

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР ПРОБЛЕМ  
ХИМИЧЕСКОЙ ФИЗИКИ И МЕДИЦИНСКОЙ ХИМИИ РАН**

*На правах рукописи*

**Крапивин Владимир Борисович**

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

1.4 – Химические науки  
1.4.4 – Физическая химия

Научный доклад  
об основных результатах научно-квалификационной практики  
(диссертации)

Научный руководитель

д. х. н., старший научный сотрудник  
Лужков Виктор Борисович

Рецензент

к.ф.-м.н., зав. лабораторией  
Горячев Николай Сергеевич

Рецензент

д. х. н., профессор, ведущий научный сотрудник  
Боженко Константин Викторович

### **Актуальность темы исследования и степень ее разработанности**

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

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

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

Еще одним классом биологически активных соединений, содержащих группу  $\text{NO}^\bullet$ , являются нитрозильные комплексы железа, которые относятся к перспективному классу доноров монооксида азота, поскольку связывают большое количество  $\text{NO}^\bullet$  и не требуют дополнительной активации для его высвобождения. Наибольший интерес представляют динитрозильные комплексы железа (ДНКЖ) с функциональными серосодержащими лигандами как синтетические аналоги активного центра негемовых железо-серных белков. Соединения данного класса являются универсальными и в то же время селективными регуляторами физиологических процессов. Молекулярное моделирование позволяет лучше понять механизм химических превращений ДНКЖ и предсказать свойства новых синтезируемых комплексов.

## Цели и задачи работы

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.

Для достижения поставленных целей были поставлены следующие задачи:

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

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

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

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

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

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

## 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 (ТЦ) и оптимизации геометрии в растворе. Показано, при оптимизации в растворе могут появляться устойчивые конформации нитроксильных радикалов, которые не являются энергетическими минимумами в газовой фазе. Впервые показано, что данный эффект может вносить систематическую ошибку при расчетах редокс-потенциалов методом ТЦ. В работе показано существенное влияние растворителя на структуру конформационно гибких биологически активных производных пиперидин- и пирролиноксила и проведены расчеты их редокс-потенциалов. Впервые выполнено молекулярно-динамическое моделирование

нитроксильных производных низкомолекулярного хитозана и получены оценки окислительно-восстановительных свойств данных соединений методами квантовой химии.

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

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

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Определены оптимальные подходы (функционалы, наборы базисных функций, основные 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. Метод ТФП сочетает строгость подхода к описанию химических систем и высокую скорость вычислений. А в сочетании с континуумными моделями растворителя и подходами статистической термодинамики ТФП позволяет рассчитывать такие параметры как свободная энергия химических реакций и электрохимический потенциал. Методы молекулярной механики (ММ) и молекулярной динамики (МД) позволяют моделировать системы из большого количества атомов и оценивать изменение систем во времени.

### **Степень достоверности результатов проведенных исследований**

Достоверность результатов обеспечена использованием вычислительных методов, рекомендуемых или специально разработанных для моделирования конкретных классов химических соединений, а также дублированием расчетов

несколькими методами. Большинство результатов расчетов было сопоставлено с экспериментальными данными по структуре и свойствам рассматриваемых веществ. Надежность использованных методик подтверждается также общим высоким уровнем публикуемости результатов расчетов по программам квантовой химии, докинга и молекулярной динамики, использованных в диссертационной работе.

### **Апробация работы**

Основные результаты диссертационной работы представлены на конференциях, таких как: Международный молодежный научный форум «Ломоносов» (Москва, МГУ, 2019, 2021, 2022 г.); Конференция с международным участием «Физическая химия в России и за рубежом: от квантовой химии до эксперимента» (Черноголовка, 2019 г.); Междисциплинарный научный форум с международным участием «Новые материалы и перспективные технологии» (Москва, 2019); Всероссийская научная конференции МФТИ, 2020 г.; Школа-конференция для молодых ученых «Супрамолекулярные стратегии в химии, биологии и медицине: фундаментальные проблемы и перспективы» (Казань, 2020 г.); Всероссийская школа молодых ученых «Научные школы большой химической физики» (Черноголовка, 2021 г.); XII International Conference on Chemistry for Young Scientists «Mendeleev 2021» (St. Petersburg University, 2021), X Всероссийская молодежная школа-конференция «Квантово-химические расчеты: структура и реакционная способность органических и неорганических молекул» (Иваново, 2022 г.); X International Voevodsky Conference «Physics and Chemistry of Elementary Chemical Processes» (Novosibirsk, 2022).

### **Личный вклад автора**

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

### **Публикации**

Основное содержание диссертации опубликовано в 10 научных работах, из них 5 статей в журналах из перечня рецензируемых научных журналов (Web of Science, Scopus и RSCI) и рекомендованных для защиты в диссертационном

совете МГУ по специальности 1.4.4. – физическая химия и 5 тезисов докладов. В работах, опубликованных в соавторстве, основополагающий вклад принадлежит соискателю.

### Основное содержание работы

**Во введении** обоснована актуальность темы работы, сформулированы цель и задачи научного исследования, изложены научная новизна и практическая значимость полученных результатов.

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

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

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

### Структура моделируемых нитроксильных радикалов

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

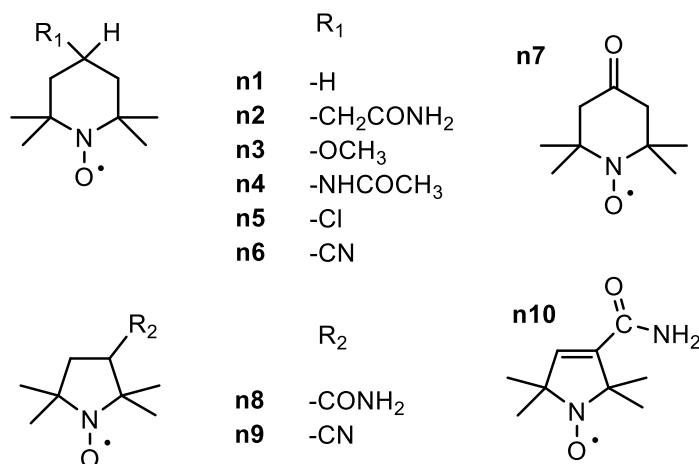


Рисунок 1 – Химическая структура исследуемых нитроксильных радикалов

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

### Результаты расчетов электрохимических потенциалов реакции окисления нитроксильных радикалов

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

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

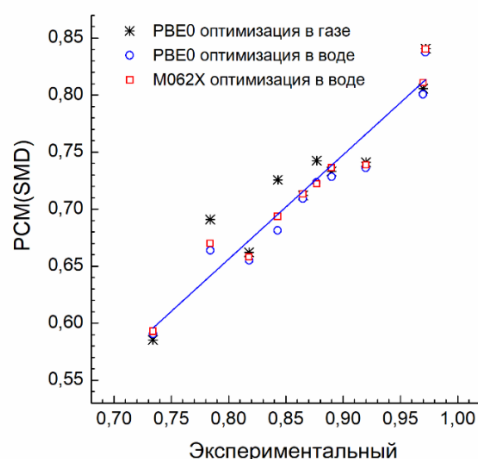


Рисунок 2 – Сопоставление экспериментальных и рассчитанных в модели РСМ(SMD) значений потенциалов  $E_{Ox}$  (В) нитроксидов **n1-n10**

Также были вычислены барьеры конформационных переходов в циклах. Свободные энергии активации для переходов *кресло* ↔ *твист* в нитроксиде **n7** и

*twist*<sup>+</sup> ↔ *twist*<sup>-</sup> в нитроксиде **n8** находятся в пределах 14-19 кДж/моль. Полученные значения обеспечивают среднее время конформационных переходов порядка 10<sup>-12</sup> с при температуре 298 К, что значительно меньше характерного времени конверсии циклогексана (10<sup>-5</sup> с).

### **Результаты расчетов электрохимических потенциалов реакции восстановления нитроксильных радикалов**

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

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

### **Конформационный анализ олигомеров хитозана**

Хитозан представляет собой полисахарид, состоящий из звеньев D-глюкозамина (G) и N-ацетил-D-глюкозамина (GAc), связанных β(1→4) гликозидной связью. Конформация основной цепи полисахарида определяется двумя двугранными углами φ(O<sub>5</sub>-C<sub>1</sub>-O<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>') и ψ(C<sub>1</sub>-O<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>'-C<sub>3</sub>') гликозидной связи (рис. 3). Как и для многих полисахаридов, в линейной кристаллической структуре хитозана присутствует внутримолекулярная водородная связь O<sub>3</sub>'-H...O<sub>5</sub>, в которой водород при атоме O<sub>3</sub>' ориентирован в сторону O<sub>1</sub>.

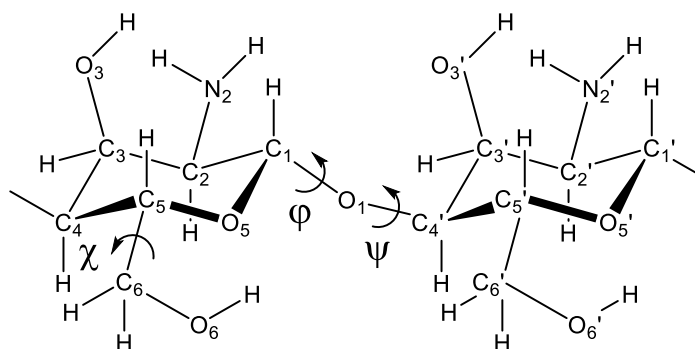


Рисунок 3 – Химическая структура димера хитозана

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

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

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

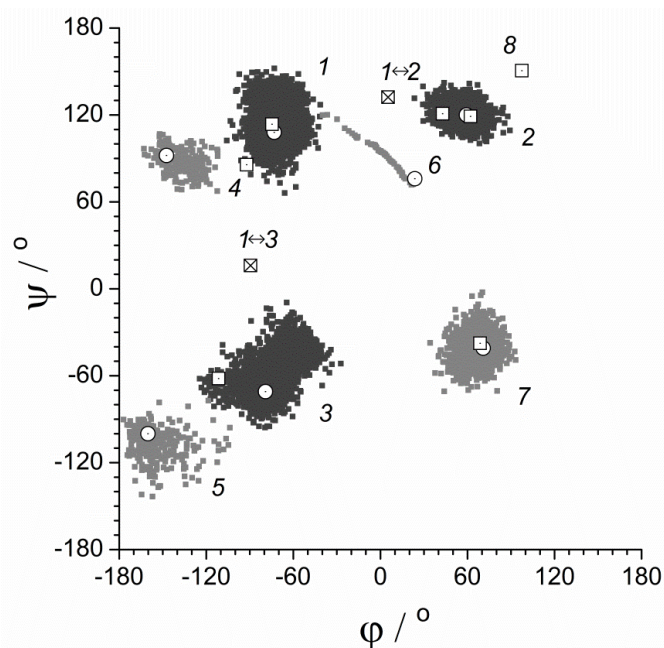


Рисунок 4 – Карта распределения конформаций нейтрального димера хитозана по углам  $\varphi$  и  $\psi$  из расчетов МД. Отдельно обозначены положения минимумов, найденные методами ММ/GBSA (○) и ТФП в водном растворе (□), а также координаты переходных состояний (⊠).

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

### Моделирование структуры нитроксильных производных хитозана

Рассматриваемые нитроксильные производные хитозана представляют собой олигосахариды с присоединенным по аминогруппе центрального звена карбоксил-содержащим нитроксильным радикалом (рис. 5). В качестве стартовых структур использовались геометрии, в которых ориентации звеньев основной цепи соответствовали конформациям *1*, *2* и *3*. Ориентации заместителей отвечали наиболее энергетически выгодным конформациям соответствующих нитроксильных радикалов, найденным ранее методом функционала плотности. Исследование конформационной подвижности нитроксильных заместителей показало, что углы  $\alpha$  и  $\beta$  обладают большей свободой и в ходе моделирования меняются в широких пределах, в то время как углы  $\omega$  и  $\gamma$  колеблются в узком диапазоне значений.

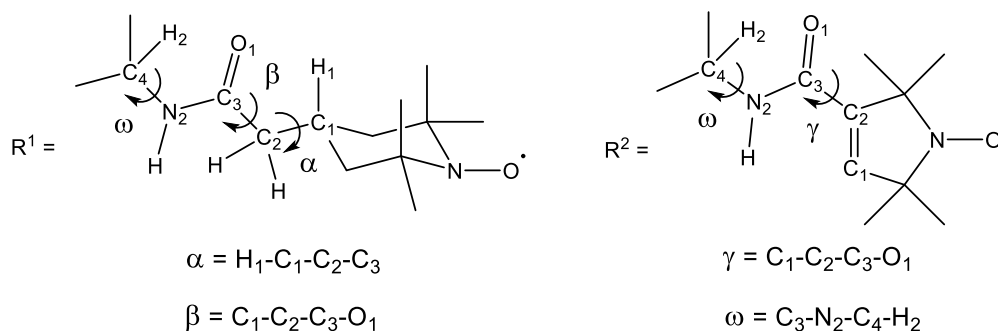


Рисунок 5 – Химическая структура нитроксильных заместителей

Расчеты показали, что линейная структура *1* по-прежнему обладает наибольшей устойчивостью. Тем не менее, для протонированных производных HG-GR<sup>1</sup>-HG и HG-GR<sup>2</sup>-HG наблюдаются самопроизвольные конформационные переходы  $1 \leftrightarrow 3$  для одного из двух крайних звеньев тримера. Большая устойчивость конформации *3* в этом случае, как и для незамещенного хитозана, связана с тем, что в случае линейной конформации положительно заряженные NH<sub>3</sub><sup>+</sup>-группы крайних звеньев располагаются на одной стороне основной цепи, в то время как при повороте аминогруппы оказываются по разные стороны и на большем расстоянии.

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

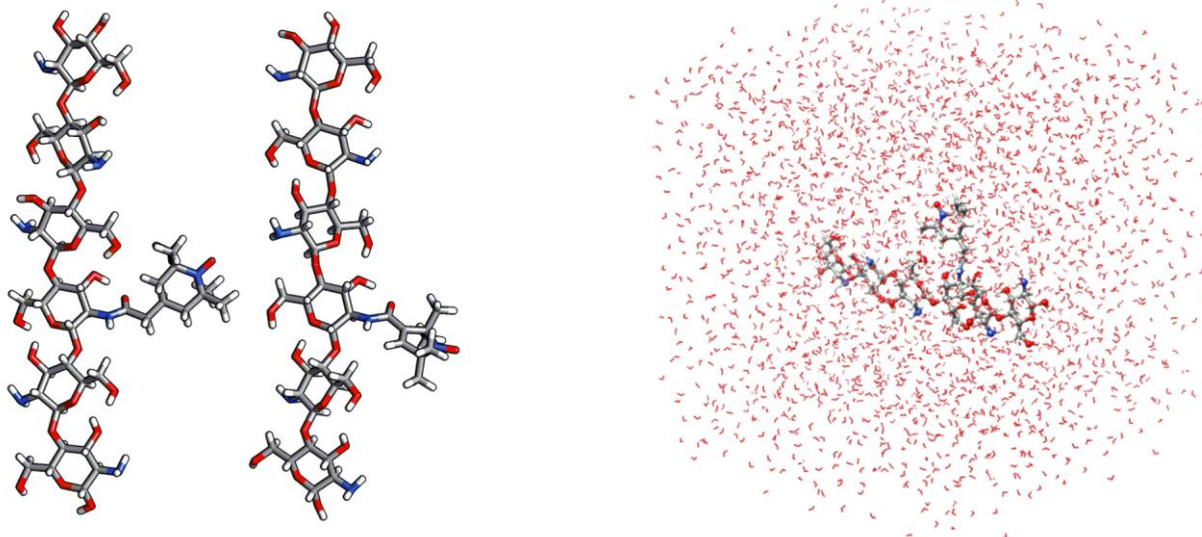


Рисунок 6 – Линейная структура гексамеров хитозана с присоединенным НР: индивидуальная и в окружении молекул воды (TIP3P) в кубической ячейке

Нитроксил R<sup>1</sup> содержит метиленовую группу и обладает большей подвижностью, что делает возможными гидрофобные взаимодействия между CH<sub>3</sub>-группами нитроксила и соседними звеньями хитозана. В то же время полярная NO-группа экранирована и не образует близких контактов с основной

цепью. Нитроксил  $R^2$  соединен с хитозаном жесткой системой двойных связей и практически не взаимодействует с основной цепью.

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

### **Окислительно-восстановительные потенциалы нитроксильных производных хитозана**

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

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

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

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

### **Структуры исследуемых динитрозильных комплексов железа с серосодержащими лигандами**

Катионные динитрозильные комплексы железа с серосодержащими лигандами представляют интерес как перспективные лекарственные препараты, обладающие NO-донорной активностью. В водном растворе данные комплексы разлагаются с высвобождением  $NO^*$ , при этом донорная активность зависит как от структуры комплекса, так и от окружающих условий (температуры,  $pH$ ,



интермедиатов **2a** и **2b** (рис. 8). Отщепление тиоформальдегида от комплексов **2a** и **2b** протекает с низким барьером (~5 кДж/моль) и приводит к образованию постреакционного комплекса **3**. Продукт первой степени 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<sub>2</sub>O с образованием пентакоординационного комплекса **5**. Отщепление второго тиоформальдегида происходит аналогично первой стадии. Конечным продуктом замещения является тетраэдрический динитрозильный аквакомплекс **7**.

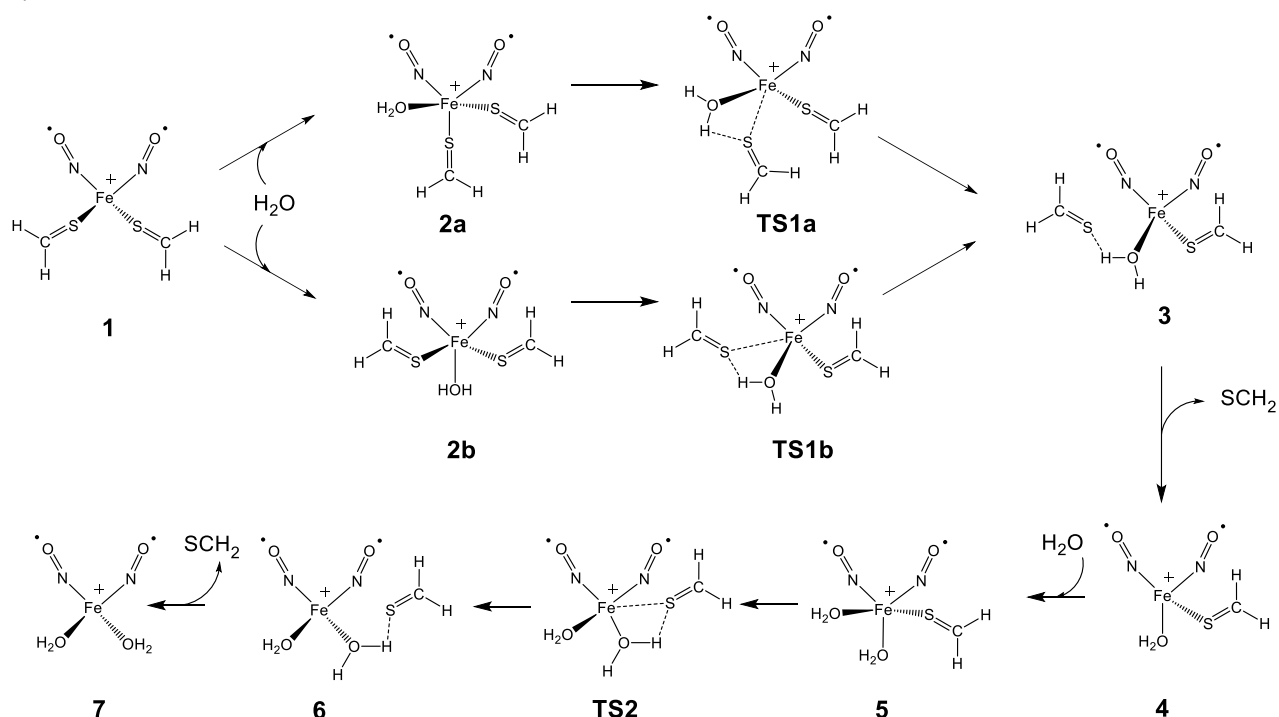


Рисунок 8 – Схема ассоциативного механизма замещения тиоформальдегида молекулами воды для комплекса **I**

Расчеты показывают, что замещение тиоформальдегидного лиганда молекулами воды в комплексе **I** носит экзотермический характер. Относительная свободная энергия продукта первой степени гидролиза **4** составляет ~ -30 кДж/моль, наблюдается хорошее согласование результатов для функционалов TPSSH и M06. Продукт полного замещения **7** имеет относительную свободную энергию -60 кДж/моль в TPSSH и -70 кДж/моль в M06. Наблюдается аддитивный эффект отщепления лигандов (таблица 1).

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

Была также рассмотрена возможность диссоциативного механизма гидролиза, когда молекулы H<sub>2</sub>O в явном виде не принимают участия в отщеплении тиоформальдегида. Свободная энергия активации для данного процесса составляет 23 – 29 кДж/моль, что значительно выше, чем в случае

ассоциативного механизма. В целом диссоциативный механизм оказывается значительно менее выгодным по сравнению с механизмом с участием явных молекул воды.

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

Комплекс	<sup>a</sup> E <sub>el</sub>		<sup>b</sup> E <sub>0</sub>		<sup>c</sup> G <sup>0</sup>	
	TPSSH	M06	TPSSH	M06	TPSSH	M06
<b>1</b> + 2H <sub>2</sub> O	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>2a</b> + H <sub>2</sub> O	-10,3	-33,4	-3,8	-23,2	15,2	2,7
<b>2b</b> + H <sub>2</sub> O	-23,1	-43,4	-14,4	-33,1	11,8	-7,1
<b>TS1a</b> + H <sub>2</sub> O	-9,0	-28,7	-2,9	-20,4	21,9	5,7
<b>TS1b</b> + H <sub>2</sub> O	-16,8	-35,7	-10,0	-28,5	16,9	-4,2
<b>3</b> + H <sub>2</sub> O	-35,5	-31,9	-27,7	-23,4	-5,4	-1,4
<b>4</b> + SCH <sub>2</sub> + H <sub>2</sub> O	-22,0	-28,1	-19,7	-25,2	-30,2	-33,4
<b>5</b> + SCH <sub>2</sub>	-28,0	-50,9	-17,7	-38,3	-9,5	-30,8
<b>TS2</b> + SCH <sub>2</sub>	-22,6	-51,0	-14,0	-38,8	-3,9	-29,5
<b>6</b> + SCH <sub>2</sub>	-42,6	-61,9	-32,9	-48,3	-26,5	-39,1
<b>7</b> + 2SCH <sub>2</sub>	-30,4	-43,1	-28,4	-37,6	-60,0	-70,3

<sup>a</sup>E<sub>el</sub> - электронная энергия; <sup>b</sup>E<sub>0</sub> – энергия с учетом нулевых колебаний; <sup>c</sup>G<sup>0</sup> – свободная энергия для температуры 298,15 К и стандартной концентрации 1 М (55,5 М для H<sub>2</sub>O).

### 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<sub>2</sub>(μ-SCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(NO)<sub>4</sub>], 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 <sup>-</sup>SCH<sub>3</sub> на H<sub>2</sub>O, а также промежуточных и переходных состояний для комплекса [Fe(NO)<sub>2</sub>(SCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]<sup>-</sup> (**V**).

Схема ассоциативного механизма гидролиза аналогична изображенной на рис. 9, однако существенно различаются относительные энергии продуктов гидролиза и значения энергетических барьеров. Поскольку лиганд <sup>-</sup>SCH<sub>3</sub> отрицательно заряжен, связь Fe-S в этом случае будет значительно прочнее, чем в тиоформальдегидном комплексе. Барьер активации для замещения метилсульфида на H<sub>2</sub>O составляет порядка 100 кДж/моль для первого лиганда и 90 кДж/моль для второго.

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

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

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

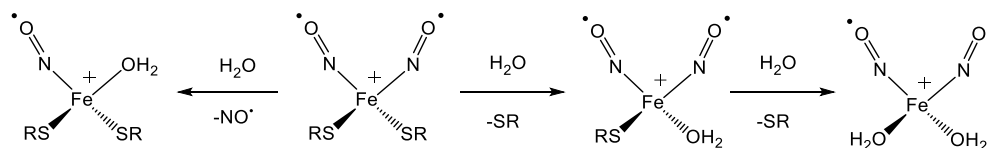


Рисунок 9 – Общая схема гидролиза ДНКЖ в анаэробных условиях

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

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

**В шестой главе** приводятся результаты моделирования связывания ДНКЖ на основе тиомочевины с бычьим сывороточным альбумином (БСА) методами молекулярного докинга и молекулярной динамики. Для белка использована трехмерная структура 4f5s.pdb.

### Докинг тиомочевинного железо-нитрозильного комплекса с альбумином

При взаимодействии ДНКЖ с альбумином могут образовываться как высокомолекулярные координационные железо-нитрозильные соединения с аминокислотными остатками в качестве лигандов, так и белок-лигандные комплексы, обусловленные межмолекулярными взаимодействиями. Метод докинга позволяет определить положения связывания ДНКЖ, выступающего в качестве лиганда, на поверхности альбумина. Структура лиганда (комплекса **II**) была получена по результатам квантово-химических расчетов. Докинг тиомочевинного комплекса **II** выявил 6 наиболее выгодных сайтов связывания на поверхности БСА, лежащих в пределах 12,5 кДж/моль. Во всех случаях

связывание происходит с анионными участками белка. Наиболее выгодными оказались сайты 1 и 4, локализованные вблизи остатка Cys34, способного замещать тиомочевину в координационной сфере железа. Стабилизация белок-лигандных комплексов осуществляется не только за счет электростатического притяжения к отрицательно заряженным карбоксильным группам, но преимущественно за счет неполярных взаимодействий с другими остатками альбумина.

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

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

### **Молекулярная динамика тиомочевинного железо-нитрозильного комплекса во взаимодействии с альбумином**

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

### **Заключение**

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

Проведен систематический конформационный анализ олигомеров хитозана. Установлено определяющее влияние полярности окружающей среды (растворителя) на устойчивость линейной и изогнутых конформаций основной цепи. Впервые проведено молекулярно-динамическое моделирование нитроксильных производных хитозана. Установлено, что нитроксильная группа

заместителя не участвует во внутримолекулярных взаимодействиях со звеньями основной цепи, которая сохраняет линейную структуру в воде. На основе полученных результатов по структуре данных производных выполнен расчет электрохимических потенциалов окисления и восстановления их нитроксильной группы.

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

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

### 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  $E_{\text{Ox}}$  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  $E_{\text{Ox}}$  в рамках модели термодинамического цикла.

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

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

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

5. Отщепление тиоформальдегида от модельного комплекса  $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{SCH}_2)_2^+$  носит экзотермический характер и протекает через стабильные пентакоординационные интермедиаты по ассоциативному механизму. Барьеры замещения тио-лиганда молекулами воды составляют  $\sim 5$  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  $\text{Fe}(\text{NO})_2(\text{SCH}_3)_2^-$  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, PA и PB субъединицах белка, при этом наиболее энергетически выгодные сайты связывания располагаются вблизи остатка Cys34.

#### **Основное содержание работы изложено в следующих работах:**

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

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

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).

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).

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).

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).

## 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». Черногловка. 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.