

На правах рукописи

АСАНБАЕВА Нургиз Байузаковна

**ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ
ТРИАРИЛМЕТИЛЬНЫХ И НИТРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ В
КАЧЕСТВЕ СПИНОВЫХ МЕТОК, СПИНОВЫХ ЗОНДОВ И
ПОЛЯРИЗУЮЩИХ АГЕНТОВ ДЛЯ ДПЯ МЕТОДОМ ЭПР**

1.3.17 — Химическая физика, горение и взрыв,
физика экстремальных состояний вещества

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск - 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Новосибирском институте органической химии им. Н.Н. Ворожцова Сибирского отделения Российской академии наук

Научный руководитель:

Багрянская Елена Григорьевна

профессор, доктор физико-математических наук, заведующая Лабораторией магнитной радиоспектроскопии, директор НИОХ СО РАН

Официальные оппоненты:

Володин Александр Михайлович

доктор химических наук, с.н.с., ведущий научный сотрудник Отдела материаловедения и функциональных материалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Институт катализа им. Г.К. Борескова Сибирского отделения Российской академии наук»

Уваров Михаил Николаевич

кандидат физико-математических наук, старший научный сотрудник Лаборатории химии и физики свободных радикалов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической кинетики и горения им. В. В. Воеводского Сибирского отделения Российской академии наук

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт «Международный томографический центр» Сибирского отделения Российской академии наук

Защита диссертации состоится 22 ноября 2023 г. в 16:45 на заседании Диссертационного совета 24.1.150.01 при ФГБУН Институте химической кинетики и горения Сибирского отделения Российской академии наук (ИХКГ СО РАН) по адресу: 630090, Новосибирск, ул. Институтская, д. 3, конференц-зал.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ИХКГ СО РАН и на сайте <http://kinetics.nsc.ru>. Текст автореферата размещён на сайте Высшей аттестационной комиссии при Министерстве образования и науки Российской Федерации по адресу: <http://vak.minobrnauki.gov.ru>.

Отзывы на автореферат в 2-х экземплярах просим направлять по адресу: 630090, г. Новосибирск, Институтская, 3, ИХКГ СО РАН, учёному секретарю диссертационного совета 24.1.150.01; e-mail: ref_dissovet@kinetics.nsc.ru.

Автореферат разослан “ ” октября 2023 года

Учёный секретарь
диссертационного совета,
кандидат химических наук



И. П. Поздняков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Нитроксильные (НР) и триарилметильные (ТАМ) радикалы – класс стабильных химических соединений, которые используются в спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) как спиновые зонды для детектирования кислорода, рН, оксида азота и окислительно-восстановительного статуса среды. Бирадикалы на основе НР и ТАМ также нашли свое применение в биофизике, став наиболее перспективными поляризуемыми агентами (ПА) в экспериментах с использованием динамической поляризации ядер (ДПЯ) в твердотельной ЯМР спектроскопии. В последние годы большой интерес привлекают исследования биомолекул в естественных условиях - в живой клетке. Однако при использовании традиционных НР в качестве спиновых меток, зондов или ПА в живых клетках возникает проблема их восстановления в диамагнитные гидроксилламины (ГА). Их более устойчивые аналоги демонстрируют низкую растворимость в водных средах. Поэтому структурный дизайн радикалов и нахождение баланса между количеством и объемом при подборе заместителей вокруг парамагнитного центра играют важную роль в получении лучших показателей по стабильности и водорастворимости. Модифицированные НР и ТАМ можно ковалентно связывать их с биомолекулами и использовать в качестве спиновых меток при исследовании структуры и функций нуклеиновых кислот, белков и их комплексов методами стационарной и импульсной ЭПР спектроскопии. Спектроскопия импульсного дипольного электронного парамагнитного резонанса является мощным методом измерения расстояний в спин-меченых белках и нуклеиновых кислотах [1] и позволяет измерять расстояние между спиновыми метками в диапазоне 1.8–16.0 нм. В диапазоне более коротких расстояний (0.5–1.8 нм) невозможно измерить расстояние с хорошей точностью данным методом из-за влияния сильного спинового обменного взаимодействия между радикальными центрами. Для измерения расстояний в таком интервале был предложен альтернативный подход в ЭПР спектроскопии, который основан на детектировании сверхтонких взаимодействий (СТВ) неспаренного электрона с окружающими

ядрами. Этот подход включает метод электронно-ядерного двойного резонанса (ДЭЯР, ENDOR) [2]. Марина Беннати и коллеги [3, 4] предложили использовать ДЭЯР в W, J-диапазоне и пару меток - нитроксил и атом фтора ^{19}F - для измерения расстояния в биомолекулах. Поскольку нитроксильные радикалы обладают значительной анизотропией g - тензора, в спектрах ДЭЯР проявляется ориентационная селективность. Как следствие, необходимо записывать спектры в различных положениях резонансного магнитного поля и затем их суммировать, что увеличивает время эксперимента и усложняет обработку данных. С другой стороны, выбор ориентации может привести к повышению чувствительности для очень малых взаимодействий за счет разделения различных компонентов тензора дипольного СТВ и дает больше информации о системе. В настоящей работе было предложено модифицировать данную методику заменой НР на ТАМ радикалы, которые практически не проявляют ориентационную селективность и, благодаря этому, значительно упрощают получение и обработку экспериментальных данных.

Степень разработанности темы исследования

В литературе представлено большое количество бирадикалов, демонстрирующих высокую эффективность в качестве ДПЯ агентов. Но как было упомянуто выше, большинство из них являются не водорастворимыми, либо неустойчивыми к восстановлению, что ограничивает их применение в биологических исследованиях. Поэтому структурный дизайн радикалов и нахождение баланса между количеством и объемом заместителей вокруг радикальных центров играют важную роль в получении лучших показателей по стабильности и водорастворимости, а также для достижения высокой эффективности ДПЯ.

В настоящее время для структурных исследований биомолекул в диапазоне коротких расстояний (до 1.5 нм) успешно применяется метод ^{19}F ДЭЯР спектроскопии. Основными типами парамагнитных меток используемых в данном методе являются нитроксильные радикалы, которые обладают значительной ориентационной селективностью, тем самым усложняя проведение экспериментов и обработку данных, и метки на основе Gd^{3+} . Комплексы Gd^{3+} обладают меньшей ориентационной

селективностью по сравнению с нитроксилами, но для них проведение экспериментов ДЭЯР возможно только в высоких магнитных полях (> 3.4 Тл), что является труднодоступным для большинства экспериментаторов. Поэтому разработка методики, позволяющей преодолеть вышеперечисленные ограничения, является актуальной задачей.

Цели настоящей работы:

1) Охарактеризовать ряд новых стереозамещенных нитроксильных и фосфорсодержащих тритильных монарадикалов в качестве спиновых зондов на основе измерения магниторезонансных параметров, рН-чувствительности (рКа), а также стабильности к восстановлению аскорбиновой кислотой в модельных условиях.

2) Оценить потенциал применения ряда новых стабильных нитроксильных и тритил-нитроксильных бирадикалов в качестве поляризующих агентов для ДПЯ на основе измерения таких параметров как обменное и диполь-дипольное взаимодействие, а также стабильность к восстановлению аскорбиновой кислотой в модельных условиях.

3) Разработать метод ^{19}F ДЭЯР для измерения расстояний в диапазоне 0.8 - 1.8 нм в биополимерах на основе стабильного триарилметильного радикала и фторной спиновой метки.

Объектами исследования данной работы были синтезированные в НИОХ СО РАН моно - и бирадикалы с нитроксильным и триарилметильным остовом. Для проведения экспериментов на биологических молекулах, сотрудниками ИХБФМ СО РАН были получены ДНК дуплексы, содержащие метки ^{19}F и триарилметильные метки.

Для достижения поставленных целей были определены **следующие задачи:**

- для стереозамещенных нитроксильных монарадикалов - определить их магнитно-резонансные параметры, а также определить их стабильность в среде аскорбата;

- для фосфорсодержащего триарилметильного радикала построить кривую рН – титрования и вычислить рКа;

- для водорастворимых бирадикалов - определить их магнитно-резонансные параметры, а также определить их

устойчивость по отношению к аскорбиновой кислоте в модельных условиях;

- для спироциклогексилзамещенных ферроценсодержащих нитроксильных бирадикалов – охарактеризовать их термическую устойчивость и рассмотреть влияние нуклеофила на линкер;

- для модельных фторсодержащих радикалов – измерить расстояния между атомом фтора и парамагнитным центром методом импульсной ^{19}F ДЭЯР спектроскопии, выявить ограничения методики;

- для биологических объектов: необходимо было методом импульсной ^{19}F ДЭЯР спектроскопии в сильных магнитных полях исследовать ДНК дуплексы с разным набором расстояний между введенными на концах фторной и триарилметильными метками и сравнить полученные из экспериментальных данных расстояния с расчетными, полученными методом молекулярной динамики. Выявить факторы, влияющие на распределение расстояний в исследуемых дуплексах.

Научная новизна

Для целого ряда новых нитроксильных и тритилнитроксильных бирадикалов были измерены такие параметры, как: константы СТВ, величины обменного взаимодействия и константы скорости восстановления аскорбиновой кислотой. Показано, что данные радикалы устойчивы в среде аскорбата в течение десятков часов, что позволяет их использовать в исследованиях биологических объектов, в частности, в экспериментах в клетках.

Впервые в ^{19}F ДЭЯР спектроскопии в качестве парамагнитного центра были использованы триарилметильные метки. Для исследуемых меченых ДНК дуплексов были получены качественные разрешенные спектры ДЭЯР Мимса, из которых даже при грубой прямой оценке были получены расстояния в пределах достоверности.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные данные имеют важное практическое значение и могут быть применены в структурных исследованиях биомакромолекул, а именно олигонуклеотидов, с помощью адресного введения спиновых меток и импульсной ^{19}F ДЭЯР спектроскопии.

В результате проведенных исследований была показана перспективность применения триарилметильных радикалов в качестве спиновых меток для ^{19}F ДЭЯР спектроскопии, показаны преимущества и недостатки по сравнению с ранее используемыми нитроксильными метками.

Исследуемые водорастворимые нитроксильные и тритил-нитроксильные бирадикалы показали свою перспективность для дальнейшего применения в экспериментах ДПЯ ЯМР в клетках, благодаря своей устойчивости к восстановлению и необходимых значений обменных и дипольных взаимодействий.

Методология и методы диссертационного исследования

В работе были использованы методы стационарной ЭПР спектроскопии в жидкости и импульсной ЭПР спектроскопии (запись эхо-детектируемых спектров, времен релаксации, эксперименты ДЭЯР Мимса) при нескольких частотах (34, 94 и 264 ГГц). Для подтверждения достоверности полученных результатов для объектов исследования были проведены конформационный анализ и моделирование молекулярной динамики. Моделирование спектров ЭПР было проведено с помощью пакета программ *EasySpin*.

Положения, выносимые на защиту

1. Высокая устойчивость новых нитроксильных и тритил-нитроксильных бирадикалов в среде аскорбата в течение десятков часов, что позволяет их использовать в исследованиях биологических объектов, в частности, в экспериментах в клетках.

2. Изменение величины обменного взаимодействия в ферроценсодержащих бирадикалах под воздействием нуклеофила – *n*-бутиламина – из-за раскрытия diazetidinoвого линкера. Влияние конформаций бирадикалов с нулевым обменным взаимодействием на эффективность ДПЯ.

3. Отсутствие значительной ориентационной селективности в спектрах тритильных радикалов даже в высоких магнитных полях, что позволяет записывать спектры ДЭЯР Мимса в одном положении поля- с максимальным сигналом эха и минимизировать экспериментальное время.

4. Влияние ненулевого изотропного СТВ в модельных фторсодержащих триарилметильных радикалах на получение корректных результатов.

5. Применимость и достаточность Q-диапазона (34 ГГц) для исследований тритил-меченых объектов методом импульсной ^{19}F ДЭЯР спектроскопии, благодаря четкому разнесению сигналов от протонов тритила и атома фтора, а также достоверность измеряемых расстояний (в диапазоне 0.8 -1.8 нм) между фторной и триарилметильной меткой.

Личный вклад соискателя

Автор диссертации принимал непосредственное участие в проведении всех экспериментов, описанных в главе диссертации «Экспериментальная часть», и обработке результатов. Проводил интерпретации полученных данных и подготовку статей и тезисов к публикации. Эксперименты с использованием импульсных ЭПР-спектрометров проводились совместно с к.ф.-м.н. А.А. Сухановым (КФТИ КазНЦ РАН, Казань), А. Meyer, A. Kehl (Институт Макса Планка, Геттинген, Германия). Объекты исследований были синтезированы в лабораториях НИОХ СО РАН: нитроксильные радикалы — в лаборатории азотистых соединений под руководством к.х.н. И.А. Кирилюка; триарилметильные радикалы — в группе изучения тритильных радикалов под руководством к.х.н. В.М. Тормышева, ферроценсодержащие бирадикалы – к.х.н. Гурской Л.Ю. Меченые ДНК дуплексы были предоставлены к.х.н. Д.С. Новопашиной, ИХБФМ СО РАН.

Степень достоверности и апробация результатов исследований

Достоверность результатов данной работы основана на применении комплекса экспериментальных и расчетных методов исследования. Полученные результаты не противоречат литературным данным. Все эксперименты были проведены на специализированном оборудовании и с использованием последних версий доступных программных пакетов.

По материалам диссертации опубликовано 7 статей в рецензируемых научных журналах и 8 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

Кроме того, результаты диссертационной работы докладывались на следующих российских и международных конференциях: Современные проблемы органической химии (СПОХ-2022 и СПОХ-2023), V Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов» (МОСМ 2021), Международная конференция «Modern Development of Magnetic Resonance» (MDMR - 2021), XXIII Симпозиум «Современная химическая физика» (2021), 17th EUROMAR conference (2021), Modern Development of Magnetic Resonance (MDMR – 2020), VI International School for Young Scientists «Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics» (2020).

Соответствие специальности 1.3.17 – химическая физика, горение и взрыв, физика экстремальных состояний вещества

Работа соответствует пунктам паспорта специальности: №1 «атомно-молекулярная структура химических частиц и веществ, механизмы химического превращения», №2 «пространственное и электронное строение, атомно-молекулярные параметры изолированных атомов, ионов, молекул», №5 «химические механизмы реакций и управление реакционной способностью».

Связь работы с научными программами и грантами

Тема диссертационной работы является составной частью тематики госзадания НИОХ СО РАН. Отдельные части работы выполнены при поддержке мегагранта 14.W03.31.0034 Министерства науки и высшего образования России "Многочастотный электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) для биохимических исследований" (2018-2022), гранта Российского научного фонда (РНФ), проект № 21-14-00219 «Изучение структуры и динамики биологических систем, моделирующих репарацию ДНК методами магнитного резонанса» (2021– 2023), гранта DAAD № 57588366.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из введения, пяти глав, результатов и выводов, списка литературы, включающего 135 источников. Работа изложена на 98 страницах, содержит 37 рисунков, 11 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описываются актуальность и разработанность темы, формулируются цели и задачи исследования, описываются научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, методы исследования, формулируются положения, выносимые на защиту, степень достоверности результатов исследования, личный вклад автора, сведения об апробации результатов.

Первая глава посвящена обзору литературы. В ней описаны основные характеристики и области применения нитроксильных и триарилметильных радикалов, в том числе применения, связанные со структурной биологией. Также в обзоре описаны основные принципы методов ЭПР, которые используются в работе. В частности рассмотрен метод импульсной ДЭЯР спектроскопии.

Вторая глава посвящена исследованию функциональных свойств нитроксильных радикалов **2.1-2.4**. (Рисунок 1) и фосфорсодержащего триарилметильного радикала (Рисунок 2).

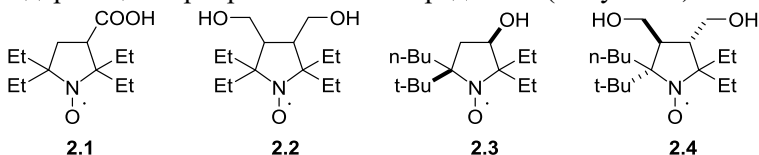


Рисунок 1 – Структуры стереозамещенных нитроксильных радикалов **2.1-2.4**.

Экспериментально полученные магнитно-резонансные параметры новых нитроксидов **2.3** и **2.4** приведены в Таблице 1. Для сравнения в Таблице 1 приведены параметры радикалов **2.1** и **2.2**. Спектры нитроксидов **2.3-2.4** характеризуются триплетом дублетов с константой СТВ на ядрах азота и водорода.

Кинетика восстановления нитроксидов до гидроксиламинов была исследована в присутствии многократного избытка восстановителя - 0.5 М аскорбата при pH 7.4. Константы скорости восстановления нитроксидов второго порядка приведены в Таблице 1. Константы скорости получены из обработки начального участка кинетики, когда накопление дегидроаскорбат-аниона было ничтожно мало [5]. Приведенные данные свидетельствуют о том,

что наиболее устойчивым к восстановлению является нитроксил 2.4.

Таблица 1 – Параметры спектров ЭПР и константы скорости восстановления аскорбатом нитроксидов 2.1-2.4.

Нитроксильный радикал	Растворитель	Параметры ЭПР		$k_{\text{Red}} \times 10^4, \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$
		$A_N, \text{ мТл}$	$A_H, \text{ мТл}$	
2.1	H ₂ O	1.56	-	12.5 ± 0.3
	H ₂ O-MeOH	1.52	-	0.6 ± 0.2
2.2	H ₂ O	1.53	0.23	3.8 ± 0.5
	H ₂ O-MeOH	1.49	0.20	1.2 ± 0.1
2.3	H ₂ O	1.61	0.21	-
	H ₂ O-MeOH	1.53	0.20	1.7 ± 0.1
2.4	H ₂ O	1.59	0.25	-
	H ₂ O-MeOH	1.50	0.25	0.012 ± 0.03

Так как сверхтонкое расщепление в спектрах ЭПР не зависит от частоты спектрометра, оно может использоваться в качестве чувствительного рН-маркера в низкочастотной ЭПР спектроскопии. Одним из таких рН-чувствительных радикалов является ТАМ, содержащий фосфатную группу (Рисунок 2).

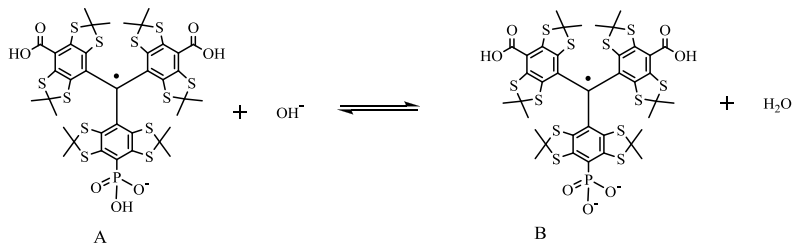


Рисунок 2 – Кислотно-основное равновесие с участием ТАМ, представленного в форме кислоты А и основания В.

ТАМ растворим в водных буферных растворах при рН 4.0-11.0 с получением концентрированных (до 10 мМ) растворов, при этом ожидаемо наблюдается зависимость вида спектра ЭПР от рН среды. При значениях рН выше 10 в спектре детектируется расщепление сигнала с константой СТВ на ядре атома фосфора $A_p = 0.333 \text{ мТл}$, при снижении рН до 4.5 константа СТВ увеличивается

до 0.361 мТл. Титрование водного раствора ТАМ с параллельной регистрацией спектров ЭПР и измерением рН позволило определить характер зависимости распределения форм А (кислота) и В (основание) от кислотных характеристик среды (Рисунок 2). Эта зависимость согласуется с ранее опубликованными данными о поведении полидейтерированной формы ТАМ в условиях кислотно-основного равновесия. Полученное при обработке кривой титрования значение рКа составило 6.9 ± 0.1 , что совпадает с результатами, опубликованными в литературе для дейтерированного аналога, и позволяет использовать его в качестве спинового зонда для измерений в физиологическом диапазоне рН.

Третья глава посвящена исследованию нитроксильных и тритил-нитроксильных бирадикалов.

На Рисунке 3 представлены структуры водорастворимых тетраэтилзамещенных нитроксильных бирадикалов **3.3-3.4**.

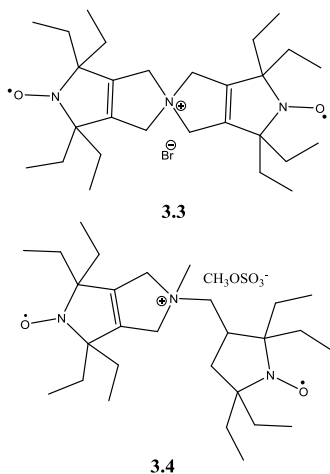


Рисунок 3 – Химические структуры нитроксильных бирадикалов **3.3-3.4**.

1000–кратному избытку аскорбата. Скорость восстановления бирадикалов определялась скоростью гибели менее устойчивого монорадикального фрагмента. Так как пирролидиновые НР являются наиболее стабильными в ряду циклических нитроксидов,

Спектр ЭПР симметричного жесткого бирадикала **3.3** был описан системой с одной фиксированной величиной обменного взаимодействия между радикальными центрами $|J| = 206 \pm 2$ МГц. Для асимметричного бирадикала **3.4** с подвижным линкером спектр ЭПР удалось смоделировать только с учетом распределения J с центром в $J = 0$ МГц и шириной $\sigma(J) = 120$ МГц. Стабильность к восстановлению для нитроксильных бирадикалов определялась по отношению к

бирадикал **3.4** продемонстрировал более медленную кинетику гибели радикальных центров, чем **3.3**. Было показано, что даже в жесткой среде аскорбата данные соединения стабильны в течение нескольких часов, что позволит их использовать как ПА в экспериментах на клетках.

На Рисунке 4 представлены химические структуры другого типа ПА - тритил-нитроксильных бирадикалов на основе Finland/OX063 и тетраэтилзамещенных нитроксильных радикалов **3.5-3.8**. Спектры ЭПР тритил-нитроксильных бирадикалов **3.6-3.8** имеют схожий вид, с выраженным вкладом обменных линий, соответствующих большому значению J ($J > 4 A_N$).

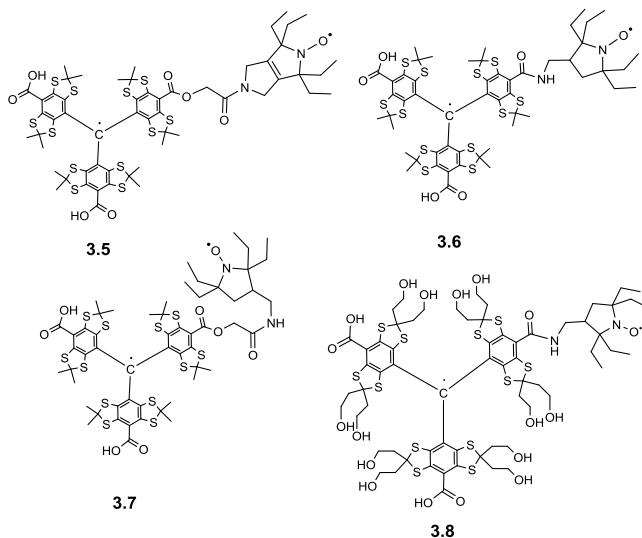


Рисунок 4 – Химические структуры тритил-нитроксильных бирадикалов **3.5-3.8**.

Скорость превращения тритил-нитроксильных бирадикалов под воздействием избытка аскорбата определяется восстановлением нитроксильной части, так как тритильный фрагмент практически не восстанавливается, и его относительный вклад в спектр увеличивается с течением времени реакции (Рисунок 5). Кинетика гибели бирадикалов **3.5** и **3.7** имеет быстрый спад на 20-30% в

течение первых 20 минут для бирадикала **3.5**, а для бирадикала **3.7** аналогичный спад происходит за 3 часа. Затем кинетическая кривая практически выходит на плато, которое представляет собой динамическое равновесие между образующимся гидроксиламином и радикалом. Различие в кинетике начальных спадов хорошо согласуется с различием в константах скорости восстановления соответствующих нитроксильных фрагментов.

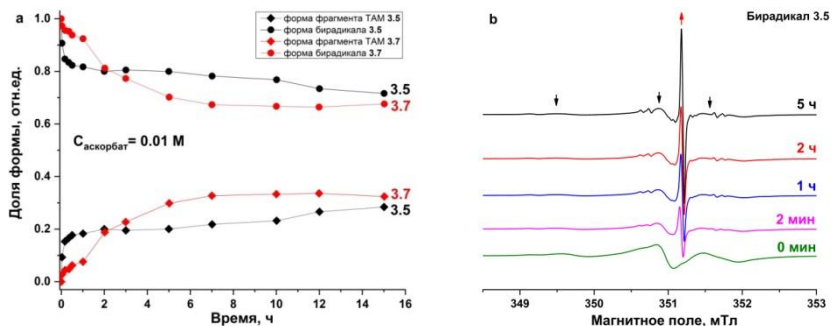


Рисунок 5 – **а**) Кинетики восстановления бирадикалов **3.5**, **3.7** в присутствии 0.01 аскорбата при pH 7.4. Кинетики, соответствующие изменению содержания бирадикала, отмечены кругом, тритила – ромбом. **б**) Изменение спектров ЭПР бирадикала **3.5** в течение 5 часов после добавления аскорбата. Красными и черными стрелками показано увеличение тритильной и уменьшение нитроксильных линий соответственно.

Как и в случае биснитроксидов **3.3-3.4**, было показано, что даже в жесткой восстановительной среде аскорбата тритил-нитроксильные бирадикалы **3.5-3.8** стабильны в течение более десяти часов, что позволит их использовать в экспериментах на клетках.

Помимо водорастворимых бирадикалов, в качестве возможных ДПЯ агентов были изучены бирадикалы на основе ферроценсодержащих нитроксидов (Рисунок 6). Выбор спироциклогексановых заместителей был связан с тем, что, введение спироциклов в положения, соседние с нитроксильной группой, приводит к увеличению времени электронной спиновой релаксации, а также повышению стабильности в восстановительных средах. Кроме того, наличие 1,3-диазетидинового линкера с

ферроценом задает особую жесткую структуру бирадикалов, что влияет на обменное взаимодействие между радикальными фрагментами.

При сравнении структур и свойств бирадикалов **3.11-3.12** было обнаружено, что спироциклогексановые заместители влияют не только на величину обменного взаимодействия, но и на реакционную способность 1,3-дiazетидинового кольца при воздействии нуклеофилов. От величины обменного взаимодействия непосредственно зависит коэффициент усиления ДПЯ ϵ : чем больше J , тем больше усиление сигнала. Спектр бирадикала **3.11** характеризуется широким распределением по J , с центром $J \sim 170$ МГц. Для радикала **3.12** спектр ЭПР был описан равным вкладом двух конформаций: $J = 0$ и $J = 218$ МГц. После полной характеристики методом стационарной ЭПР спектроскопии бирадикалы **3.3-3.4** и **3.11-3.12** были проверены в качестве ДПЯ агентов в техническом университете г. Дармштадт (Германия). В соответствующих матрицах для всех четырех бирадикалов были получены ^1H MAS и $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CPMAS спектры в присутствии и отсутствии СВЧ-излучения. Рассчитанные итоговые коэффициенты усиления ДПЯ ϵ приведены в Таблице 2.

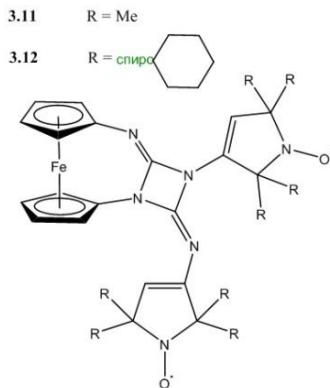


Рисунок 6 – Химические структуры бирадикалов **3.11-3.12**.

Таблица 2 – Коэффициенты усиления ДПЯ ϵ для нитроксильных бирадикалов **3.3-3.4** (растворитель - глицерин- $d_8/D_2O/H_2O$ (60:30:10 об.)) и **3.11-3.12** (растворитель - ТХЭ).

Бирадикал	3.3	3.4	3.11	3.12
^1H , ϵ	13	9	15	4
^{13}C , ϵ	15	9	14	4

Как и предполагалось, значительный вклад конформаций с нулевым обменным взаимодействием у бирадикалов **3.4** и **3.12**

снижает эффективность ДПЯ по сравнению с их аналогами **3.3** и **3.11**, у которых такой вклад минимален (Таблица 2).

Известно, что 1,3-дiazетидиновые циклы подвергаются раскрытию кольца при взаимодействии с нуклеофилами. Такое превращение приводит к появлению новых бирадикалов с увеличенными расстояниями между спиновыми фрагментами и очень низкими значениями J , что является негативным эффектом для ДПЯ экспериментов. Поэтому в данной работе была рассмотрена реакция бирадикалов с нуклеофилом – *n*-бутиламином. В ходе реакции в спектрах ЭПР наблюдалось изменение соотношения интенсивностей линий, соответствующих бирадикалам с $J \approx 0$ и линий, соответствующих бирадикалам с сильным обменным взаимодействием $J \gg 0$. Были рассчитаны вклады в спектр от двух компонент с разными значениями J , полученные зависимости этих весов от времени реакции представлены на Рисунке 7. Для бирадикала **3.12** изменений практически не наблюдалось.

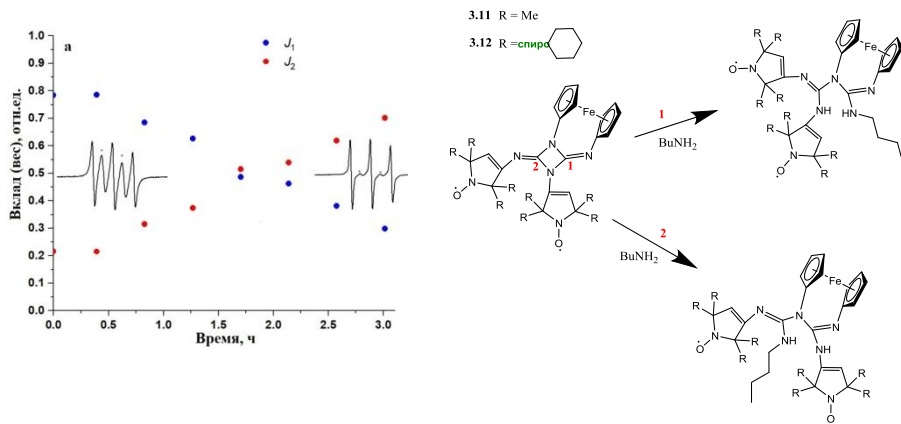


Рисунок 7 – Зависимость соотношения двух компонент спектра ЭПР с разным значением J от времени в реакции раскрытия цикла для радикала **3.11** (слева) и предполагаемые схемы реакции бирадикалов **3.11-3.12** с избытком *n*-бутиламина при комнатной температуре (справа).

Для асимметрично замещенных 1,3-дiazетидинов при взаимодействии с аминами предполагаются два возможных пути

реакции (Рисунок 7, справа). Из-за наличия объемных спириоциклогексановых заместителей путь 1 более вероятен для бирадикала **3.12** (соотношение вкладов с разными значениями J остается постоянным). Для метилзамещенного бирадикала **3.11** возможны оба варианта, что приводит к значительному ускорению раскрытия цикла. Результаты этого эксперимента наглядно демонстрируют преимущество спириозамещенных бирадикалов в нуклеофильной среде.

Четвертая глава посвящена исследованию модельных и биологических систем методом ^{19}F ДЭЯР спектроскопии с использованием тритильного радикала и фторной спиновой метки.

Предварительно методика ^{19}F ДЭЯР была отработана на специально синтезированных модельных соединениях, с различными линкерами между остовом тритильного радикала и фторсодержащим фрагментом (Рисунок 8).

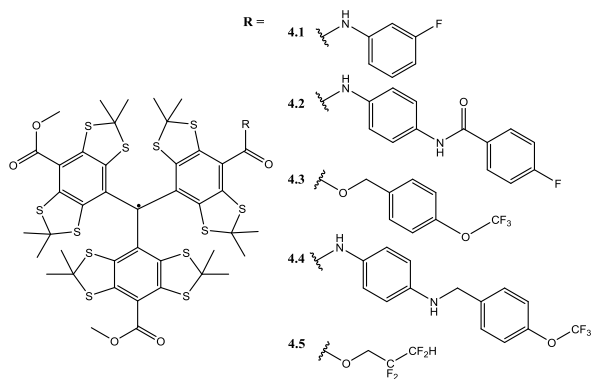


Рисунок 8 – Структура модельных фторсодержащих ТАМ **4.1-4.5**.

Для определения влияния анизотропии g -тензора тритила на спектры ДЭЯР, 94 ГГц ^{19}F спектры ДЭЯР Мимса были записаны на двух разных резонансных положениях магнитного поля (Рисунок 9). Полученные спектры практически идентичны друг другу, что приводит к выводу об отсутствии ориентационной селективности у тритилов. Таким образом, можно получать спектры ДЭЯР Мимса только в одном положении магнитного поля - соответствующем максимуму сигнала эха, в отличие от нитроксидов, где необходимо

записывать спектры при 5-ти различных положениях и затем суммировать их. Данный результат для радикалов ТАМ позволяет значительно оптимизировать время работы на спектрометре и упростить обработку данных.

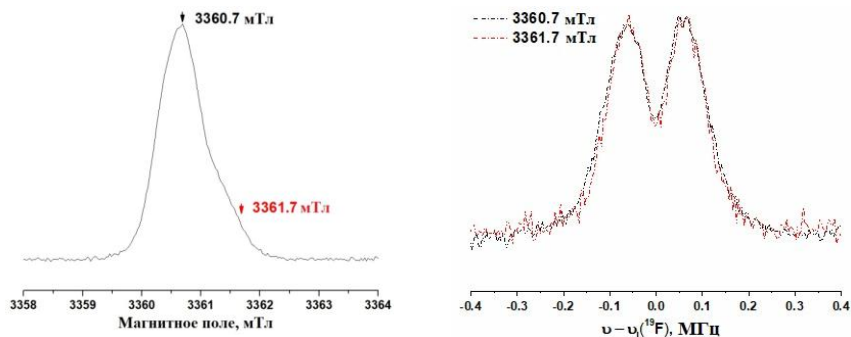


Рисунок 9 – а) 94 ГГц эхо-детектируемый спектр ЭПР радикала **4.5** в $[d_6]$ ДМСО/ $[d_4]$ MeOD (2:3). б) 94 ГГц ^{19}F спектры ДЭЯР Мимса радикала **4.5** в $[d_6]$ ДМСО / $[d_4]$ MeOD (2:3) в положениях 3360.7 мТл (черный) и 3361.7 мТл (красный) при 80 К. Эксперименты проведены на оборудовании КФТИ КазНЦ РАН (г. Казань, Россия).

Для радикалов **4.1** и **4.5** удалось получить хорошо разрешенные спектры ^{19}F ДЭЯР Мимса. В результате обработки полученных спектров ДЭЯР Мимса было выявлено, что расстояние между центром тритила и атомом фтора, рассчитанное непосредственно из спектра с использованием приближения точечного диполя (уравнение 1):

$$T_{\perp} = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar} \left(\frac{g_{\text{ТАМ}} g_F \mu_e \mu_N}{R^3} \right) = \frac{C}{R^3} \quad (1)$$

для радикала **4.1** не соответствует ни одному из его 2-х возможных конформеров. Причиной данного несоответствия стало наличие значительной изотропной константы СТВ на атоме ^{19}F ($A_{\text{Физо}} > 150$ кГц) из-за сопряжения ароматической системы остова тритила и линкера.

На следующем этапе, в качестве исследуемых объектов исследований были выбраны 20-мерные ДНК дуплексы,

содержащие 2'-фтормодифицированный нуклеотид на 3'-конце одной цепи и ТАМ метку на 5'-конце комплементарной цепи. 2'-Фтормодифицированный нуклеотид вводили в первое или второе положение от 3'-конца олигонуклеотида 2 (F1 и F2). Серии дуплексов ДНК отличались расстоянием между ТАМ и атомом фтора (Рисунок 10).

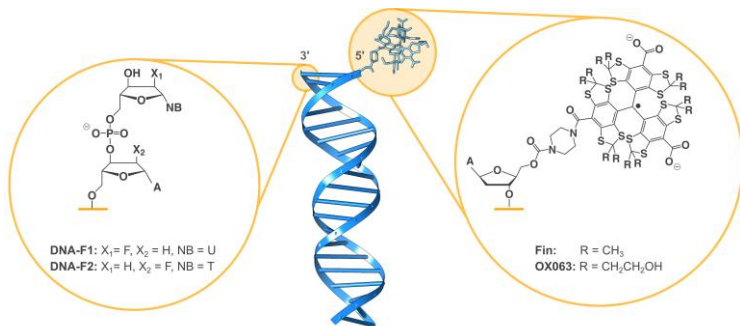


Рисунок 10 – Схематическое изображение синтезированных 20-мерных дуплексов ДНК.

Было проведено сравнение спектров ДЭЯР Мимса в положении максимального эха, записанных при трех частотах – 34, 94 и 263 ГГц. Данные эксперименты были проведены на высокочастотных импульсных ЭПР спектрометрах в г. Геттинген (Германия). Явных отличий в форме спектров не наблюдалось. Таким образом, можно сделать вывод о том, что тритил-меченные объекты можно исследовать в более доступном Q-диапазоне. Однако необходимо иметь в виду, что для проведения таких экспериментов экспериментальная установка должна быть оснащена мощным радиочастотным усилителем. Для всех меченых дуплексов ДНК мы наблюдали разрешенные спектры ДЭЯР Мимса, что позволило рассчитать T и, как следствие, расстояние R непосредственно из спектра. В Таблице 3 представлены значения сверхтонкого взаимодействия, определенные непосредственно из экспериментальных ДЭЯР спектров. Значения T_{read} определяли как расстояние между максимумами пиков спектра. Для проверки достоверности полученных значений с помощью МД-

моделирования (выполнено к.х.н. Шернюковым А.В.) были рассчитаны расстояния между фтором и центром ТАМ в исследуемых дуплексах (Рисунок 11).

Таблица 3 – Параметры моделирования 34 ГГц спектров ДЭЯР Мимса

Образец	τ , нс	T_{read} , МГц	R_{reads} Å
Fin-DNA20-F1	2500	0.09 ± 0.01	9.3 ± 0.4
	1600	0.11 ± 0.01	8.9 ± 0.3
Fin-DNA20-F2	2000	0.04 ± 0.01	12.1 ± 1.1
OX063-DNA20-F1	2500	0.08 ± 0.01	9.7 ± 0.5
	1000	0.09 ± 0.01	9.4 ± 0.4
OX063-DNA20-F2	2500	0.03 ± 0.01	14.4 ± 3.4

Значения расстояний, полученных экспериментально с помощью ДЭЯР, соответствуют области конфигураций с наибольшим весом в МД-распределении. Этот факт говорит о том, что в данной методике даже грубая оценка расстояний без моделирования спектров дает надежный результат. Расчетные спектры ДЭЯР Мимса на основе МД-распределения хорошо описывают экспериментальные данные (Рисунок 11). В этом случае возможно извлечь больше информации о терминальной структуре дуплексов ДНК.

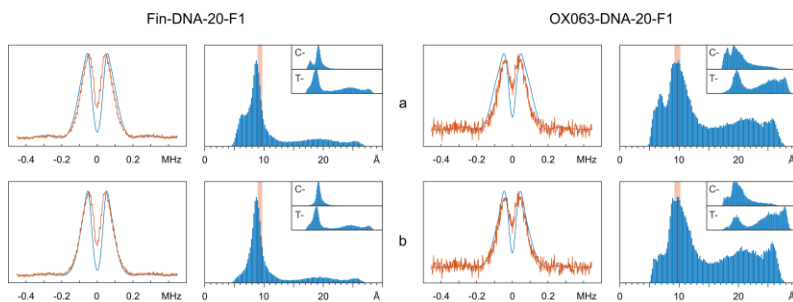


Рисунок 11 – Сравнение расчетных спектров ДЭЯР Мимса (на основе конформаций из МД-моделирования, синяя линия) с экспериментальными (оранжевая линия) и соответствующие распределения парных расстояний между атомом F и центральным атомом углерода тритильного фрагмента. Оранжевой областью на распределении отмечен интервал, полученный по разности пиков экспериментального дублета (см. R_{read} в Таблице 3).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Для ряда новых моно- и бирадикалов были измерены спектры ЭПР и времена электронной спиновой релаксации. На основании сравнения экспериментальных и расчетных спектров получены магнитно-резонансные параметры а именно, константы СТВ, величины обменного взаимодействия (J).

2. Показана высокая устойчивость новых нитроксильных и тритил-нитроксильных моно- и бирадикалов в среде аскорбата в течение десятков часов, что позволяет их использовать в исследованиях биологических объектов, в частности, в экспериментах на клетках.

3. Для ферроценсодержащих бирадикалов была исследована зависимость обменного взаимодействия от температуры. Исследовано изменение величины обменного взаимодействия в ферроценсодержащих бирадикалах под воздействием нуклеофила – *n*-бутиламина – из-за раскрытия диазетидинового линкера. Предположен возможный механизм реакции. Значительный вклад конформаций бирадикалов с нулевым обменным взаимодействием снижает эффективность ДПЯ.

4. Показано отсутствие значительной ориентационной селективности в спектрах тритила даже в высоких магнитных полях, что позволяет записывать спектры ДЭЯР Мимса в одном положении поля - с максимальным сигналом эха. Выявлено критическое влияние ненулевого изотропного СТВ в модельных фторсодержащих триарилметильных радикалах на получение корректных результатов по расстояниям.

5. Продемонстрирована применимость метода импульсной ^{19}F ДЭЯР спектроскопии в Q-диапазоне (34 ГГц), для тритил-меченых объектов, благодаря четкому разнесению сигналов от протонов тритила и атома фтора. Определена достоверность измеряемых расстояний (в диапазоне 0.8 - 1.8 нм) между фторной и триарилметильной меткой, полученных обработкой спектров ДЭЯР Мимса. Получено хорошее согласие с данными МД моделирования и конформационного анализа.

ЦИТИРУЕМАЯ ЛИТЕРАТУРА

[1] Jeschke G. DEER distance measurements on proteins / Jeschke G. // Annual Review of Physical Chemistry – 2012. – Т. 63 – С.419–446.

[2] Dikanov S.A. Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) Spectroscopy / Dikanov S.A., Tsvetkov Yu.D. – Boca Raton, Fla: CRC Press, 1992.

[3] Meyer A. Measurement of Angstrom to Nanometer Molecular Distances with ^{19}F Nuclear Spins by EPR/ENDOR Spectroscopy / Meyer A., Dechert S., Dey S., Höbartner C., Bennati M. // Angewandte Chemie - International Edition – 2020. – Т. 59 – № 1 – С.373–379.

[4] Kehl A. Resolution of chemical shift anisotropy in ^{19}F ENDOR spectroscopy at 263 GHz/9.4 T / Kehl A., Hiller M., Hecker F., Tkach I., Dechert S., Bennati M., Meyer A. // Journal of Magnetic Resonance – 2021. – Т. 333 – С.107091.

[5] Bobko A.A. Reversible reduction of nitroxides to hydroxylamines: Roles for ascorbate and glutathione / Bobko A.A., Kirilyuk I.A., Grigor'ev I.A., Zweier J.L., Khrantsov V. V. // Free Radical Biology and Medicine – 2007. – Т. 42 – № 3 – С.404–412.

ПУБЛИКАЦИИ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах:

[A1] **N.B. Asanbaeva**, D.S. Novopashina, O.Yu. Rogozhnikova, V.M.Tormyshev, A. Kehl, A.A. Sukhanov, A.V. Shernyukov, A.M. Genaev, A.A. Lomzov, M. Bennati, A. Meyer, E.G. Bagryanskaya. « ^{19}F electron nuclear double resonance (ENDOR) spectroscopy for distance measurements using trityl spin labels in DNA duplexes», Phys. Chem. Chem. Phys., 2023, 25, 23454-23466.

[A2] **Н.Б. Асанбаева**, О.Ю. Рогожникова, В.М. Тормышев, Д.А. Морозов, Ю.Ф. Полиенко, И.Ф. Журко, А.М. Генаев, Е.Г. Багрянская. «Синтез и ЭПР исследование высокостабильных тритил-нитроксильных бирадикалов», Изв. АН. Сер. хим., 2023, 72(11), 213-222.

[A3] **N.B. Asanbaeva**, S.A. Dobrynin, D.A. Morozov, N. Haro-Mares, T. Gutmann, G. Buntkowsky, E.G. Bagryanskaya. «An EPR study on highly stable nitroxyl-nitroxyl biradicals for dynamic nuclear

polarization applications at high magnetic fields», *Molecules* 2023, 28(4), 1926.

[A4] **N.B. Asanbaeva**, L.Yu. Gurskaya, Yu.F. Polienko, T.V. Rybalova, M.S. Kazantsev, A.A. Dmitriev, N.P. Gritsan, N. Haro-Mares, T. Gutmann, G. Buntkowsky, E.V. Tretyakov, E.G. Bagryanskaya. «Effects of Spiro-Cyclohexane Substitution of Nitroxyl Biradicals on Dynamic Nuclear Polarization», *Molecules* 2022, 27(10), 3252.

[A5] **N.B. Asanbaeva**, A.A. Sukhanov, A.A. Diveikina, O.Y. Rogozhnikova, D.V. Trukhin, V.M. Tormyshev, A.S. Chubarov, A.G. Maryasov, A.M. Genaev, A.V. Shernyukov, G.E. Salnikov, A.A. Lomzov, D.V. Pyshnyi, E.G. Bagryanskaya. «Application of W-band ¹⁹F electron nuclear double resonance (ENDOR) spectroscopy to distance measurement using a trityl spin probe and a fluorine label», *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2022, 24 (10), 5982-6001.

[A6] Irina F. Zhurko, Sergey Dobrynin, Artem A. Gorodetsky, Yuri I. Glazachev, Tatyana V. Rybalova, Elena I. Chernyak, **Nargiz Asanbaeva**, Elena G. Bagryanskaya, Igor A. Kirilyuk. «2-Butyl-2-tert-butyl-2,2-diethylpyrrolidine-1-oxyls: Synthesis and properties», *Molecules* (2020) 845 25.

[A7] О.Ю. Рогожникова, Д.В. Трухин, **Н.Б. Асанбаева**, В.М. Тормышев. «Простой и удобный метод синтеза многофункционального спинового зонда - фосфонатного производного стабильного радикала трис(тетрааарил)метильного ряда», *Журн. орг. химии*, 2021, V. 57, P. 905-913.

Тезисы конференций:

[A8] Н. Асанбаева, Д. Новопашина, О. Рогожникова, В. Тормышев, А. Kehl, А. Meyer, А. Суханов, А. Шернюков, А. Генаев, А. Ломзов, М. Vennati, Е. Багрянская, «Спектроскопия ¹⁹F электронного ядерного двойного резонанса для измерения расстояний в ДНК дуплексах с использованием триарилметильных спиновых меток», СПОХ-2023, 26-30 июня 2023, Академгородок, Новосибирск, Сборник тезисов, стр.109.

[A9] Л. Гурская, Ю. Полиенко, Т. Рыбалова, И. Багрянская, Н. Грицан, М. Казанцев, Е. Зайцева, Д. Пархоменко, Н. Асанбаева, И. Береговая, Е. Третьяков, Е. Багрянская, «Спиновые системы на основе ферроцен-1,1'-диил-1,3-диазетидин-2,4-диимина», СПОХ-

2022, 12-14 сентября 2022, Академгородок, Новосибирск, Сборник тезисов, стр.49.

[A10] E. Bagryanskaya, N. Asanbaeva, O. Krumkacheva, V. Tormushev, «Trityl radicals as spin labels», V Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов», МОСМ 2021, г. Екатеринбург, Россия, 8-12 ноября 2021 г, Сборник тезисов, PL-13.

[A11] Н.Б. Асанбаева, Д.А. Морозов, С.А. Добрынин, О.Ю. Рогожникова, Д.В. Трухин, И.А. Кирилук, В.М. Тормышев, Е.Г. Багрянская, «Исследование стабильности и обменных взаимодействий в нитроксильных и тритил-нитроксильных бирадикалов методом ЭПР», XXXIII Симпозиум «Современная химическая физика», 24 сентября -4 октября 2021 г., г. Туапсе, Россия, Сборник тезисов, стр.51.

[A12] N.B. Asanbaeva, A.A. Sukhanov, A.A. Diveikina, O.Yu. Rogozhnikova, D.V. Trukhin, V.M. Tormyshev, A.S. Chubarov, A.G. Maryasov, A.M. Genaev, E.G. Bagryanskaya, «W-band ¹⁹F ENDOR Spectroscopy for Distance Measurement Using Trityl Spin Probe», Международная конференция «Modern Development of Magnetic Resonance», MDMR 2021, Kazan, Russian Federation, 1-5 November 2021, Abstracts Book, p.75.

[A13] N. Asanbaeva, D. Morozov, S. Dobrynin, O. Rogozhnikova, D. Trukhin, I. Kirilyuk, V. Tormyshev, E. Bagryanskaya, «EPR study of highly stable biradicals perspective for DNP in cell», Euromar2021, (г. Любляна, Словения, 5 июля - 8 июля 2021). PO 121.

[A14] N. Asanbaeva, D. Morozov, S. Dobrynin, V. Tormyshev, I. Kirilyuk, E. Bagryanskaya, «Stable Novel Biradicals for Dynamic Nuclear Polarization», Modern Development of Magnetic Resonance, September 28–October 2 2020, Kazan, Russia. Abstracts. P.14.

[A15] N. Asanbaeva, D. Morozov, S. Dobrynin, V. Tormyshev, I. Kirilyuk, E. Bagryanskaya, «Novel Biradicals for Dynamic Nuclear Polarization», VI International School for Young Scientists 2020, Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics, September 2-10 2020, Roschino, Russia, Book of Abstr., P. 19.