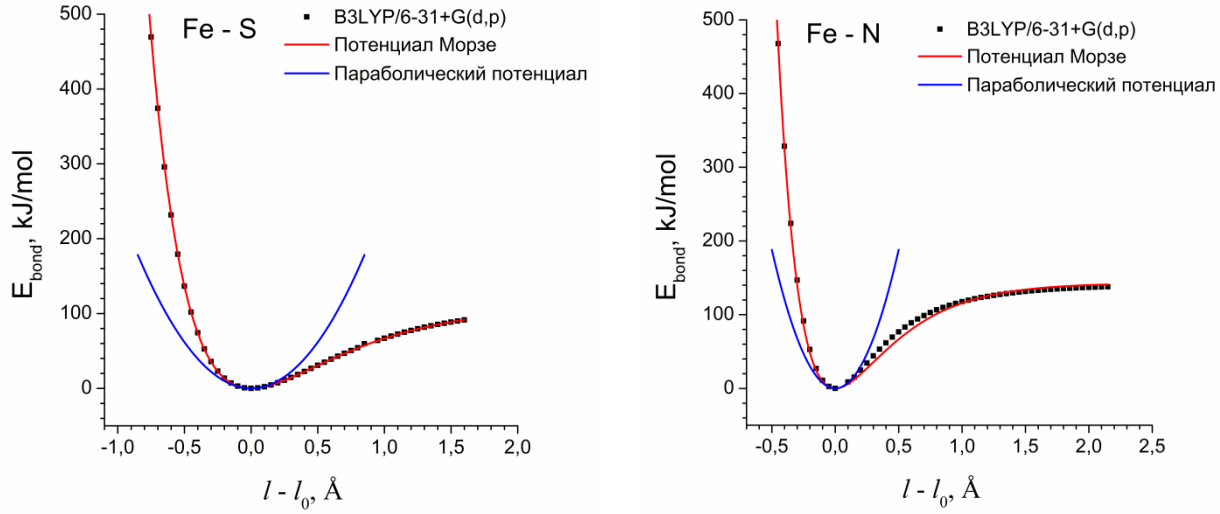
Атом	Тип атома по GAFF	Заряд
Fe_1	fe	-0,2050
N_1	no	0,3862
N_2	no	0,3862
O_1	o	-0,2316
O_2	o	-0,2316
S_1	s2	-0,3213
S_2	s2	-0,3213
C_1	c2	0,4950
C_2	c2	0,4950
N_3	n	-0,6592
N_4	n	-0,7170
N_5	n	-0,6592
N_6	n	-0,7170
H_1	hn	0,4335
H_2	hn	0,3618
H_3	hn	0,4547
H_4	hn	0,4004
H_5	hn	0,4335
H_6	hn	0,3618
H_7	hn	0,4547
H_8	hn	0,4004

Сканирования связей Fe-S и Fe-N осуществлялось с шагом 0,05 Å с оптимизацией остальных геометрических параметров молекулы. Результаты представлены на рисунке 51. Зависимость энергии от межатомного расстояния $l - l_0$ аппроксимировалась методом наименьших квадратов функцией Морзе:

$$E_{bond} = D\left[1 - e^{-\alpha(l-l_0)}\right]^2 \quad (26)$$

Константа связи из уравнения (18) определялась через разложение потенциала Морзе в ряд Тейлора как $K_l = 2\alpha^2 D$.

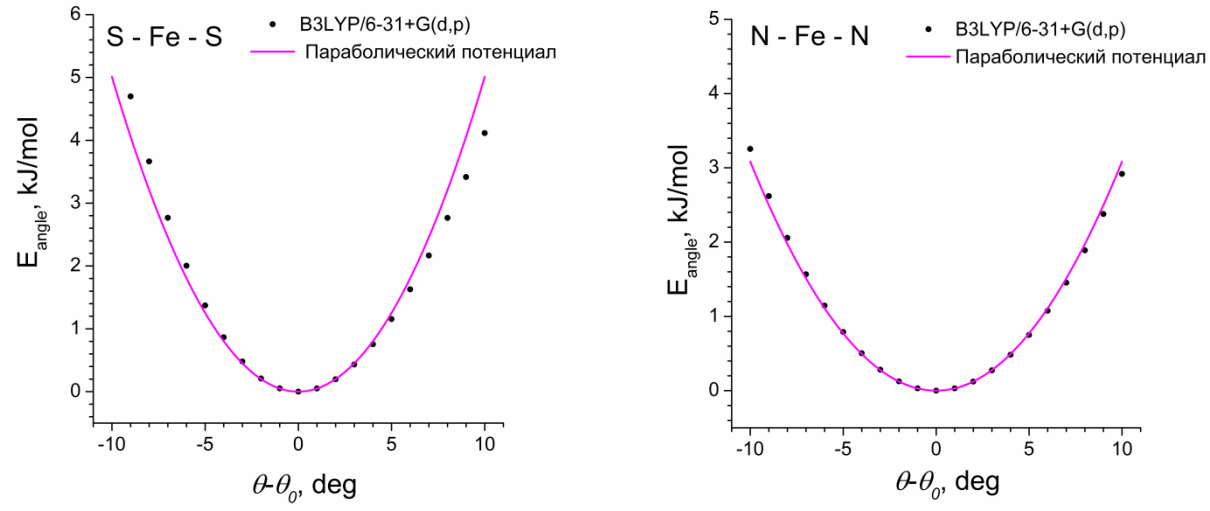
По графикам видно, что гармонический потенциал хорошо воспроизводит расчетные значения энергии при амплитуде колебаний до 0,3 Å, что позволяет описывать колебания химических связей при комнатной температуре.



(*а*) (*б*)

Рисунок 51 – Зависимости потенциальной энергии от длины связи Fe-S (*а*) и Fe-N (*б*) для комплекса **II**

Аналогично были просканированы валентные углы, содержащие атом железа, с шагом 1°. Результаты расчетов были аппроксимированы параболической функцией, содержащей ненулевой коэффициент только при квадратичном члене. Полученные зависимости для углов S-Fe-S и N-Fe-N представлены на рисунке 52.



(*а*) (*б*)

Рисунок 52 – Зависимости потенциальной энергии от значения валентного угла S-Fe-S (*а*) и N-Fe-N (*б*) для комплекса **II**

Поскольку равновесное значение валентного угла Fe-N-O близко к 180°, потенциал вращения вокруг связи Fe-N был принят равным 0. Тогда как для определения барьера вращения вокруг связи Fe-S был рассмотрен поворот лиганда с шагом 15° на примере тиоформальдегидного комплекса **I**. Результат представлен на рисунке 53, барьер вращения составил ~4 кДж/моль. Стоит отметить, что при моделировании металлических центров Amber рекомендует принимать торсионный потенциал для связей металл-лиганд равным 0.

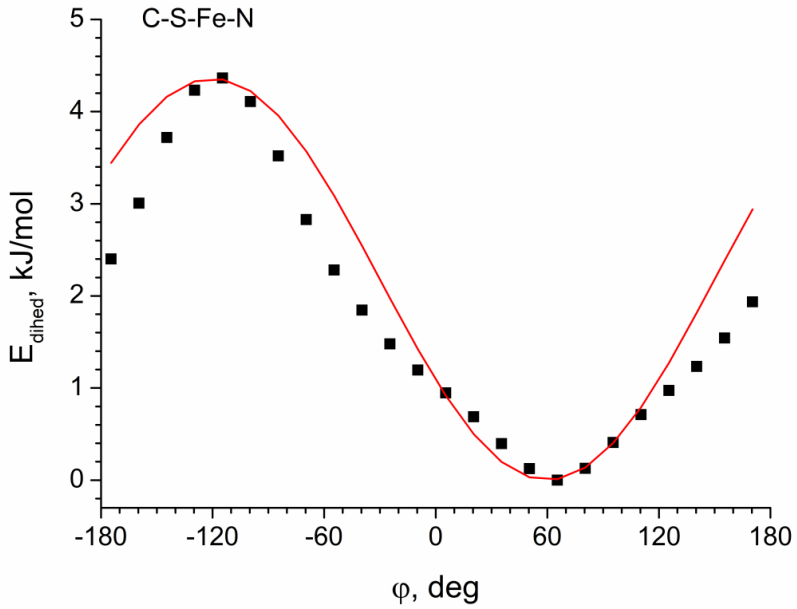


Рисунок 53 – Зависимость потенциальной энергии от торсионного угла, характеризующего вращение вокруг связи Fe-S

Результаты расчетов силовых констант и равновесных параметров для комплекса **II** представлены в таблице 24. Поскольку в силовом поле GAFF в качестве единиц измерения энергии используются калории, значения констант также приведены в кал/моль. По полученным данным константа связи Fe-N составляет 360 ккал/(моль · Å^2) и примерно равна константе фосфодиэфирной связи. Для связи Fe-S силовая константа в три раза меньше и равна 118 ккал/(моль · Å^2). Константы валентных углов тетраэдра в 2-3 раза меньше, чем для метана. Результаты, представленные в таблице 26, позволяют проводить молекулярно-динамическое моделирование тиомочевинного ДНКЖ **II** в водном растворе и на поверхности БСА. Для этого были определены возможные сайты связывания на поверхности протеина методом молекулярного докинга.

Таблица 26. Вычисленные значения параметров силового поля для моделирования комплекса **II**

Связи	K_l, $\frac{\text{ккал}}{\text{моль·Å}^2}$	l_0, Å
Fe – S	118,0	2,33
Fe – N	360,0	1,69
Валентные углы	K_θ, $\frac{\text{кал}}{\text{моль·град}^2}$	θ_0, град
Fe–S–C	24,5	106,8
Fe–N–O	6,6	169,4
S–Fe–S	24,0	106,8
N–Fe–N	14,7	118,8
S–Fe–N	14,5	107,7

Торсионные углы	n	V_n, $\frac{\text{ккал}}{\text{моль·град}}$	γ, град
X–Fe–S–X	1	1,042	0.0
X–Fe–N–X	1	0,000	0.0

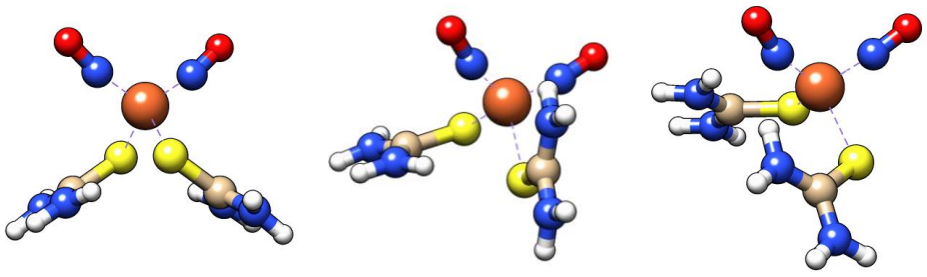
[*]**Ван-дер-ваальсовы параметры**	R_{vdW}, Å	D_{vdW}, $\frac{kcal}{mol}$
Fe	2,912	0,013

[*]Приведены стандартные параметры Amber для железа, используемые в программе Dock6.

6.2 Исследование взаимодействие тиомочевинного железо-нитрозильного комплекса с альбумином методом молекулярного докинга

Для докинга использовалась структура бычьего сывороточного альбумина 4f5s. Экспериментальная геометрия была минимизирована градиентным методом за 100 шагов в воде с использованием обобщенной модели сольватации Борна. Без учета протонирпования остатков гистидина формальный заряд БСА должен составлять -17 при физиологическом pH = 7, однако часть гистидинов может протонироваться. Для учета данного эффекта было проведено *in silico* титрование ионизируемых остатков альбумина с использованием программы Rosetta [195]. Расчеты показали, что все остатки Asp, Glu, Lys и Arg в БСА ионизируются при pH 7, в то время как pK_a гистидинов 9, 105, 246 и 287 составляют 6,8, 7,9, 6,9 и 7,9 соответственно. Таким образом, His105 и His287 были рассмотрены как положительно заряженные, а для His9 и His246 было рассмотрено два состояния: как протонированное, так и нейтральное. Сульфидная группа остатка Cys34 была принята как S^-, поскольку ее эффективное pK_a может быть меньше 5 [221]. Поэтому суммарный заряд БСА в расчетах составлял -14 или -16.

Структура лиганда (комплекса **II**) была получена по результатам квантово-химических расчетов. Оптимизация геометрии проводилась в газовой фазе методом B3LYP в базисе 6-311+G(2df,2p), в качестве стартовой рассматривалась структура, полученная по результатам РСА хлоридной соли комплекса **II** [112]. Были найдены три устойчивые конформации, строение которых аналогичго конформерам c1-c3 тиоформальдегидного комплекса **I** (Рисунок 54).



c1 c2 c3

Рисунок 54 – Конформации комплекса **II**, определенные методом B3LYP/6-311+G(2df,2p) в газовой фазе

Для докинга использовалась жесткая структура лиганда (комплекса **II**), отвечающая наиболее устойчивой конформации типа c1. Две возможные ориентации тиомочевины рассматривались независимо, как зеркально-симметричные структуры [208].

Докинг тиомочевинного комплекса **II** выявил 6 наиболее выгодных сайтов связывания на поверхности альбумина, лежащих в пределах 12,5 кДж/моль (Рисунок 55). Во всех случаях связывание происходит с анионными участками белка. Сайты расположены в домене IA, а также на границах доменов IA и IIA, IIA и IIB.

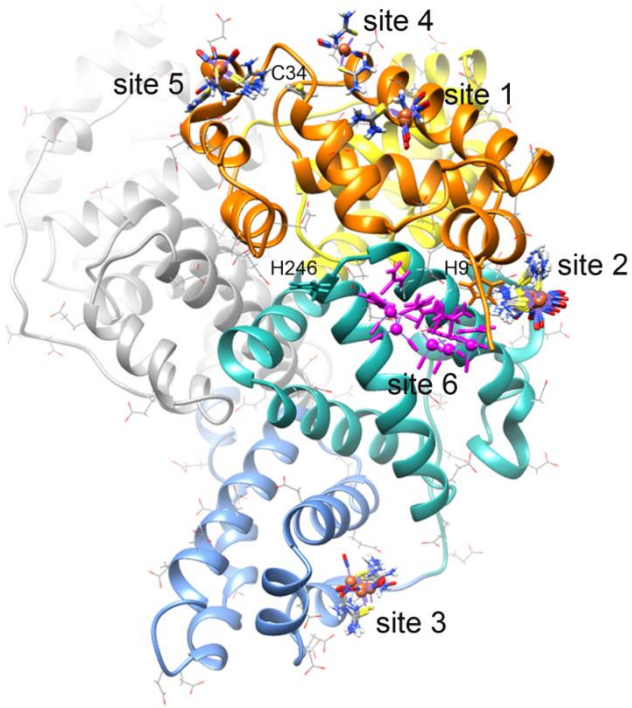
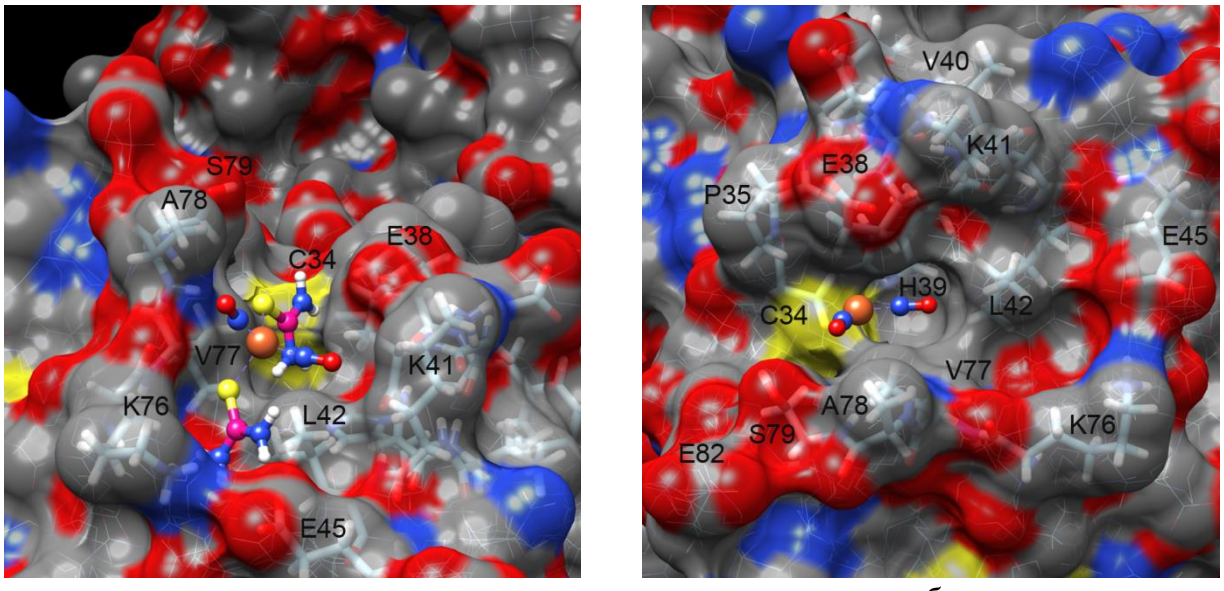


Рисунок 55 – Сайты связывания комплекса **II** на поверхности БСА. Цветом выделены домены: IA – оранжевый, IB – желтый, IIA – светло-зеленый, IIB – синий, IIIA – серый, IIIB – светло-серый [208]

В случае полного заряда БСА -14 наибольшую устойчивость связывания обеспечивает сайт 1, находящийся между двумя спиралями домена IA и образованый отрицательно заряженными остатками Glu45, Asp72. Энергия связывания E_{bind}, рассчитанная по формуле (19), составляет в этом случае -121,4 кДж/моль, а электростатический и ван-дер-ваальсов вклады равны -51,5 и -69,9 кДж/моль соответственно. Относительная устойчивость белок-лигандных

комплексов уменьшается в ряду сайт 1 > сайт 2 > сайт 3 > сайт 4 > сайт 5. При рассмотрении непротонированных His9 и His246 расчет предсказывает появление сайта 6, расположенного в области между двумя этими остатками (Рисунок 56). Порядок устойчивости связывания в случае полного заряда БСА -16 изменяется: сайт 2 > сайт 1 ≈ сайт 6.

Несимметричная конформация c2, имеющая на 5,4 кДж/моль более высокую свободную энергию в воде образует устойчивые белок-лигандные комплексы в сайтах 3 и 4 вблизи остатка Cys34 (Рисунок 56, *а*). Существенный выигрыш в энергии связывания компенсирует разницу в свободных энергиях и делает связывание конформации c1 в сайте 1 и конформации c2 в сайте 4 одинаково благоприятным. При этом стабилизация осуществляется не только за счет электростатического притяжения к отрицательно заряженным карбоксильным группам, но преимущественно за счет неполярных взаимодействий с другими остатками альбумина.



а *б*

Рисунок 56 – Позиции связывания конформации c2 комплекса **II** (*а*) и железо-нитрозильного $Fe(NO)_2^+$ фрагмента (*б*) в сайте 4 [208]

Отдельно было исследовано взаимодействие железо-нитрозильного фрагмента $Fe(NO)_2^+$ с остатком Cys34, располагающимся в гидрофобном кармане альбумина вблизи сайта 4. Для этого был рассчитан потенциал силового поля

внутри куба со стороной 14 Å, полностью охватывающего сайт 4, с шагом 0,2 Å. Расчеты подтвердили координацию фрагмента $Fe(NO)_2^+$ к отрицательно заряженному атому S остатка Cys34 (Рисунок 56, *б*). 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. Расстояние Fe-NE остатка His39 составляет 5,57 Å. За счет подвижности структуры белка железо-нитрозильный фрагмент, вероятно, проникает вглубь гидрофобного кармана с образованием тетраэдрического комплекса –S–$Fe(NO)_2$–NE–.

Таким образом, расчеты методом молекулярного докинга предсказывают связывание комплекса **II** на поверхности БСА за счет электростатических и ван-дер-ваальсовых взаимодействий с боковыми остатками белка. Обнаружено 6 возможных сайтов связывания, наиболее выгодными из которых являются сайты 1 и 4, расположенные вблизи остатка Cys34. Полученные результаты согласуются с экспериментальными данными по высвобождению NO в присутствии альбумина *in vitro*. В работе [208] установлено, что альбумин стабилизирует ДНКЖ **II** и продлевает NO-донорную активность. В главе 5 методами квантовой химии показано, что комплекс **II** достаточно лабильный и в водном растворе способен легко замещать тиомочевинные лиганды молекулами воды, в то время как фрагмент $Fe(NO)_2^+$ значительно более устойчив. Поэтому вероятным процессом будет образование железо-нитрозильного фрагмента, содержащего вакантные места в координационной сфере железа, и его взаимодействие с остатком Cys34. Об образовании высокомолекулярного белкового ДНКЖ, где в качестве лигандов выступают остатки Cys34 и His39, свидетельствует появление полосы при 390 нм в спектре раствора комплекса **II** и БСА [208].

Образование координационного комплекса с альбумином подтверждается также наблюдаемым тушением флюоресценции остатка Trp134. При этом взаимодействия комплекса **II** с поверхностью БСА будут вносить минимальный вклад в данный эффект. Для доказательства устойчивости связывания ДНКЖ с

альбумином в сайтах 1-6 было проведено молекулярно-динамическое моделирование белок-лигандных комплексов с учетом всех внутри- и межмолекулярных взаимодействий и явных молекул воды.

6.3 Молекулярная динамика тиомочевинного железо-нитрозильного комплекса в растворе и в комплексе с альбумином

Для проверки корректности параметров, представленных в таблице 24, был выполнен конформационный анализ ДНКЖ **II** в воде с помощью метода силового поля с использованием обобщенной модели Борна (GBSA). Полученные данные качественно согласуются с результатами квантово-химических расчетов (таблица 25): наименьшей энергией обладает конформация c1, затем с разницей 1,5 кДж/моль идет несимметричная конформация c2, а конформация c3, близкая кристаллической структуре хлоридной соли **II**, имеет энергию 10,1 кДж/моль. ММ расчет также предсказывает существование высокоэнергетической симметричной конформации c4 (Рисунок 57), характерной для тиоформальдегидного комплекса **I**, но не обнаруженной для комплекса **II** методами квантовой химии.

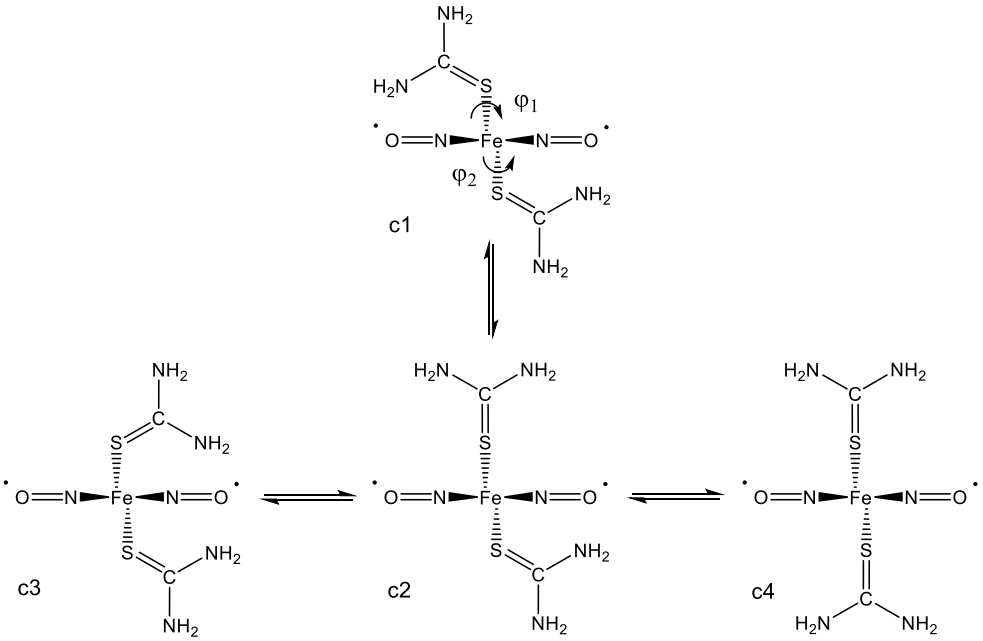


Рисунок 57 – Схема конформационных переходов
для тиомочевинного ДНКЖ **II**

Для найденных структур c1-c4 было проведено МД моделирование в модели периодической кубической решетки с учетом явных молекул воды (Рисунок 58). Заселенность различных конформаций, полученная при анализе траекторий в 1 нс, представлена в таблице 27.

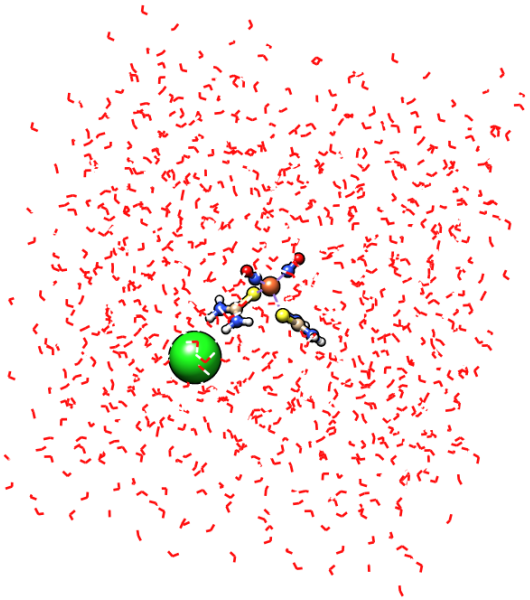


Рисунок 58 – Кубический водный ящик для МД моделирования конформационной подвижности комплекса **II**. Для нейтрализации заряда добавлен хлорид-анион

Таблица 27. Основные характеристики конформаций комплекса **II** в воде по данным расчетов методами молекулярной механики и молекулярной динамики

Конформация	стат. вес	φ_1, град.	φ_2, град.	E(отн), кДж/моль	Заселенность, %	
					GBSA	МД
c1	2	60 -60	60 -60	0,0	63,20	45,05
c2	4	180 180 60 -60	60 -60 180 180	1,5	34,43	42,05
c3	2	60 -60	-60 60	10,1	1,06	4,50
c4	1	180	180	9,6	1,31	8,40

Результаты молекулярной динамики хорошо согласуются с расчетами внутренних энергий конформеров методом GBSA. Таким образом, найденные параметры силового поля позволяют моделировать ДНКЖ **II**, поэтому

следующим шагом стало проведение МД расчетов белок-лигандных комплексов, найденных методом докинга.

Структуры БСА с лигандом **II** со стартовой конформацией c1, находящимся в сайтах 1-6, были помещены в кубическую ячейку из молекул воды (Рисунок 59), а нескомпенсированный заряд белка был нейтрализован добавлением ионов Na^+ с использованием программного модуля AmberTools.

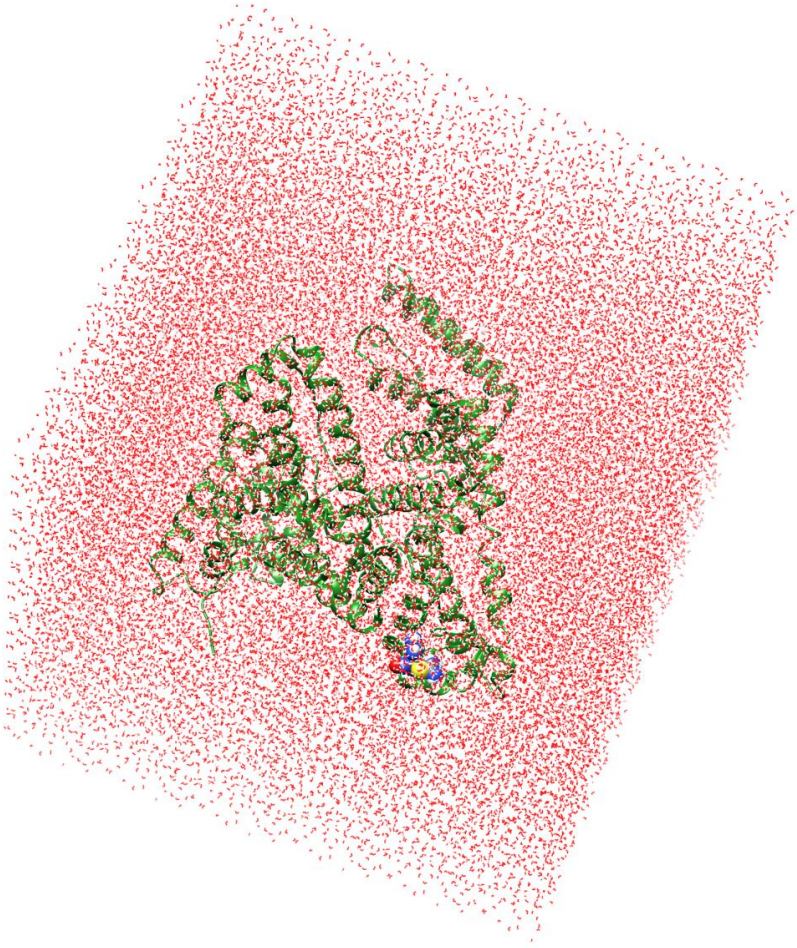


Рисунок 59 – Структура ячейки, содержащей белок-лигандный комплекс, окруженный молекулами воды

Для сайтов 2 и 6 суммарный заряд альбумина составлял -16, а для остальных сайтов -14. Перед началом моделирования система была оптимизирована за 100 шагов с целью исключения возможных близких контактов атомов. Затем был осуществлен нагрев до температуры 300 К при постоянном объеме ячейки. МД моделирование проводилось в течение 10 нс в NPT-ансамбле с сохранением координат и скоростей каждую 1 пс. Файлы траекторий

анализировались с использованием программ Vega ZZ [187] и VMD [182], а также скриптового языка программирования tcl. При анализе рассчитывались полные энергии, среднеквадратичные отклонения (RMSD) относительных координат атомов протеина и лиганда, а также торсионные углы φ_1 и φ_2, определяющие конформацию комплекса **II**.

В таблице 28 представлены заселенности различных конформаций комплекса **II** на поверхности альбумина. На большей части траектории для всех сайтов преобладают конформеры c1 и c2, причем несимметричная конформация c2 реализуется на участке, составляющем около 90 % траектории в случае сайтов 1 и 3. Конформация c1 преобладает в сайте 6. Во всех случаях ДНКЖ **II** остается на поверхности альбумина в течение 10 нс, что подтверждает относительную устойчивость связывания.

Таблица 28. Заселенности (%) различных комплекса **II** на поверхности БСА по данным МД расчетов

Сайт	c1	c2	c3	c4
1	5,90	88,22	2,08	3,80
2	43,13	41,68	14,9	0,29
3	9,08	87,96	0,69	2,27
4	38,84	52,13	8,06	0,98
5	34,13	54,71	8,31	2,84
6	59,85	33,07	5,37	1,71

На рисунке 60 приведены RMSD белка и лиганда для сайтов 1-6. Графики наглядно демонстрируют конформационные переходы комплекса **II**. При этом структура БСА оказывается достаточно устойчивой в случае сайтов 1-3, тогда как для сайтов 4-6 наблюдается увеличение отклонения в течение всего времени моделирования. Тем не менее, доменная структура альбумина сохраняется во всех траекториях молекулярной динамики, а большое отклонение может быть связано с подвижностью концевых остатков.

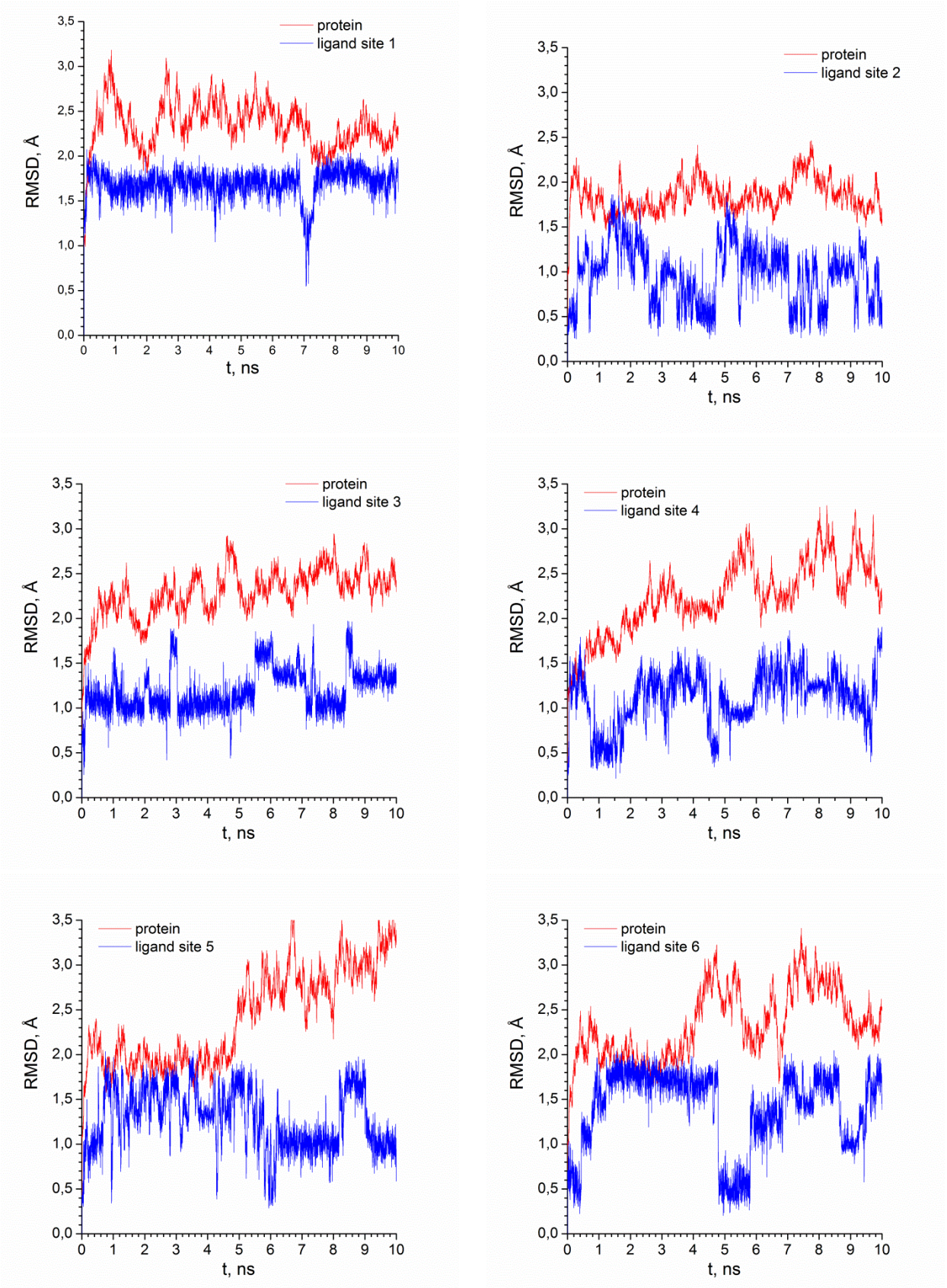


Рисунок 60 – Временные зависимости RMSD альбумина (protein) и ДНКЖ **II** (ligand), полученные в ходе МД моделирования белок-лигандных комплексов

Таким образом, методами молекулярной механики дана структурная интерпретация неспецифического связывания тиомочевинного железо-нитрозильного комплекса на поверхности БСА без образования высокомолекулярных белковых ДНКЖ. Наличие шести устойчивых сайтов подтверждает результаты экспериментальных исследований, показывающих возможность связывания альбумином до 5 железо-нитрозильных комплексов [208]. Два из шести сайтов расположены в непосредственной близости от остатка Cys34, что открывает возможность специфического взаимодействия нитрозильного фрагмента $Fe(NO)_2^+$, образующегося в результате распада комплекса **II**, с сульфидной группой цистеина 34 и азотом гистидина 39. Моделирование показало, что образование координационных связей Fe–S и Fe–N может быть достигнуто за счет проникновения $Fe(NO)_2^+$ в гидрофобный карман в направлении His39, которое требует согласованного вращения боковой цепи Leu42 и Val77. Таким образом, в работе показано, что альбумин принимает активное участие в биотрансформации железо-нитрозильного комплекса **II** и способен модулировать биологическую активность ДНКЖ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Циклические нитроксильные радикалы обладают уникальными окислительно-восстановительными свойствами, что делает их перспективными биологическими агентами с антиоксидантной активностью. Важной характеристикой нитроксилов, позволяющей прогнозировать их биологическую активность, является электрохимический потенциал. Теоретический расчет редокс-потенциалов позволяет предсказывать свойства новых нитроксильных радикалов и создавать производные с заданными свойствами. Модификация физиологически активных молекул и других биологических объектов нитроксил-содержащими соединениями позволяет исследовать данные объекты магниторезонансными методами за счет наличия неспаренного электрона на группе NO˙. Кроме того, нитроксильные производные могут обладать синергетическим эффектом.

Квантово-химические расчеты электрохимических потенциалов ряда пяти- и шестичленных НР в воде показали хорошее соответствие с экспериментальными данными при использовании ТФП функционалов B3LYP и M062X в сочетании с континуумной моделью сольватации PCM(SMD). При этом для структурно жестких молекул достаточно учитывать одну, низшую по энергии, конформацию реактантов. Использование модели термодинамического цикла, когда оптимизация геометрии и расчет термохимического вклада производятся в газовой фазе, а свободная энергия сольватации определяется методом одноточечного расчета, также дает хорошие результаты. В то же время для гибких молекул данный подход приводит к систематическим ошибкам, связанным с конформационной подвижностью и влиянием растворителя на равновесную геометрию реагирующих частиц. Поэтому более точные результаты дает оптимизация геометрии в воде и учет множественных конформаций. С использованием данных подходов в работе оценены потенциалы реакций окисления и восстановления нитроксильных производных фуллерена C_{60} и олигомеров хитозана.

Полисахарид хитозан представляет интерес как перспективное средство доставки лекарственных средств за счет растворимости в воде, способности образовывать мицеллы, широкому спектру биологической активности и наличию возможностей для химической модификации. Нитроксил-содержащие производные хитозана показали себя как активные антиоксиданта с улучшенными транспортными свойствами. Активность таких соединений определяется как свойствами нитроксильного заместителя, так и структурой производных, зависящей от внутри- и межмолекулярных взаимодействий присоединенного нитроксила со звеньями глюкозамина. Проведенные молекулярно-механическте расчеты позволили определить факторы, влияющие на гибкость основной цепи хитозана, и изучить механизм конформационной подвижности. Установлено влияние заместителей на основе 2,2,6,6-тетраметилпиперидин-N-оксила и 2,2,5,5-тетраметилпирролин-N-оксила на подвижность гликозидных связей в хитозан-нитроксилах, содержащих от 3 до 6 звеньев глюкозамина. В работе также выполнены квантово-химические расчеты окислительно-восстановительных потенциалов данных соединений.

В отличие от нитроксильных радикалов динитрозильные комплексы железа способны высвобождать молекулы NO˙, что делает их донорами монооксида азота. Поэтому их биологическая активность будет определяться количеством и скоростью выделения NO˙, которые зависят от структуры комплекса и условий окружающей среды. Известно, что в организмах живых существ ДНКЖ образуются на основе молекул, содержащих свободные SH-группы, причем наиболее устойчивыми являются высокомолекулярные белковые комплексы. В то же время синтетические ДНКЖ на основе серосодержащих низкомолекулярных лигандов представляют интерес при создании новых лекарственных средств за счет высокой лабильности и синергетического действия лигандов. В настоящей работе исследованы реакции распада катионных тиокарбонильных и анионных тиолатных ДНКЖ в бескислородном водном растворе квантово-химическими методами. Для модельных комплексов на основе тиоформальдегида и метилсульфида получены структуры промежуточных соединений и переходных

состояний для реакций замещения тиолигандов на молекулы воды. Оценены свободные энергии и энергетические барьеры реакций. Для ряда структурных аналогов данных комплексов, полученных экспериментально, определены свободные энергии продуктов гидролиза. Полученные результаты позволяют оценить устойчивость и потенциальную активность ДНКЖ на основе данных об их химической структуре.

Попадая в организм, железо-нитрозильные комплексы связываются с белками плазмы крови, в первую очередь с альбумином. Экспериментальные исследования *in vitro* показали, что альбумин не только образует высокомолекулярные ДНКЖ за счет взаимодействия остатков цистеина и гистидина с железом, но также способен стабилизировать исходные комплексы, связывая их на поверхности электростатическими и ван-дер-ваальсовыми силами и продлевая NO-донорную активность. Было установлено, что одна молекула альбумина связывает до 5 железо-нитрозильных комплексов на основе тиомочевины. В данной работе методом молекулярного докинга найдены 6 возможных сайтов связывания тиомочевинных ДНКЖ на поверхности БСА. Устойчивость связывания подтверждена молекулярно-динамическим моделированием, проведенным с использованием разработанных параметров силового поля для тиокарбонильных ДНКЖ.

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 нитроксилов.

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.

Список сокращений и условных обозначений

АФК	активные формы кислорода
БСА	бычий сывороточный альбумин
ДМФА	диметилформамид
ДНКЖ	динитрозильные комплексы железа
ИК	инфракрасный
ККМ	критическая концентрация мицеллообразования
МД	молекулярная динамика
ММ	молекулярная механика
НАДФ	Никотинамидадениндинуклеотидфосфат
НКЖ	нитрозильные комплексы железа
НР	нитроксильные радикалы
РСА	рентгеноструктурный анализ
СА	степень ацилирования
СВЭ	стандартный водородный электрод
СОД	супероксиддисмутаза
СП	силовое поле
ТЕМПО	2,2’,6,6’-тетраметилпиперидин-N-оксил
ТНКЖ	тетранитрозильные комплексы железа
ТФП	теория функционала плотности
ТЦ	термодинамический цикл
ЭПР	электронный парамагнитный резонанс
NPT	изобарно-изотермический ансамбль
NVT	изохорически-изотермический ансамбль
PDB	Protein Data Bank
RMSD	root-mean-square deviation, среднеквадратичное отклонение

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Puoliväli J. The radical scavenger IAC (bis(1-hydroxy-2,2,6,6-tetramethyl-4-piperidinyl)decantionate) decreases mortality, enhances cognitive functions in water maze and reduces amyloid plaque burden in hAβPP transgenic mice / J. Puoliväli, A. Nurmi, T. K. Miettinen et al. // Journal of Alzheimer's Disease. – 2011. – Т. 27, № 3. – С. 499-510.
2. Liang Q. Neuroprotective effects of TEMPOL in central and peripheral nervous system models of Parkinson's disease / Q. Liang, A. D. Smith, S. Pan et al. // Biochemical pharmacology. – 2005. – Т. 70, № 9. – С. 1371-1381.
3. Neil S. Oral administration of the nitroxide radical TEMPOL exhibits immunomodulatory and therapeutic properties in multiple sclerosis models / S. Neil, J. Huh, V. Baronas et al. // Brain, behavior, and immunity. – 2017. – Т. 62. – С. 332-343.
4. Nassar T. Effects of the superoxide dismutase-mimetic compound TEMPOL on endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats / T. Nassar, B. Kadery, C. Lotanet al. // European Journal of Pharmacology. – 2002. – Т. 436. – С. 111-118.
5. Gelvan D. Cardiac reperfusion damage prevented by a nitroxide free radical / D. Gelvan, P. Saltman, S. R. Powell // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1991. – Т. 88, № 11. – С. 4680-4684.
6. Izmaylov D. M. Geroprotector efficiency depends on viability of control population: life span investigation in D. melanogaster / D. M. Izmaylov, L. K. Obukhova // Mechanisms of ageing and development. – 1996. – Т. 91, № 3. – С. 155-164.
7. Schubert R. Cancer chemoprevention by the antioxidant TEMPOL in Atm-deficient mice / R. Schubert, L. Erker, C. Barlow et al. // Human molecular genetics. – 2004. – Т. 13, № 16. – С. 1793-1802.
8. Krainz T. A mitochondrial-targeted nitroxide is a potent inhibitor of ferroptosis / T. Krainz, M. M. Gaschler, C. Lim // ACS central science. – 2016. – Т. 2, № 9. – С. 653-659.

9. Ilium L. Chitosan and its use as a pharmaceutical excipient // Pharmaceutical research. – 1998. – T. 15, № 9. – C. 1326-1331.
10. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications // Progress in polymer science. – 2006. – T. 31, № 7. – C. 603-632.
11. Kato Y. Application of chitin and chitosan derivatives in the pharmaceutical field / Y. Kato, H. Onishi, Y. Machida // Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2003. – T. 4, № 5. – C. 303-309.
12. Cunha T. et al. Biological and pharmacological activity of chitosan and derivatives // Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics. – 2012. – C. 75-92.
13. Oliver S. Enhancing the therapeutic effects of polyphenols with macromolecules / S. Oliver, O. Vittorio, G. Cirillo, C. Boyer // Polymer Chemistry. – 2016. – T. 7, № 8. – C. 1529-1544.
14. Il'ina A. V. Neutralization of reactive oxygen species by chitosan and its derivatives in vitro/in vivo / A. V. Il'ina, V. P. Varlamov // Applied biochemistry and microbiology. – 2016. – T. 52, № 1. – C. 1-14.
15. Sogias I. A. Why is chitosan mucoadhesive? / I. A. Sogias, A. C. Williams, V. V. Khutoryanskiy // Biomacromolecules. – 2008. – T. 9, № 7. – C. 1837-1842.
16. Tsao C. T. Kinetic study of acid depolymerization of chitosan and effects of low molecular weight chitosan on erythrocyte rouleaux formation / C. T. Tsao, C. H. Chang, Y. Y. Lin et al. // Carbohydrate research. – 2011. – T. 346, № 1. – C. 94-102.
17. Yalpani M. Some chemical and analytical aspects of polysaccharide modifications. III. Formation of branched-chain, soluble chitosan derivatives / M. Yalpani, L. D. Hall // Macromolecules. – 1984. – T. 17, № 3. – C. 272-281.
18. Sen V. D. Low molecular chitosan–(poly) nitroxides: Synthesis and evaluation as antioxidants on free radical-induced erythrocyte hemolysis / V. D. Sen, E. M. Sokolova, N. I. Neshev et al. // Reactive and Functional Polymers. – 2017. – T. 111. – C. 53-59.
19. Sen V. D. Amphiphilic chitosan–polyaminoxyls loaded with daunorubicin: Synthesis, antioxidant activity, and drug delivery capacity / V. D. Sen, A. A.

Balakina, T. S. Stupina et al. // International Journal of Biological Macromolecules. – 2021. – T. 193. – C. 965-979.

20. Aldoshin S. M. A new class of nitric oxide donors / S. M. Aldoshin, N. A. Sanina, M. I. Davydov, E. I Chazov // Herald of the Russian Academy of Sciences. – 2016. – T. 86, № 3. – C. 158-163.
21. Lewandowska H. Nitrosyl iron complexes – synthesis, structure and biology / H. Lewandowska, M. Kalinowska, K. Brzóska et al. // Dalton Transactions. – 2011. – T. 40, № 33. – C. 8273-8289.
22. Lala P. K. Significance of nitric oxide in carcinogenesis, tumor progression and cancer therapy // Cancer and Metastasis Reviews. – 1998. – T. 17, № 1. – C. 1.
23. Janczyk A. NO-dependent phototoxicity of Roussin's black salt against cancer cells / A. Janczyk, A. Wolnicka-Glubisz, A. Chmura et al. // Nitric Oxide. – 2004. – T. 10, № 1. – C. 42-50.
24. Sanina N. A. Structure and properties of iron nitrosyl complexes with functionalized sulfur-containing ligands / N. A. Sanina, S. M. Aldoshin // Russian Chemical Bulletin. – 2011. – T. 60, № 7. – C. 1223-1251.
25. Leach A. R., Molecular modelling: principles and applications. – Pearson education, 2001.
26. Cramer C. J. Essentials of computational chemistry: theories and models. – John Wiley & Sons, 2013.
27. Лужков В. Б. Квантовохимические исследования структурных характеристик и реакционной способности ингибиторов свободно-радикальных процессов в химических и биологических системах : дис. д-ра химических наук : 02.00.04 / Рос. АН Ин-т хим. физ. в Черноголовке. – Черноголовка, 1992. – 323 с. : ил.
28. Jorgensen W. L. The many roles of computation in drug discovery / W. L. Jorgensen // Science. – 2004. – T. 303, № 5665. – C. 1813-1818.
29. Varfolomeev S. D. Computer simulation in molecular medicine and drug design / S. D. Varfolomeev, S. V. Lushchekina, A. V. Nemukhin // Herald of the Russian Academy of Sciences. – 2016. – T. 86, № 3. – C. 185-192.

30. Luzhkov V. B. Molecular modelling and free-energy calculations of protein-ligand binding / V. B. Luzhkov // Russian Chemical Reviews. – 2017. – Т. 86, № 3. – С. 211-230.
31. Åqvist J. Ligand binding affinities from MD simulations / J. Åqvist, V. B. Luzhkov, B. O. Brandsdal // Accounts of chemical research. – 2002. – Т. 35, № 6. – С. 358-365.
32. Luzhkov V. Microscopic models for quantum mechanical calculations of chemical processes in solutions: LD/AMPAC and SCAAS/AMPAC calculations of solvation energies / V. Luzhkov, A. Warshel // Journal of Computational Chemistry. – 1992. – Т. 13, № 2. – С. 199-213.
33. Kapusta D. P. Effect of solvation water shells on enzyme active sites in zinc-dependent hydrolases / D. P. Kapusta, D. A. Firsov, M. G. Khrenova et al. // Structural Chemistry. – 2019. – Т. 30, № 2. – С. 481-488.
34. Kollman P. A. Calculating structures and free energies of complex molecules: combining molecular mechanics and continuum models / P. A. Kollman, I. Massova, C. Reyes et al. // Accounts of chemical research. – 2000. – Т. 33, № 12. – С. 889-897.
35. Kohn W. Self-consistent equations including exchange and correlation effects / W. Kohn, L. J. Sham // Physical review. – 1965. – Т. 140, № 4A. – С. A1133.
36. Розанцев Э. Г., Жданов Р. И. Нитроксильные радикалы: синтез, химия, приложения. М.: Наука. – 1987. – С. 271.
37. Karoui H. Stable radicals: fundamentals and applied aspects of odd-electron compounds / H. Karoui, F. Le Moigne, O. Ouari, P. Tordo // Nitroxide radicals: properties, synthesis and applications / R.G. Hicks, Wiley, Chichester, – 2010. – Т. 5. – С. 173
38. Плисс Е. М., Сень В. Д., Тихонов И. В. Нитроксильные радикалы в химических и биохимических процессах // М.: LAPLAMBERT Academic Publishing. – 2013. – С. 55.
39. Розанцев Э.Г. Свободные иминоксильные радикалы. – М.: Химия – 1970. – С. 216.

40. Бучаченко А.Л., Вассерман А.М. Стабильные радикалы. – М.: Химия. – 1973. – С. 408.
41. Chatgilialoglu C., Studer A. Encyclopedia of radicals in chemistry, biology, and materials // – Ltd : John Wiley & Sons, – 2012. – Т. 2. – С. 561-600.
42. Gryn'ova G. Computational Design of Cyclic Nitroxides as Efficient Redox Mediators for Dye-Sensitized Solar Cells / G. Gryn'ova, J. M. Barakat, J. P. Blinco et al. // Chemistry–A European Journal. – 2012. – Т. 18, № 24. – С. 7582-7593.
43. Soule B. P. The chemistry and biology of nitroxide compounds / B. P. Soule, F. Hyodo, K. I. Matsumoto et al. // Free Radical Biology and Medicine. – 2007. – Т. 42, № 11. – С. 1632-1650.
44. Aronovitch Y. Dual activity of nitroxides as pro-and antioxidants: catalysis of copper-mediated DNA breakage and H2O2 dismutation / Y. Aronovitch, D. Godinger, A. Israeli et al. // Free Radical Biology and Medicine. – 2007. – Т. 42, № 9. – С. 1317-1325.
45. Wilcox C. S. Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress // Pharmacology & therapeutics. – 2010. – Т. 126, № 2. – С. 119-145.
46. Griesser M. The catalytic reaction of nitroxides with peroxyl radicals and its relevance to their cytoprotective properties / M. Griesser, R.Shah, A. T. Van Kessel et al. // Journal of the American Chemical Society. – 2018. – Т. 140, № 10. – С. 3798-3808.
47. Hicks R. (ed.). Stable radicals: fundamentals and applied aspects of odd-electron compounds. – John Wiley & Sons. – 2011. – С. 620.
48. Samuni A. A novel metal-free low molecular weight superoxide dismutase mimic / A. Samuni, C. M. Krishna, P. Riesz et al. // Journal of Biological Chemistry. – 1988. – Т. 263, № 34. – С. 17921-17924.
49. Mitchell J. B. Biologically active metal-independent superoxide dismutase mimics / J. B. Mitchell, A. Samuni, M. C. Krishna et al. // Biochemistry. – 1990. – Т. 29, № 11. – С. 2802-2807.
50. Krishna M. C. Oxoammonium cation intermediate in the nitroxide-catalyzed dismutation of superoxide / M. C. Krishna, D. A. Grahame, A. Samuni et al. //

Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – T. 89, № 12. – C. 5537-5541.

51. Krishna M. C. Do Nitroxide Antioxidants Act as Scavengers of O 2−˙ or as SOD Mimics? / C. M. Krishna, A. Russo, J. B. Mitchell et al. // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – T. 271, № 42. – C. 26026-26031.
52. Amorati R. TEMPO reacts with oxygen-centered radicals under acidic conditions / R. Amorati, G. F. Pedulli, D. A. Pratt, L. Valgimigli // Chemical communications. – 2010. – T. 46, № 28. – C. 5139-5141.
53. Haidasz E. A. Acid is key to the radical-trapping antioxidant activity of nitroxides / E. A. Haidasz, D. Meng, R. Amorati et al. // Journal of the American Chemical Society. – 2016. – T. 138, № 16. – C. 5290-5298.
54. Maillard B. Rate constants for the reactions of free radicals with oxygen in solution / B. Maillard, K. U. Ingold, J. C. Scaiano // Journal of the American Chemical Society. – 1983. – T. 105, № 15. – C. 5095-5099.
55. Beckwith A. L. J. Kinetics of nitroxide radical trapping. 1. Solvent effects / A. L. J. Beckwith, V. W. Bowry, K. U. Ingold //Journal of the American Chemical Society. – 1992. – T. 114, № 13. – C. 4983-4992.
56. Bowry V. W. Kinetics of nitroxide radical trapping. 2. Structural effects / V. W. Bowry, K. U. Ingold // Journal of the American Chemical Society. – 1992. – T. 114, № 13. – C. 4992-4996.
57. Mendkovich A. S. Influence of the nature of solvent and substituents on the oxidation potential of 2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl derivatives / A. S. Mendkovich, V. B. Luzhkov, M. A. Syroeshkin et al. // Russian Chemical Bulletin. – 2017. – T. 66, № 4. – C. 683-689.
58. Hansch C. A survey of Hammett substituent constants and resonance and field parameters / C. Hansch, A. Leo, R. W. Taft // Chemical reviews. – 1991. – T. 91, №. 2. – C. 165-195.
59. Sen’ V. D. Kinetics and thermodynamics of reversible disproportionation–comproportionation in redox triad oxoammonium cations–nitroxyl radicals–

hydroxylamines / V. D. Sen', I. V. Tikhonov, L. I. Borodin et al. // Journal of Physical Organic Chemistry. – 2015. – T. 28, № 1. – C. 17-24.

60. Hodgson J. L. One-electron oxidation and reduction potentials of nitroxide antioxidants: A theoretical study / J. L. Hodgson, M. Namazian, S. E. Bottle, M. L. Coote // The Journal of Physical Chemistry A. – 2007. – T. 111, № 51. – C. 13595-13605.
61. Israeli A. Kinetics and mechanism of the comproportionation reaction between oxoammonium cation and hydroxylamine derived from cyclic nitroxides / A. Israeli, M. Patt, M. Oron et al. // Free Radical Biology and Medicine. – 2005. – T. 38, № 3. – C. 317-324.
62. McEwen C. N. C60 as a radical sponge / C. N. McEwen, R. G. McKay, B. S. Larsen // Journal of the American Chemical Society. – 1992. – T. 114, № 11. – C. 4412-4414.
63. Krusic P. J. Radical reactions of C60 / P. J. Krusic, E. Wasserman, P. N. Keizer et al. // Science. – 1991. – T. 254, № 5035. – C. 1183-1185.
64. Gubskaya V. P. Synthesis, structure and biological activity of nitroxide malonate methanofullerenes / V. P. Gubskaya, L. S. Berezhnaya, A. T. Gubaidullin et al. // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2007. – T. 5, № 6. – C. 976-981.
65. R. A. A. Muzzarelli. Chemical and Technological Advances in Chitins and Chitosans Useful for the Formulation of Biopharmaceuticals // Chitosan-Based Systems for Biopharmaceuticals: Delivery, Targeting and Polymer Therapeutics. – 2012. – C. 3-21.
66. Sannan T. Studies on chitin, 2. Effect of deacetylation on solubility / T. Sannan, K. Kurita, Y. Iwakura // Die Makromolekulare Chemie: Macromolecular Chemistry and Physics. – 1976. – T. 177, № 12. – C. 3589-3600.
67. Sorlier P. Relation between the degree of acetylation and the electrostatic properties of chitin and chitosan / P. Sorlier, A. Denuzière, C. Viton, et al. // Biomacromolecules. – 2001. – T. 2, № 3. – C. 765-772.

68. Schatz C. Typical physicochemical behaviors of chitosan in aqueous solution / C. Schatz, C. Viton, T. Delair et al. // Biomacromolecules. – 2003. – T. 4, № 3. – C. 641-648.
69. Uragami T. Studies of synthesis and permeabilities of special polymer membranes. LI. Active transport of halogen ions through chitosan membranes / T. Uragami, F. Yoshida, M. Sugihara // Journal of Applied Polymer Science. – 1983. – T. 28, № 4. – C. 1361-1370.
70. Gibbs G. Sorption of Acid Green 25 on chitosan: influence of experimental parameters on uptake kinetics and sorption isotherms / G. Gibbs, J. M. Tobin, E. Guibal // Journal of applied polymer science. – 2003. – T. 90, № 4. – C. 1073-1080.
71. Prabaharan M., Jayakumar R. Polymeric bionanocomposites as promising materials for controlled drug delivery // Chitosan for Biomaterials II. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2011. – C. 1-18.
72. Zhao D. Biomedical applications of chitosan and its derivative nanoparticles / D. Zhao, S. Yu, B. Sun et al. // Polymers. – 2018. – T. 10, № 4. – C. 462.
73. Younes I. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications / I. Younes, M. Rinaudo // Marine drugs. – 2015. – T. 13, № 3. – C. 1133-1174.
74. Younes I. Influence of acetylation degree and molecular weight of homogeneous chitosans on antibacterial and antifungal activities / I. Younes, S. Sellimi, M. Rinaudo et al. // International journal of food microbiology. – 2014. – T. 185. – C. 57-63.
75. Hsu S. Chitosan as scaffold materials: Effects of molecular weight and degree of deacetylation / S. H. Hsu, S. W. Whu, C. L. Tsai et al. // Journal of Polymer Research. – 2004. – T. 11, № 2. – C. 141-147.
76. Islam S., Bhuiyan M. A., Islam M. N. Chitin and chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering / S. Islam, M. A. Bhuiyan, M. N. Islam // Journal of Polymers and the Environment. – 2017. – T. 25, № 3. – C. 854-866.
77. Mahmoudzadeh M. Elucidation of molecular mechanisms behind the self-assembly behavior of chitosan amphiphilic derivatives through experiment and molecular

modeling / M. Mahmoudzadeh, A. Fassihi, F. Dorkoosh et al. // Pharmaceutical research. – 2015. – T. 32, №. 12. – C. 3899-3915.

78. Jiang G. B. Novel polymer micelles prepared from chitosan grafted hydrophobic palmitoyl groups for drug delivery / G. B. Jiang, D. Quan, K. Liao et al. // Molecular pharmaceutics. – 2006. – T. 3, № 2. – C. 152-160.
79. Dellera E. Development of chitosan oleate ionic micelles loaded with silver sulfadiazine to be associated with platelet lysate for application in wound healing / E. Dellera, M. C. Bonferoni, G. Sandri et al. // European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. – 2014. – T. 88, № 3. – C. 643-650.
80. Konovalova N. P. Modulatory effect of tempol on toxicity and antitumor activity of 6-mercaptopurine and on P450 cytochrome level / N. P. Konovalova, R. F. Diatchkovskaya, L. M. Volkova et al. // Neoplasma. – 1996. – T. 43, № 5. – C. 341-346.
81. Tan N. P. H. Novel paramagnetic AT 1 receptor antagonists / N. P. Tan, M. K. Taylor, S. E. Bottle et al. // Chemical Communications. – 2011. – T. 47, № 44. – C. 12083-12085.
82. Sen V. D., Terentiev A. A., Konovalova N. P. Platinum complexes with bioactive nitroxyl radicals: Synthesis and antitumor properties // Nitroxides-Theory, Experiment and Applications; Kokorin, A., Ed. – 2012. – C. 385-406.
83. Gnewuch C. T., Sosnovsky G. Critical appraisals of approaches for predictive designs in anticancer drugs / C. T. Gnewuch, G. Sosnovsky // Cellular and Molecular Life Sciences CMLS. – 2002. – T. 59, № 6. – C. 959-1023.
84. Brugnerotto J. Overview on structural characterization of chitosan molecules in relation with their behavior in solution / J. Brugnerotto, J. Desbrieres, L. Heux et al. // Macromolecular Symposia. – Weinheim : WILEY-VCH Verlag GmbH, 2001. – T. 168, № 1. – C. 1-20.
85. Morris G. A. Macromolecular conformation of chitosan in dilute solution: A new global hydrodynamic approach / G. A. Morris, J. Castile, A. Smith et al. // Carbohydrate Polymers. – 2009. – T. 76, № 4. – C. 616-621.

86. Yui T. Molecular and crystal structure of the anhydrous form of chitosan / T. Yui, K. Imada, K. Okuyama et al. // Macromolecules. – 1994. – T. 27, № 26. – C. 7601-7605.
87. Okuyama K. Molecular and crystal structure of hydrated chitosan / K. Okuyama, K. Noguchi, T. Miyazawa et al. // Macromolecules. – 1997. – T. 30, № 19. – C. 5849-5855.
88. Okuyama K. Structural diversity of chitosan and its complexes / K. Okuyama, K. Noguchi, M. Kanenari et al. // Carbohydrate Polymers. – 2000. – T. 41, № 3. – C. 237-247.
89. Ogawa K. Three D structures of chitosan / K. Ogawa, T. Yui, K. Okuyama // International Journal of Biological Macromolecules. – 2004. – T. 34, № 1-2. – C. 1-8.
90. Franca E. F. Characterization of chitin and chitosan molecular structure in aqueous solution / E. F. Franca, R. D. Lins, L. C. Freitas et al. // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2008. – T. 4, № 12. – C. 2141-2149.
91. Skovstrup S. Conformational flexibility of chitosan: a molecular modeling study / S. Skovstrup, S. G. Hansen, T. Skrydstrup et al. // Biomacromolecules. – 2010. – T. 11, № 11. – C. 3196-3207.
92. Dadou S. M. Effect of protonation state and N-acetylation of chitosan on its interaction with xanthan gum: a molecular dynamics simulation study / S. M. Dadou, M. I. El-Barghouthi, S. K. Alabdallah et al. // Marine Drugs. – 2017. – T. 15, №. 10. – C. 298.
93. Esteban C. Dissecting the conformational determinants of chitosan and chitlac oligomers / C. Esteban, I. Donati, S. Pantano et al. // Biopolymers. – 2018. – T. 109, № 6. – C. e23221.
94. Sakajiri T. Molecular dynamics approach to study the discrepancies in the thermal behavior of amylose and chitosan conformations / T. Sakajiri, T. Kikuchi, I. Simon et al. // Journal of Molecular Structure: THEOCHEM. – 2006. – T. 764, № 1-3. – C. 133-140.

95. Ignarro L. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview / L. Ignarro // Journal of physiology and pharmacology. – 2002. – T. 53, № 4. – C. 503-514.
96. McCleverty J. A. Chemistry of nitric oxide relevant to biology / J. A. McCleverty // Chemical reviews. – 2004. – T. 104, № 2. – C. 403-418.
97. Korde Choudhari S. Nitric oxide and cancer: a review / S. Korde Choudhari, M. Chaudhary, S. Bagde et al. // World journal of surgical oncology. – 2013. – T. 11, № 1. – C. 1-11.
98. Ischiropoulos H. Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association? / H. Ischiropoulos, J. S. Beckman // The Journal of clinical investigation. – 2003. – T. 111, № 2. – C. 163-169.
99. Hall C. N. Assessing the physiological concentration and targets of nitric oxide in brain tissue / C. N. Hall, D. Attwell // The Journal of physiology. – 2008. – T. 586, № 15. – C. 3597-3615.
100. Ignarro L. J. Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview / L. J. Ignarro, G. Cirino, A. Casini et al. // Journal of cardiovascular pharmacology. – 1999. – T. 34, № 6. – C. 879-886.
101. Patel R. P. Biological aspects of reactive nitrogen species / R. P. Patel, J.McAndrew, H. Sellak et al. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics. – 1999. – T. 1411, № 2-3. – C. 385-400.
102. Murad F. Nitric oxide signaling: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone? / F. Murad // Recent progress in hormone research. – 1998. – T. 53. – C. 43-59.
103. Napoli C. Nitric oxide and atherosclerosis / C. Napoli, L. J. Ignarro // Nitric oxide. – 2001. – T. 5, № 2. – C. 88-97.
104. Jaworski K. S-nitrosothiols do not induce oxidative stress, contrary to other nitric oxide donors, in cultures of vascular endothelial or smooth muscle cells / K. Jaworski, F. Kinard, D. Goldstein et al. // European journal of pharmacology. – 2001. – T. 425, № 1. – C. 11-19.

105. Leopold J. A., Loscalzo J. S-nitrosothiols // Nitric oxide and the cardiovascular system. – Humana Press, Totowa, NJ, 2000. – С. 411-429.
106. Butler A. R. Nitrosyl complexes of iron-sulfur clusters / A. R. Butler, C. Glidewell, M.-H. Li // Advances in inorganic chemistry. – Academic Press, 1988. – Т. 32. – С. 335-393.
107. Butler A. R. Non-heme iron nitrosyls in biology / A. R. Butler, I. L. Megson // Chemical reviews. – 2002. – Т. 102, № 4. – С. 1155-1166.
108. Cesareo E. Nitrosylation of human glutathione transferase P1-1 with dinitrosyl diglutathionyl iron complex in vitro and in vivo / E. Cesareo, L. J. Parker, J. Z. Pedersen et al. // Journal of Biological Chemistry. – 2005. – Т. 280, № 51. – С. 42172-42180.
109. Vanin A. F. The 2.03 signal as an indicator of dinitrosyl–iron complexes with thiol-containing ligands / A. F. Vanin, V. A. Serezhenkov, V. D. Mikoyan et al. // Nitric oxide. – 1998. – Т. 2, № 4. – С. 224-234.
110. Chazov E. I. Hypotensive effect of Oxacom® containing a dinitrosyl iron complex with glutathione: animal studies and clinical trials on healthy volunteers / E. I. Chazov, O. V. Rodnenkov, A. V. Zorin et al. // Nitric Oxide. – 2012. – Т. 26, № 3. – С. 148-156.
111. Pectol D. C. Toward the optimization of dinitrosyl iron complexes as therapeutics for smooth muscle cells / D. C. Pectol, S. Khan, R. B. Chupik et al. // Molecular Pharmaceutics. – 2019. – Т. 16, № 7. – С. 3178-3187.
112. Sanina N. A. Mesomeric tautomerism of ligand is a novel pathway for synthesis of cationic dinitrosyl iron complexes: X-ray structure and properties of nitrosyl complex with thiourea / N. A. Sanina, S. M. Aldoshin, N. Yu. Shmatko et al. // Inorganic Chemistry Communications. – 2014. – Т. 49. – С. 44-47.
113. Sanina N. A. A new member of the cationic dinitrosyl iron complexes family incorporating N-ethylthiourea is effective against human HeLa and MCF-7 tumor cell lines / N. A. Sanina, N. Yu. Shmatko, D. V. Korchagin et al. // Journal of Coordination Chemistry. – 2016. – Т. 69, № 5. – С. 812-825.

114. Sanina N. A. Structure and properties of iron nitrosyl complexes with functionalized sulfur-containing ligands / N. A. Sanina, S. M. Aldoshin // Russian Chemical Bulletin. – 2011. – Т. 60, № 7. – С. 1223-1251.

115. Boese M. S-nitrosation of serum albumin by dinitrosyl-iron complex / M. Boese, P. I. Mordvintcev, A. F. Vanin et al. // Journal of Biological Chemistry. – 1995. – Т. 270, № 49. – С. 29244-29249.

116. Emel'yanova N. S. Redox potentials of iron—nitrosyl complexes: DFT calculations / N. S. Emel'yanova, A. F. Shestakov, N. A. Sanina // Russian Chemical Bulletin. – 2011. – Т. 60, № 7. – С. 1352-1356.

117. Emelyanova N. S. The structures of the dicationic tetranitrosyl iron complex with cysteamine $[Fe_2S_2(CH_2CH_2NH_3)_2(NO)_4]^{2+}$ and its decomposition products in protic media: an experimental and theoretical study / N. S. Emelyanova, A. F. Shestakov, I. V. Sulimenkov et al. // Russian Chemical Bulletin. – 2012. – Т 61, №. 1. – С. 1-11

118. Emel'yanova N. S. Quantum chemical modeling of the stability of reduced forms of Roussin's red esters. Effect of the nature of the ligand / N. S. Emel'yanova, A. F. Shestakov, N. A. Sanina et al. // Russian Chemical Bulletin. – 2013. – Т. 62, № 2. – С. 355-362.

119. Tsai M. L. Dinitrosyl iron complexes (DNICs): from biomimetic synthesis and spectroscopic characterization toward unveiling the biological and catalytic roles of DNICs / M. L. Tsai, C. C. Tsou, W. F. Liaw // Accounts of chemical research. – 2015. – Т. 48, № 4. – С. 1184-1193.

120. Liu P. H. Insight into chalcogenolate-bound $\{Fe(NO)_2\}^9$ dinitrosyl iron complexes (DNICs): covalent character versus ionic character / P. H. Liu, F. T. Tsai, B. H. Chen et al. // Dalton Transactions. – 2019. – Т. 48, № 18. – С. 6040-6050.

121. Vanin A. F. EPR detection and biological implications of nitrosyl nonheme iron complexes / A. F. Vanin, A. L. Kleschyov // Nitric oxide in transplant rejection and anti-tumor defense. – Springer, Boston, MA, 1998. – С. 49-82.

122. Muller B. Nitric oxide transport and storage in the cardiovascular system / B. Muller, A. L. Kleschyov, J. L. Alencar et al. // Annals of the New York Academy of Sciences. – 2002. – Т. 962, № 1. – С. 131-139.

123. Hickok J. R. Dinitrosyliron complexes are the most abundant nitric oxide-derived cellular adduct: biological parameters of assembly and disappearance / J. R. Hickok, S. Sahni, H. Shen et al. // Free Radical Biology and Medicine. – 2011. – T. 51, № 8. – C. 1558-1566.
124. Harrop T. C. Reactivity pathways for nitric oxide and nitrosonium with iron complexes in biologically relevant sulfur coordination spheres / T. C. Harrop, D. Song, S. J. Lippard // Journal of inorganic biochemistry. – 2007. – T. 101, № 11-12. – C. 1730-1738.
125. Tonzetich Z. J. Dinitrosyl iron complexes relevant to Rieske cluster nitrosylation / Z. J. Tonzetich, L. H. Do, S. J. Lippard // Journal of the American Chemical Society. – 2009. – T. 131, № 23. – C. 7964-7965.
126. Crack J. C. Iron–sulfur clusters as biological sensors: the chemistry of reactions with molecular oxygen and nitric oxide / J. C. Crack, J. Green, A. J. Thomson et al. // Accounts of chemical research. – 2014. – T. 47, № 10. – C. 3196-3205.
127. Pokidova O. V. Transformation of mononuclear dinitrosyl iron complex (DNIC) with thiourea in glutathione aqueous solution / O. V. Pokidova, N. S. Emel'yanova, B. L. Psikha et al. // Journal of Molecular Structure. – 2019. – T. 1192. – C. 264-273.
128. Shumaev K. B. Dinitrosyl iron complexes bind with hemoglobin as markers of oxidative stress / K. B. Shumaev, O. V. Kosmachevskaya, A. A. Timoshin et al. // Methods in Enzymology. – Academic Press, 2008. – T. 436. – C. 445-461.
129. Pokidova O. Influence of hemoglobin and albumin on the NO donation effect of tetranitrosyl iron complex with thiosulfate / O. Pokidova, T. Rudneva, B. Tretyakov et al. // Nitric Oxide. – 2020. – T. 94. – C. 69-72.
130. Schreiber G., Urban J. The synthesis and secretion of albumin // Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. – 1978. – T. 82. – C. 27-95.
131. Peters Jr T. All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. – Academic press, 1995.
132. Novohradský V. Influence of the binding of reduced NAMI-A to human serum albumin on the pharmacokinetics and biological activity / V. Novohradský, A.

Bergamo, M. Cocchietto et al. // Dalton Transactions. – 2015. – T. 44, № 4. – C. 1905-1913.

133. Yamasaki K. Albumin–drug interaction and its clinical implication / K. Yamasaki, V. T. G. Chuang, T. Maruyama et al. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 2013. – T. 1830, № 12. – C. 5435-5443.
134. Larsen M. T. Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease / M. T. Larsen, M. Kuhlmann, M. L. Hvam et al. // Molecular and cellular therapies. – 2016. – T. 4, № 1. – C. 1-12.
135. Patel S. U. Direct detection of albumin in human blood plasma by proton NMR spectroscopy. Complexation of nickel2+ / S. U. Patel, P. J. Sadler, A. Tucker et al. // Journal of the American Chemical Society. – 1993. – T. 115, № 20. – C. 9285-9286.
136. Bal W. Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates / W. Bal, M. Sokołowska, E. Kurowska et al. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. – 2013. – T. 1830, № 12. – C. 5444-5455.
137. Coverdale J. P. C. A metalloproteomic analysis of interactions between plasma proteins and zinc: Elevated fatty acid levels affect zinc distribution / J. P. Coverdale, J. P. Barnett, A. H. Adamu et al. // Metallomics. – 2019. – T. 11, № 11. – C. 1805-1819.
138. Li Y. Cadmium-binding proteins in human blood plasma / Y. Li, Y. S. Huang, B. He et al. // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2020. – T. 188. – C. 109896.
139. Correia I. Evaluation of the binding of oxovanadium (IV) to human serum albumin / I. Correia, T. Jakusch, E. Cobbinna et al. // Dalton Transactions. – 2012. – T. 41, № 21. – C. 6477-6487.
140. de Paula Q. A. Binding affinity studies of 1, 2, 3-triazole copper (II) complexes to human serum albumin / Q. A. de Paula, J. P. Joly, K. Selmeczi et al. // Journal of Coordination Chemistry. – 2018. – T. 71, № 11-13. – C. 1894-1909.
141. Massai L. The cisplatin/serum albumin system: A reappraisal / L. Massai, A. Pratesi, J. Gailer et al. // Inorganica Chimica Acta. – 2019. – T. 495. – C. 118983.
142. Parsekar S. U. Protein binding studies with human serum albumin, molecular docking and in vitro cytotoxicity studies using HeLa cervical carcinoma cells of Cu

(II)/Zn (II) complexes containing a carbohydrazone ligand / S. U. Parsekar, P. Velankanni, S. Sridhar et al. // Dalton Transactions. – 2020. – T. 49, № 9. – C. 2947-2965.

143. Bujacz A. Structures of bovine, equine and leporine serum albumin / A. Bujacz // Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography. – 2012. – T. 68, № 10. – C. 1278-1289.
144. Stamler J. S. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin / J. S. Stamler, O. Jaraki, J. Osborne et al. // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1992. – T. 89, № 16. – C. 7674-7677.
145. Lipton S. A. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds / S. A. Lipton, Y. B. Choi, Z. H. Pan et al. // Nature. – 1993. – T. 364, № 6438. – C. 626-632.
146. Bolotina V. M. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle / V. M. Bolotina, S. Najibi, J. J. Palacino et al. // Nature. – 1994. – T. 368, № 6474. – C. 850-853.
147. Henderson S. A. Nitric oxide reduces early growth response-1 gene expression in rat lung macrophages treated with interferon-gamma and lipopolysaccharide / S. A. Henderson, P. H. Lee, E. E. Aeberhard et al. // Journal of Biological Chemistry. – 1994. – T. 269, № 41. – C. 25239-25242.
148. Becker K. Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione / K. Becker, M. Gui, R. H. Schirmer // European journal of biochemistry. – 1995. – T. 234, № 2. – C. 472-478.
149. Roothaan C. C. J. New developments in molecular orbital theory / C. C. J. Roothaan // Reviews of modern physics. – 1951. – T. 23, № 2. – C. 69-89.
150. Atkins P., Atkins P. W., de Paula J. Atkins' physical chemistry. – Oxford university press, 2014. – C. 604-659.
151. Marenich A. V. Computational electrochemistry: prediction of liquid-phase reduction potentials / A. V. Marenich, J. Ho, M. L. Coote et al. // Physical Chemistry Chemical Physics. – 2014. – T. 16, № 29. – C. 15068-15106.

152. Winget P. Computation of equilibrium oxidation and reduction potentials for reversible and dissociative electron-transfer reactions in solution / P. Winget, C. J. Cramer, D. G. Truhlar // Theoretical Chemistry Accounts. – 2004. – Т. 112, № 4. – С. 217-227.
153. Krapivin V. B. Quantum chemical calculations of the one-electron oxidation potential of nitroxide spin labels in biologically active compounds / V. B. Krapivin, V. D. Sen, V. B. Luzhkov // Chemical Physics. – 2019. – Т. 522. – С. 214-219.
154. Ho J. Theoretical Calculation of Reduction Potentials / J. Ho, M. L. Coote, C. J. Cramer et al. – Organic Electrochemistry, 5th edition, edited by O. Hammerich and B. Speiser (CRC Press, Boca Raton, FL, 2016). – С. 229-259.
155. Bartmess J. E. Thermodynamics of the electron and the proton / J. E. Bartmess // The Journal of Physical Chemistry. – 1994. – Т. 98, № 25. – С. 6420-6424.
156. Fawcett W. R. The ionic work function and its role in estimating absolute electrode potentials / W. R. Fawcett // Langmuir. – 2008. – Т. 24, № 17. – С. 9868-9875.
157. Isse A. A., Gennaro A. Absolute potential of the standard hydrogen electrode and the problem of interconversion of potentials in different solvents / A. A. Isse, A. Gennaro // The Journal of Physical Chemistry B. – 2010. – Т. 114, № 23. – С. 7894-7899.
158. Trasatti S. The absolute electrode potential: an explanatory note (Recommendations 1986) / S. Trasatti // Pure and Applied Chemistry. – 1986. – Т. 58, № 7. – С. 955-966.
159. Салем Л. Электроны в химических реакциях // М: Мир. – 1985.
160. Tomasi J. Quantum mechanical continuum solvation models / J. Tomasi, B. Mennucci, R. Cammi // Chemical reviews. – 2005. – Т. 105. – №. 8. – С. 2999-3094.
161. Cances E. A new integral equation formalism for the polarizable continuum model: Theoretical background and applications to isotropic and anisotropic dielectrics / E. Cances, B. Mennucci, J. Tomasi // The Journal of chemical physics. – 1997. – Т. 107, № 8. – С. 3032-3041.

162. Barone V. A new definition of cavities for the computation of solvation free energies by the polarizable continuum model / V. Barone, M. Cossi, J. Tomasi // The Journal of chemical physics. – 1997. – T. 107, № 8. – C. 3210-3221.
163. Marenich A. V. Universal solvation model based on solute electron density and on a continuum model of the solvent defined by the bulk dielectric constant and atomic surface tensions / A. V. Marenich, C. J. Cramer, D. G. Truhlar // The Journal of Physical Chemistry B. – 2009. – T. 113, № 18. – C. 6378-6396.
164. Fiedler D. A., Scholz F. Electrochemical studies of solid compounds and materials / D. A. Fiedler, F. Scholz // Electroanalytical methods. – Springer, Berlin, Heidelberg, 2005. – C. 211-222.
165. Kato Y. Reversible half-wave potentials of reduction processes on nitroxide radicals / Y. Kato, Y. Shimizu, L. Yijing et al. // Electrochimica acta. – 1995. – T. 40, № 17. – C. 2799-2802.
166. Lee C. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density / C. Lee, W. Yang, R. G. Parr // Physical review B. – 1988. – T. 37, № 2. – C. 785.
167. Becke A. D. Density-Functional Thermochemistry. III. The Role of Exact Exchange. / A. D. Becke // J. Chem. Phys. – 1993. – T. 98. – C. 5648-5652.
168. Zhao Y. The M06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four M06-class functionals and 12 other functionals / Y. Zhao, D. G. Truhlar // Theoretical chemistry accounts. – 2008. – T. 120, № 1. – C. 215-241.
169. Gaussian 09, Revision B.01 / M. J. Frisch, G. W. Trucks, H. B. Schlegel et al. // Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2010.
170. Staroverov V. N. Comparative assessment of a new nonempirical density functional: Molecules and hydrogen-bonded complexes / V. N. Staroverov, G. E. Scuseria, J. Tao et al. // The Journal of chemical physics. – 2003. – T. 119, № 23. – C. 12129-12137.

171. Jensen K. P. Bioinorganic chemistry modeled with the TPSSh density functional / K. P. Jensen // Inorganic chemistry. – 2008. – T. 47, № 22. – C. 10357-10365.
172. Teixeira M. H. Modeling the Hydrolysis of Iron–Sulfur Clusters / M. H. Teixeira, F. Curtolo, S. R. Camilo et al. // Journal of Chemical Information and Modeling. – 2019. – T. 60, № 2. – C. 653-660.
173. Pliego J. R. Thermodynamic cycles and the calculation of pKa / J. R. Pliego // Chemical physics letters. – 2003. – T. 367, № 1-2. – C. 145-149.
174. Hopmann K. H. Spin Coupling in Roussin's Red and Black Salts / K. H. Hopmann, L. Noodleman, A. Ghosh // Chemistry–A European Journal. – 2010. – T. 16, № 34. – C. 10397-10408.
175. Kitagawa Y. Approximate spin projection for broken-symmetry method and its application / Y. Kitagawa, T. Saito, K. Yamaguchi // Symmetry (Group Theory) and Mathematical Treatment in Chemistry. – 2018. – C. 121-139.
176. Allinger N. L. Molecular mechanics. The MM3 force field for hydrocarbons. 1 / N. L. Allinger, Y. H. Yuh, J. H. Lii // Journal of the American Chemical Society. – 1989. – T. 111, № 23. – C. 8551-8566.
177. Jorgensen W. L. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin / W. L. Jorgensen, J. Tirado-Rives // Journal of the American Chemical Society. – 1988. – T. 110, № 6. – C. 1657-1666.
178. MacKerell Jr A. D. All-atom empirical potential for molecular modeling and dynamics studies of proteins / A.D. MacKerell, D. Bashford, M. Bellott et al. // The journal of physical chemistry B. – 1998. – T. 102, № 18. – C. 3586-3616.
179. Cornell W. D. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules / W. Cornell, P. Cieplak, Ch. Bayly et al. // Journal of the American Chemical Society. – 1995. – T. 117, № 19. – C. 5179-5197.
180. Verlet L. Computer "experiments" on classical fluids. I. Thermodynamical properties of Lennard-Jones molecules / L. Verlet // Physical review. – 1967. – T. 159, №. 1. – C. 98-103.

181. Kalé L. NAMD2: greater scalability for parallel molecular dynamics / L. Kalé, R. Skeel, M. Bhandarkar et al. // Journal of Computational Physics. – 1999. – T. 151, № 1. – C. 283-312.
182. Humphrey W. VMD: visual molecular dynamics / W. Humphrey, A. Dalke, K. Schulten // Journal of molecular graphics. – 1996. – T. 14, № 1. – C. 33-38.
183. Case D. A. et al. Amber 10 / D. A. Case, T. A. Darden, T. E. Cheatham et al. // University of California, 2008.
184. Kirschner K. N. GLYCAM06: a generalizable biomolecular force field. Carbohydrates / K. N. Kirschner, A. B. Yongye, S. M. Tschampel et al. // Journal of computational chemistry. – 2008. – T. 29, №. 4. – C. 622-655.
185. Case D. A. et al. Onufriev A, Simmerling C, Wang B, Woods RJ. The Amber biomolecular simulation programs // Journal of Computational Chemistry. – 2005. – T. 26, № 16. – C. 1668-1688.
186. Still W. C. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics / W. C. Still, A. Tempczyk, R. C. Hawley et al. // Journal of the American Chemical Society. – 1990. – T. 112, № 16. – C. 6127-6129.
187. Pedretti A. The VEGA suite of programs: An versatile platform for cheminformatics and drug design projects / A. Pedretti, A. Mazzolari, S. Gervasoni et al. // Bioinformatics. – 2021. – T. 37, № 8. – C. 1174-1175.
188. Pettersen E. F. UCSF Chimera–a visualization system for exploratory research and analysis / E. F. Pettersen, T. D. Goddard, C. C. Huang et al. // Journal of computational chemistry. – 2004. – T. 25, № 13. – C. 1605-1612.
189. Wang J. Development and testing of a general amber force field / J. Wang, R. M. Wolf, J. W. Caldwell et al. // Journal of computational chemistry. – 2004. – T. 25, № 9. – C. 1157-1174.
190. Maier J. A. ff14SB: improving the accuracy of protein side chain and backbone parameters from ff99SB / J. A. Maier, C. Martinez, K. Kasavajhala et al. // Journal of chemical theory and computation. – 2015. – T. 11, № 8. – C. 3696-3713.

191. Kuntz I. D. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions / I. D. Kuntz, J. M. Blaney, S. J. Oatley et al. // Journal of molecular biology. – 1982. – T. 161, № 2. – C. 269-288.
192. Kuhl F. S. A combinatorial algorithm for calculating ligand binding / F. S. Kuhl, G. M. Crippen, D. K. Friesen // Journal of Computational Chemistry. – 1984. – T. 5, № 1. – C. 24-34.
193. Allen W. J. DOCK 6: Impact of new features and current docking performance / W. J. Allen, T. E. Balius, S. Mukherjee et al. // Journal of computational chemistry. – 2015. – T. 36, № 15. – C. 1132-1156.
194. Castro-Alvarez A. The performance of several docking programs at reproducing protein–macrolide-like crystal structures / A. Castro-Alvarez, A. M. Costa, J. Vilarrasa // Molecules. – 2017. – T. 22, № 1. – C. 136
195. Kilambi K. P. Rapid calculation of protein pKa values using Rosetta / K. P. Kilambi, J. J. Gray // Biophysical journal. – 2012. – T. 103, № 3. – C. 587-595.
196. Krapivin V. B. Quantum chemical calculations of hydration electrostatics and electrochemical oxidation potential of cyclic nitroxide radicals / V. B. Krapivin, A. S. Mendkovich, V. D. Sen et al. // Mendeleev Communications. – 2019. – T. 29, № 1. – C. 77-79.
197. Sen V. D. Synthesis and structure of redox derivatives of 4-(2-Amino-2-oxoethyl)-2, 2, 6, 6-tetramethylpiperidine-1-yloxyl / V. D. Sen, G. V. Shilov, V. A. Golubev // Russian Journal of Organic Chemistry. – 2014. – T. 50, № 8. – C. 1124-1132.
198. Yamago S. Chemical derivatization of organofullerenes through oxidation, reduction, and carbon-oxygen and carbon-carbon bond-forming reactions / S. Yamago, H. Tokuyama, E. Nakamura et al. // The Journal of Organic Chemistry. – 1993. – T. 58, № 18. – C. 4796-4798.
199. Hummelen J. C. Preparation and characterization of fulleroid and methanofullerene derivatives / J. C. Hummelen, B. W. Knight, F. LePeq et al. // The Journal of Organic Chemistry. – 1995. – T. 60, № 3. – C. 532-538.

200. Ishida T. Synthesis and characterization of C60 derivatives possessing TEMPO radicals / T. Ishida, K. Shinozuka, T. Nogami et al. // Tetrahedron. – 1996. – Т. 52, № 14. – С. 5103-5112.
201. Gubskaya V. P. Synthesis, structure and biological activity of nitroxide malonate methanofullerenes / V. P. Gubskaya, L. S. Berezhnaya, A. T. Gubaidullin et al. // Organic & Biomolecular Chemistry. – 2007. – Т. 5, № 6. – С. 976-981.
202. Luzhkov V. B. Molecular modelling and quantum mechanical calculations of the hydration free energy of buckminsterfullerene / V. B. Luzhkov, V. M. Volokhov, G. A. Pokatovich // Chemical Physics Letters. – 2017. – Т. 676. – С. 95-98.
203. Крапивин В. Б. Молекулярное моделирование конформационной динамики нитроксильных производных хитозана в водном растворе / В. Б. Крапивин, В. Б. Лужков // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2021. – № 8. – С. 1523-1532.
204. Sundaralingam M. Some aspects of stereochemistry and hydrogen bonding of carbohydrates related to polysaccharide conformations / M. Sundaralingam // Biopolymers: Original Research on Biomolecules. – 1968. – Т. 6, № 2. – С. 189-213.
205. Braccini I. Conformational and configurational features of acidic polysaccharides and their interactions with calcium ions: a molecular modeling investigation / I. Braccini, R. P. Grasso, S. Pérez // Carbohydrate Research. – 1999. – Т. 317, № 1-4. – С. 119-130.
206. Luzhkov V. B. Treatment of the Conformational Contributions in Quantum Mechanical Calculations of the Redox Potentials of Nitroxyl Radicals / V. B. Luzhkov // Russian Journal of Physical Chemistry A. – 2020. – Т. 94, № 5. – С. 908-913.
207. Krapivin V. B. Decomposition of dinitrosyl iron complex with thioformaldehyde ligands in water: reaction mechanisms and the role of chemical hardness of ligands / V. B. Krapivin, V. B. Luzhkov, N. A. Sanina et al. // Mendeleev Communications. – 2022. – V. 32.

208. Pokidova O. V. Effect of albumin on the transformation of dinitrosyl iron complexes with thiourea ligands / O. V. Pokidova, V. B. Luzhkov, N. S. Emel'yanova et al. // Dalton Transactions. – 2020. – T. 49, № 36. – C. 12674-12685.
209. Lau J. K. C. Hydrolysis of the anticancer drug cisplatin: pitfalls in the interpretation of quantum chemical calculations / J. K. C. Lau, D. V. Deubel // Journal of Chemical Theory and Computation. – 2006. – T. 2, № 1. – C. 103-106.
210. Song T., Hu P. Insight into the solvent effect: A density functional theory study of cisplatin hydrolysis / T. Song, P. Hu // The Journal of chemical physics. – 2006. – T. 125, № 9. – C. 091101.
211. Grimme S. A. consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu / S. Grimme, J. Antony, S. Ehrlich et al. // The Journal of chemical physics. – 2010. – T. 132, № 15. – C. 154104.
212. Shestakov A. F. Experimental and theoretical studies of the structure and IR spectra of neutral diamagnetic binuclear iron nitrosyl complexes $Fe_2(\mu\text{-}SC_{6-n}H_{5-n}N_n)_2(NO)_4$ (n= 0, 1, 2) / A. F. Shestakov, Y. M. Shul'ga, N. S. Emel'yanova, et al. // Russian chemical bulletin. – 2006. – T. 55, № 12. – C. 2133-2142.
213. Klicić J. J. Accurate prediction of acidity constants in aqueous solution via density functional theory and self-consistent reaction field methods / J. J. Klicić, R. A. Friesner, S. Y. Liu et al. // The Journal of Physical Chemistry A. – 2002. – T. 106, № 7. – C. 1327-1335.
214. Click T. H. Importance of electrostatic polarizability in calculating cysteine acidity constants and copper (I) binding energy of Bacillus subtilis CopZ / T. H. Click, S. Y. Ponomarev, G. A. Kaminski // Journal of Computational Chemistry. – 2012. – T. 33, № 11. – C. 1142-1151.
215. Glušič M. Binding of cadmium dication to glutathione facilitates cysteine SH deprotonation: A computational DFT study / M. Glušič, J. Stare, J. Grdadolnik et al. // Journal of inorganic biochemistry. – 2013. – T. 119. – C. 90-94.

216. Parr R. G. Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity / R. G. Parr, R. G. Pearson //Journal of the American chemical society. – 1983. – T. 105, № 26. – C. 7512-7516.
217. Pearson R. G. Chemical hardness and density functional theory //Journal of Chemical Sciences. – 2005. – T. 117, № 5. – C. 369-377.
218. Emel'yanova N. S. Quantum-chemical study of the Fe (NO) 2 fragment in the cation of mononuclear nitrosyl iron complex $[Fe(SC(NH_2)_2)_2(NO)_2]Cl•H_2O$ / N. S. Emel'yanova, N. A. Sanina, S. M. Aldoshin et al. // Computational and Theoretical Chemistry. – 2015. – T. 1060. – C. 1-9.
219. Emelyanova N. S. Quantum chemical modeling of possible reactions of mononuclear iron nitrosyl complex $[Fe(SC(NH_2)_2)_2(NO)_2]Cl•H_2O$ in an aqueous solution et al. // Russian Chemical Bulletin. – 2017. – T. 66, № 10. – C. 1842-1846.
220. Emel'yanova N. S. Investigation of the interaction of the cationic nitrosyl iron complex $[Fe(SC(NH_2)_2)_2(NO)_2]^+$ with molecular oxygen / N. S. Emel'yanova, L. G. Gutsev, O. V. Pokidova et al. // Inorganica Chimica Acta. – 2021. – T. 522. – C. 120361.
221. Pedersen A. O. Reactivity of the thiol group in human and bovine albumin at pH 3–9, as measured by exchange with 2, 2′-dithiodipyridine / A. O. Pedersen, J. Jacobsen // European Journal of Biochemistry. – 1980. – T. 106, № 1. – C. 291-295.