

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
НОВОСИБИРСКИЙ ИНСТИТУТ ОРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
ИМ. Н. Н. ВОРОЖЦОВА
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

АСАНБАЕВА НАРГИЗ БАЙУЗАКОВНА

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

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

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель:
д. ф.-м. н., профессор
Багрянская Елена Григорьевна

Новосибирск, 2023

Оглавление

Список использованных обозначений	4
Введение.....	5
Глава 1. Литературный обзор	17
1.1 Нитроксильные радикалы	17
1.1.1 Механизм реакции восстановления нитроксильных радикалов под воздействием аскорбата.....	18
1.2 Триарилметильные радикалы	20
1.3 Динамическая поляризация ядер.....	22
1.3.1 Бирадикалы – поляризующие агенты	25
1.4 Методы импульсной ЭПР спектроскопии.....	26
1.4.1 Метод ДЭЯР спектроскопии.....	29
Постановка задачи	31
Глава 2. Исследование функциональных свойств нитроксильных и триарилметильных монорадикалов.....	33
2.1 Нитроксильные радикалы	33
2.2 Фосфорсодержащие триарилметильные радикалы	36
Заключение к главе 2.....	38
Глава 3. Исследование обменных взаимодействий и стабильности в нитроксильных и тритил–нитроксильных бирадикалах	39
3.1 Нитроксил-нитроксильные бирадикалы.....	39
3.2 Тритил-нитроксильные бирадикалы	43
3.3 Исследование спирозамещенных ферроценсодержащих бирадикалов 50	
3.3.1 Реакция раскрытия diaзетидинового кольца в ферроценсодержащих бирадикалах.....	54

Заключение к главе 3	56
Глава 4. Применение триарилметильных радикалов для измерения расстояний в модельных и биологических объектах методом ^{19}F ДЭЯР спектроскопии	58
4.1 Измерение расстояний в модельных фторсодержащих триарилметильных радикалах	58
4.2 Измерение расстояний в ДНК дуплексах, сравнение спектров при разных частотах (34, 94 и 263 ГГц).....	65
4.3 Особенности моделирования спектров ДЭЯР и обработки распределений	71
Заключение к главе 4.....	75
Глава 5. Экспериментальная часть.....	77
5.1 Параметры записи стационарных ЭПР спектров в X - диапазоне.....	77
5.2 Приготовление проб для измерений в X - диапазоне.....	77
5.3 Параметры экспериментов ДЭЯР Мимса.....	78
Основные результаты и выводы.....	80
Список литературы	82

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АК – аскорбиновая кислота

ГА – гидроксилламин

ДПЯ – динамическая поляризация ядер

НР – нитроксильный радикал

ПА – поляризующий агент

СТВ – сверхтонкое взаимодействие

ТАМ – триарилметильный радикал

ЭПР – электронный парамагнитный резонанс

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

СВ ЭПР – continuous wave ЭПР, стационарный метод ЭПР

ENDOR, ДЭЯР – electron nuclear double resonance, электрон-ядерный двойной резонанс

GSH – глутатион

HSA, ЧСА – human serum albumin, человеческий сывороточный альбумин

PELDOR, ДЭЭР – pulsed electron double resonance, импульсный метод двойного электронного резонанса

PRE – paramagnetic relaxation enhancement, усиление парамагнитной релаксации

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Нитроксильные и триарилметильные (ТАМ) радикалы – класс стабильных химических соединений, который используется в спектроскопии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) и его модификациях для детектирования кислорода [1, 2], рН [3, 4], оксида азота [5] и окислительно-восстановительного статуса среды [1, 2]. Благодаря введению специальных групп в структуру нитроксильных 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 методом стационарной (CW) и импульсной ЭПР спектроскопии.

Бирадикалы - соединения, состоящие из двух радикальных фрагментов, также нашли свое применение в биофизике, став наиболее перспективными поляризующими агентами (ПА) в экспериментах с использованием динамической поляризации ядер (ДПЯ) в твердотельной ЯМР спектроскопии. Метод ДПЯ заключается в селективном насыщении электронных переходов в ПА микроволновым излучением. Выравнивание населенности электронных уровней индуцирует кросс-релаксационные переходы с переворотом ядерных спинов и в итоге к их поляризации. Усиление сигнала ядерных спинов за счет ДПЯ может составлять десятки и сотни раз, что позволяет изучать спектры ЯМР при малых концентрациях биомолекул.

В последние годы большой интерес привлекают исследования биомолекул в естественных условиях - в живой клетке. Показано, что в некоторых случаях структура белков различается в клетках и модельных условиях. Однако при использовании традиционных НР с метильными заместителями около N-О группы в живых клетках возникает проблема восстановления спиновых меток или зондов в диамагнитные гидроксилламины (ГА) с помощью низкомолекулярных восстановителей и ферментных систем, обычно находящихся внутри клеток. Для увеличения стабильности нитроксильных радикалов на протяжении последних

десятилетий исследовательские группы проводят их модификацию, изменяя остов и заместители вокруг радикального центра. Добавление объемных заместителей в окружение N-O фрагмента позволяет сделать его стерически недоступным для молекул восстановителя, тем самым сохраняя парамагнитный центр. Но увеличение числа алкильных заместителей приводит также к ухудшению растворимости радикалов в воде. А водорастворимость спиновых зондов и меток является одним из важнейших критериев для биофизических приложений. Поэтому структурный дизайн радикалов и нахождение баланса между количеством и объемом при подборе заместителей играют важную роль в получении лучших показателей по стабильности и водорастворимости.

Для получения информации о структуре биомолекул используют целый ряд методов, таких как рентгеновская кристаллография [6, 7], криоэлектронная микроскопия (ЭМ), флуориметрия и т.д. [8]. В случае рентгеновской кристаллографии необходимо вырастить кристалл, что не всегда удается, особенно для больших белков или их комплексов с ДНК. Кроме того, в этом случае отсутствует информация о динамике молекул. Криоэлектронная микроскопия относительно новый и очень перспективный метод исследования структуры биомолекул, но, к сожалению, пока малодоступный и дорогой. ЭПР-спектроскопия представляет собой высокочувствительный аналитический метод, требующий относительно небольших концентраций исследуемого материала (10^{-5} – 10^{-4} М); он хорошо подходит для изучения структуры биологических систем. Метод ЭПР особенно эффективен для изучения биомолекул, которые трудно кристаллизовать либо они слишком велики, чтобы их можно было охарактеризовать другими методами, такими, например, как ЯМР. Доступны различные методики ЭПР, которые позволяют получить различные типы структурных данных. Спектроскопия импульсного дипольного электронного парамагнитного резонанса является мощным методом измерения расстояний в спин-меченых белках и нуклеиновых кислотах [9]. Используются различные парамагнитные спиновые метки, такие как нитроксилы [10, 11], комплексы гадолиния [12, 13], комплексы меди [14] и триарилметильные (ТАМ) радикалы

[15, 16]. ТАМ имеют узкие линии электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), гораздо меньшую анизотропию g -фактора по сравнению с нитроксилами и длительное время релаксации продольного электронного спина электрона при низких температурах. Благодаря сочетанию этих свойств ТАМ успешно использовались для измерения расстояний в биомолекулах с помощью двойного электрон-электронного резонанса (ДЭЭР, PELDOR) и спектроскопии с двойной квантовой когерентностью (ДКК, DQC) [17, 18]. Более того, ТАМ позволяют исследователям проводить измерения не только в замороженных растворах, но и при комнатной и физиологически значимой температуре [19–21]. А также проводить эксперименты в клетках [22, 23]. ДЭЭР спектроскопия 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 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 детекции сверхтонких взаимодействий (СТВ) неспаренного электрона с окружающими ядрами. Этот подход включает метод электронно-ядерного двойного резонанса (ДЭЯР, ENDOR) [24]. Марина Беннати и коллеги [25] предложили использовать ДЭЯР в W -диапазоне и пару меток - нитроксил и атом фтора ^{19}F - для измерения расстояния в биомолекулах. Атомы ^{19}F редко встречаются в биологических системах и имеют высокое гиромангнитное отношение; таким образом, метод ДЭЯР позволяет проводить селективное измерение атомных расстояний до 1.5 нм. Но 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. Одним из способов

избежать влияния ориентационной селективности является использование меток комплексов Gd^{3+} , предложенных Д. Гольдфарб и соавторами [26, 28, 30]. Основным преимуществом Gd^{3+} является его узкий ЭПР спектр в сильных магнитных полях. Эти метки также обеспечивают высокочувствительные сигналы ДЭЯР при физиологических концентрациях (~ 5 мкМ) [32]. Но метки такого типа хорошо работают только в сильных магнитных полях, начиная с W-диапазона.

Следует отметить, что спектроскопия ЯМР также используется для измерения коротких расстояний в биомолекулах. В частности, эксперименты по усилению парамагнитной релаксации (PRE) позволяют измерять средние расстояния 12–20 Å в жидкостях для биомолекул, меченных нитроксилами или ионами металлов [27, 29, 31, 33]. В последнее время спиновые метки на основе атомов ^{19}F широко используются в ЯМР для определения структуры биомолекул путем измерения величины взаимодействий между 1H и ^{19}F или между парами ядер ^{19}F [27] или с помощью PRE-экспериментов [29]. Недостатком этого метода, как и любого метода ЯМР, является необходимость высокой концентрации биомолекул порядка 1 мМ.

Подход, предложенный авторами [25, 34], основан на использовании импульсного метода ДЭЯР в высоких магнитных полях и двух типов спиновых меток: электронного спина нитроксильного радикала и ядерного спина атома фтора ^{19}F . Применение высоких магнитных полей (> 3.4 Тл) позволяет избежать перекрывания 1H - и ^{19}F -резонансов, так как ларморовские частоты протонов и фтора разнесены на 8.5 МГц [25, 34]. В настоящей работе было предложено модифицировать данную методику заменой нитроксила на ГАМ радикалы, которые практически не проявляют ориентационную селективность и, благодаря этому, значительно упрощают получение и обработку экспериментальных данных по сравнению с нитроксильными радикалами.

Степень разработанности темы исследования

В литературе представлено огромное 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 нитроксильными, 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 и задачи работы

Цели настоящей работы:

1) Охарактеризовать ряд новых стереозамещенных нитроксильных и фосфорсодержащего тритильного монорадикалов 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 монорадикалов - 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 тритил-нитроксильных 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 необходимым значениям 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 диазетидинового 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 «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.

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:

1. **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. «¹⁹F electron nuclear double resonance (ENDOR) spectroscopy for distance measurements using trityl spin labels in DNA duplexes», *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 2023.

2. **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.

3. **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.

4. **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.

5. **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 ^{19}F 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.

6. 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.

7. O. Yu. Rogozhnikova, D. V. Trukhin, **N. B. Asanbaeva**, V. M. Tormyshev. «A Simple and Convenient Synthesis of a Multifunctional Spin Probe, Phosphonate Derivative of a Persistent Radical of the Triarylmethyl Series», *Russian Journal of Organic Chemistry*, 2021, V. 57, P. 905-913.

Кроме того, результаты диссертационной работы докладывались на следующих российских и международных конференциях:

1. Современные проблемы органической химии, СПОХ-2023, 26-30 июня 2023, Академгородок, Новосибирск.

2. Современные проблемы органической химии, СПОХ-2022, 12-14 сентября 2022, Академгородок, Новосибирск.

3. V Международная конференция «Современные синтетические методологии для создания лекарственных препаратов и функциональных материалов», МОСМ 2021, г. Екатеринбург, Россия, 8-12 ноября 2021 г.

4. Международная конференция «Modern Development of Magnetic Resonance», MDMR 2021, Kazan, Russian Federation, 1-5 November 2021.
5. 17th EUROMAR 2021 conference, г. Любляна, Словения, 5 июля - 8 июля 2021.
6. XXIII Симпозиум «Современная химическая физика», 24 сентября -4 октября 2021 г., г. Туапсе, Россия.
7. Modern Development of Magnetic Resonance, September 28–October 2 2020, Kazan, Russia.
8. VI International School for Young Scientists 2020, Magnetic Resonance and Magnetic Phenomena in Chemical and Biological Physics, September 2-10 2020, Roschino, Russia.

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

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 и триарилметильных радикалов. Приведены результаты измерений стабильности

Третья глава посвящена исследованию нитроксильных и тритил-нитроксильных бирадикалов.

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

В пятой главе описаны параметры экспериментов стационарного и импульсного ЭПР, процесс исследования стабильности радикалов, процесс подготовки проб.

В конце работы приведен список используемой литературы, состоящий из 135 источников. Работа состоит из 98 страниц и содержит 37 рисунков, 11 таблиц.

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Нитроксильные радикалы

Нитроксилы представляют собой стабильные свободные радикалы, содержащие N-O• парамагнитный центр. Они широко используются в качестве молекулярных зондов и меток в биофизике, структурной биологии и биомедицинских исследованиях [35–38]. Современные тенденции в этих областях исследований, такие как эксперименты по внутриклеточному СВ ЭПР и импульсному электрон-электронному двойному резонансу (PELDOR), визуализация ЯМР и ЭПР *in vivo* [3, 39], требуют стабильных парамагнитных агентов, которые могут находиться в живых клетках или тканях достаточно долго для проведения измерений. Устойчивость нитроксильной группы, несущей неспаренный электрон, к химическому восстановлению низкомолекулярными антиоксидантами и ферментативными системами имеет решающее значение для этих применений. Окислительно-восстановительные свойства нитроксидов зависят от размера кольца (для циклических нитроксидов) и электронных и стерических эффектов заместителей [40, 41]. Нитроксильные радикалы с пятичленным циклом пирролидинового ряда проявляют наибольшую устойчивость к восстановлению [42, 43]. Введение более объемных алкильных заместителей вместо метильных групп у атома углерода, соседнего с группой N–O, может повысить стабильность нитроксидов в модельных системах и биологических образцах [44–46]. 2,2,5,5-Тетраэтилпирролидин-1-оксиды являются наиболее устойчивыми к восстановлению среди всех известных в настоящее время нитроксидов [47–49]. Можно предположить, что дальнейшее увеличение стерического затруднения в положениях 2 и 5 может сделать нитроксид еще более стабильным, но синтез таких напряженных структур остается сложной задачей и приводит зачастую к ухудшению растворимости в водных средах.

На Рисунке 1 приведены структуры нитроксильных радикалов, которые широко используются в качестве спиновых меток и зондов.

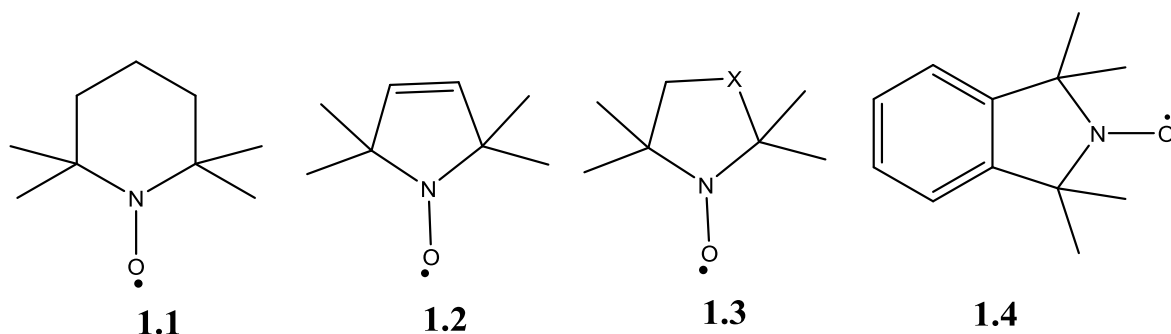


Рисунок 1 – Структуры остовов распространенных нитроксильных радикалов: пиперидиновые (1.1), пирролиновые (1.2), пирролидиновые (1.3, X = C), оксазолидиновые/имидазолидиновые (1.3, X = O, N) и изоиндолиновые (1.4).

1.1.1 Механизм реакции восстановления нитроксильных радикалов под воздействием аскорбата

Быстрое восстановление НР в биологических образцах до гидроксиламинов (ГА) существенно ограничивает их применение. В работе [50] были проведены сравнительные исследования восстановления пирролидинового, имидазолинового и имидазолидинового НР аскорбатом как *in vitro*, так и *in vivo*. Удивительно, но эти НР в присутствии 100-кратного избытка аскорбата сохраняли 10–50% исходной интенсивности сигнала электронного парамагнитного резонанса в течение примерно 1 ч (Рисунок 2).

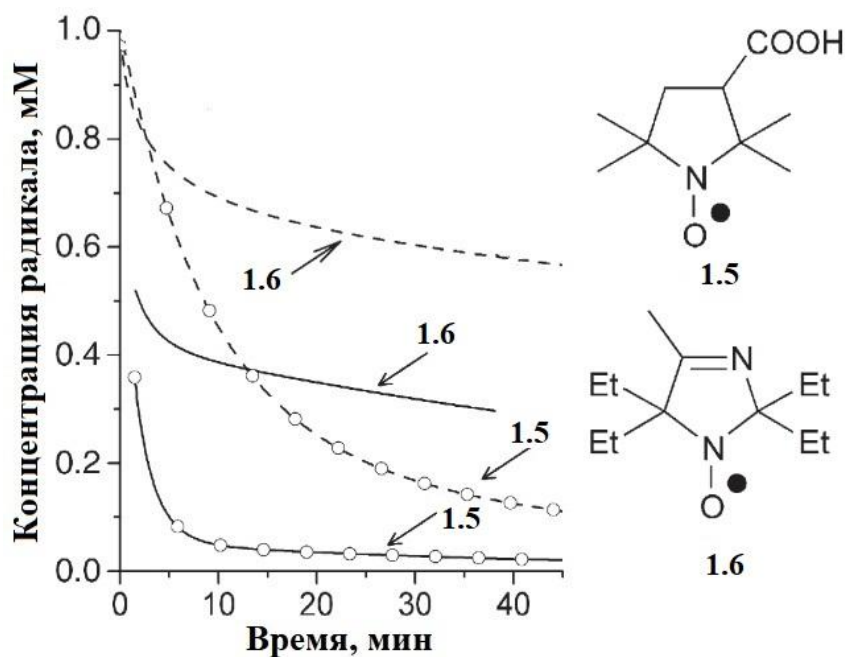


Рисунок 2 – Экспериментальные кинетики восстановления нитроксидов **1.5-1.6** (1 мМ) в среде 20 мМ (прерывистая линия) и 100 мМ (сплошная линия) раствора аскорбата (адаптировано из работы [50]).

Для объяснения этих данных было предположено, что реакция восстановления НР (прямая реакция **1**) является обратимой, то есть происходит повторное окисление образующегося ГА аскорбатным радикалом (обратная реакция **1**), а также дегидроаскорбиновой кислотой обратно в НР (прямая реакция **2**):



НР – нитроксильный радикал, АК – аскорбиновая кислота (анион аскорбата), ГА – гидроксиламин, АР – радикал аскорбата, ДГА – дегидроаскорбиновая кислота, ДКГ – 2,3-дикетогулоновая кислота.

Кроме того, было обнаружено, что константы равновесия для одноэлектронного восстановления тетраэтилзамещенного НР аскорбатом находятся в диапазоне от 2.65×10^{-6} до 10^{-5} , что значительно ниже соответствующих значений для тетраметилзамещенного НР (больше или около 10^{-4}). Этим объясняется установление квазиравновесного уровня концентрации тетраэтилзамещенного НР, детектируемого ЭПР, в присутствии избытка аскорбата. Помимо этого, было установлено, что на окислительно-восстановительные реакции пары нитроксил – гидроксилламин в аскорбатсодержащих средах существенное влияние оказывает глутатион (GSH). Он участвует в восстановлении аскорбатных радикалов, приводя к повторной генерации аскорбат анионов, и константа скорости этой реакции оказалась равной $10 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$. Именно по этой причине, при исследовании стабильности нитроксидов наряду с аскорбатом используют глутатион: для поддержания концентрации аскорбата, смещения равновесия в сторону образования гидроксилламина. Данный подход позволяет привести кинетический порядок реакции восстановления к псевдопервому и упростить обработку экспериментальных кинетических кривых. Этот способ был применен в данной работе при проведении экспериментов по восстановлению радикалов.

1.2 Триарилметильные радикалы

Стабильные радикалы трис(тетраарил)метильного ряда (ТАМ, тритилы), прочно вошли в повсеместную практику в химических, биомедицинских и спектроскопических исследованиях [51]. Они нашли применение в качестве парамагнитных меток и зондов, ориентированных на использование импульсных методик электронного парамагнитного резонанса. На основе радикалов такого типа были получены спиновые метки для исследования строения и функциональных особенностей различных биомолекул, например, олигонуклеотидов [20, 52], белков [53–55] и супрамолекулярных белково-нуклеиновых комплексов [19]. Также триарилметильные спиновые зонды показывают высокую чувствительность при измерении концентрации кислорода

in vivo [56]. Значительный интерес представляют мультифункциональные ТАМ, которые позволяют получать набор количественных сведений о таких характеристиках, как: содержание молекулярного кислорода, рН- и редокс-статус и информацию о других параметрах, требуемых для современной биомедицинской диагностики [4, 57–59].

На Рисунке 3 приведены структуры триарилметильных радикалов, использующихся в качестве спиновых зондов и спиновых меток.

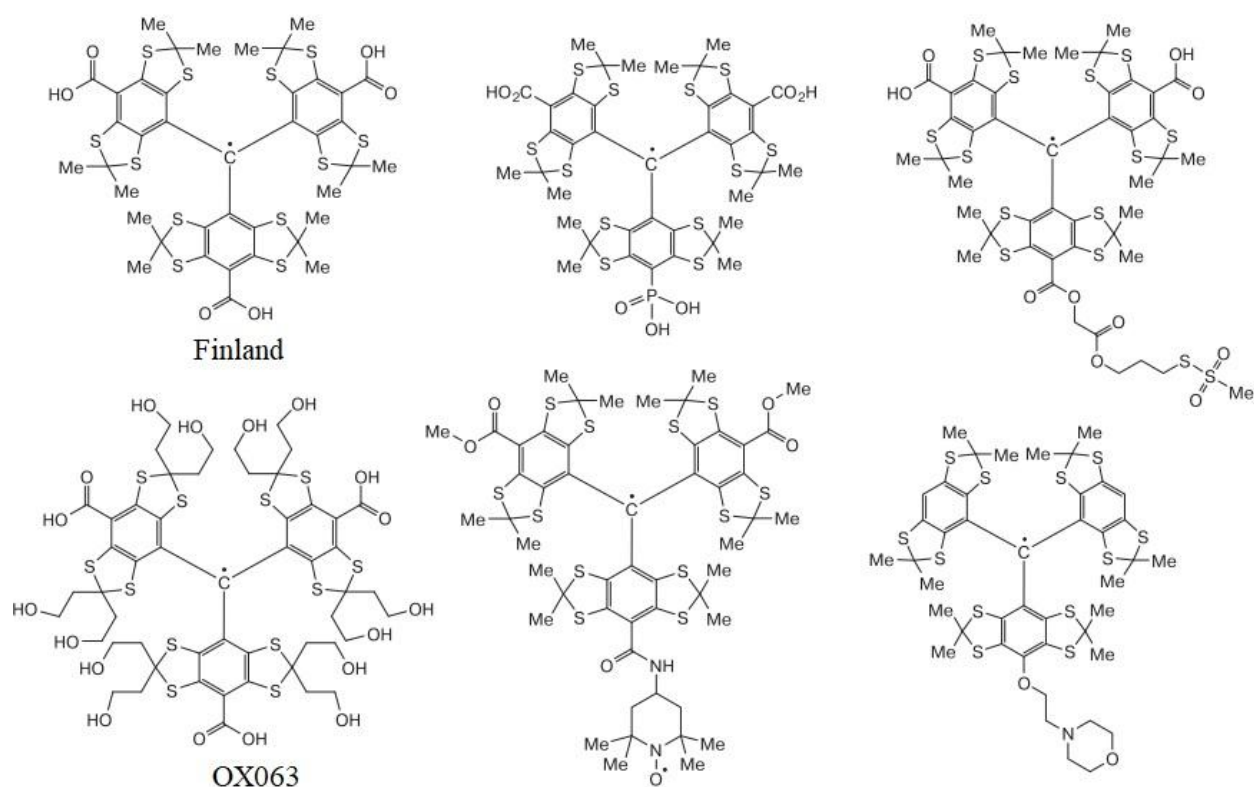


Рисунок 3 – Структуры триарилметильных радикалов, использующихся в качестве спиновых зондов и спиновых меток (адаптировано из статьи [60]).

В последние годы появляется все больше работ по использованию тритильных радикалов в качестве зондов для ЭПР приложений. Поэтому понимание путей деградации тритильных радикалов имеет решающее значение при разработке зондов с повышенной стабильностью. В бескислородных условиях ТАМ стабильны в течение нескольких дней, но период полураспада значительно сокращается в присутствии кислорода. Для частично замещенных тритильных радикалов в присутствии O₂ масс-спектрометрический анализ показывает образование продукта хиноидного типа [61–63]. В данном случае окислительно-

восстановительная химия предполагает образование промежуточного тритил-катиона. Исследования стабильности производных ТАМ показали, что тризамещенные тритильные радикалы более стабильны по сравнению с моно- и ди- замещенными ТАМ (замещение в положении R` на Рисунке 4) [64]. Также, стоит отметить, что сложноэфирные и амидкарбоксилатные производные ТАМ могут быть восстановлены тиолами, такими как глутатион (GSH) и цистеин (Cys), с образованием соответствующих тритильных карбанионов, которые впоследствии восстанавливают молекулярный O_2 до $O_2^{\cdot-}$ с последующей регенерацией тритильного радикала. Схема реакции восстановления ТАМ приведена на Рисунке 4.

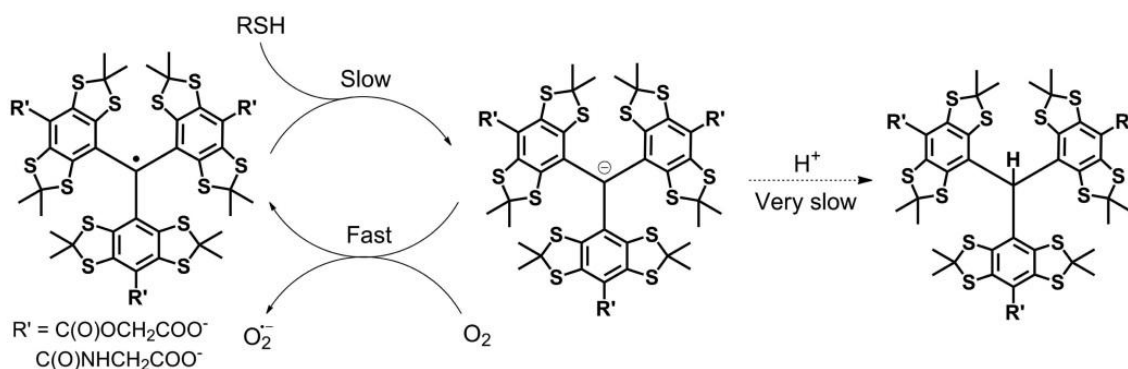


Рисунок 4 – Механизм реакции тритильного радикала с тиолом (RSH) в аэробных условиях (адаптировано из статьи [63]).

Однако константа скорости реакции тиола с тритилом довольно низкая: k находится в диапазоне от 0.03 до 0.33 $M^{-1} s^{-1}$ [63, 65].

1.3 Динамическая поляризация ядер

Спектроскопия твердотельного ядерного магнитного резонанса (ЯМР) с вращением под магическим углом (MAS – magic angle spinning) является мощным методом получения информации о структуре биополимеров (протеинов и нуклеиновых кислот, а также их комплексов) [66–70]. Основной проблемой этого метода является его низкая чувствительность из-за малой разницы заселенностей ядерных спинов между основным и возбужденным состояниями под действием приложенного магнитного поля. Этот параметр можно улучшить различными

способами. Увеличение напряженности магнитного поля увеличивает поляризацию ядерных спинов, и за последние 60 лет рабочие частоты и, как следствие, максимально достижимая величина поляризации увеличилась почти на два порядка. Более того, по мере увеличения частоты ЯМР спектрометров сигналы ЯМР в спектрах демонстрируют более высокое значение отношения сигнал/шум (S/N). Другая тенденция в исследованиях проведение изотопного обогащения редких ядерных спинов, таких как ^{13}C , ^{15}N и ^{17}O . Одним из альтернативных методов повышения чувствительности за счет усиления поляризации ядерных спинов является так называемый метод *динамической поляризации ядер*.

Метод динамической поляризации ядер (ДПЯ) [71–74] основан на переносе поляризации с поляризованных резонансным микроволновым магнитным излучением неспаренных электронных спинов поляризующих агентов (ПА) на ядерные спины (^1H или ^{13}C) исследуемых молекул, что позволяет увеличить отношение сигнал/шум в спектрах ЯМР исследуемых молекул на один-два порядка. Этот перенос поляризации основан на взаимном перевороте спина между электронами и ядрами и был впервые предсказан Оверхаузером [75] в 1953 году.

Существует четыре основных механизма ДПЯ в твердых телах: эффект Оверхаузера (Overhauser effect, OE) [76], солид эффект (Solid effect, SE) [76], кросс эффект (Cross effect, CE) [77, 78] и термическое смешивание (Thermal mixing, TM) [76]. В данной работе мы более подробно остановимся на механизме SE, так как он является преобладающим при работе с такими поляризующими агентами как бирадикалы.

Впервые механизм SE был предложен Кессенихом и Маненковым [79, 80]. Он предполагал наличие двух типов электронных спинов \mathbf{S}_1 и \mathbf{S}_2 и одного ядерного спина \mathbf{I} , ларморовские частоты которых ω_{0e1} , ω_{0e2} и ω_{0n} , удовлетворяют соотношению [78] (Рисунок 5):

$$\pm\omega_{0n} = \omega_{0e2} - \omega_{0e1} \quad (6)$$

Данный механизм можно разбить на два этапа. Сначала на трехспиновую (S_1 , S_2 , I) систему подается микроволновое излучение, которое насыщает электронный переход для одного из спинов за счет выравнивания заселенностей энергетических уровней (при $\omega_{0e1} = \omega_{MW}$ или $\omega_{0e2} = \omega_{MW}$). Как следствие поляризация одного из электронных спинов уменьшается, и создается ненулевая разность поляризаций у двух электронных спинов. На следующем этапе, когда разность ЭПР частот совпадает с частотой ЯМР (уравнение 6), уже все три спина могут переворачиваться с сохранением общей энергии. Все перевороты спинов будут стремиться уравнивать поляризацию ядра за счет разности поляризаций между двумя электронами.

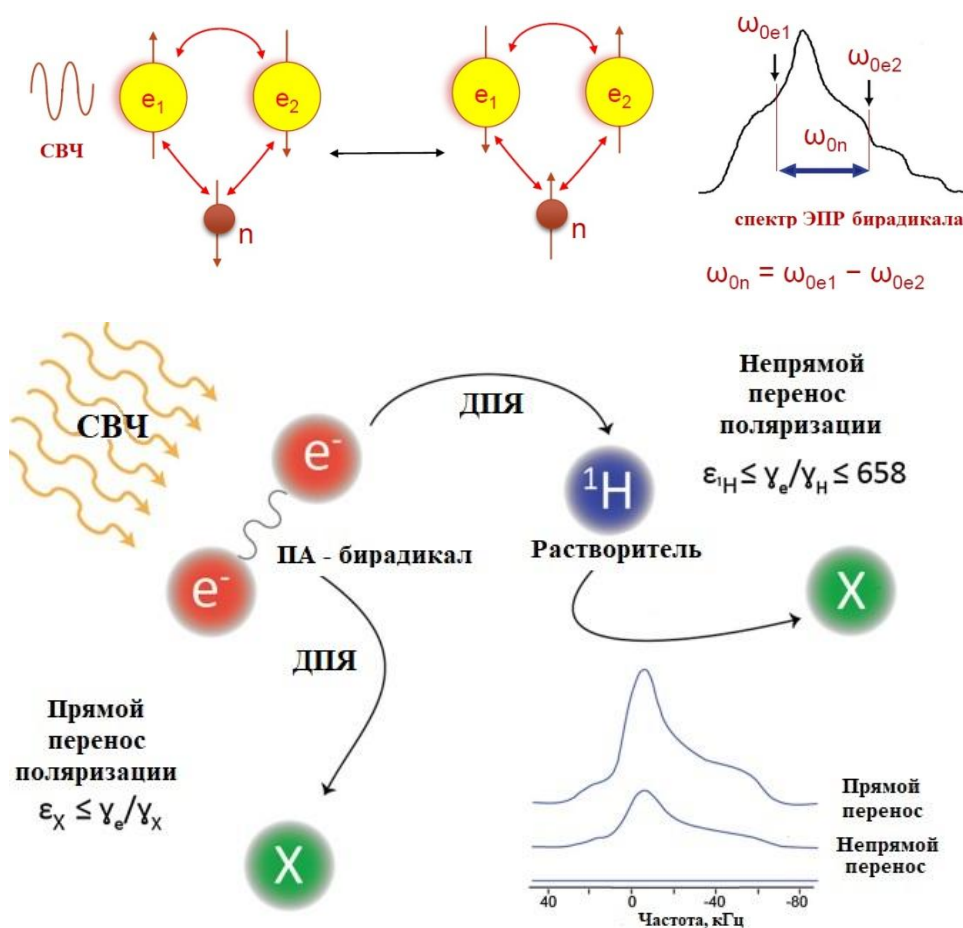


Рисунок 5 – Механизм кросс эффект (СЕ) ДНЯ. X – обозначение для ядер целевой молекулы.

На Рисунке 5 сверху представлен общий механизм СЕ ДНЯ с указанием переворотов спинов. Внизу на этом же рисунке представлена условная схема возможных путей переноса поляризации в экспериментальном объекте.

Возможны два пути переноса поляризации с электронов на ядра: прямой – когда перенос происходит непосредственно на ядра целевой молекулы, и непрямой – когда поляризация переносится сначала на ядра молекул растворителя (например, ^1H), и только потом с ^1H на ядра интересующей молекулы. Как и следует ожидать, сигнал ЯМР при прямом переносе поляризации более интенсивный, чем при непрямом переносе. Но добиться прямого переноса довольно сложно из-за наличия в практически каждом объекте исследования объемной матрицы растворителя.

В СЕ ДПЯ взаимодействие между двумя электронами играет ключевую роль в усилении эффективности переноса поляризации. В литературе распространено предположение, что увеличение суммы электрон-электронного дипольного (D) и обменного взаимодействий (J) до более высоких оптимальных значений повысит эффективность СЕ ДПЯ [81]. Более того, предполагалось, что увеличение значения J , независимо от D , также максимизирует данный эффект. Однако последние исследования показали, что решающим фактором для получения высокого коэффициента усиления ДПЯ (рассчитывается как отношение интенсивностей сигналов ЯМР при наличии и отсутствии воздействия микроволнового излучения) является относительная величина J и D , выраженная как отношение J/D [82]. Это привело к целому ряду работ химиков-синтетиков по оптимизации химического линкера, соединяющего радикальные (электронные) центры, геометрии, растворимости и соответствующих скоростей релаксации электронного спина поляризующего агента - бирадикала.

1.3.1 Бирадикалы – поляризующие агенты

Стоит отметить, что в течение последних лет бирадикалы используются не только как ПА в твердотельной ЯМР спектроскопии, но и в исследованиях биологических систем *in vivo* и *in vitro* для измерения таких физиологических параметров, как рН [83], кислорода, оксида азота [5], концентрации тиолов [84].

В течение последнего десятилетия были синтезированы и использованы в качестве ПА различные группы бинитроксидов: TOTAPOL [85–87], bcTol [87, 88],

AMUPols [89, 90], SPIROPols [91, 92], bTbk [93], TinyPols [94], AsymPols [95] и тритил-нитроксильных бирадикалов: TEMTriPols [96], NATriPols [97], соединения на основе BDPA [98–101], TN [1, 2, 102] и SNAPols [103]. Нитроксил-нитроксильные бирадикалы демонстрируют наилучшие параметры в ЯМР спектрометрах с резонансной частотой 400 МГц, а бирадикалы на основе тритильных и нитроксильных радикалов показали высокую эффективность поляризации в высоких магнитных полях (700-800 МГц ЯМР спектрометры).

При работе с бирадикалами исследователи сталкиваются с проблемами их растворимости в воде и устойчивости к восстановителям, что немаловажно при растворении ПА в среде биообъектов. Восстановление даже одной части бирадикала приводит к неактивной форме ПА и, как следствие, невозможности проявления ДПЯ с кросс-эффектом. Например, TOTAPOL при использовании для изучения нативных мембран показал потерю усиления ДПЯ, вероятно, из-за восстановления бирадикала свободными цистеинами [104]. Некоторые исследования устойчивости наиболее популярных ПА к восстановлению проводились ранее [90, 105]. Показано, что повышение внутриклеточной стабильности TOTAPOLa или AMUPola возможно за счет добавления N-этилмалеимида, удаляющего эндогенные биотиолы, или регенерации TOTAPOLa путем окисления его гидроксиламиновых форм. Хотя нитроксилы, добавленные к клеткам, были защищены N-этилмалеимидом, стабилизация бирадикалов с помощью этого метода не позволила увеличить коэффициенты усиления ДПЯ.

Стабильность нитроксильных радикалов коррелирует с размером кольца и заместителями, соседними с парамагнитным центром [41]. В данной работе мы изучили бирадикалы, скелет которых основан на пятичленных нитроксилах и тетраэтильных заместителях, обеспечивающих дополнительную устойчивость.

1.4 Методы импульсной ЭПР спектроскопии

Основными методами ЭПР спектроскопии являются стационарный метод ЭПР (CW) и импульсный методы. В стационарном методе микроволновое излучение подается непрерывно, производится развертка внешнего магнитного

поля с одновременной регистрацией поглощения микроволновой энергии в резонаторе. В импульсных вариантах ЭПР спектроскопии подаются серии микроволновых импульсов на резонансной частоте, которые поворачивают намагниченность на определенный угол, а измеряют интенсивность электронного спинового эха, и его зависимость от задержек между импульсами. Спиновым эхо называют сигнал, возникающий при воздействии на систему с электронным спином двух последовательных СВЧ-импульсов с частотой, равной резонансной частоте спинов. Причем первый импульс поворачивает намагниченность спинов на 90° , а второй импульс, поданный через время τ в другой проекции, поворачивает намагниченность на 180° , тем самым собирая ее после расфокусировки. На выходе через время τ после второго импульса будет возникать непосредственно сигнал эха.

На Рисунке 6 приведены наиболее часто использующиеся импульсные последовательности ЭСЭ для определения диполь-дипольных взаимодействий между электронными спинами.

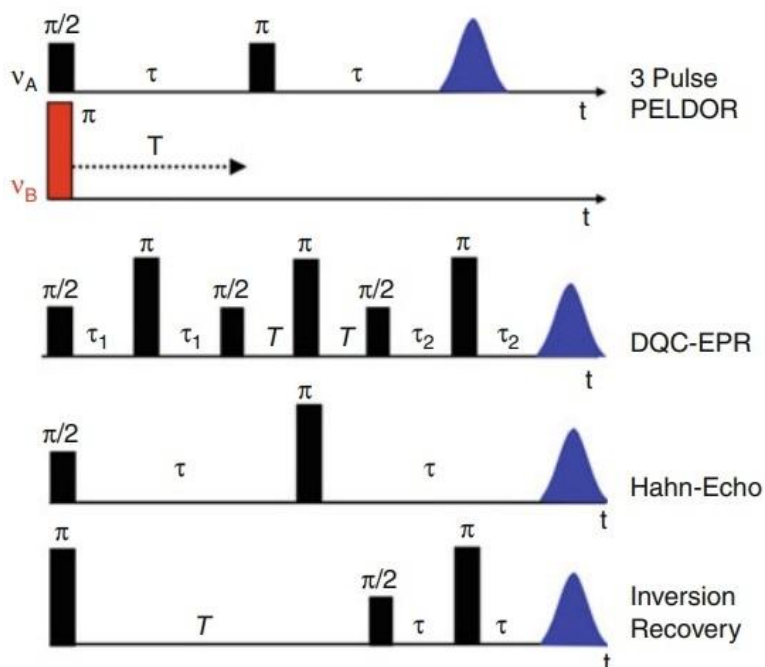


Рисунок 6 – Импульсные последовательности ЭСЭ для определения диполь-дипольных взаимодействий между электронными спинами (адаптировано из работы [106]). ДЭЭР (PELDOR), ДКК (DQC), классическая Хановская последовательность (Hahn-Echo) для получения эхо-детектируемых ЭПР

спектров и измерения времени спин-спиновой релаксации T_2 , инверсия-восстановление (Inversion Recovery) для измерения времени спин-решеточной релаксации T_1 .

Если в какой-либо системе присутствуют парамагнитные частицы или их туда искусственно помещают, то становится возможным измерить расстояния между ними и извлечь структурную информацию о системе. Расстояния можно измерить при помощи метода ЭПР спектроскопии, который позволяет изучать диполь-дипольные взаимодействия между электронами. А диполь-дипольное взаимодействие характеризуется величиной обратно пропорциональной r^3 , где r – это расстояние между парамагнитными центрами. Стационарная ЭПР спектроскопия позволяет измерять расстояния между спинами в диапазоне 1-1.5 нм [107]. В этом случае измеряют ширины резонансных линии ЭПР, обусловленные диполь-дипольным взаимодействием между спинами. Предел измерений возникает из-за вклада неразрешенных констант сверхтонкого взаимодействия в неоднородное уширение спектральных линий.

Миловым с соавторами [108] был предложен импульсный метод измерения расстояний между спинами, названный Pulse ELectron DOuble Resonance (PELDOR). Этот метод, а также его модификация, названная двойным электрон-электронным резонансом (ДЭЭР) получил наибольшее распространения, вследствие его высокой информативности и простоты (Рисунок 6). Идея метода заключается в том, что наблюдение электронного спинового эха ведется на одном спине, а в течение времени задержки между первым и вторым импульсами прикладывается 180 градусный импульс на резонансной частоте второго спина, взаимодействующего по диполь-дипольному механизму с первым спином. В результате амплитуда сигнала эха будет осциллировать с частотой, которая равна энергии диполь-дипольного взаимодействия E_{dd} :

$$V(2\tau) = V_0 \times \cos (E_{dd} \times \tau) \quad (7)$$

В дальнейшем метод PELDOR был модифицирован в различных вариантах с использованием трех- и четырех импульсов. В настоящее время эти методики

успешно применяются для исследования структуры биомолекул в комбинации с методом селективного введения спиновых меток (Site Directed Spin Labelling, SDSL) [20, 109]. Этот метод эффективно используется для измерения расстояний в диапазоне 1.8 – 8 нм. Для измерения малых расстояний этот метод не применим, поскольку при локализации спиновых меток на таких малых расстояниях величина обменного взаимодействия становится значительной и вносит вклад в ЭПР спектр. Кроме того, это приводит к высокой скорости электронной (спин-решеточной) релаксации $1/T_1$ и невозможности регистрации спинового эха. Поэтому для измерения коротких расстояний применяют методы, основанные на детектирование сверхтонкого взаимодействия между электроном и окружающими ядрами. Одним из таких методов является метод двойного электронно-ядерного резонанса.

1.4.1 Метод ДЭЯР спектроскопии

Метод двойного электронно-ядерного резонанса (ДЭЯР) представляет собой гибридный метод ЯМР/ЭПР, в котором используются как микроволновые, так и радиочастотные импульсы для изменения намагниченности спинов электронов и ядер соответственно. Существует две основные импульсные последовательности ДЭЯР: Дэвиса [110] и Мимса [111] (Рисунок 7), названные по именам авторов, предложивших эти последовательности. Идея эксперимента заключается в измерении дипольного сверхтонкого взаимодействия между неспаренным электроном и соседними ядерными спинами. Ядерный спин переворачивается радиочастотным импульсом на 180° . Поворот ядерного спина приводит к изменению эффективного магнитного поля, и в месте локализации электрона, и, как следствие, влияет на амплитуду сигнала спинового эха. В эксперименте ДЭЯР магнитное поле и все микроволновые импульсы фиксируются, а производится развертка частоты радиочастотного импульса с одновременным детектированием сигнала ЭСЭ. Точная радиочастота, на которой изменяется сигнал эха, дает информацию о размере величины сверхтонкого взаимодействия и, следовательно, об эффективном расстоянии между неспаренным электроном и ядерным спином.

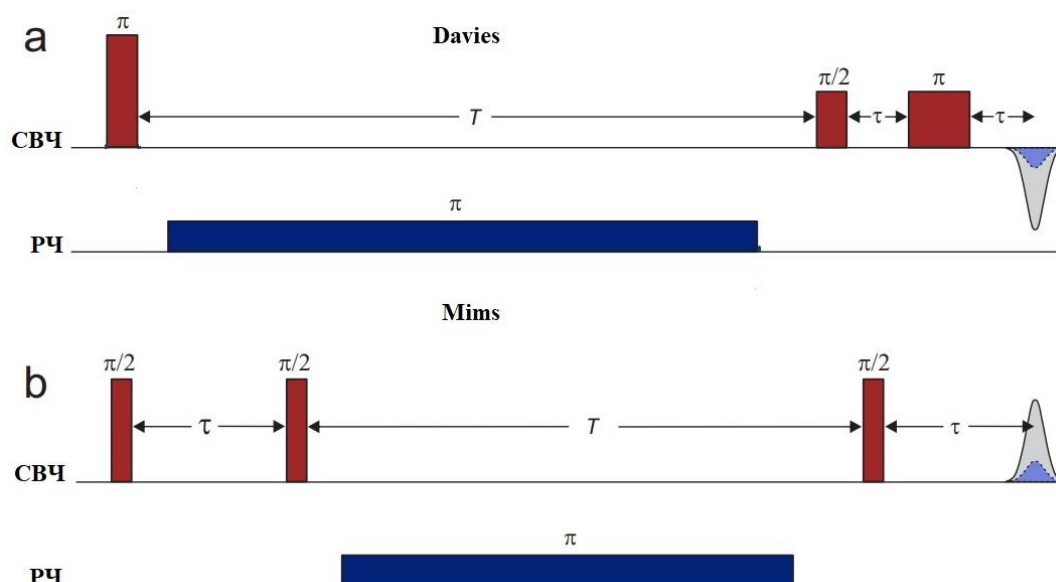


Рисунок 7 – Схема импульсных последовательностей ДЭЯР: а) Дэвиса б) Мимса

Теоретическая эффективность ДЭЯР зависит от значения $T \cdot \tau$:

$$F = \frac{1}{4} (1 - \cos(T \cdot \tau)) \quad (8)$$

где F – интенсивность ДЭЯР сигнала, T – дипольное сверхтонкое взаимодействие (СТВ) между ядром атома фтора и неспаренным электроном, τ – время задержки между импульсами в последовательности ДЭЯР Мимса. При некоторых значениях T и τ возможна ситуация, когда $F \approx 0$. Такие положения с нулевым сигналом в спектрах называются «слепыми зонами». Поэтому подбор корректного времени задержки τ является одним из наиболее важных этапов при проведении ДЭЯР экспериментов, который позволяет избежать потери сигнала.

Чувствительность метода ДЭЯР в случае применения импульсной последовательности Мимса намного выше, чем для последовательности Дэвиса, потому что в этом случае могут использоваться жесткие неселективные импульсы с большей шириной полосы возбуждения спектра. Благодаря этому, сразу возбуждается большое количество спинов, и все они вносят свой вклад в результирующий сигнал. Также из-за мощных СВЧ импульсов можно подобрать достаточно длительное время задержки τ , чтобы увеличить чувствительность.

Поэтому последовательность ДЭЯР Мимса, как правило, предпочтительнее для экспериментов по детектированию небольших сверхтонких взаимодействий.

Для больших значений анизотропного СТВ, как правило, лучшим выбором является импульсная последовательность ДЭЯР Дэвиса. В этом случае селективный СВЧ-импульс можно сделать относительно широкополосным и избежать «слепых зон», усложняющих анализ [112].

Следует отметить, что импульсная спектроскопия ^1H ДЭЯР в X-диапазоне ранее уже была успешно применена к радикалам ТАМ для исследования их конформаций в растворе и сверхтонких взаимодействий ТАМ с молекулами растворителя [113, 114].

Постановка задачи

Как показано в литературном обзоре, нитроксильные и триарилметильные моно - и бирадикалы широко используются в качестве спиновых зондов при детектировании кислорода, рН и оксида азота; в качестве спиновых меток при измерении расстояний в биомолекулах, а также как поляризующие агенты для ДПЯ. Исследователями проводится постоянная модификация таких радикалов для достижения высокой чувствительности к физиологическим параметрам и повышенной стабильности в среде биообъектов. В НИОХ СО РАН синтезируется большее количество новых радикалов с улучшенными функциональными свойствами. Исследование свойств таких моно – и бирадикалов методом стационарной и импульсной ЭПР-спектроскопии и является одной из основных целей данной работы.

Для достижения поставленных целей были определены следующие задачи:

- для стереозамещенных нитроксильных монорадикалов - измерить их магнитно-резонансные параметры и определить их стабильность в среде аскорбата; для фосфорсодержащего триарилметильного радикала построить кривую рН – титрования и вычислить рКа;

- для водорастворимых бирадикалов - измерить 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;

В данной работе помимо изучения свойств ряда новых радикалов, проводилось также исследование триарилметильных радикалов в качестве спиновых меток для ДЭЯР спектроскопии. Целью настоящей работы было разработать метод ^{19}F ДЭЯР с применением двух типов спиновых меток ТАМ – гидрофобного Finland и гидрофильного ОХ063.

Для начала предложенную методику необходимо было отработать на модельных объектах. Поэтому была поставлена задача:

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

После успешной отработки данного метода на модельных объектах стало возможным перейти на изучение уже более сложных биологических систем. В качестве биообъекта был выбран 20-мерный ДНК дуплекс, полученный в ИХБФМ СО РАН. Выбор размера дуплекса определялся его устойчивостью и возможностью количественного спин-мечения. На данном этапе была поставлена следующая задача:

- 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.

ГЛАВА 2. ИССЛЕДОВАНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ СВОЙСТВ НИТРОКСИЛЬНЫХ И ТРИАРИЛМЕТИЛЬНЫХ МОНОРАДИКАЛОВ

Данный раздел посвящен изучению магнитно-резонансных параметров и стабильности ряда новых стереозамещенных нитроксильных монорадикалов и рН – чувствительного фосфорсодержащего триарилметильного радикала, синтезированных в НИОХ СО РАН.

2.1 Нитроксильные радикалы

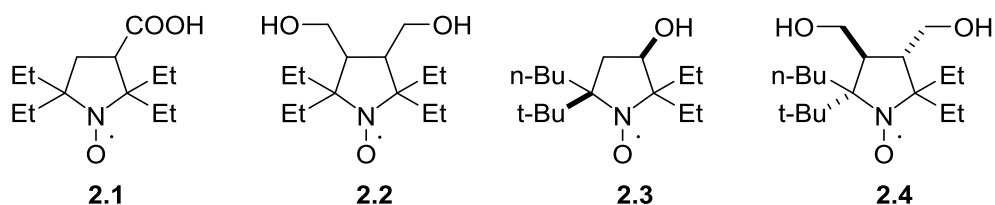


Рисунок 8 – Структуры стереозамещенных нитроксильных радикалов **2.1-2.4**.

Структуры исследуемых нитроксидов **2.1-2.4** представлены на Рисунке 8. Спектры новых нитроксидов **2.3-2.4** (Рисунок 9) характеризуются триплетом дублетов с константой СТВ на ядрах азота и водорода.

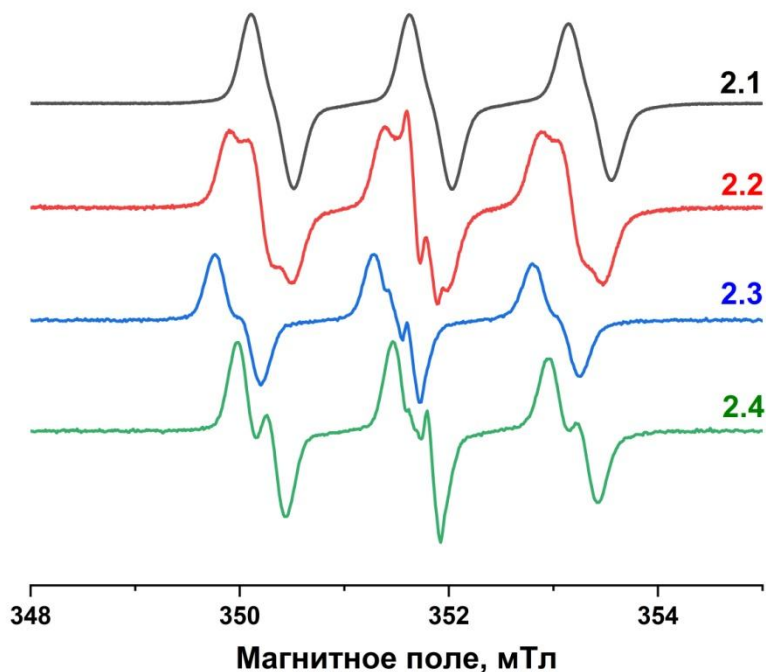


Рисунок 9 – Стационарные спектры ЭПР (X – диапазон) нитроксидов **2.1-2.4** в метаноле.

Такое поведение характерно для 3-замещенных или 3,4-дизамещенных пирролидиновых нитроксидов с этильными группами в положении 2 или 5 [47,

48]. Причина этого дополнительного расщепления дублетов была ранее исследована для нитроксидов имидазолидина, которые имеют аналогичную геометрию [115]. Было показано, что геминальные этильные заместители способствуют конформации с высокой спиновой плотностью при одном из четырех атомов водорода метилена. Замена этила любой другой группой или удаление соседнего заместителя может изменить конформационное поведение с исчезновением явного сверхтонкого расщепления.

Параметры спектров ЭПР новых нитроксидов **2.3** и **2.4** приведены в Таблице 1, а спектральные параметры **2.1** и **2.2**, снятые в тех же условиях, приведены для сравнения.

Таблица 1 – Параметры спектров ЭПР и константы скорости восстановления аскорбатом нитроксидов **2.1-2.4** [117].

Нитроксильный радикал	Растворитель	Параметры ЭПР		$k_{\text{Red}} \times 10^4, \text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$
		A_{N}, mTl	A_{H}, mTl	
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

Нитроксиды **2.3** и **2.4** продемонстрировали высокую термическую стабильность. Нагревание данных образцов при 100°C в течение 80 мин не привело к значительному ослаблению сигнала ЭПР нитроксидов.

НР **2.3** и **2.4** достаточно липофильны. Их небольшая водорастворимость позволяет зарегистрировать спектры ЭПР в воде, но соотношение сигнал/шум таких спектров оказывается в итоге недостаточным для отслеживания кинетики восстановления. Более того, попытка растворить их в воде с помощью обработки в ультразвуковой ванне дало невоспроизводимые результаты, предположительно

из-за образования нестабильных мицеллярных растворов. По этой причине окислительно-восстановительные свойства соединений **2.3** и **2.4** исследовали в системе метанол : вода (объемное соотношение 1:1), где стало возможным приготовить стабильные 0.1 мМ растворы. Кинетика распада нитроксидов в присутствии 0.5 М аскорбата при рН 7.4 представлена на Рисунке 10. 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 [50]. Для сравнения оценивали восстановление нитроксильных радикалов **2.1** и **2.2** в тех же условиях. Восстановление **2.1** и **2.2** в 50%-ном метаноле протекает значительно медленнее, чем в водном растворе, что следует из уменьшения константы скорости в 20.8 и 3.2 раза соответственно. Известно, что растворитель может существенно влиять на константу скорости химических реакций [116]. Основным механизмом является влияние полярности растворителя на энергию стабилизации исходных соединений, а также на уровень энергии переходного состояния. Увеличение полярности растворителя увеличивает скорость реакций, в которых в активированном комплексе возникает заряд, начиная с нейтрального или слабо заряженного реагента.

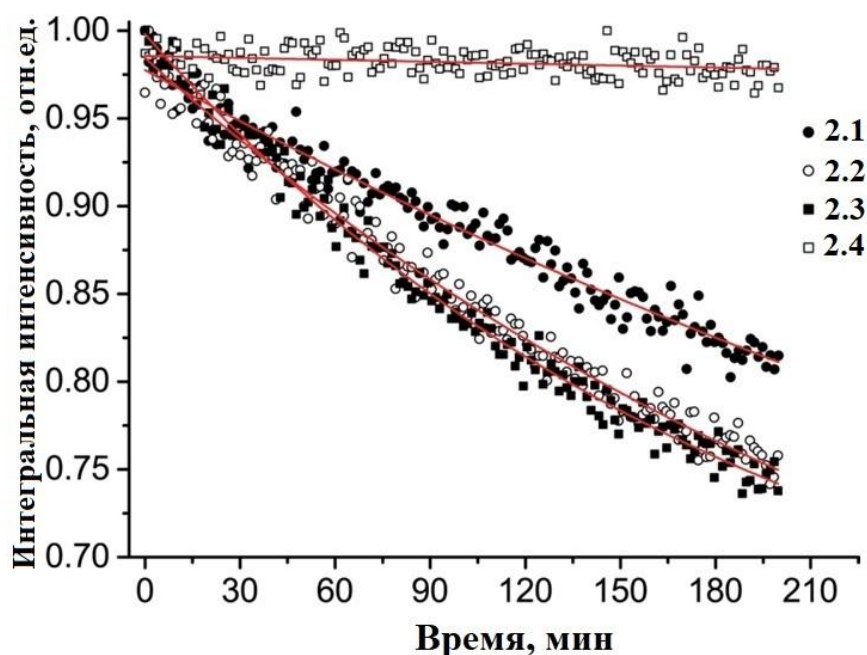


Рисунок 10 – Кинетики восстановления нитроксильных радикалов **2.1-2.4** в среде

0.5 М аскорбата в смеси метанол : вода (1:1).

Кинетика восстановления в 50% метаноле была очень похожей для **2.1**, **2.2** и **2.3**, тогда как в воде восстановление **2.1** происходило значительно быстрее, чем восстановление **2.2**. Предположительно, это различие может быть связано с различием сольватации нитроксила, аскорбат-аниона и переходного состояния. Приведенные данные также свидетельствуют о том, что наиболее устойчивым к восстановлению является нитроксил **2.4**.

2.2 Фосфорсодержащие триарилметильные радикалы

Так как сверхтонкое расщепление в спектрах ЭПР не зависит от частоты спектрометра, оно может использоваться в качестве чувствительного рН-маркера в низкочастотной ЭПР спектроскопии. Недавно были синтезированы амино [118] и трифосфонированные [119, 120] ТАМ-зонды, чувствительные к рН в физиологическом диапазоне. Однако сложные спектральные характеристики этих производных ТАМ делают трудоемким их применение для одновременной детекции кислорода и рН. Крайне желательно дальнейшее упрощение спектральных свойств ТАМ-зондов двойного назначения, в идеале обеспечивающее простейший дуплетный спектр ЭПР.

Фосфорсодержащий ТАМ (Рисунок 11) стабилен как в твердом виде, так и в растворах в средах различной полярности. Радикал хорошо растворим в органических растворителях (спирты, ДМСО) и дает характерный сигнал с явным расщеплением в спектрах ЭПР. Так для раствора радикала в метаноле был зарегистрирован спектр ЭПР с константой СТВ, равной 0.370 мТл. Ширина сигнала (115-125 мкТл в деоксигенированных растворах) сопоставима с результатами для ранее описанных тритильных радикалов.

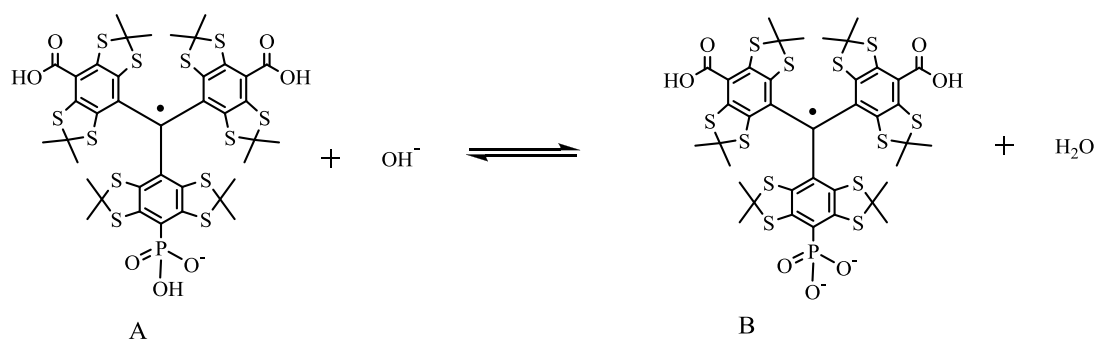


Рисунок 11 – Кислотно-основное равновесие с участием ТАМ, представленного в форме кислоты А и основания В.

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 A_p 0.333 мТл, при снижении рН до 4.5 константа СТВ увеличивается до 0.361 мТл. Указанное обстоятельство позволило детально исследовать кислотно-основное равновесие, представленное на Рисунке 11. 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 12) [121]. Эта зависимость согласуется с ранее опубликованными данными о поведении полидейтерированной формы ТАМ в условиях кислотно-основного равновесия [59]. Полученное при обработке кривой титрования значение рКа для кислоты А составило 6.9 ± 0.1 , что совпадает с результатами, опубликованными в литературе для дейтерированного аналога [59].

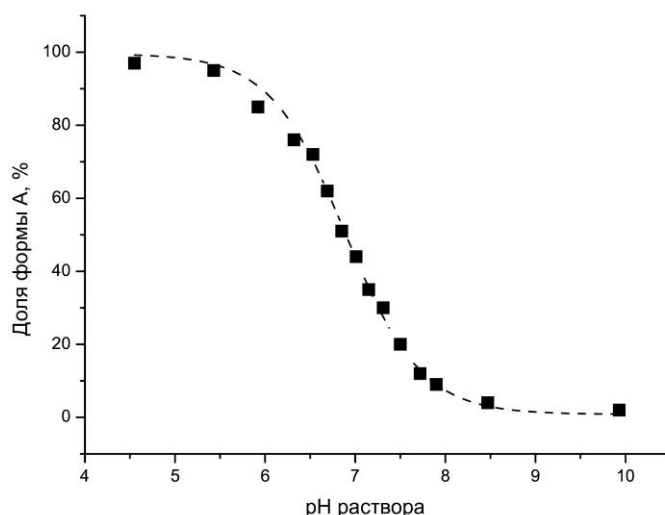


Рисунок 12 – Зависимость доли кислотной формы А ТАМ от рН среды (представлены квадратами). Пунктиром представлена кривая титрования, соответствующая значению $pK_a = 6.9$.

Заключение к главе 2

В данном разделе были исследованы стереозамещенные нитроксильные монорадикалы. Была показана высокая устойчивость в жесткой восстановительной среде аскорбата, а также термическая стабильность радикалов **2.3-2.4**. Показано, что радикал **2.4** практически не восстанавливается под воздействием аскорбата в течение более 3-х часов. Для рН - чувствительного фосфорсодержащего триарилметильного радикала было определено значение $pK_a = 6.9 \pm 0.1$.

ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ОБМЕННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ И СТАБИЛЬНОСТИ В НИТРОКСИЛЬНЫХ И ТРИТИЛ-НИТРОКСИЛЬНЫХ БИРАДИКАЛАХ

В этой работе нами были исследованы синтезированные в НИОХ СО РАН новые монарадикалы и биснитроксильные и тритил-нитроксильные бирадикалы, изучены их спектры ЭПР, измерены параметры обменного взаимодействия и стабильность в восстановительных средах. Стабильность нитроксильных радикалов зависит от размера кольца и заместителей, в положениях, близких к парамагнитному центру [41]. В данной работе мы исследовали бирадикалы на основе пятичленных нитроксильных радикалов с тетраэтильными заместителями (Рисунок 13) [122], которые обеспечивают дополнительную стабильность, а в качестве тритильных фрагментов были использованы Finland и водорастворимый тритильный радикал OX063 (Рисунок 3).

3.1 Нитроксил-нитроксильные бирадикалы

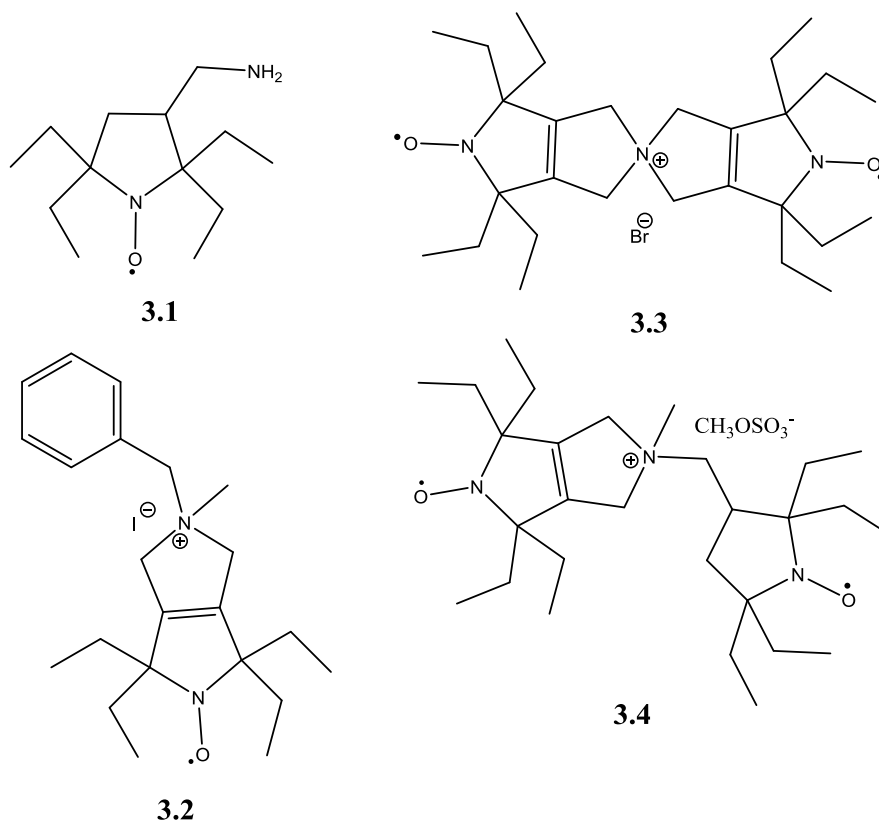
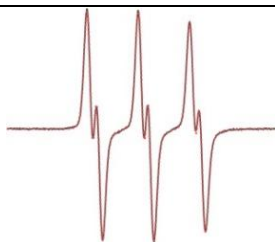
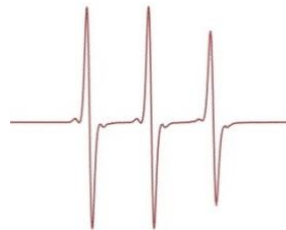

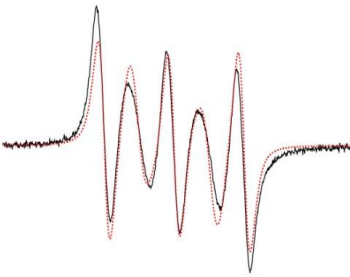


Рисунок 13 – Химические структуры монарадикалов **3.1-3.2** и нитроксил-нитроксильных бирадикалов **3.3-3.4**.

Чтобы охарактеризовать локальную структуру парамагнитных центров новых бирадикалов, мы провели эксперименты на стационарном ЭПР спектрометре фирмы Bruker в X-диапазоне (9.87 ГГц) при комнатной температуре на 100 мкМ растворах в метаноле или фосфатно-солевом буфере (PBS). Наблюдаемые спектры ЭПР X-диапазона всех соединений представлены в Таблице 2 (столбец 2). Форма спектров ЭПР бирадикалов обусловлена изотропным сверхтонким взаимодействием на ядрах ^{14}N нитроксидов ($A_{\text{N}_{\text{изо}}}$), и обменным взаимодействием (J) между двумя неспаренными электронами. Спектры ЭПР были рассчитаны с учетом обменного гамильтониана, выраженного как $J \cdot S_1 \cdot S_2$. Полученные параметры (величина обменного взаимодействия J и изотропная константа СТВ $A_{\text{изо}}$), полученные из сравнения экспериментальных и расчетных спектров приведены в столбце 3 (Таблица 2).

Таблица 2 – ЭПР спектры X-диапазона ~ 0.1 мМ радикалов **3.1–3.4**

Радикал	ЭПР спектры	Параметры моделирования
3.1	 PBS	$A_{\text{N}_{\text{изо}}} = 43.0 \pm 0.2$ МГц $A_{\text{H}_{\text{изо}}} = 7.2 \pm 0.2$ МГц
3.2	 PBS	$A_{\text{N}_{\text{изо}}} = 43.7 \pm 0.2$ МГц
3.3	 PBS	$A_{\text{N}_{\text{изо}}} = 43.7 \pm 0.2$ МГц $J = 206 \pm 2$ МГц

3.4		$A_{N1 \text{ изо}} = 44.0 \pm 0.2 \text{ МГц}$ $A_{N2 \text{ изо}} = 43.2 \pm 0.2 \text{ МГц}$ $J = 0$ $\sigma(J) = 120 \text{ МГц}$ J распределение
-----	---	---

Спектр ЭПР симметричного жесткого бирадикала **3** можно описать системой с $A_{\text{изо}} \approx 43.7 \text{ МГц}$, $|J| = 206 \pm 2 \text{ МГц}$ (среднее значение \pm стандартное отклонение), тогда как для асимметричного бирадикала **4** получить такую же картину с учетом одного значения обменного взаимодействия не удалось. Следует отметить, что для бирадикалов с аналогичными ЭПР спектрами авторы работы [123] предложили две интерпретации спектров ЭПР. Первое объяснение состоит в том, что бирадикал характеризуется только нулевым средним значением обменного взаимодействия J , но большой шириной распределения значений обменного взаимодействия. Авторы [123] предполагают, что данная интерпретация наиболее вероятна. Второе объяснение предполагает восстановление большей части бирадикалов в монорадикал, т.к. спектры ЭПР монорадикала и бирадикала с $J = 0$ могут отличаться только временем корреляции вращения. Чтобы опровергнуть этот вариант, мы провели количественный анализ парамагнитных частиц в бирадикалах **3.3** и **3.4** относительно стандартных калиброванных растворов ТЕМПО и Finland тритила методом стационарной ЭПР спектроскопии. Спектры ЭПР для образцов и стандартов были записаны в одинаковых условиях (объем образца, экспериментальные настройки), а затем были проинтегрированы. Интегральные интенсивности были сравнены со стандартами и пересчитаны соответственно в концентрации. В результате этого эксперимента было установлено, что концентрация парамагнитных спинов в растворе соответствует предположению, что все частицы в растворе находятся в форме бирадикалов, так как полученная концентрация парамагнитных центров была в два раза больше рассчитанной при приготовлении концентрации молекул

бирадикала. Таким образом, нами был сделан вывод о том, что в растворе бирадикала **3.4** присутствует значительная доля бирадикала с $J = 0$. За счет учета распределения J с центром в $J = 0$ МГц и $\sigma(J) = 120$ МГц было достигнуто хорошее совпадение расчетных и экспериментальных спектров ЭПР.

Устойчивость бирадикалов к восстановлению аскорбиновой кислотой.

Для измерения константы скорости восстановления бирадикалов аскорбатом, мы добавляли 0.1 М раствор аскорбата при pH 7.4 к 0.3 мМ раствору бирадикалов, помещали данную смесь в ЭПР спектрометр и записывали спектры ЭПР через равные интервалы времени. Затем каждый спектр интегрировали. Интегральная интенсивность сигнала ЭПР отражает общую концентрацию парамагнитных частиц, которая в отсутствие восстановления вдвое больше концентрации бирадикалов. Кинетика гибели радикалов **3.1-3.4**, а именно спад концентрации спинов от времени, в присутствии 0.1 М раствора аскорбата показана на Рисунке 14.

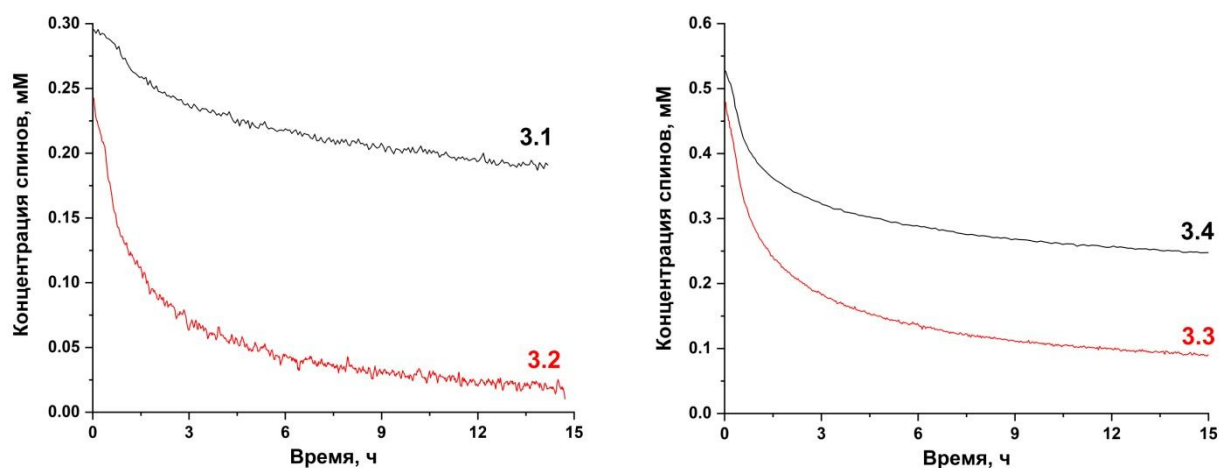


Рисунок 14 – Кинетика гибели радикалов **3.1-3.4** в присутствии 0.1 М аскорбата при pH 7.4.

На Рисунке 15 показано изменение спектров ЭПР бирадикала **3.4** в присутствии аскорбата. С течением времени вклад монорадикальной части (три линии, черные стрелки) увеличивается, а обменные линии (две линии, красные стрелки) уменьшаются. Кроме того, магнитно-резонансные параметры образовавшегося моонитроксила соответствуют параметрам радикала **3.1**. Это

наблюдение согласуется с выводом о том, что радикал **3.2** менее стабилен, чем радикал **1** [122].

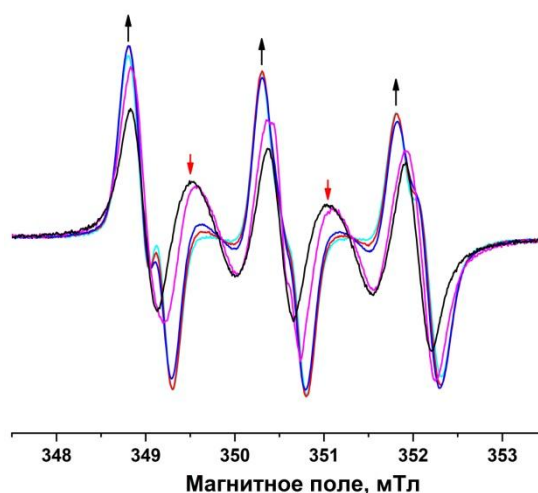


Рисунок 15 – Изменение в спектре ЭПР бирадикала **3.4** с течением времени при восстановлении 0.1 М раствором аскорбата.

3.2 Тритил-нитроксильные бирадикалы

Нитроксил-нитроксильные бирадикалы демонстрируют наилучшие параметры в ЯМР спектрометрах с резонансной частотой 400 МГц, а бирадикалы на основе тритильных и нитроксильных радикалов показали высокую эффективность поляризации в высоких магнитных полях (700-800 МГц) [96, 97]. Исследования соединений последнего типа позволили выявить группу факторов, значимых для успешного применения тритил-нитроксильных бирадикалов в средах биологической природы. В частности, соединения, остов которых представлен ГАМ радикалом типа Finland, в ряде случаев обладают ограниченной растворимостью в воде. Это ограничение может быть устранено переходом к гидрофильной форме ГАМ – радикалу типа OX063.

На Рисунке 16 представлены химические структуры тритил-нитроксильных бирадикалов на основе Finland/ OX063 и тетраэтилзамещенных нитроксильных радикалов **3.5-3.8**.

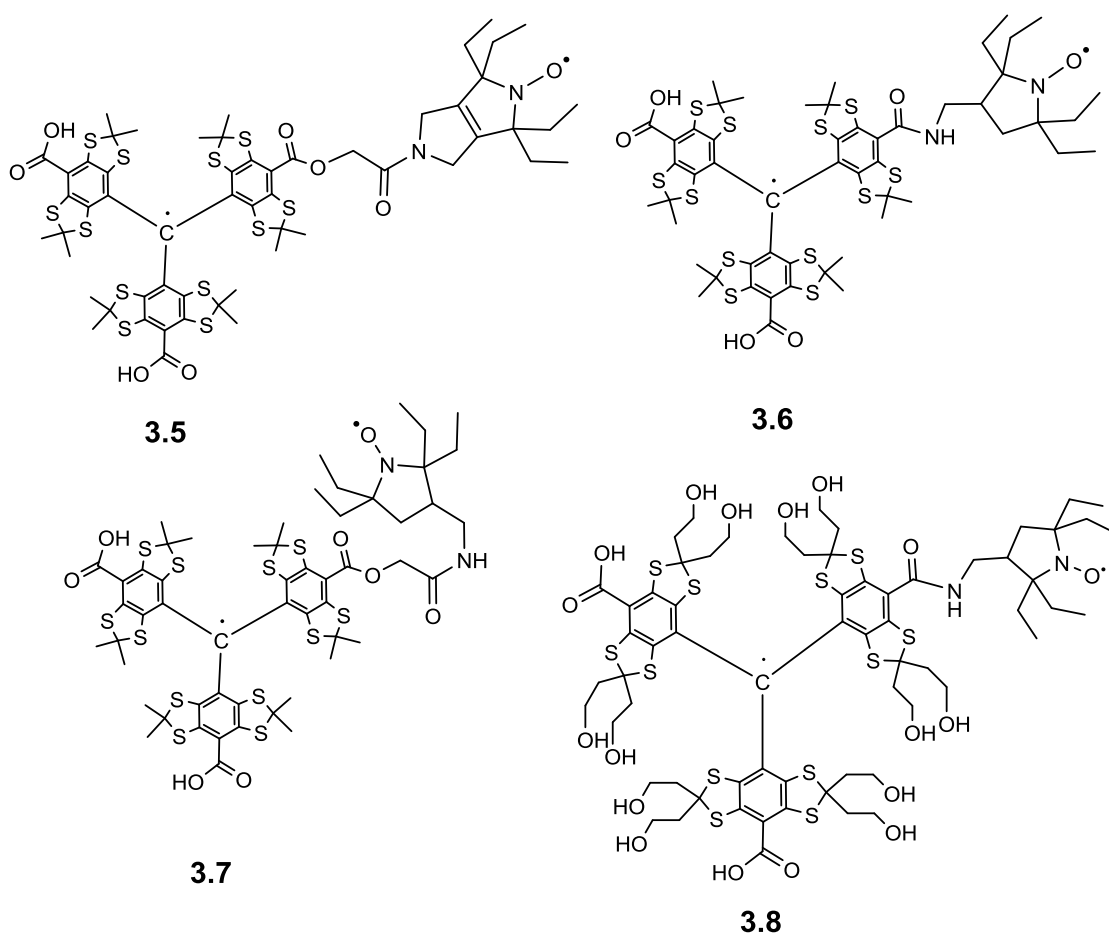
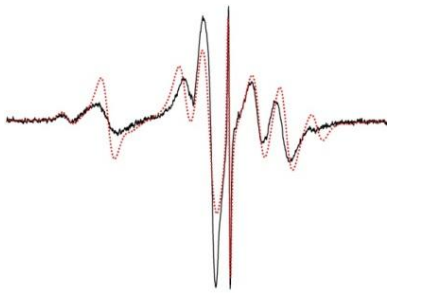
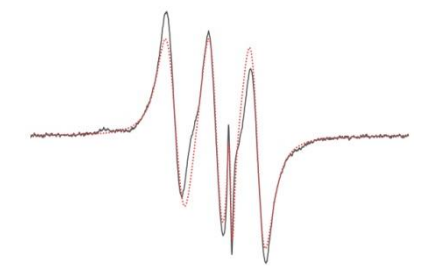
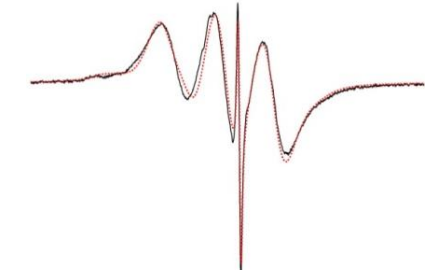
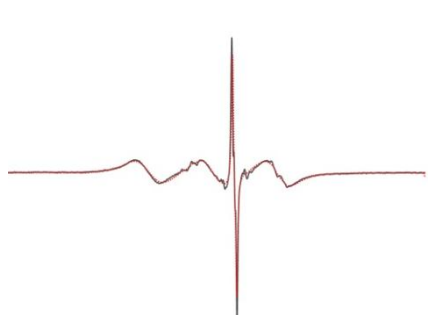


Рисунок 16 – Химические структуры тритил-нитроксильных бирадикалов 3.5-3.8.

Исследование обменного взаимодействия в бирадикалах

Для получения магнитно-резонансных параметров синтезированных бирадикалов были записаны спектры ЭПР в X-диапазоне (9.87 ГГц) при комнатной температуре для 100 мкМ растворов в метаноле или PBS (фосфатно-солевой буфер). Для всех бирадикалов наблюдается расщепление в спектре ЭПР, обусловленное сверхтонким взаимодействием (СТВ) с атомом азота (A_{Niso}) и обменным взаимодействием (J) между двумя неспаренными электронами. Наблюдаемые спектры ЭПР всех соединений приведены в Таблице 3 (колонка 2). Параметры обменного взаимодействия J и изотропного СТВ A_{Niso} , приведенные в Таблице 3, были получены из сравнения расчетных и экспериментальных спектров ЭПР.

Таблица 3 – Спектры ЭПР X-диапазона при комнатной температуре для ~ 0.1 мМ бирадикалов **3.5-3.8** в метаноле, параметры констант СТВ и обменного взаимодействия, полученные из симуляции экспериментальных спектров. Узкие линии в спектрах соответствуют небольшой (1-5 %) примеси тритильного радикала, вследствие восстановления нитроксильного фрагмента в процессе синтеза.

Бирадикал	ЭПР спектр	Параметры СТВ и обменного взаимодействия
3.5		$A_{N\text{ iso}} = 42.8 \pm 0.2 \text{ МГц}$ $J = 45 \pm 2 \text{ МГц}$
3.6		$A_{N\text{ iso}} = 39.5 \pm 0.2 \text{ МГц}$ $J = 364 \pm 2 \text{ МГц}$
3.7		$A_{N\text{ iso}} = 40.6 \pm 0.2 \text{ МГц}$ $J = 176 \pm 2 \text{ МГц (88\%)}$ $A_{N\text{ iso}} = 39.2 \pm 0.2 \text{ МГц}$ $J = 7 \pm 2 \text{ МГц (10\%)}$
3.8		$A_{N\text{ iso}} = 40.3 \pm 0.2 \text{ МГц}$ $J = 367 \pm 2 \text{ МГц}$

Спектры ЭПР бирадикалов **3.5**, **3.6** и **3.8** хорошо описываются моделированием с использованием одного параметра обменного взаимодействия. Для бирадикала **3.5** спектр был рассчитан с учетом вклада 88% бирадикала с $J > 4$ А_N, 10% бирадикала с гораздо меньшим значением обменного взаимодействия (7 МГц). Спектры тритил-нитроксильных бирадикалов **3.6-3.8** имеют сходный вид, с выраженным вкладом линий, соответствующих большому значению J .

Конформационный анализ

Характерные расстояния между радикальными центрами в бирадикалах **3.5-3.8** оценены на основе распределения расстояний в конформерах бирадикалов. Поиск конформеров проведен программой crest [124] методом молекулярной механики с использованием силового поля GFN-FF [125] с учетом неявного растворителя-метанола. Для бирадикалов **3.5-3.8** было найдено соответственно 4560, 3147, 2297 и 315 уникальных конформеров, лежащих в пределах энергетического окна 6 ккал/моль. За расстояние между радикальными центрами принимали расстояние между центральным атомом тритильного фрагмента и центром связи N–O нитроксильного фрагмента. Вклад каждого расстояния учитывался в соответствии с распределением Больцмана по молекулярно-механическим энергиям конформеров. Итоговые распределения расстояний приведены на Рисунке 17. Максимальное сближение радикальных центров наблюдается в бирадикале **3.7**. Очевидно, что этому способствует длинный гибкий линкер.

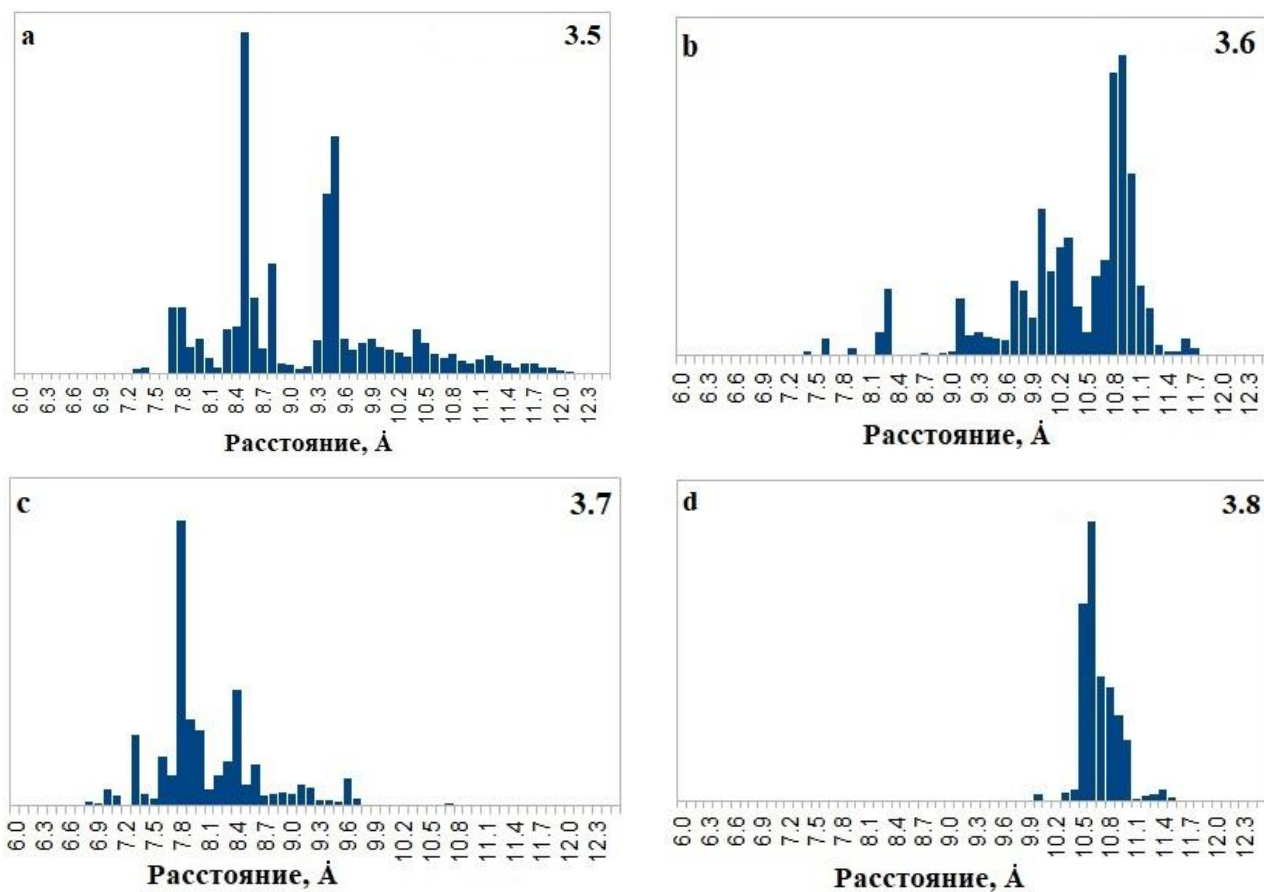


Рисунок 17 – Распределение расстояний между радикальными центрами в бирадикалах **3.5** - **a**, **3.6** – **b**, **3.7** – **c**, **3.8** - **d**.

Сравнение распределений в бирадикалах **3.6** и **3.8** с одинаковыми линкерами позволяет предположить, что сближению радикальных центров в бирадикале **3.8** препятствуют имеющиеся в OX063 заместители $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$.

Расчет диполь-дипольного взаимодействия в бирадикалах 3.5-3.8

Значение диполь-дипольного взаимодействия было рассчитано при помощи инструментов *EasySpin* на основе расстояний для конформеров с наибольшим весом. Полученные данные приведены в Таблице 4.

Как было показано ранее, оптимальные значения J/D должны находиться в диапазоне $1.25 < J/D < 2.25$ [82]. Данному критерию удовлетворяет бирадикал **3.7**. Вероятно, гибкий линкер в этом бирадикале позволяет сблизить радикальные центры до расстояний меньше, чем 8 Å и, соответственно, увеличить значение дипольного взаимодействия между неспаренными электронами.

Таблица 4 – Рассчитанные значения обменного (J) и диполь-дипольного (D) взаимодействия для бирадикалов **3.5-3.8** (взяты конформеры с наибольшим весом)

Бирадикал	Расстояние, Å	J , МГц	D , МГц	$J+D$, МГц	J/D
3.5	8.5	45	85	130	0.53
3.6	10.9	364	40	404	9.1
3.7	7.8	176	109	285	1.6
3.8	10.6	367	44	411	8.3

Устойчивость бирадикалов к восстановлению аскорбатом

Чтобы определить скорость восстановления бирадикалов, 0.01-0.1 М раствор аскорбата при рН 7.4 добавляли к 0.3 мМ раствору бирадикалов и записывали спектры ЭПР через равные интервалы времени. Полученный набор спектров был смоделирован вкладом бирадикала и тритильного монорадикала. Кинетика гибели бирадикалов **3.5-3.8** в присутствии аскорбата в водно-метанольном растворе для бирадикалов **3.5-3.7** и в водном растворе для бирадикала **3.8** показана на Рисунке 18 (a,b).

Скорость превращения бирадикалов определяется восстановлением нитроксильной части, так как тритильный фрагмент практически не восстанавливается, и его относительный вклад в спектр увеличивается с течением времени реакции (Рисунок 18с). Механизм реакции тритильных радикалов с аскорбиновой кислотой зависит от концентрации кислорода и тиолов и был ранее изучен в работах [126, 127]. В наших экспериментах на временах 10-15 часов гибель триарилметильного радикала не превышала 10-15%. Как видно из Рисунка 18а кинетика гибели бирадикалов **3.5** и **3.7**, полученных при концентрации 0.01 М аскорбата имеет быстрый спад на 20-30% в течение 15-20 минут для бирадикала **3.5** и 2-3 часа для бирадикала **3.7**, а затем практически выходит на плато. Аналогичное поведение кинетики гибели для стерически-затрудненных нитроксильных радикалов было описано в работе [50], где был изучен механизм

восстановления нитроксильных радикалов аскорбиновой кислотой и показано, что он включает в себя реакцию динамического равновесия между образующимся гидроксиламином и радикалом, а характер кинетики сильно зависит от концентрации нитроксильных радикалов и концентрации аскорбата. Различие в кинетике начальных спадов хорошо согласуется с различием в константах скорости восстановления соответствующих нитроксильных фрагментов [122].

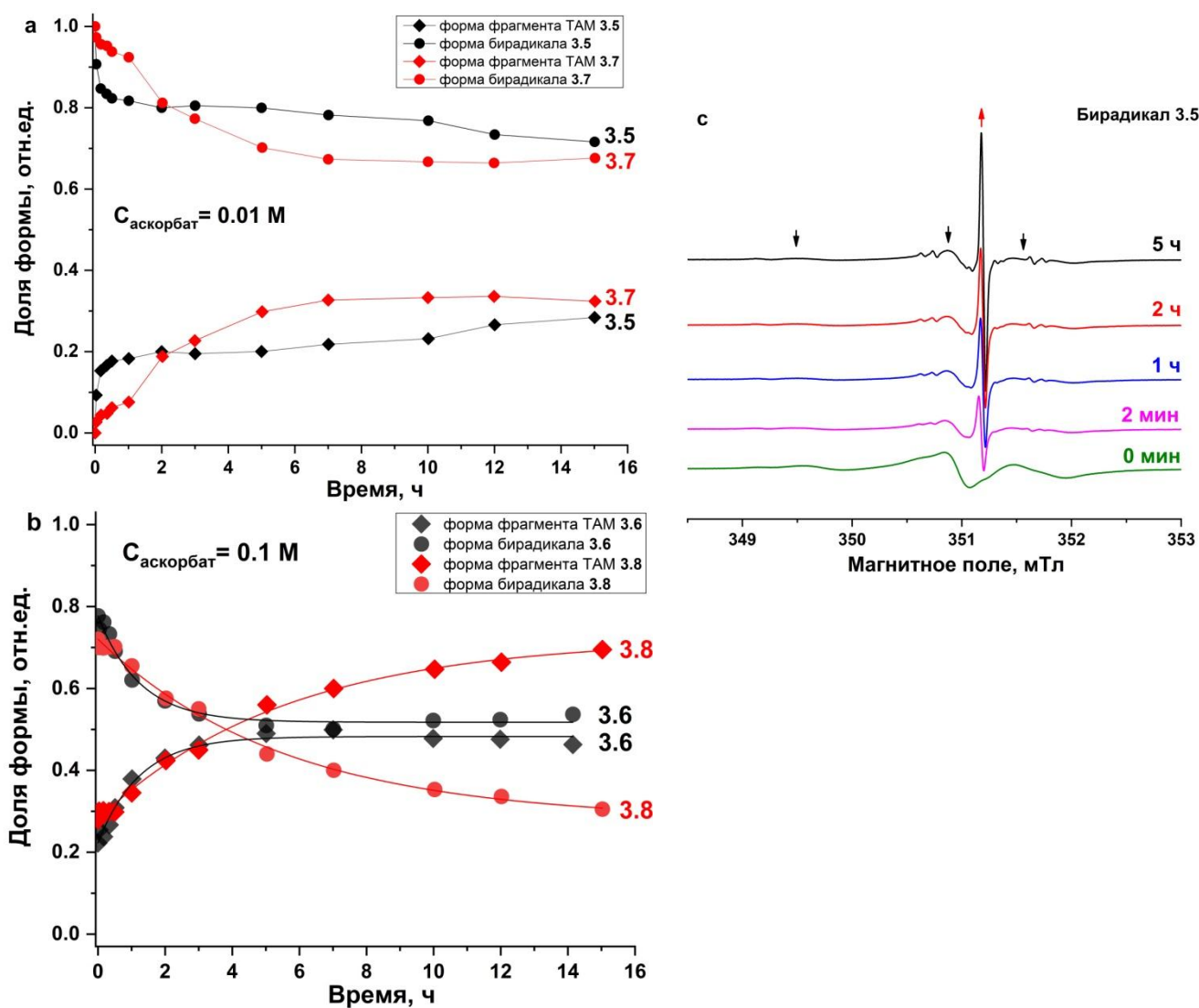


Рисунок 18 – а) Кинетики восстановления бирадикалов 3.5, 3.7 в присутствии 0.01 аскорбата в растворе PBS при pH 7.4. б) Кинетики восстановления бирадикалов 3.6, 3.8 в присутствии 0.1 М аскорбата в растворе PBS при pH 7.4. Кинетики, соответствующие изменению содержания бирадикала, отмечены кругом, тритила – ромбом. в) Изменение спектров ЭПР бирадикала 3.5 в течение 5 часов после добавления аскорбата. Красной и черными стрелками показано увеличение тритильной и уменьшение нитроксильных линий соответственно.

3.3 Исследование спиروزамещенных ферроценсодержащих бирадикалов

Нами было проведено исследование магнитно-резонансных свойств и возможность использования как ПА для ДПЯ бирадикалов на основе спирициклогексанзамещенных нитроксидов (Рисунок 19) [128]. Интерес к этим системам обусловлен тем, что ранее ферраценовые линкеры не использовались при синтезе бирадикалов как поляризующих агентов. Выбор радикалов со спиругексановыми заместителями был связан с тем, что, как известно, введение спирициклогексановых заместителей в положения соседние с нитроксильной группой приводит к увеличению времени электронной спиновой релаксации при температурах ниже 150°C. Кроме того, стабильность таких нитроксидов в восстановительных средах по сравнению с тетраметилзамещенными нитроксильными радикалами на порядок выше [129–131]. Мы сравнили структуру и свойства бирадикалов с метильными и спирициклогексановыми заместителями в положениях 2 и 5 нитроксидов и обнаружили, что спирициклогексановые заместители влияют не только на величину обменного взаимодействия, но и на реакционную способность 1,3-дiazетидинового линкера.

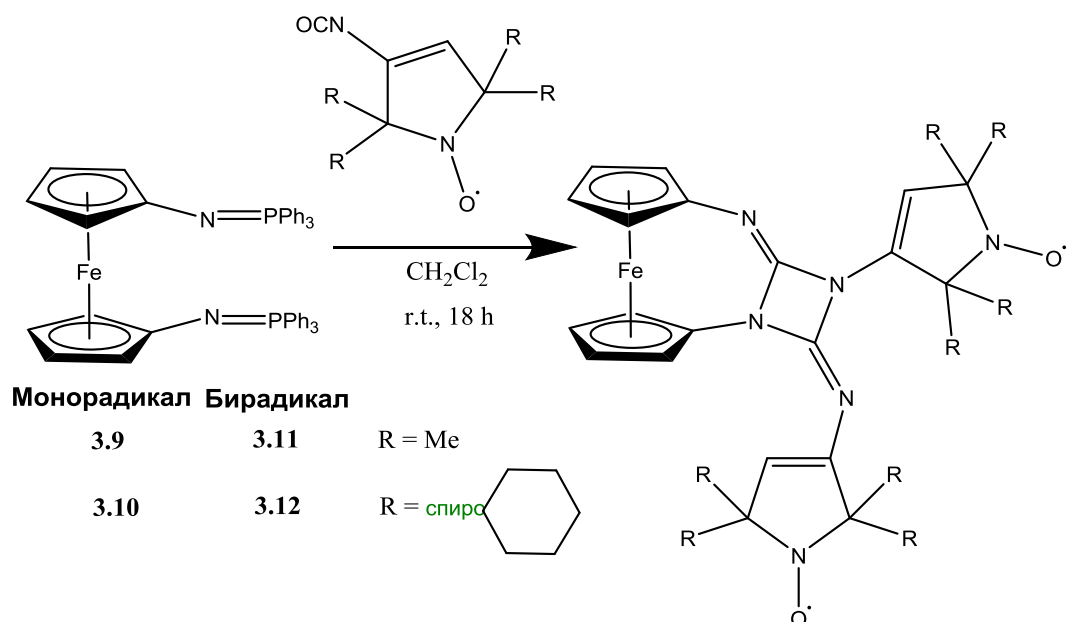


Рисунок 19 – Схема синтеза ферроценсодержащих бирадикалов 3.11 - 3.12.

Чтобы охарактеризовать парамагнитные центры в бирадикалах 3.11 и 3.12, мы провели эксперименты ЭПР в X-диапазоне (9.87 ГГц, 0.35 Тл) при комнатной

температуре. На Рисунке 20 представлены спектры ЭПР разбавленных деоксигенированных растворов бирадикалов **3.11** и **3.12** в толуоле, записанные при разных температурах.

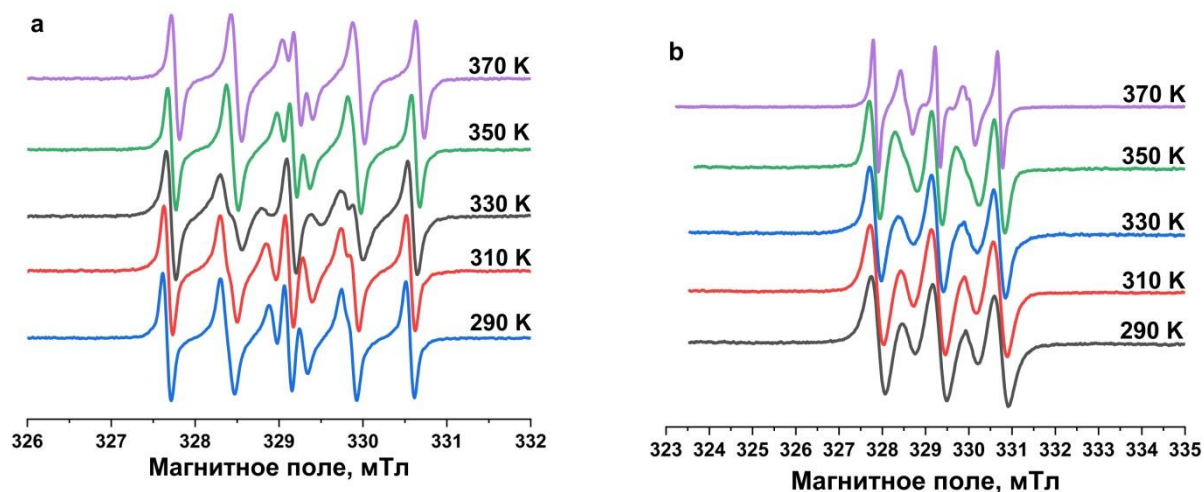


Рисунок 20 – ЭПР спектры (9.87 ГГц) разбавленных деоксигенированных растворов бирадикалов **3.11** (a) и **3.12** (b) в толуоле, записанные в диапазоне температур 290-370 К.

Спектры бирадикала **3.11** при 290–370 К были описаны системой с $A_N = 1.44$ мТл, значением константы спин-спинового обмена J и шириной распределения $\sigma(J)$ указанными в Таблице 5. С повышением температуры центр распределения смещается в сторону больших значений обменного взаимодействия.

Таблица 5 – Параметры для моделирования спектров ЭПР бирадикала **3.11**

Т, К	J , МГц	$\sigma(J)$, МГц
290	169	137
310	265	96
330	315	125
350	385	149
370	425	237

Спектры бирадикала **3.12** при 290-330 К были смоделированы с учетом вкладов от двух конформаций с $A_N = 1.42$ мТл и значениями констант спин-спинового обмена $J = 0$ и $J = 218$ МГц (практически в равном соотношении).

Параметры указаны в Таблице 6. При температурах выше 350 К число конфигураций с $J=0$ увеличивается, и спектры бирадикала **3.12** моделируются с учетом распределения J , с центром J_{cp} и шириной распределения $\sigma(J)$.

Таблица 6 – Параметры для моделирования спектров ЭПР бирадикала **3.12**

Т, К	J_1 , МГц	J_2 , МГц
290	0 (51%)	218 (49%)
310	0 (51%)	218 (49%)
330	0 (51%)	218(49%)
350	0	$J_{cp} = 25$ МГц $\sigma(J) = 90$ МГц
370	0	$J_{cp} = 25$ МГц $\sigma(J) = 137$ МГц

ДЛЯ эксперименты

На Рисунке 21 показаны ^1H MAS и $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CPMAS спектры для радикалов 3.11 и 3.12. Во всех спектрах сигнал от кремниевой пробки около 0 ppm отмечен знаком #. Бирадикал 3.11 показывает усиление 15 для ^1H и 14 для ^{13}C (Рисунок 21 а и б), в то время как поляризующий агент 3.12 достиг усиления только 4 для обоих ядер. Почти одинаковое усиление сигнала в ^1H MAS и $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CPMAS для каждого радикала ясно указывает на однородное распределение радикалов в растворе ТХЭ (тетрахлорэтилен), приводящее к однородному распространению поляризации по образцу.

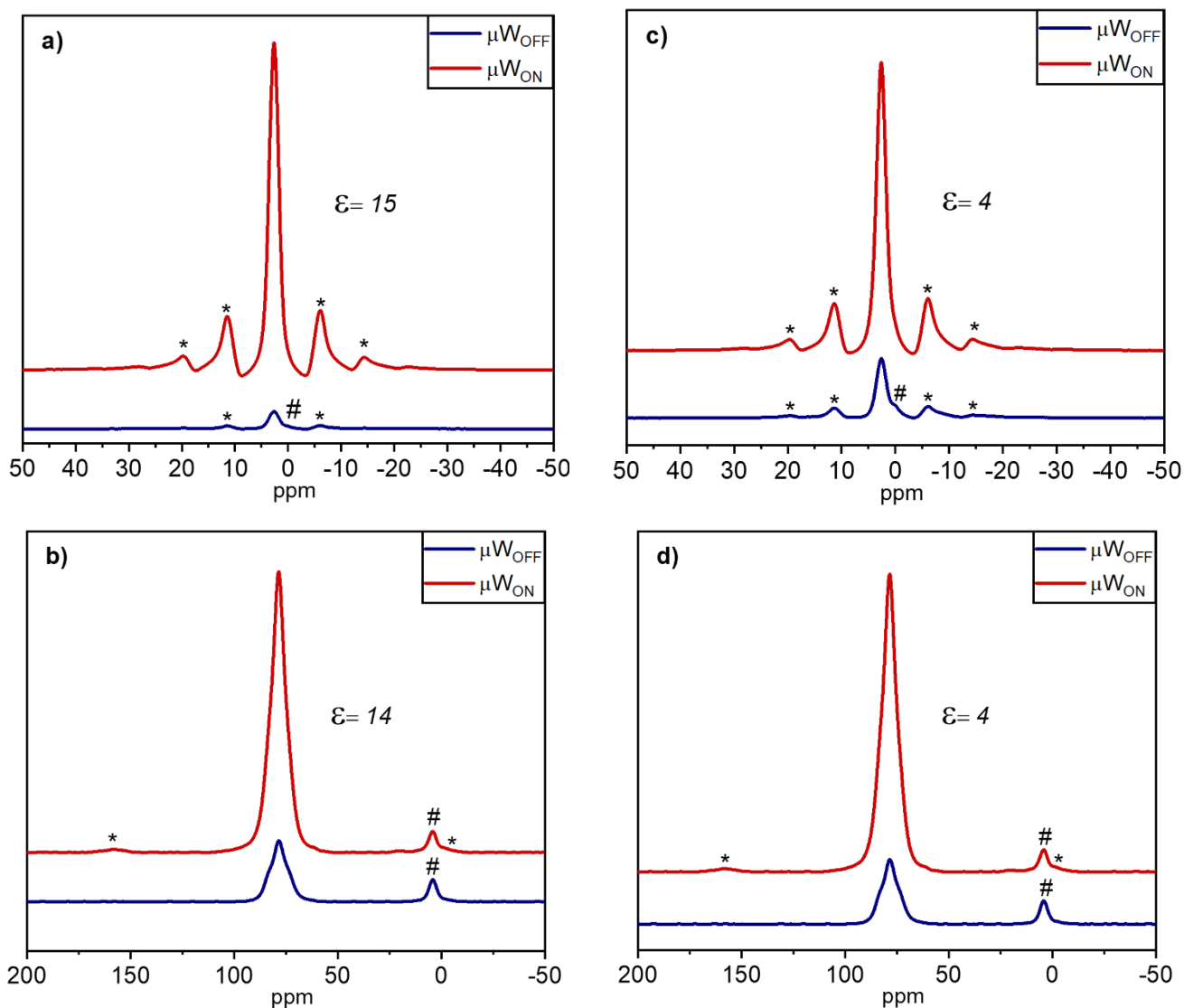


Рисунок 21 – Спектры ^1H MAS и $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ CPMAS 15 мМ раствора бирадикалов: **3.11** (a, b) и **3.12** (c, d) в ТХЭ (тетрахлорэтилен). Измерения проводились при номинальной температуре 115 К в присутствии (μW_{ON}) и отсутствии (μW_{OFF}) микроволнового излучения. «#» указывает на сигнал от силиконовой пробки около 0 ppm.

Различие в усилении ДПЯ между двумя радикалами можно объяснить наличием значительной части ($\sim 50\%$) конформера с $J = 0$ МГц в бирадикале **3.12**, что снижает эффект ДПЯ по сравнению с радикалом **3.11**. Как уже отмечалось, значение J оказывает существенное влияние на эффект ДПЯ. В **3.11** и **3.12** величина J модулируется не только конформационными переходами, но и специфическими химическими свойствами, присущими 1,3-азетидинам. Известно, что последние 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 . Поэтому важно также более подробно рассмотреть реакцию бирадикалов с нуклеофилами, которая обсуждается в разделе 3.3.1.

3.3.1 Реакция раскрытия диазетидинового кольца в ферроценсодержащих бирадикалах

В 1989 г. Молина и соавторы [132] показали, что бис(арилимино)замещенные 1,3-дiazетидины могут вступать в реакцию раскрытия цикла при добавлении аминов, приводящую к образованию пентазамещенных бигуанидов. Раскрытие цикла под действием нуклеофила может вызвать изменение остова молекулы, увеличение расстояния между нитроксильными фрагментами и, как следствие, изменение спин-спинового взаимодействия.

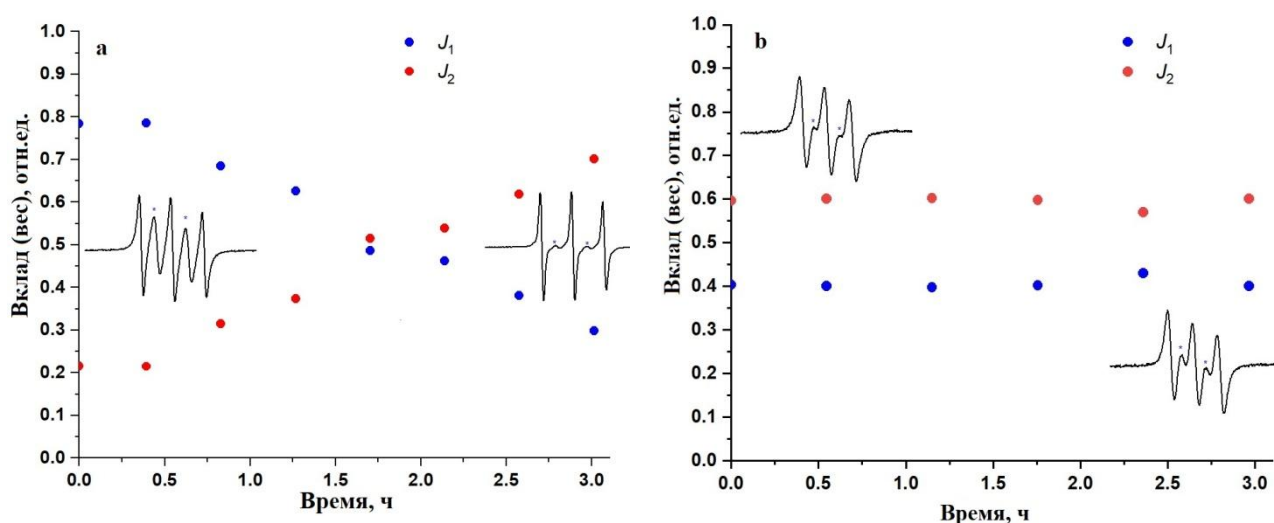


Рисунок 22 – Зависимость соотношения двух компонентов с разным значением J от времени в реакции раскрытия цикла для радикала **3.11** (а) и **3.12** (б).

Для изучения реакции раскрытия цикла под действием нуклеофилов были проведены следующие эксперименты. К раствору каждого бирадикала в концентрации $2 \cdot 10^{-4}$ М в диметилсульфоксиде добавляли *n*-бутиламин в равном объеме (~10000-кратный молярный избыток). Затем через равные промежутки времени регистрировали спектры ЭПР полученной реакционной смеси в течение 3 ч при комнатной температуре. Наблюдалось изменение соотношения

интенсивностей линий ЭПР, соответствующих бирадикалам с $J \approx 0$ (линии 1, 3 и 5), и линий, соответствующих бирадикалам с сильным обменным взаимодействием $J \gg 0$ (линии 2 и 4). Полученные спектры моделировались с учетом вкладов двух типов бирадикалов, а именно, с $J_1 = 100$ (90 для радикала **3.12**) МГц и $J_2 = 0$ МГц. Рассчитаны вклады в спектр от двух компонент с разными значениями J , полученные зависимости этих весов от времени реакции представлены на Рисунке 22. Для бирадикала **3.12** изменений практически не наблюдается (Рисунок 22, справа). Увеличение интенсивности линий обмена (2,4), скорее всего, связано с изменением конформационного распределения при добавлении амина. Для бирадикала **3.11** отмечено значительное уменьшение вклада обменных линий (линии 2,4; отмечены знаком «*»). Для обоих бирадикалов интегральная интенсивность практически не меняется в ходе реакции, что свидетельствует о том, что число радикальных центров остается постоянным, а сами радикальные фрагменты не реагируют с *n*-бутиламином.

Для асимметрично замещенных 1,3-дiazетидинов при взаимодействии с аминами предполагаются два возможных пути реакции (Рисунок 23) в отличие от описанных ранее примеров [132, 133]. Из-за наличия объемных циклогексильных заместителей путь 1 более вероятен для бирадикала **3.12**, что согласуется с данными ЭПР (соотношение вкладов с разными значениями J остается постоянным).

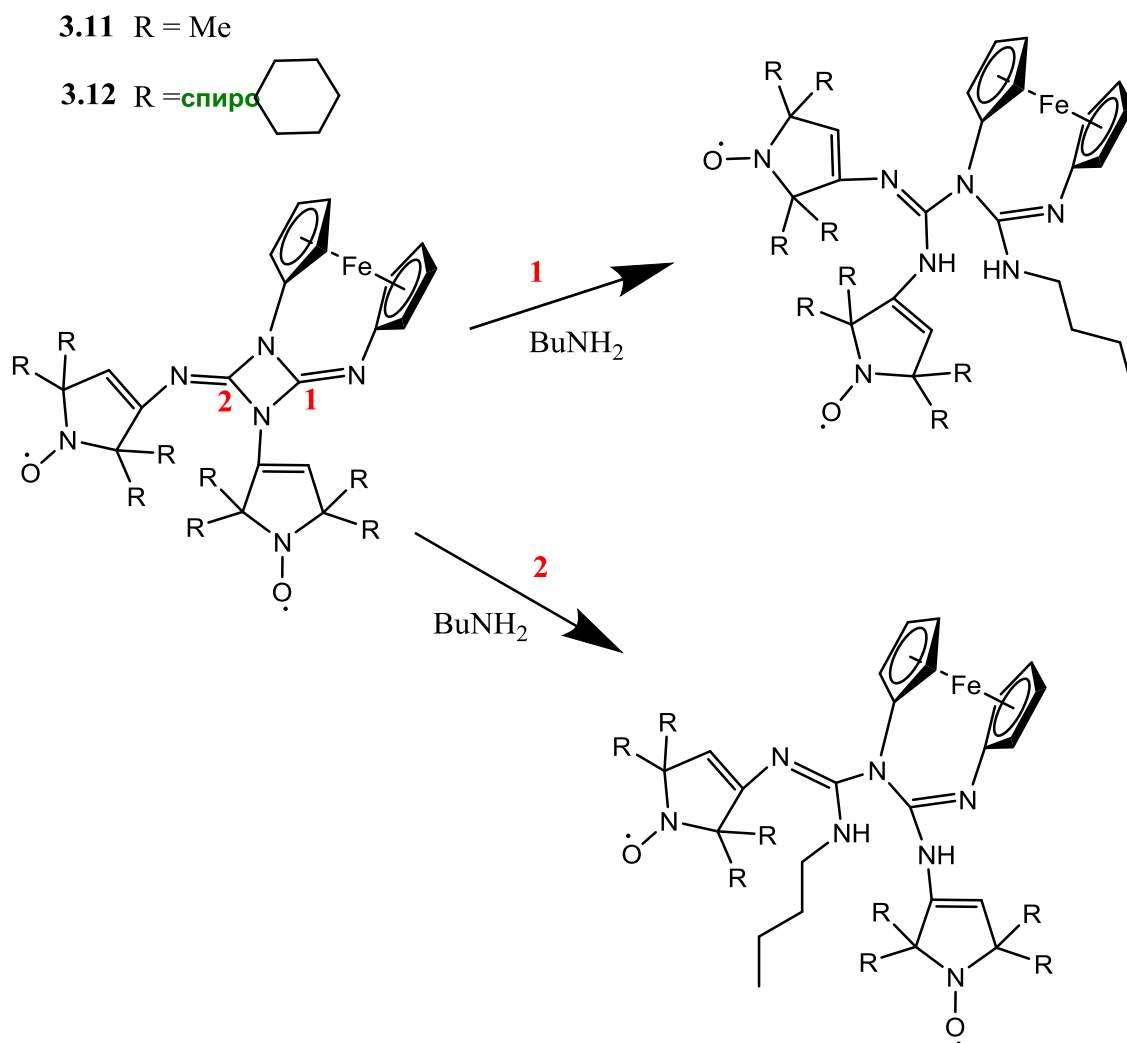


Рисунок 23 – Предполагаемые схемы реакции бирадикалов **3.11** - **3.12** с избытком н-бутиламина при комнатной температуре [132].

Для метилзамещенного бирадикала **3.11** возможны оба варианта, что приводит к значительному ускорению раскрытия цикла. Результаты этого эксперимента наглядно демонстрируют преимущество спирозамещенных бирадикалов в нуклеофильной среде.

Заключение к главе 3

В данном разделе были исследованы различные типы бирадикалов. Для водорастворимых биснитроксильных и тритил-нитроксильных бирадикалов была показана высокая устойчивость по отношению к аскорбату в течение десятков часов, что позволит их использовать в дальнейшем в исследованиях биологических объектов, в частности, в экспериментах на клетках. Также было

исследовано поведение обменного взаимодействия в ферроценсодержащих бирадикалах под воздействием нуклеофила – *n*-бутиламина – из-за раскрытия diaзетидинового линкера. Предположен возможный механизм реакции. Показано, что 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 7).

Таблица 7 – 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
$^1H, \epsilon$	13	9	15	4
$^{13}C, \epsilon$	15	9	14	4

ГЛАВА 4. ПРИМЕНЕНИЕ ТРИАРИЛМЕТИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ ДЛЯ ИЗМЕРЕНИЯ РАССТОЯНИЙ В МОДЕЛЬНЫХ И БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДОМ ^{19}F ДЭЯР СПЕКТРОСКОПИИ

В данной главе описаны результаты исследования, посвященного комбинации метода высокочастотного двойного электрон-ядерного резонанса в сочетании с ядерными спинами ^{19}F и ТАМ для измерения расстояний, как в модельных, так и в биологических системах.

4.1 Измерение расстояний в модельных фторсодержащих триарилметильных радикалах

В этой работе мы провели эксперименты ДЭЯР W-диапазона в сочетании с ядерными спинами ^{19}F и ТАМ для измерения расстояния на специально синтезированных модельных соединениях **4.1–4.5** (Рисунок 24) и сравнили результаты с систематическим конформационным анализом с помощью молекулярной механики (силовое поле MMFF94) и моделирование молекулярной динамики (МД) [134].

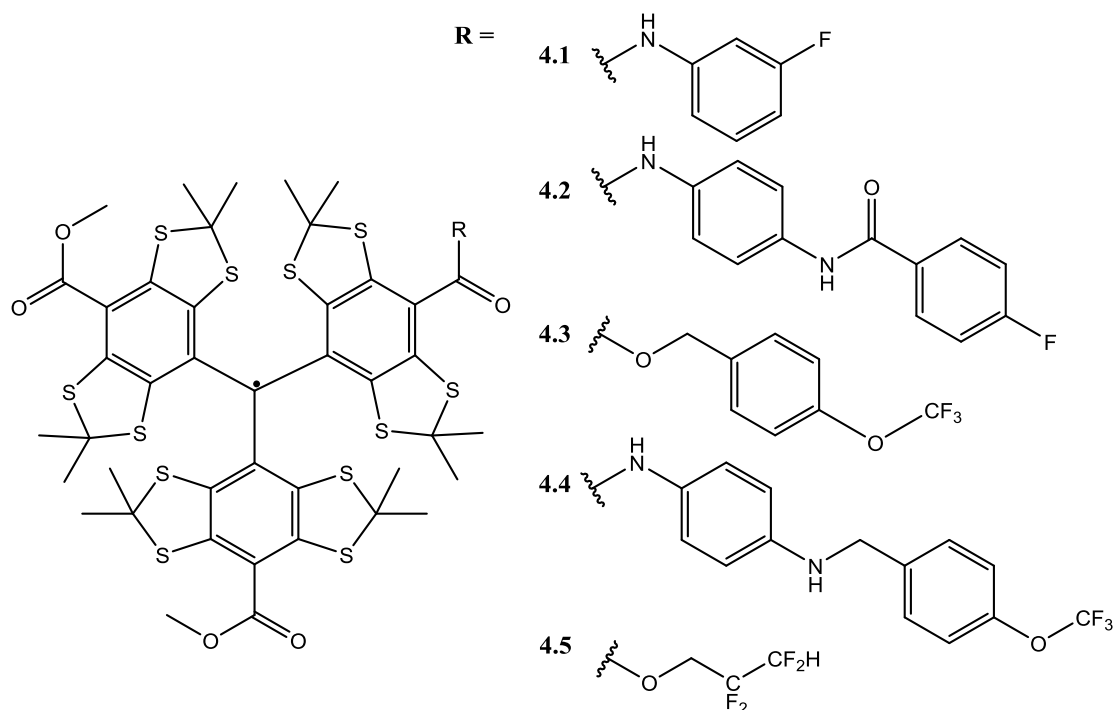


Рисунок 24 – Структура модельных соединений **4.1-4.5**.

С целью определения изотропных констант сверхтонкого взаимодействия (СТВ) для деоксигенированных растворов радикалов **4.1-4.5** (в метаноле) были записаны ЭПР спектры X – диапазона при комнатной температуре. Каждый спектр характеризуется одной узкой линией с шириной ~ 0.05 мТл, g -фактором $g = 2.0032 \pm 0.0004$ и набором сателлитов ^{13}C с константами СТВ [1.12 0.89 0.31 0.22 0.12] мТл. Явного расщепления на других атомах не наблюдается. В спектрах соединений **4.1**, **4.2** и **4.4** появляется дополнительное уширение и искривление центральной линии благодаря сверхтонкому расщеплению на амидном атоме азота ^{14}N $A_{\text{N}} = 0.018$ мТл. Расщепление линии в ЭПР спектре из-за наличия константы изотропного СТВ на ядрах атомах фтора не наблюдается, из-за чего был сделан вывод о том, что $A_{\text{F}} \approx 0$. Данное предположение было проверено в дальнейшем при помощи квантово-химических расчетов и использовано при моделировании спектров ДЭЯР Мимса.

Экспериментальные данные по спин-решеточной релаксации (T_1) и фазовой релаксации (T_2) при 80 К обрабатывались с помощью следующих моноэкспоненциальных функций соответственно:

$$I = I_0 \left(1 - \exp \left(- \frac{\tau}{T_1} \right) \right) \quad (9)$$

$$I = I_0 \exp \left(- \left(\frac{\tau}{T_2} \right)^x \right) \quad (10)$$

Полученные значения времен релаксации приведены в Таблице 8. Стоит отметить, что соединения **4.1-4.5** характеризуются временем релаксации $T_2 \sim 4$ мкс уже при 80 К, в то время как нитроксильные радикалы, использованные в работе Vennati et.al [25], демонстрируют такие значения только при более низких температурах (50 К). Длительные времена релаксации позволяют в дальнейшем использовать более длительные задержки между импульсами, при проведении экспериментов ДЭЯР Мимса.

Для всех радикалов были записаны эхо-детектируемые 94 ГГц ЭПР спектры для определения анизотропии g -тензора и положения поля, соответствующего

максимуму сигнала эха. Рассчитанные из спектров компоненты и анизотропия g -тензора представлены в Таблице 8. Как видно из Таблицы 8 анизотропия в W -диапазоне у тритильных соединений проявляется только в 4-м знаке g -фактора после запятой, в то время как у нитроксидов в 3-м знаке, т.е. отличие на порядок величины.

Таблица 8 – Времена релаксации T_1 , T_2 и компоненты g -тензора для радикалов **4.1-4.5**. Погрешность определения g -фактора в W – диапазоне составляет ± 0.00005 .

Радикал	T_1 , мс	T_2 , мкс	g_{\perp}	g_{\parallel}	$(g_{\perp} - g_{\parallel}) \times 10^3$
4.1	1.22±0.01	4.69±0.01	2.00381	2.00334	0.47
4.2	1.20±0.01	4.37±0.01	2.00363	2.00327	0.36
4.3	1.15±0.01	4.20±0.02	2.00382	2.00329	0.53
4.4	1.32±0.01	4.44±0.01	2.00377	2.00338	0.39
4.5	1.08±0.01	3.77±0.01	2.00379	2.00330	0.49

Было показано влияние малой величины анизотропии g -тензора на спектры ДЭЯР Мимса. Для этого на двух разных резонансных положениях были записаны спектры ДЭЯР Мимса (Рисунок 25). 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 положении магнитного поля, соответствующем максимуму сигнала эха, в отличие от нитроксидов, где необходимо записывать спектры при 5-ти различных положениях и затем суммировать их. Данное свойство тритильных радикалов позволяет значительно оптимизировать время работы на спектрометре и упростить обработку данных.

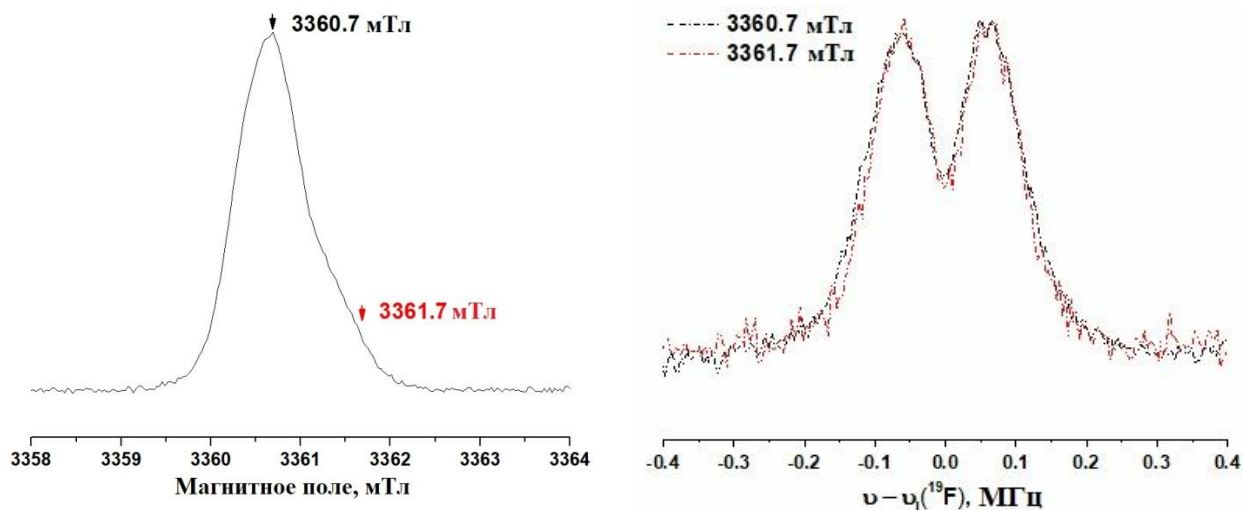


Рисунок 25 – а) Эхо-детектируемый спектр ЭПР (W-диапазон) радикала **4.5** в $[d_6]$ ДМСО/ $[d_4]$ MeOD (2:3). б) 94 ГГц ^{19}F спектры ДЭЯР Мимса радикала **4.5** в $[d_6]$ ДМСО / $[d_4]$ MeOD (2:3) при резонансах ЭПР 3360.7 мТл (черный) и 3361.7 мТл (красный) при 80 К.

Для соединений **4.1-4.5** в замороженном растворе $[d_6]$ ДМСО / $[d_4]$ MeOD (2:3) были измерены 94 ГГц спектры ДЭЯР Мимса при 80 К (Рисунок 26). Спектры ДЭЯР регистрировались в положении магнитного поля, где сигнал эха был максимальным. Чтобы избежать появления «слепых зон» в спектре были подобраны времена задержки между первыми двумя импульсами в соответствии с формулой интенсивности ДЭЯР сигнала (уравнение 8).

Для всех соединений были получены ДЭЯР спектры, а для радикалов **4.1** и **4.5** удалось получить еще и хорошо разрешенные спектры.

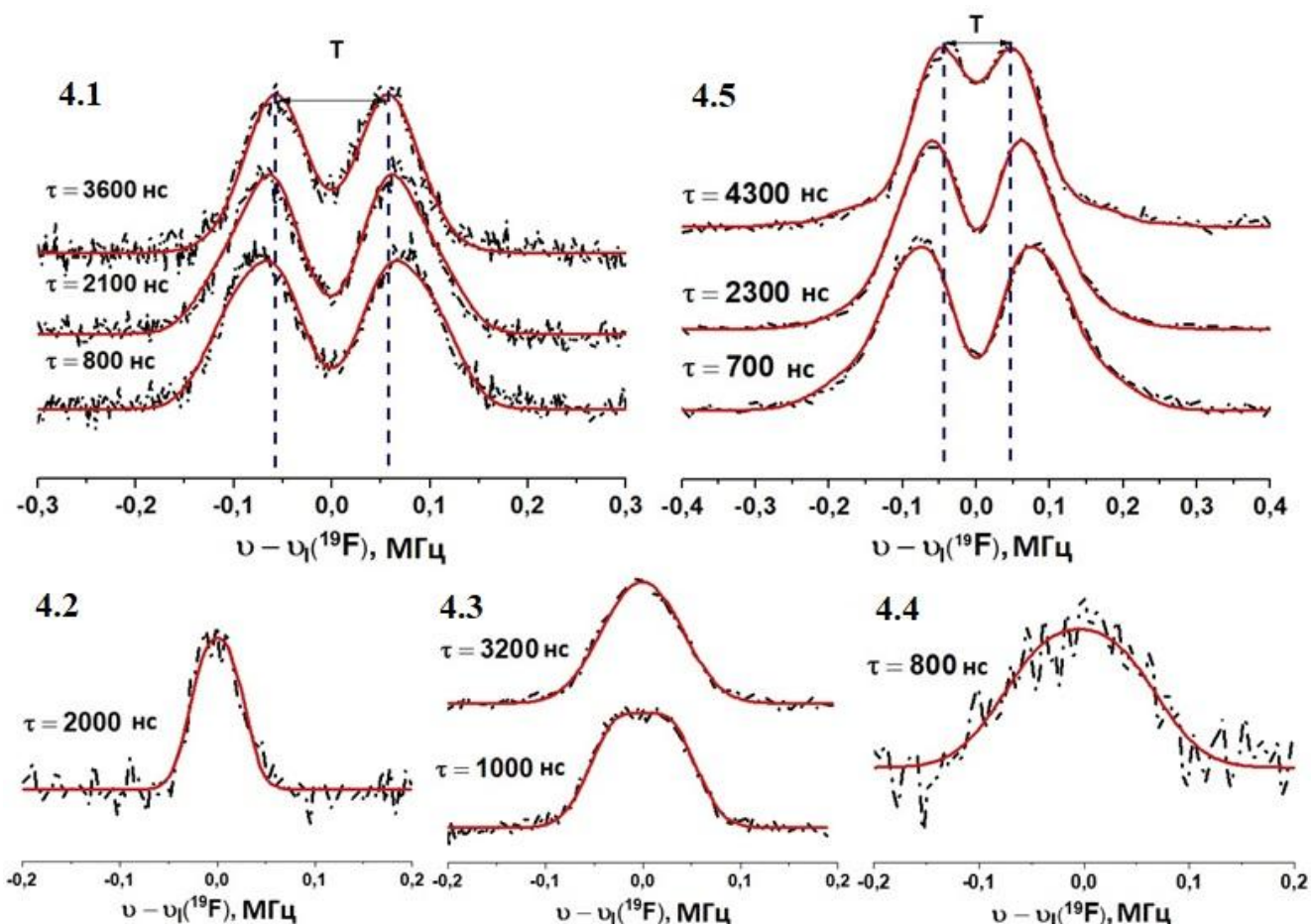


Рисунок 26 – 94 ГГц ^{19}F спектры ДЭЯР Мимса радикалов **4.1-4.5** в $[\text{d}_6]$ ДМСО/ $[\text{d}_4]$ MeOD (2:3), записанные при разном времени задержки между импульсами τ : черным цветом – экспериментальные данные, красным – расчетные данные.

Моделирование спектров ДЭЯР Мимса было выполнено в программе EasySpin с использованием функции *saffron*. Обработка была проведена в приближении, что на ядрах атома F отсутствует изотропная константа СТВ. При анализе экспериментальных спектров были получены значения диполь-дипольного взаимодействия 128 ± 5 кГц для **4.1** и два набора значений $115 \pm 8 / 218 \pm 40$ кГц для **4.5**, которые можно отнести к 2 группам фторов в соединении. Для расчета расстояний из значений дипольного СТВ было использовано уравнение 11:

$$T_{\perp} = \frac{\mu_0}{4\pi h} \left(\frac{g_{\text{TAM}} g_{\text{F}} \mu_e \mu_N}{R^3} \right) = \frac{C}{R^3} \quad (11)$$

Данное уравнение допускается использовать только в приближении точечного диполя и аксиальности T -тензора. Исходя из него, значения R

составляют 8.3 ± 0.1 для соединения **4.1** и $8.7 \pm 0.2 / 7.0 \pm 0.4$ Å для **4.5**. Из результатов конформационного анализа (Рисунок 27) следует, что радикал **4.1** характеризуется двумя конфигурациями с расстояниями 11 и 6.2 Å. Расстояние, рассчитанное из спектров ДЭЯР Мимса с использованием уравнения 11 для радикала **4.1**, не соответствует ни одной из его 2-х возможных жестких конфигураций. Тогда для соединения **4.1** были проведены квантово-химические расчеты, которые показали наличие изотропной константы СТВ на фторе и неаксиальность тензора СТВ.

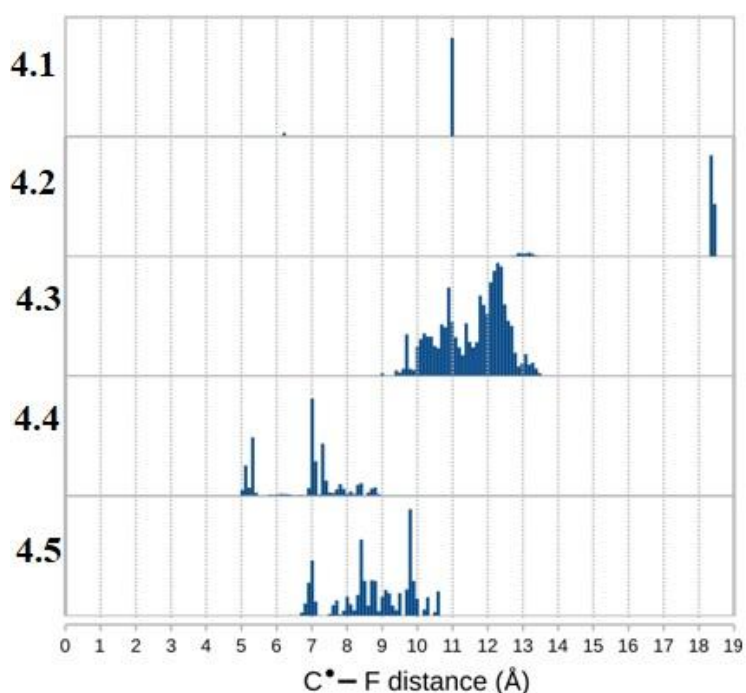


Рисунок 27 – Распределения расстояний для модельных соединений **4.1–4.5**, полученные из конформационного анализа.

Диполярный тензор СТВ был рассчитан с помощью метода DFT для радикалов **4.1** и **4.5**. Для расчета были выбраны геометрии наиболее стабильных конформеров. В отличие от результатов работы Беннати и соавторов [25] рассчитанный тензор имеет неаксиальный вид $0.5 \cdot T_1 \neq T_2 \neq T_3$ (T_1, T_2, T_3 – главные значения тензора) со значительным вкладом изотропной константы СТВ ($A_{\text{изо}}$). Поэтому спектры ДЭЯР Мимса моделировались в программе *EasySpin* с учетом предсказанного DFT тензора СТВ. Спектры, смоделированные на основе рассчитанных тензоров для этих двух конформаций, показаны на Рисунке 28.

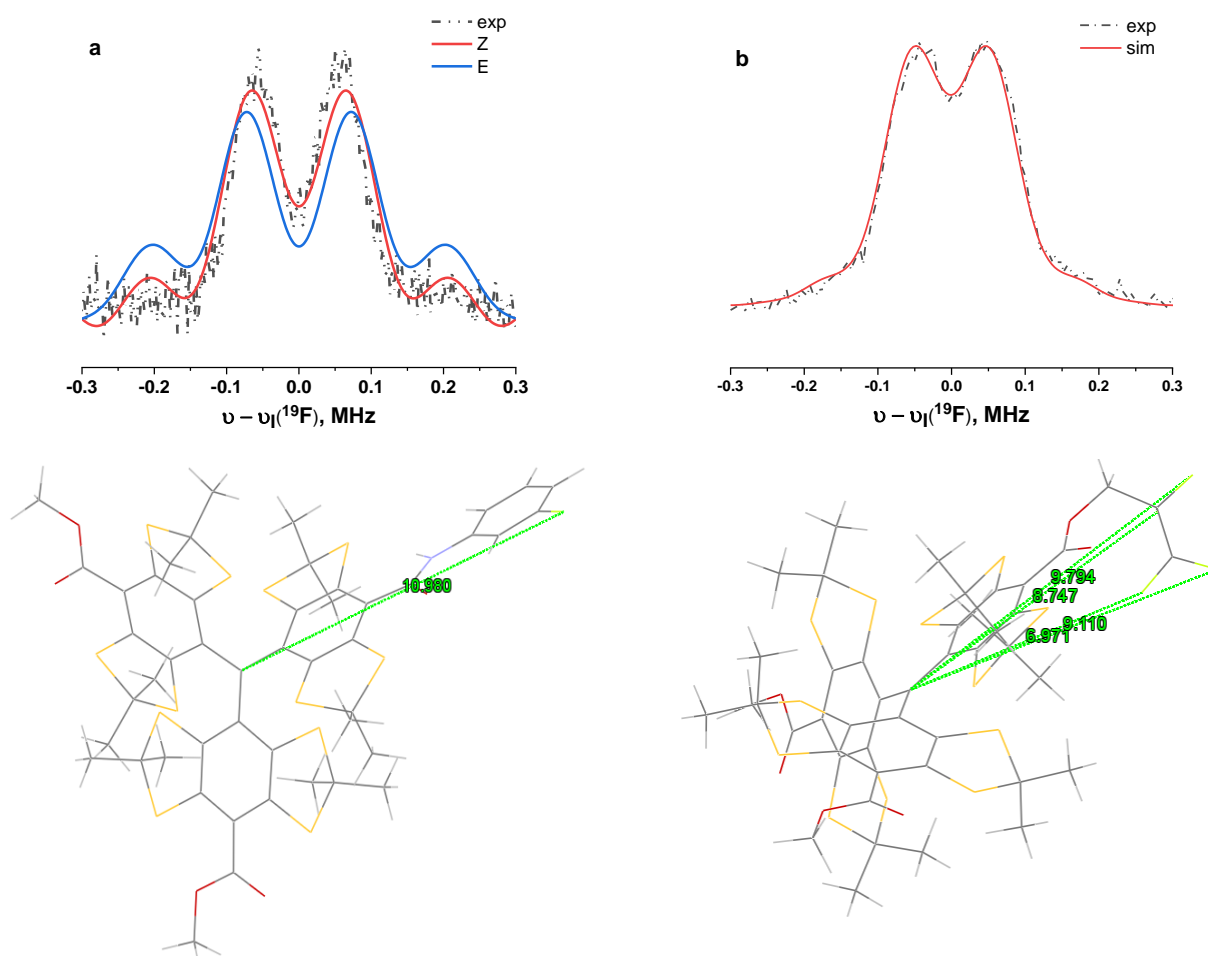


Рисунок 28 – Экспериментальные и смоделированные 94 ГГц спектры ДЭЯР Мимса (*EasySpin*) а) радикала **4.1**, б) радикала **4.5** с учетом анизотропного СТВ, рассчитанного с помощью DFT.

Наилучшее согласие с экспериментальными данными имеет развернутая конфигурация Z с расстоянием 11 Å (красная линия). Это логично, так как эта конформация вносит наибольший вклад в распределение конформеров. Расхождение с расстоянием, полученным из приближения точечного диполя 8.3 Å, можно объяснить тем, что предсказанная константа изотропного СТВ больше, чем расщепление в спектре ДЭЯР ($A_{\text{изо}} > 150$ кГц).

Таким образом, уравнение 11 в случае радикала **4.1** применять некорректно. В случае соединения **4.5** получено хорошее согласие результатов с результатами PRE ЯМР экспериментов и конформационного анализа.

Из анализа ширины линий неразрешенных спектров ДЭЯР радикалов **4.2-4.4** была сделана оценка минимального расстояния между фтором и радикальным

центром. Минимальное расстояние составило 1.2 нм, что, по сути, является верхней границей расстояний, определяемых данным методом.

4.2 Измерение расстояний в ДНК дуплексах, сравнение спектров при разных частотах (34, 94 и 263 ГГц)

Новый подход к измерению расстояний методом ^{19}F ENDOR с использованием тритильных радикалов был применен нами к модельным биологическим системам. В качестве объекта исследований были выбраны 20-мерные ДНК дуплексы, состоящие из следующих цепей: 1) дезоксирибонуклеотид **1** (Fin-DNA20 или OX063-DNA20), меченный ТАМ (Finland тритил-Fin или OX063) на 5'-конце; 2) олигонуклеотид **2**, комплементарный дезоксирибонуклеотиду **1**, содержащий 2'-фтормодифицированный нуклеотид на 3'-конце. 2'-Фтормодифицированный нуклеотид вводили в первое или второе положение от 3'-конца олигонуклеотида **2** (F1 и F2). Серии дуплексов ДНК, отличающиеся расстоянием между ТАМ и фтором, были приготовлены путем смешивания олигодезоксирибонуклеотидов **1** и **2** типа (Рисунок 29).

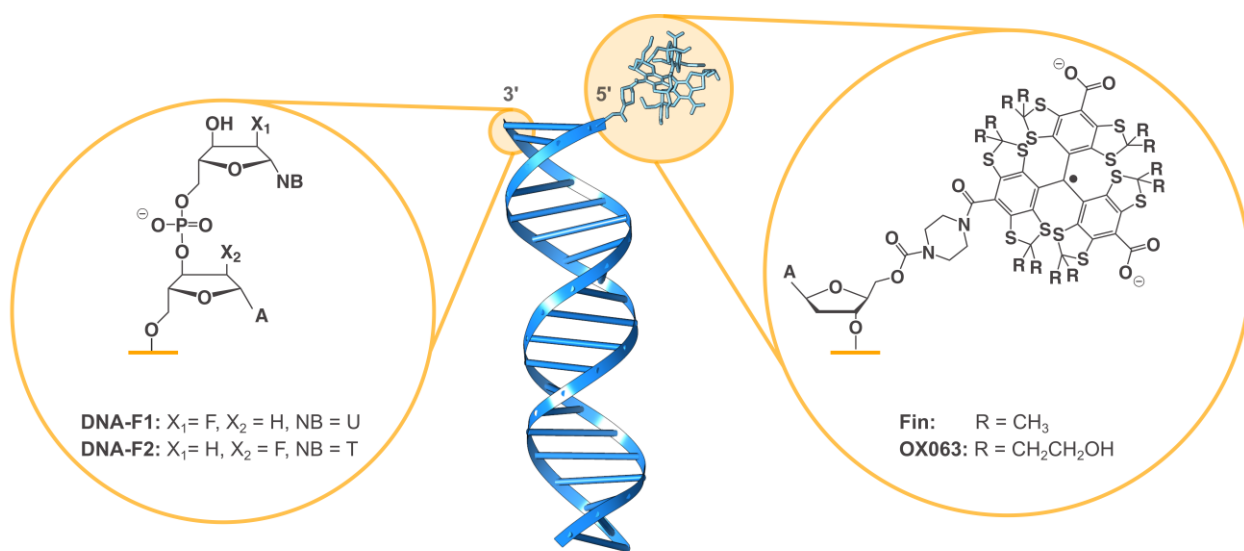


Рисунок 29 – Схематическое изображение синтезированных 20-мерных дуплексов ДНК.

Описание спин-меченых ДНК дуплексов приведено в Таблице 9. Для исследования методом ДЭЯР спектроскопии при температуре 50 К образцы были растворены в смеси дейтерированных воды и глицерина в объемном соотношении 1:1.

Таблица 9 – Описание спин-меченых дуплексов ДНК. В третьем столбце указаны концентрации образцов после растворения в водно-глицериновой смеси.

Структура олигонуклеотида	Обозначение	Концентрация, мкМ
5'- Fin -АТАСГ-ТТААС-ГАТСС-ТТСАС-3' 3' – U ^F АТГС-ААТТГ-СТАГГ-ААГТГ-5'	Fin-DNA20-F1	120-150
5'- Fin -АТАСГ-ТТААС-ГАТСС-ТТСАС-3' 3' – ТА ^F ТГС-ААТТГ-СТАГГ-ААГТГ-5'	Fin-DNA20-F2	150
5'- OX063 -АТАСГ-ТТААС-ГАТСС-ТТСАС-3' 3' – U ^F АТГС-ААТТГ-СТАГГ-ААГТГ-5'	OX063-DNA20-F1	100
5'- OX063 -АТАСГ-ТТААС-ГАТСС-ТТСАС-3' 3' – ТА ^F ТГС-ААТТГ-СТАГГ-ААГТГ-5'	OX063-DNA20-F2	100

Для определения степени мечения олигонуклеотидов триарилметильными радикалами был использован метод ЭПР спектроскопии. Появление в спектре ЭПР сверхтонкого расщепления на ядре атома азота пиперазинового линкера подтверждает факт присоединения тритильной метки к 5'-концу олигонуклеотида. В спектре свободной метки такое расщепление отсутствует (Рисунок 30).

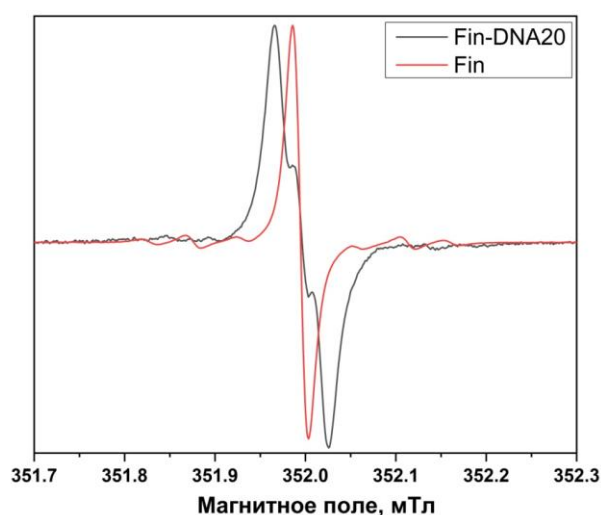


Рисунок 30 – Сравнение ЭПР спектров свободной метки Fin (красным) и тритил-меченного олигонуклеотида Fin-DNA20 (черным).

Концентрацию парамагнитных частиц определяли путем сравнения с стандартным раствором Finland тритила. Доля меченных олигонуклеотидов от их общего числа составила $\sim 40\%$. Так как комплементарная цепь на 100% состоит из фтормеченных олигонуклеотидов, то в итоговом дуплексе доля двойных цепей, которые содержат и фтор и тритил, составила 40%, что является достаточным для детектирования сигнала методами ЭПР спектроскопии.

Для всех образцов были выполнены следующие измерения: измерения времен спин-решеточной релаксации T_1 (методом инверсии - восстановления) и фазовой релаксации T_2 (по затуханию первичного эха), запись эхо-детектируемых спектров, проведение экспериментов ДЭЯР Мимса. Эксперименты ДЭЯР Мимса проводились при температуре 50 К с использованием РЧ-импульсов после усилителя мощностью 150 Вт. Длительность микроволновых $\pi/2$ импульсов составила 10 нс.

Необходимость исследования данных образцов в Германии определялась наличием высокочастотного (263 ГГц) экспериментального оборудования. Предполагалось, что применение высоких магнитных полей позволит получить дополнительную информацию об ориентационной селективности триарилметильной метки, как, например, для нитроксидов [30]. Спектры ДЭЯР Мимса, записанные в разных позициях магнитного поля (263 ГГц), практически не отличаются между собой (Рисунок 31).

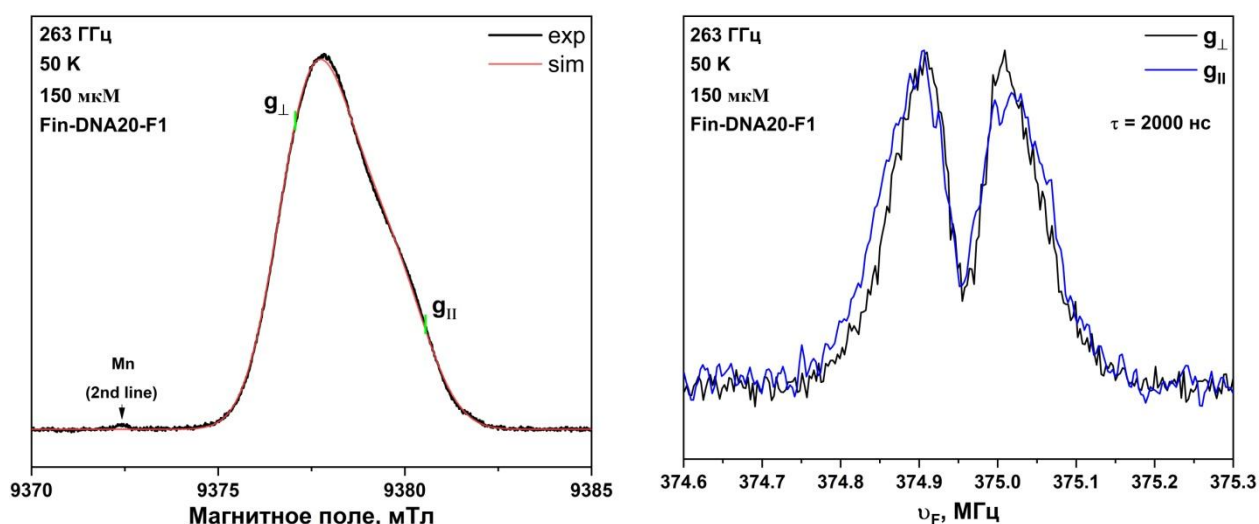


Рисунок 31 – **Слева:** указаны положения поля на эхо-детектируемом спектре ЭПР (263 ГГц), на которых были записаны спектры ДЭЯР Мимса. **Справа:** сравнение спектров ДЭЯР Мимса на частоте 263 ГГц, записанных в разных положениях поля.

Было проведено сравнение спектров ДЭЯР Мимса в положении максимального эха, записанных при трех частотах – 34, 94 и 263 ГГц. На Рисунке 32 показано, что явных отличий в форме спектров не наблюдается. Таким образом, можно сделать вывод о том, что тритил-меченные объекты можно исследовать в Q-диапазоне. Однако необходимо иметь в виду, что для проведения таких экспериментов экспериментальная установка должна быть оснащена радиочастотным усилителем мощностью порядка 1кВт.

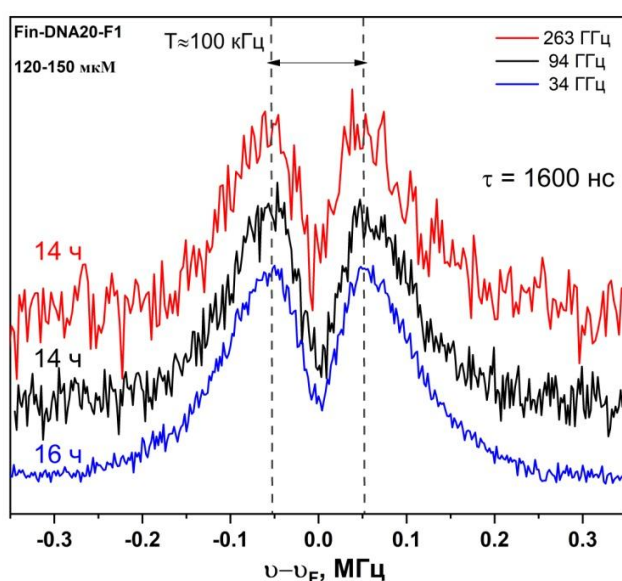


Рисунок 32 – Сравнение спектров ДЭЯР Мимса, записанных при трех разных частотах.

Кроме того, для проверки возможности измерений в Q-диапазоне, был записан 34 ГГц спектр ДЭЯР Мимса для образца Fin-DNA20-F1 в широком диапазоне ядерных частот. На Рисунке 33 мы видим четкое разделение сигналов от ядер фтора и протона, что позволило нам в дальнейшем работать с остальными объектами при данной частоте.

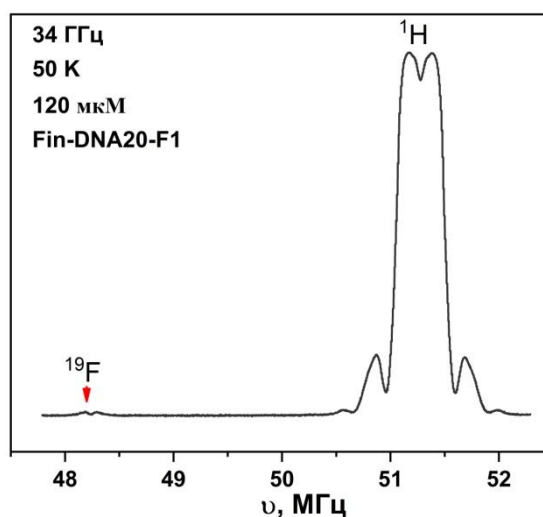


Рисунок 33 – ^{19}F и ^1H 34 ГГц спектр ДЭЯР Мимса Fin-DNA20-F1. Сигналы от ядер фтора и протона не перекрываются при данной частоте.

Одним из важных моментов при проведении экспериментов ДЭЯР Мимса является подбор правильных значений задержек между импульсами, в особенности задержки между 1-м и 2-м микроволновыми импульсами τ . При некорректном выборе времени τ возможно подавление сигнала и получение так называемых «слепых пятен». Для тритильного радикала, у которого присутствует большое количество возможных конформаций, необходимо записывать спектры при нескольких значениях τ . На Рисунке 34 (слева) показано, как происходит потеря сигнала при варьировании τ . Выбор подходящего значения τ должен исключать спектральные искажения. В то время как оба значения времени τ позволяют разрешить наиболее заметное расщепление, более длительное значение приводит к подавлению флангов и слепому пятну в пределах резонансного диапазона. Поэтому необходимо сравнивать спектры разных образцов при одних и тех же временах τ , что и было сделано и результаты представлены на Рисунке 34 (справа) для Fin и OX063.

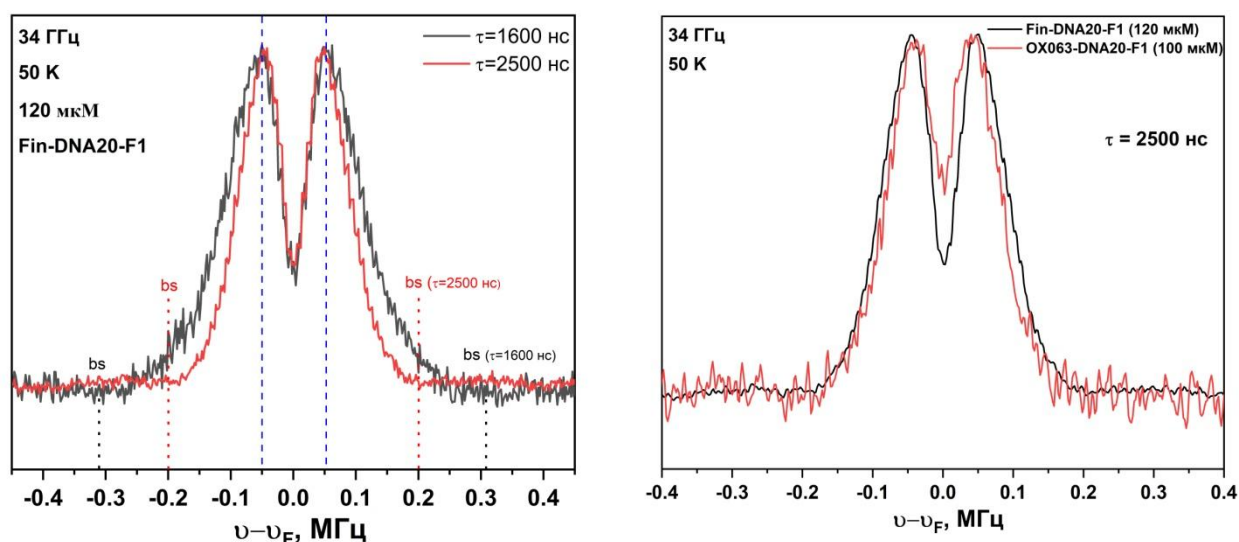


Рисунок 34 – Слева: сравнение 34 ГГц спектров ДЭЯР Мимса при 2 значениях τ образца Fin-DNA20-F1. Справа: сравнение 34 ГГц спектров ДЭЯР Мимса ДНК-дуплексов, меченных Fin и OX063, с атомом фтора в первом положении.

Сверхтонкое расщепление, наблюдаемое для OX063-DNA20-F1, меньше, чем у Fin-DNA20-F1 (Рисунок 34), а спектр OX063-DNA20-F1 менее разрешен в центре по сравнению с Fin-DNA20-F1. Соответственно, мы можем предположить наличие вклада более длинных расстояний в OX063-DNA20-F1 из-за более высокой подвижности OX063 по сравнению с гидрофобным Finland тритилом.

В Таблице 10 представлены значения сверхтонкого взаимодействия, определенные непосредственно из экспериментальных ДЭЯР спектров. Значения T_{read} определяли как расстояние между максимумами пиков спектра.

Таблица 10 – Параметры моделирования 34 ГГц спектров ДЭЯР Мимса

Образец	τ , нс	T_{read} , МГц	R_{read} , 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

Стоит отметить, что разница в значениях T_{read} при двух разных τ для образца Fin-DNA20-F1 составила всего 13 кГц, что всего в два раза превышает точность

определения этим методом (6 кГц). Расстояние R_{read} было рассчитано из соответствующего значения T_{read} путем использования приближения точечного диполя (уравнение 11).

4.3 Особенности моделирования спектров ДЭЯР и обработки распределений расстояний

Для всех меченых дуплексов ДНК мы наблюдали разрешенные спектры ДЭЯР Мимса, что позволило рассчитать T и, как следствие, расстояние R непосредственно из спектра. Для проверки достоверности полученных значений с помощью МД-моделирования были рассчитаны расстояния между фтором и центром ТАМ в исследуемых дуплексах. Значения расстояний, полученные 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 35, Рисунок 36). В этом случае удастся извлечь больше информации о терминальной структуре дуплексов ДНК. Для дуплексов, содержащих на конце пару А-У^F, для обоих типов меток ТАМ спектры, рассчитанные на основе распределения структур без учета расплетения, несколько лучше согласуются с экспериментальными спектрами. В случае ОХ063 распределение смещено в сторону больших расстояний; спектры показывают меньшее расщепление T и, как следствие, плохое разрешение. Для дуплексов с концевой парой А-Т модельные спектры на основе расплетенных структур для обоих типов радикальных меток лучше коррелируют с экспериментальными спектрами. В этом случае короткие расстояния между метками, необходимые для описания «широкого пикового основания», могут быть получены только при расплетении дуплекса и попадании ТАМ внутрь ДНК дуплекса.

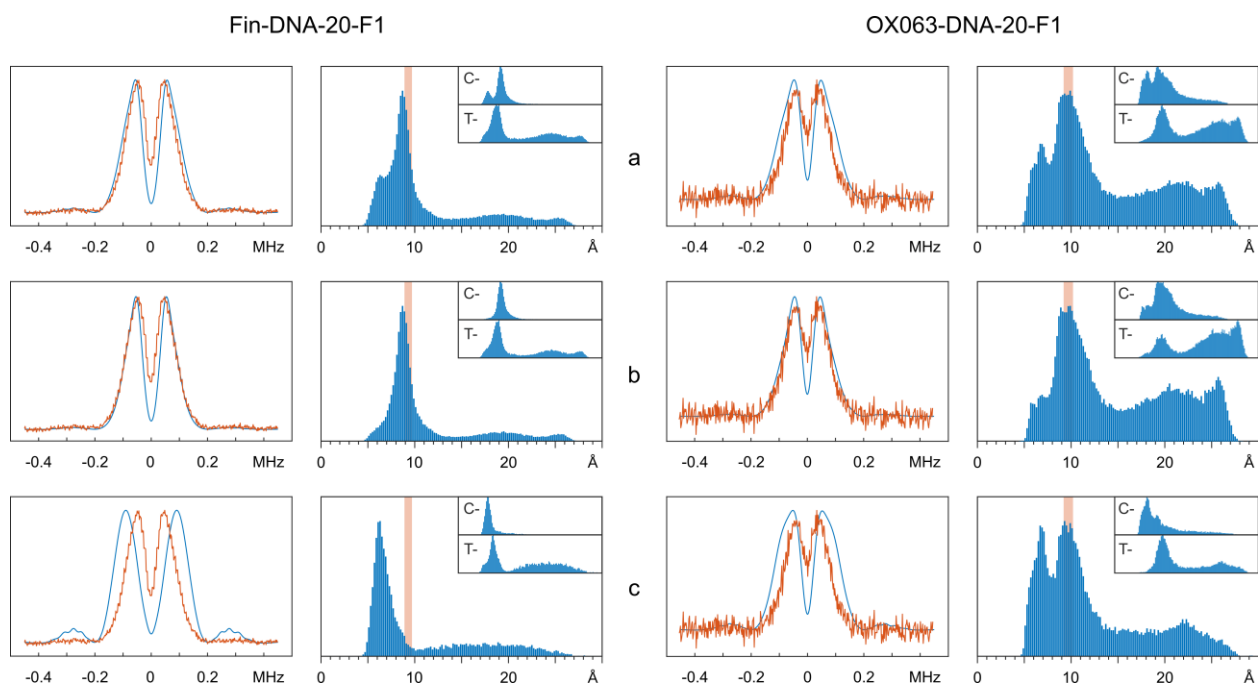


Рисунок 35 – Сравнение расчетных спектров ДЭЯР Мимса (синяя линия) с экспериментальными (оранжевая линия, $\tau = 2500$ нс) и соответствующие распределения парных расстояний между атомом F и центральным атомом углерода тритильного фрагмента, использованные для моделирования. Вставки указывают распределения для цис- ("C-") и транс- ("T-") конфигурации линкера отдельно. Оранжевой областью на распределении отмечен интервал, полученный по разности пиков экспериментального дублета (см. R_{read} в Таблице 10). а: Используются все структуры из МД б: Используются только нерасплетенные МД-структуры с: Используются только расплетенные МД-структуры.

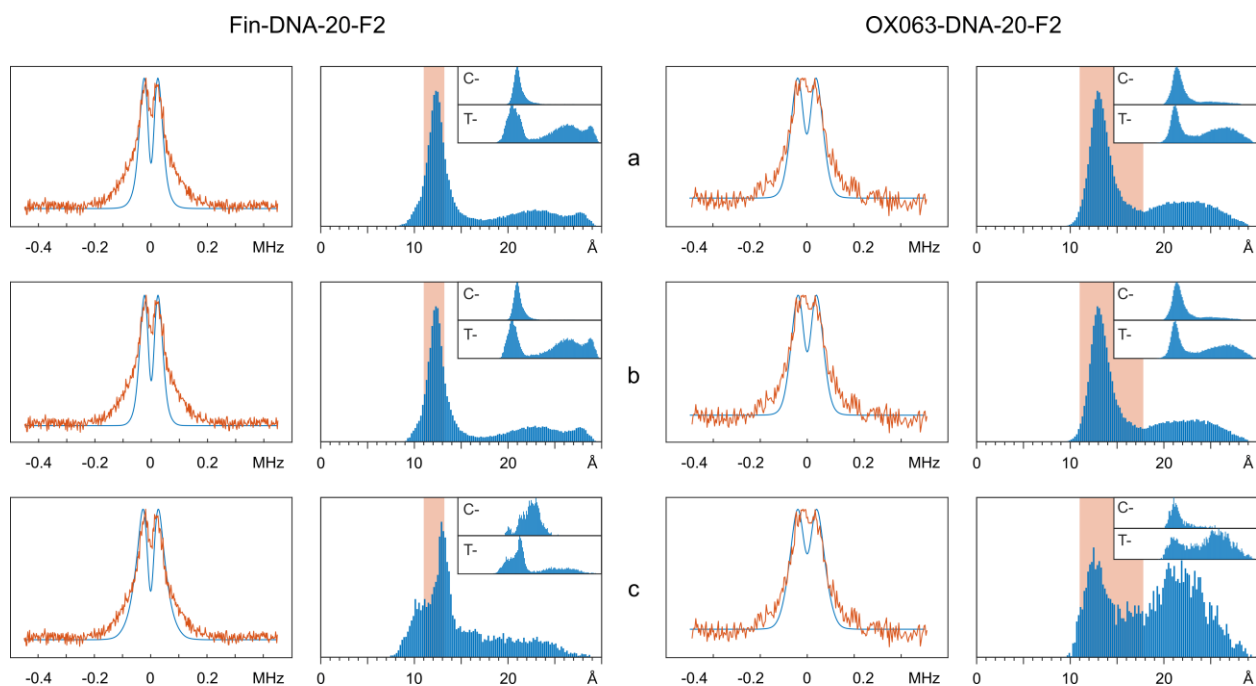


Рисунок 36 – Сравнение смоделированных спектров ДЭЯР Мимса (синяя линия) с экспериментами (оранжевая линия, $\tau=2000$ нс для Fin-DNA-20-F2 и $\tau=2500$ нс для OX063-DNA-20-F2) и соответствующими распределениями парных расстояний между F-атом и центральный атом углерода тритильного фрагмента, используемые для моделирования. Вставки указывают распределения для цис- ("С-") и транс- ("Т-") конфигурации линкера отдельно. Оранжевой областью на распределении отмечен интервал, полученный по разности пиков экспериментального дублета (см. R_{read} в Таблице 10). а: Используются все структуры из МД b: Используются только нерасплетенные МД-структуры с: Используются только расплетенные МД-структуры.

Моделирование спектров ДЭЯР Мимса (34 ГГц) было выполнено в программе *EasySpin* с использованием функции *saffron*. На первом этапе была использована аппроксимация гауссовым распределением расстояний с центром R_0 и шириной σ , которые были пересчитаны в значения сверхтонких взаимодействий. Для каждого значения R в диапазоне $[R_0-3\sigma; R_0+3\sigma]$ рассчитывался спектр ДЭЯР Мимса, после чего все спектры суммировались с соответствующими весами:

$$w = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma^2}} * e^{-\frac{(R-R_0)^2}{2\sigma^2}} \quad (12)$$

Хотя моделирование оказалось вполне удовлетворительным (Рисунок 37, красный спектр), мы предположили, что реальное распределение расстояний может быть более сложным, чем гауссово. Поэтому на втором этапе мы выполнили моделирование методом МД, чтобы получить более подробную картину возможного конформационного распределения.

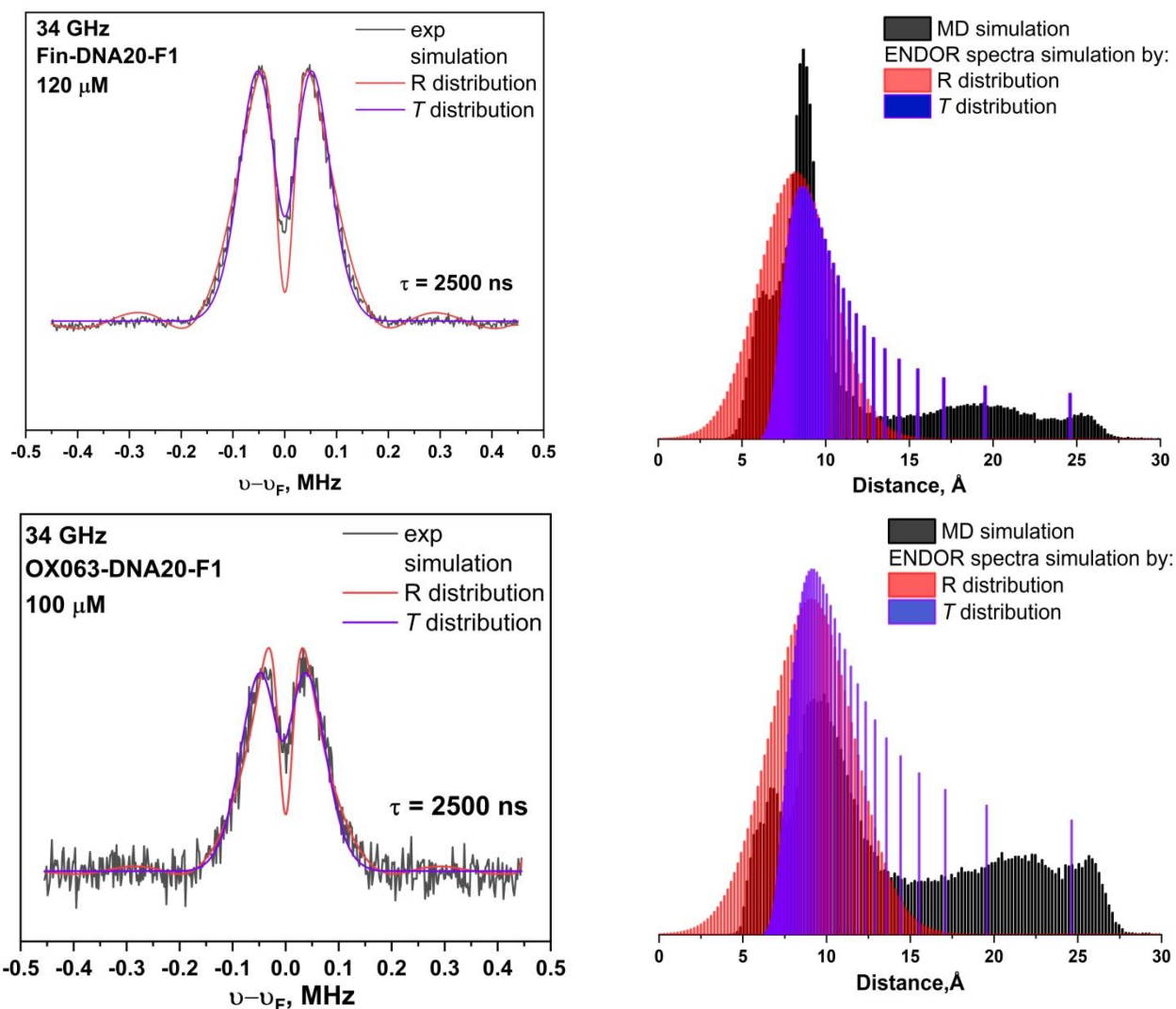


Рисунок 37 – Экспериментальные и расчетные 34 ГГц спектры ДЭЯР Мимса образцов Fin-DNA20-F1 (**сверху**) и OX063-DNA20-F1 (**снизу**); соответствующие распределения расстояний показаны справа.

Как видно из результатов МД моделирования (Рисунок 35-36), мы можем выбрать распределение, удовлетворительно описывающее экспериментальные данные. Расстояние R_{read} входит в диапазон, а центр распределения R_0 может быть смещен почти на 1 Å. Проблема, скорее всего, в том, что мы используем для описания только одно распределение Гаусса. Если мы используем моделирование с гауссовым распределением значений T (веса были рассчитаны аналогично уравнению 12), мы получим лучшее соответствие с экспериментальными спектрами (Рисунок 37). Результирующие значения T из распределения Гаусса соответствуют сложной (негауссовой) кривой распределения расстояний (синяя диаграмма на Рисунке 37, справа). Как показывают результаты МД-

моделирования (черная диаграмма), диапазон возможных расстояний представляет собой более сложное, негауссово распределение. Данный факт указывает на то, что для моделирования экспериментальных спектров ДЭЯР наиболее подходящим способом является использование гауссового распределения T . Рассчитанные значения СТВ и расстояний для разных методов приведены в Таблице 11.

Таблица 11 – Параметры моделирования 34 ГГц спектров ДЭЯР Мимса

Образец	τ , нс	T_{read} , МГц	R_{read} , Å	R_{sim} , Å $\pm \sigma$	T_{sim} , МГц $\pm \sigma$
Fin-DNA20-F1	2500	0.09 ± 0.01	9.3 ± 0.4	8.2 ± 2.2	0.12 ± 0.06
	1600	0.11 ± 0.01	8.9 ± 0.3	8.2 ± 2.0	0.14 ± 0.07
Fin-DNA20-F2	2000	0.04 ± 0.01	12.1 ± 1.1	12.9 ± 2.9 (60%) 8.6 ± 2.2 (40%)	0.04 ± 0.02 (60%) 0.12 ± 0.08 (40%)
OX063-DNA20-F1	2500	0.08 ± 0.01	9.7 ± 0.5	9.1 ± 2.5	0.10 ± 0.06
	1000	0.09 ± 0.01	9.4 ± 0.4	-	
OX063-DNA20-F2	2500	0.03 ± 0.01	14.4 ± 3.4	-	

Заключение к главе 4

В данной главе была продемонстрирована возможность применения метода высокочастотной ^{19}F ДЭЯР спектроскопии в комбинации с триарилметильными метками. Методика первоначально была отработана на модельных объектах – фтормеченых ТАМ. Было 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, что наличие ненулевого изотропного СТВ в модельных фторсодержащих триарилметильных радикалах не позволяет корректно напрямую обработать спектры ДЭЯР Мимса.

На примере тритил- и фтормеченых ДНК дуплексов была продемонстрирована применимость метода импульсной ^{19}F ДЭЯР спектроскопии в Q-диапазоне (34 ГГц), благодаря четкому разнесению сигналов от протонов тритила и атома фтора. Была 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.

ГЛАВА 5. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

5.1 Параметры записи стационарных ЭПР спектров в X - диапазоне

Все спектры ЭПР X-диапазона (~ 9.87 ГГц) были зарегистрированы на коммерческом спектрометре Bruker Eleksys E 540 (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Измерения температуры проводились с помощью резонатора ER 4119 HS в сочетании с системой контроля температуры ER 4131VT. Жидкие пробы загружали в стеклянные капилляры объемом 50 мкл, которые помещали в кварцевые пробирки. Спектры электронного спинового резонанса регистрировали при следующих настройках: микроволновая мощность 2.0 мВт; амплитуда модуляции 0.02–0.10 мТл; постоянная времени 40.96 мс; время преобразования 20.8 мс. Моделирование ЭПР спектров в жидкости проводилось в программе EasySpin (5.2.35) [135], которая доступна на сайте <http://www.easypin.org>. Количественные измерения ЭПР проводили методом сравнения со стандартным раствором ТЕМПО. Измеренные концентрации бирадикалов оказались на 6% ниже теоретических значений. Это отклонение входит в погрешность измерения данным методом; поэтому можно сделать вывод, что образцы состоят исключительно из бирадикальных фрагментов.

Для кинетических измерений спектры ЭПР записывали при тех же параметрах, но с более высокой амплитудой модуляции (0.05–0.15 мТл), чтобы оптимизировать соотношение сигнал/шум.

5.2 Приготовление проб для измерений в X - диапазоне

Для измерения кинетики восстановления были приготовлены исходные растворы нитроксильных радикалов, аскорбиновой кислоты и глутатиона в фосфатном буфере (10 мМ, pH 7.4). Значение pH 7.4. было достигнуто с помощью NaHCO_3 . Все компоненты были тщательно и быстро смешаны в небольшой пробирке для получения необходимых концентраций (радикал: 0.3 мМ, GSH: 2 мМ и аскорбат: 10–100 мМ) и вставляли в капилляр ЭПР (50 мкл). Капилляр был

закрыт с обеих сторон и помещен в резонатор ЭПР. В течение всего эксперимента контролировали спад интегральной интенсивности ЭПР спектра.

5.3 Параметры экспериментов ДЭЯР Мимса

Параметры экспериментов в Q – диапазоне (34 ГГц)

Эхо-детектируемые спектры и спектры ДЭЯР Мимса на частоте 34 ГГц регистрировали на спектрометре Bruker E580 X/Q-диапазона, оснащенном импульсным резонатором EPR/ENDOR Bruker EN 5107D2. Импульсы СВЧ подавались на усилитель TWT Q-диапазона, обеспечивающий выходную мощность ~ 170 Вт на частоте 34.1 ГГц. Образцы для измерений в Q-диапазоне имели типичный объем 10 мкл и помещались в капилляры с наружным диаметром 1.6 мм (Wilmad 222T-RB).

Параметры экспериментов в W – диапазоне (94 ГГц)

Образцы для экспериментов 94 ГГц ДЭЯР Мимса готовили в пробирках Suprasil EPR (Wilmad LabGlass, внутренний диаметр 0.5 мм [ID], внешний диаметр 0.9 мм [OD], открытые с обоих концов) при концентрациях 100-150 мкМ в смеси дейтерированной воды и d_8 - глицерин (об./об. = 1:1). Измерения проводились с помощью ЭПР-спектрометра Eleksys E680 (Bruker BioSpin), оснащенного коммерческим цилиндрическим резонатором EPR/ENDOR TE011 (EN600-1021H, Bruker BioSpin), вставленным в гелиевый проточный криостат (Oxford Instruments). При использовании усилителя СВЧ мощностью 2 Вт была достигнута типичная длина импульса $\pi/2$ 8–10 нс. Эхо-детектируемые спектры ЭПР были записаны с помощью двух-импульсной последовательности ($\pi/2$ - τ - π - τ -эхо) с временем задержки $\tau = 460$ нс.

Для экспериментов ДЭЯР Мимса ($\pi/2$ - τ - $\pi/2$ - τ - π (РЧ) - $\pi/2$ - τ -эхо) время задержки измерений τ было установлено равным 1590 нс для дуплекса 1. Радиочастотные импульсы были усилены с помощью РЧ-усилителя мощностью 250 Вт (250A250A Amplifier Research). Были использованы РЧ π -импульсы длиной 48–50 мкс (оптимизированные экспериментами по нутации Раби).

Спектры ДЭЯР были записаны с помощью стохастической радиочастотной регистрации с 10 импульсами на точку и временем повторения импульсов 18 мс. Типичное время сбора данных составляло 14 часов. Все спектры были записаны при 50 К.

Параметры экспериментов в J – диапазоне (263 ГГц)

Образцы были подготовлены так же, как и образцы для частоты 94 ГГц, с использованием капилляров Vitrocom CV2033S/Q (внутренний диаметр 0.2 мм, наружный диаметр 0.33 мм, открытые с обоих концов). Измерения проводились на спектрометре Elexsys E780 (Bruker BioSpin), оснащенный цилиндрическим резонатором EPR/ENDOR TE012 (E950110, Bruker BioSpin), помещенным в проточный гелиевый криостат (Oxford Instruments). Все эксперименты проводились при 50 К. При использовании усилителя СВЧ мощностью 100 мВт (Virginia Diodes) была достигнута типичная длина импульса $\pi/2$ 30 нс. Спектры ЭПР записывали с использованием двух-импульсной последовательности ($\pi/2$ - τ - π - τ -эхо) со временем задержки между импульсами $\tau = 350$ нс. Процедура линейаризации, реализованная Bruker BioSpin, была применена для компенсации нелинейного поведения магнитного поля во время развертки. Спектры ДЭЯР Мимса были получены с использованием тех же значений τ для всех дуплексов, что и при измерениях на частоте 94 ГГц. Радиочастотное излучение было усилено усилителем мощностью 125 Вт (модель 125 W1000, Amplifier Research). Длительность РЧ-импульса была установлена равной 50 мкс.

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.

БЛАГОДАРНОСТИ

В заключении автор работы выражает огромную благодарность научному руководителю Елене Григорьевне Багрянской за постановку задач и научное руководство; сотрудникам лаборатории азотистых соединений под руководством к. х. н. И.А. Кирилюка, к.х.н. Л.Ю. Гурской и группе изучения тритильных радикалов НИОХ СО РАН под руководством к.х.н. В.М. Тормышева за синтез нитроксильных и тритильных радикалов; к.х.н. Д.С. Новопашиной за синтез меченых ДНК олигонуклеотидов; к.ф.-м.н Суханову А.А., А. Meyer, А. Kehl за помощь в проведении экспериментов на импульсных ЭПР спектрометрах; к.х.н. А.В. Шернюкову и к.х.н. А.М. Генаеву за проведение МД моделирования и конформационного анализа исследуемых объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu Y. Trityl-nitroxide biradicals as unique molecular probes for the simultaneous measurement of redox status and oxygenation / Liu Y., Villamena F.A., Rockenbauer A., Zweier J.L. // *Chemical Communications* – 2010. – Т. 46 – № 4 – С.628–630.
2. Liu Y. Synthesis of ¹⁴N- and ¹⁵N-labeled trityl-nitroxide biradicals with strong spin-spin interaction and improved sensitivity to redox status and oxygen / Liu Y., Villamena F.A., Song Y., Sun J., Rockenbauer A., Zweier J.L. // *Journal of Organic Chemistry* – 2010. – Т. 75 – № 22 – С.7796–7802.
3. Komarov D.A. In vivo extracellular pH mapping of tumors using electron paramagnetic resonance / Komarov D.A., Ichikawa Y., Yamamoto K., Stewart N.J., Matsumoto S., Yasui H., Kirilyuk I.A., Khramtsov V. V, Inanami O., Hirata H. // *Analytical chemistry* – 2018. – Т. 90 – № 23 – С.13938–13945.
4. AU - Bobko A.A. In Vivo EPR Assessment of pH, pO₂, Redox Status, and Concentrations of Phosphate and Glutathione in the Tumor Microenvironment / AU - Bobko A.A., AU - Eubank T.D., AU - Driesschaert B., AU - Khramtsov V. V // *JoVE* – 2018. – № 133 – С.e56624.
5. Marx L. Application of a Spin-Labeled Spin-Trap to the Detection of Nitric Oxide (NO) / Marx L., Rassat A. // *Angewandte Chemie International Edition* – 2000. – Т. 39 – № 24 – С.4494–4496.
6. Drenth J. Principles of protein X-ray crystallography / J. Drenth – Springer Science & Business Media, 2007.
7. Chapman H.N. X-Ray Free-Electron Lasers for the Structure and Dynamics of Macromolecules / Chapman H.N. // *Annual Review of Biochemistry* – 2019. – Т. 88 – № 1 – С.35–58.
8. Hebert H. CryoEM: a crystals to single particles round-trip / Hebert H. // *Current Opinion in Structural Biology* – 2019. – Т. 58 – С.59–67.
9. Jeschke G. DEER distance measurements on proteins / Jeschke G. // *Annual Review of Physical Chemistry* – 2012. – Т. 63 – С.419–446.
10. Edwards T.E. Site-specific incorporation of nitroxide spin-labels into internal

sites of the TAR RNA; structure-dependent dynamics of RNA by EPR spectroscopy / Edwards T.E., Okonogi T.M., Robinson B.H., Sigurdsson S.T. // *Journal of the American Chemical Society* – 2001. – T. 123 – № 7 – C.1527–1528.

11. Sale K. Explicit treatment of spin labels in modeling of distance constraints from dipolar EPR and DEER / Sale K., Song L., Liu Y.S., Perozo E., Fajer P. // *Journal of the American Chemical Society* – 2005. – T. 127 – № 26 – C.9334–9335.

12. Dalaloyan A. Gd(III)-Gd(III) EPR distance measurements-the range of accessible distances and the impact of zero field splitting / Dalaloyan A., Qi M., Ruthstein S., Vega S., Godt A., Feintuch A., Goldfarb D. // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2015. – T. 17 – № 28 – C.18464–18476.

13. Martorana A. Probing protein conformation in cells by EPR distance measurements using Gd³⁺ spin labeling / Martorana A., Bellapadrona G., Feintuch A., Gregorio E. Di, Aime S., Goldfarb D. // *Journal of the American Chemical Society* – 2014. – T. 136 – № 38 – C.13458–13465.

14. Wagner E.P. An Undergraduate Experiment to Explore Cu(II) Coordination Environment in Multihistidine Compounds through Electron Spin Resonance Spectroscopy / Wagner E.P., Gronborg K.C., Ghosh S., Saxena S. // *Journal of Chemical Education* – 2019. – T. 96 – № 8 – C.1752–1759.

15. Reginsson G.W. Trityl radicals: Spin labels for nanometer-distance measurements / Reginsson G.W., Kunjir N.C., Sigurdsson S.T., Schiemann O. // *Chemistry - A European Journal* – 2012. – T. 18 – № 43 – C.13580–13584.

16. Krumkacheva O. Trityl radicals as spin labels / Krumkacheva O., Bagryanskaya E. // *Electron Paramagnetic Resonance. The Royal Society of Chemistry* – 2017. – 35–60c.

17. Krumkacheva O. EPR-based distance measurements at ambient temperature / Krumkacheva O., Bagryanskaya E. // *Journal of Magnetic Resonance* – 2017. – T. 280 – C.117–126.

18. Kunjir N.C. Measurements of short distances between trityl spin labels with CW EPR, DQC and PELDOR / Kunjir N.C., Reginsson G.W., Schiemann O., Sigurdsson S.T. // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2013. – T. 15 – № 45 –

C.19673–19685.

19. Krumkacheva O.A. DNA complexes with human apurinic/aprimidinic endonuclease 1: Structural insights revealed by pulsed dipolar EPR with orthogonal spin labeling / Krumkacheva O.A., Shevelev G.Y., Lomzov A.A., Dyrkheeva N.S., Kuzhelev A.A., Koval V. V., Tormyshev V.M., Polienko Y.F., Fedin M. V., Pyshnyi D. V., Lavrik O.I., Bagryanskaya E.G. // *Nucleic Acids Research* – 2019. – T. 47 – № 15 – C.7767–7780.

20. Shevelev G.Y. A Versatile Approach to Attachment of Triarylmethyl Labels to DNA for Nanoscale Structural EPR Studies at Physiological Temperatures / Shevelev G.Y., Gulyak E.L., Lomzov A.A., Kuzhelev A.A., Krumkacheva O.A., Kupryushkin M.S., Tormyshev V.M., Fedin M. V., Bagryanskaya E.G., Pyshnyi D. V. // *Journal of Physical Chemistry B* – 2018. – T. 122 – № 1 – C.137–143.

21. Meyer A. Performance of PELDOR, RIDME, SIFTER, and DQC in measuring distances in trityl based bi- and triradicals: Exchange coupling, pseudosecular coupling and multi-spin effects / Meyer A., Jassoy J.J., Spicher S., Berndhäuser A., Schiemann O. // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2018. – T. 20 – № 20 – C.13858–13869.

22. Jassoy J.J. Versatile Trityl Spin Labels for Nanometer Distance Measurements on Biomolecules In Vitro and within Cells / Jassoy J.J., Berndhäuser A., Duthie F., Kühn S.P., Hagelueken G., Schiemann O. // *Angewandte Chemie - International Edition* – 2017. – T. 56 – № 1 – C.177–181.

23. Fleck N. SLIM: A Short-Linked, Highly Redox-Stable Trityl Label for High-Sensitivity In-Cell EPR Distance Measurements / Fleck N., Heubach C.A., Hett T., Haege F.R., Bawol P.P., Baltruschat H., Schiemann O. // *Angewandte Chemie - International Edition* – 2020. – T. 59 – № 24 – C.9767–9772.

24. Dikanov S.A. T.Y..Electron Spin Echo Envelope Modulation (ESEEM) Spectroscopy / T. Y. . Dikanov S.A. – Boca Raton, Fla: CRC Press, 1992.

25. 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. – T. 59 – № 1 – C.373–379.

26. Potapov A. Distance measurements in model bis-Gd(III) complexes with flexible “bridge”. Emulation of biological molecules having flexible structure with Gd(III) labels attached / Potapov A., Song Y., Meade T.J., Goldfarb D., Astashkin A. V., Raitsimring A. // *Journal of Magnetic Resonance* – 2010. – T. 205 – № 1 – C.38–49.
27. Bondarenko V. ^{19}F Paramagnetic Relaxation-Based NMR for Quaternary Structural Restraints of Ion Channels / Bondarenko V., Wells M.M., Chen Q., Singewald K.C., Saxena S., Xu Y., Tang P. // *ACS Chemical Biology* – 2019. – T. 14 – № 10 – C.2160–2165.
28. Potapov A. Nanometer-scale distance measurements in proteins using Gd $^{3+}$ spin labeling / Potapov A., Yagi H., Huber T., Jergic S., Dixon N.E., Otting G., Goldfarb D. // *Journal of the American Chemical Society* – 2010. – T. 132 – № 26 – C.9040–9048.
29. Matei E. ^{19}F Paramagnetic Relaxation Enhancement: A Valuable Tool for Distance Measurements in Proteins / Matei E., Gronenborn A.M. // *Angewandte Chemie - International Edition* – 2016. – T. 55 – № 1 – C.150–154.
30. Seal M. Gd (III)- ^{19}F Distance Measurements of Proteins in Cells by Electron-Nuclear Double Resonance / Seal M., Zhu W., Dalaloyan A., Feintuch A., Bogdanov A., Frydman V., Su X.-C., Gronenborn A.M., Goldfarb D. // *Angewandte Chemie* – 2023.
31. Huang Y. Use of paramagnetic ^{19}F NMR to monitor domain movement in a glutamate transporter homolog / Huang Y., Wang X., Lv G., Razavi A.M., Huysmans G.H.M., Weinstein H., Bracken C., Eliezer D., Boudker O. // *Nature Chemical Biology* – 2020. – T. 16 – № 9 – C.1006–1012.
32. Judd M. Short-range ENDOR distance measurements between Gd(III) and trifluoromethyl labels in proteins / Judd M., Abdelkader E.H., Qi M., Harmer J.R., Huber T., Godt A., Savitsky A., Otting G., Cox N. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* – 2022. – T. 24 – № 41 – C.25214–25226.
33. Gimenez D. ^{19}F NMR as a tool in chemical biology / Gimenez D., Phelan A., Murphy C.D., Cobb S.L. // *Beilstein Journal of Organic Chemistry* – 2021. – T. 17 – C.293–318.

34. 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. – T. 333 – C.107091.
35. Hubbell W.L. Technological advances in site-directed spin labeling of proteins / Hubbell W.L., López C.J., Altenbach C., Yang Z. // *Current opinion in structural biology* – 2013. – T. 23 – № 5 – C.725–733.
36. Roser P. Site-directed spin labeling of proteins for distance measurements in vitro and in cells / Roser P., Schmidt M.J., Drescher M., Summerer D. // *Organic & biomolecular chemistry* – 2016. – T. 14 – № 24 – C.5468–5476.
37. Endeward B. Advanced EPR Methods for Studying Conformational Dynamics of Nucleic Acids / B. Endeward, A. Marko, V. P. Denysenkov, S. T. Sigurdsson, T. F. Prisner – Elsevier Inc., 2015. Вып. 1 – 403–425с.
38. Khramtsov V. V In vivo spectroscopy and imaging of nitroxide probes / Khramtsov V. V // *Nitroxides: Theory, Experiment and Applications* – 2012. – C.317–346.
39. Audran G. Enzymatically Shifting Nitroxides for EPR Spectroscopy and Overhauser-Enhanced Magnetic Resonance Imaging / Audran G., Bosco L., Brémond P., Franconi J.-M., Koonjoo N., Marque S.R.A., Massot P., Mellet P., Parzy E., Thiaudière E. // *Angewandte Chemie* – 2015. – T. 127 – № 45 – C.13577–13582.
40. Couet W.R. Factors affecting nitroxide reduction in ascorbate solution and tissue homogenates / Couet W.R., Brasch R.C., Sosnovsky G., Tozer T.N. // *Magnetic resonance imaging* – 1985. – T. 3 – № 1 – C.83–88.
41. Kirilyuk I.A. Effect of Sterical Shielding on the Redox Properties of Imidazoline and Imidazolidine Nitroxides / Kirilyuk I.A., Bobko A.A., Semenov S. V., Komarov D.A., Irtegoва I.G., Grigorev I.A., Bagryanskaya E. // *Journal of Organic Chemistry* – 2015. – T. 80 – № 18 – C.9118–9125.
42. Keana J.F. Influence of structure on the reduction of nitroxide MRI contrast-enhancing agents by ascorbate. / Keana J.F., Nice F.L. Van // *Physiological chemistry and physics and medical NMR* – 1984. – T. 16 – № 6 – C.477–480.
43. Morris S. Chemical and Electrochemical Reduction Rates of Cyclic Nitroxides

(Nitroxyls) / Morris S., Sosnovsky G., Hui B., Huber C.O., Rao N.U.M., Swartz H.M. // *Journal of Pharmaceutical Sciences* – 1991. – T. 80 – № 2 – C.149–152.

44. Marx L. A comparative study of the reduction by ascorbate of 1, 1, 3, 3-tetraethylisoindolin-2-ylloxyl and of 1, 1, 3, 3-tetramethylisoindolin-2-ylloxyl / Marx L., Chiarelli R., Guiberteau T., Rassat A. // *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1* – 2000. – № 8 – C.1181–1182.

45. Kirilyuk I.A. Synthesis of the tetraethyl substituted pH-sensitive nitroxides of imidazole series with enhanced stability towards reduction / Kirilyuk I.A., Bobko A.A., Grigor'ev I.A., Khramtsov V. V // *Organic & Biomolecular Chemistry* – 2004. – T. 2 – № 7 – C.1025–1030.

46. Yamasaki T. Structure- reactivity relationship of piperidine nitroxide: electrochemical, ESR and computational studies / Yamasaki T., Mito F., Ito Y., Pandian S., Kinoshita Y., Nakano K., Murugesan R., Sakai K., Utsumi H., Yamada K. // *The Journal of Organic Chemistry* – 2011. – T. 76 – № 2 – C.435–440.

47. Paletta J.T. Synthesis and Reduction Kinetics of Sterically Shielded Pyrrolidine Nitroxides / Paletta J.T., Pink M., Foley B., Rajca S., Rajca A. // *Organic Letters* – 2012. – T. 14 – № 20 – C.5322–5325.

48. Jagtap A.P. Sterically shielded spin labels for in-cell EPR spectroscopy: Analysis of stability in reducing environment / Jagtap A.P., Krstic I., Kunjir N.C., Hänsel R., Prisner T.F., Sigurdsson S.T. // *Free radical research* – 2015. – T. 49 – № 1 – C.78–85.

49. Dobrynin S.A. Synthesis of 3,4-Bis(hydroxymethyl)-2,2,5,5-tetraethylpyrrolidin-1-oxyl via 1,3-Dipolar Cycloaddition of Azomethine Ylide to Activated Alkene / Dobrynin S.A., Glazachev Y.I., Gatilov Y. V, Chernyak E.I., Salnikov G.E., Kirilyuk I.A. // *The Journal of Organic Chemistry* – 2018. – T. 83 – № 10 – C.5392–5397.

50. 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., Khramtsov V. V. // *Free Radical Biology and Medicine* – 2007. – T. 42 – № 3 – C.404–412.

51. Hicks R. Stable radicals: fundamentals and applied aspects of odd-electron compounds / R. Hicks – John Wiley & Sons, 2011.

52. Shevelev G.Y. Physiological-temperature distance measurement in nucleic acid using triarylmethyl-based spin labels and pulsed dipolar EPR spectroscopy / Shevelev G.Y., Krumkacheva O.A., Lomzov A.A., Kuzhelev A.A., Rogozhnikova O.Y., Trukhin D. V., Troitskaya T.I., Tormyshev V.M., Fedin M. V., Pyshnyi D. V., Bagryanskaya E.G. // *Journal of the American Chemical Society* – 2014. – T. 136 – № 28 – C.9874–9877.

53. Tormyshev V.M. Methanethiosulfonate Derivative of OX063 Trityl: A Promising and Efficient Reagent for Side-Directed Spin Labeling of Proteins / Tormyshev V.M., Chubarov A.S., Krumkacheva O.A., Trukhin D. V., Rogozhnikova O.Y., Spitsyna A.S., Kuzhelev A.A., Koval V. V., Fedin M. V., Godovikova T.S., Bowman M.K., Bagryanskaya E.G. // *Chemistry - A European Journal* – 2020. – T. 26 – № 12 – C.2705–2712.

54. Yang Z. A triarylmethyl spin label for long-range distance measurement at physiological temperatures using T1 relaxation enhancement / Yang Z., Bridges M.D., López C.J., Rogozhnikova O.Y., Trukhin D. V, Brooks E.K., Tormyshev V., Halpern H.J., Hubbell W.L. // *Journal of Magnetic Resonance* – 2016. – T. 269 – C.50–54.

55. Joseph B. Selective High-Resolution Detection of Membrane Protein–Ligand Interaction in Native Membranes Using Trityl–Nitroxide PELDOR / Joseph B., Tormyshev V.M., Rogozhnikova O.Y., Akhmetzyanov D., Bagryanskaya E.G., Prisner T.F. // *Angewandte Chemie International Edition* – 2016. – T. 55 – № 38 – C.11538–11542.

56. Epel B. Oxygen-Guided Radiation Therapy / Epel B., Maggio M.C., Barth E.D., Miller R.C., Pelizzari C.A., Krzykawska-Serda M., Sundramoorthy S. V, Aydogan B., Weichselbaum R.R., Tormyshev V.M., Halpern H.J. // *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics* – 2019. – T. 103 – № 4 – C.977–984.

57. Taguchi A. In vitro simultaneous mapping of the partial pressure of oxygen, pH and inorganic phosphate using electron paramagnetic resonance / Taguchi A., DeVience S., Driesschaert B., Khramtsov V. V, Hirata H. // *Analyst* – 2020. – T. 145 –

№ 9 – C.3236–3244.

58. Gorodetskii A.A. Development of multifunctional Overhauser-enhanced magnetic resonance imaging for concurrent in vivo mapping of tumor interstitial oxygenation, acidosis and inorganic phosphate concentration / Gorodetskii A.A., Eubank T.D., Driesschaert B., Poncelet M., Ellis E., Khramtsov V. V, Bobko A.A. // *Scientific Reports* – 2019. – T. 9 – № 1 – C.1–11.

59. Dhimitruka I. Phosphonated Trityl Probes for Concurrent in Vivo Tissue Oxygen and pH Monitoring Using Electron Paramagnetic Resonance-Based Techniques / Dhimitruka I., Bobko A.A., Eubank T.D., Komarov D.A., Khramtsov V. V // *Journal of the American Chemical Society* – 2013. – T. 135 – № 15 – C.5904–5910.

60. Tormyshev V.M. Trityl radicals: synthesis, properties, and applications / Tormyshev V.M., Bagryanskaya E.G. // *Russian Chemical Bulletin* – 2021. – T. 70 – № 12 – C.2278–2297.

61. Decroos C. Oxidative decarboxylation of tris-(p-carboxyltetrathiaaryl)methyl radical EPR probes by peroxidases and related heme proteins: Intermediate formation and characterization of the corresponding cations / Decroos C., Li Y., Soltani A., Frapart Y., Mansuy D., Boucher J.L. // *Archives of Biochemistry and Biophysics* – 2010. – T. 502 – № 1 – C.74–80.

62. Decroos C. Toward stable electron paramagnetic resonance oximetry probes: Synthesis, characterization, and metabolic evaluation of new ester derivatives of a tris-(para-carboxyltetrathiaaryl)methyl (TAM) radical / Decroos C., Balland V., Boucher J.L., Bertho G., Xu-Li Y., Mansuy D. // *Chemical Research in Toxicology* – 2013. – T. 26 – № 10 – C.1561–1569.

63. Tan X. Thiol-dependent reduction of the triester and triamide derivatives of Finland trityl radical triggers O₂-Dependent superoxide production / Tan X., Chen L., Song Y., Rockenbauer A., Villamena F.A., Zweier J.L., Liu Y. // *Chemical Research in Toxicology* – 2017. – T. 30 – № 9 – C.1664–1672.

64. Xia S. Reactivity of Molecular Oxygen with Ethoxycarbonyl Derivatives of Tetrathiatritylmethyl Radicals / Xia S., Villamena F.A., Hadad C.M., Kuppusamy P., Li Y., Zhu H., Zweier J.L. // *The Journal of Organic Chemistry* – 2006. – T. 71 – № 19

– C.7268–7279.

65. Zamora P.L. Clinical Probes for ROS and Oxidative Stress BT - Measuring Oxidants and Oxidative Stress in Biological Systems / под ред. L.J. Berliner, N.L. Parinandi. Cham: Springer International Publishing, 2020. – 13–38c.

66. Su Y. Magic angle spinning NMR of proteins: high-frequency dynamic nuclear polarization and ^1H detection / Su Y., Andreas L., Griffin R.G. // *Annual review of biochemistry* – 2015. – Т. 84 – С.465–497.

67. Akbey Ü. Structural biology applications of solid state MAS DNP NMR / Akbey Ü., Oschkinat H. // *Journal of Magnetic Resonance* – 2016. – Т. 269 – С.213–224.

68. Rosay M. Sensitivity-Enhanced NMR of Biological Solids: Dynamic Nuclear Polarization of Y21M fd Bacteriophage and Purple Membrane / Rosay M., Zeri A.-C., Astrof N.S., Opella S.J., Herzfeld J., Griffin R.G. // *Journal of the American Chemical Society* – 2001. – Т. 123 – № 5 – С.1010–1011.

69. Narasimhan S. DNP-Supported Solid-State NMR Spectroscopy of Proteins Inside Mammalian Cells / Narasimhan S., Scherpe S., Lucini Paioni A., Zwan J. van der, Folkers G.E., Ovaas H., Baldus M. // *Angewandte Chemie - International Edition* – 2019. – Т. 58 – № 37 – С.12969–12973.

70. Maciejko J. Photocycle-dependent conformational changes in the proteorhodopsin cross-protomer Asp-His-Trp triad revealed by DNP-enhanced MAS-NMR. / Maciejko J., Kaur J., Becker-Baldus J., Glaubitz C. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* – 2019. – Т. 116 – № 17 – С.8342–8349.

71. Lilly Thankamony A.S. Dynamic nuclear polarization for sensitivity enhancement in modern solid-state NMR / Lilly Thankamony A.S., Wittmann J.J., Kaushik M., Corzilius B. // *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* – 2017. – Т. 102–103 – С.120–195.

72. Gutmann T. Solid-state NMR of nanocrystals / Gutmann T., Groszewicz P.B., Buntkowsky G. // *Annual Reports on NMR Spectroscopy* – 2019. – Т. 97 – С.1–82.

73. Corzilius B. High-field dynamic nuclear polarization / Corzilius B. // *Annual*

Review of Physical Chemistry – 2020. – T. 71 – C.143–170.

74. Perras F.A. Optimal sample formulations for DNP SENS: The importance of radical-surface interactions / Perras F.A., Wang L.L., Manzano J.S., Chaudhary U., Opembe N.N., Johnson D.D., Slowing I.I., Pruski M. // *Current Opinion in Colloid and Interface Science* – 2018. – T. 33 – C.9–18.

75. Overhauser A.W. Polarization of nuclei in metals / Overhauser A.W. // *Physical Review* – 1953. – T. 92 – № 2 – C.411.

76. Wind R.A. Applications of dynamic nuclear polarization in ^{13}C NMR in solids / Wind R.A., Duijvestijn M.J., Lugt C. Van Der, Manenschijn A., Vriend J. // *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* – 1985. – T. 17 – C.33–67.

77. Wollan D.S. Dynamic nuclear polarization with an inhomogeneously broadened ESR line. I. Theory / Wollan D.S. // *Physical Review B* – 1976. – T. 13 – № 9 – C.3671.

78. Atsarkin V.A. Dynamic polarization of nuclei in solid dielectrics / Atsarkin V.A. // *Soviet Physics Uspekhi* – 1978. – T. 21 – № 9 – C.725.

79. Kessenikh A. V On explanation of experimental data on dynamic polarization of protons in irradiated polyethylenes / Kessenikh A. V, Manenkov A.A., Pyatnitskii G.I. // *Soviet Phys.-Solid State (English Transl.)* – 1964. – T. 6.

80. Kessenikh A. V Proton polarization in irradiated polyethylenes / Kessenikh A. V, Lushchikov V.I., Manenkov A.A., Taran Y. V // *Soviet Phys.-Solid State (English Transl.)* – 1963. – T. 5.

81. Mentink-Vigier F. Computationally Assisted Design of Polarizing Agents for Dynamic Nuclear Polarization Enhanced NMR: The AsymPol Family / Mentink-Vigier F., Marin-Montesinos I., Jagtap A.P., Halbritter T., Tol J. Van, Hediger S., Lee D., Sigurdsson S.T., Paëpe G. De // *Journal of the American Chemical Society* – 2018. – T. 140 – № 35 – C.11013–11019.

82. Equbal A. Balancing dipolar and exchange coupling in biradicals to maximize cross effect dynamic nuclear polarization / Equbal A., Tagami K., Han S. // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2020. – T. 22 – № 24 – C.13569–13579.

83. Ishiguro K. Preparation and property of 2-(3',5'-di-tert-butylphenyl-4'-oxyl)-

4,4,5,5-tetramethyl-4,5, -dihydro-1H-imidazole-3-oxide-1-oxyl / Ishiguro K., Ozaki M., Kamekura Y., Sekine N., Sawaki Y. // *Molecular Crystals and Liquid Crystals Science and Technology Section A: Molecular Crystals and Liquid Crystals* – 1997. – T. 306 – № December 2014 – C.75–80.

84. Roshchupkina G.I. In vivo EPR measurement of glutathione in tumor-bearing mice using improved disulfide biradical probe / Roshchupkina G.I., Bobko A.A., Bratasz A., Reznikov V.A., Kuppusamy P., Khramtsov V. V. // *Free Radical Biology and Medicine* – 2008. – T. 45 – № 3 – C.312–320.

85. Song C. TOTAPOL: A biradical polarizing agent for dynamic nuclear polarization experiments in aqueous media / Song C., Hu K.N., Joo C.G., Swager T.M., Griffin R.G. // *Journal of the American Chemical Society* – 2006. – T. 128 – № 35 – C.11385–11390.

86. Nagaraj M. Surface Binding of TOTAPOL Assists Structural Investigations of Amyloid Fibrils by Dynamic Nuclear Polarization NMR Spectroscopy / Nagaraj M., Franks T.W., Saeidpour S., Schubeis T. – 2016. – C.1308–1311.

87. Geiger M.-A. Efficiency of Water-Soluble Nitroxide Biradicals for Dynamic Nuclear Polarization in Rotating Solids at 9.4 T: bcTol-M and cyolyl-TOTAPOL as New Polarizing Agents / Geiger M.-A., Jagtap A.P., Kaushik M., Sun H., Stöppler D., Sigurdsson S.T., Corzilius B., Oschkinat H. // *Chemistry – A European Journal* – 2018. – T. 24 – № 51 – C.13485–13494.

88. Jagtap A.P. bcTol: a highly water-soluble biradical for efficient dynamic nuclear polarization of biomolecules / Jagtap A.P., Geiger M.-A., Stöppler D., Orwick-Rydmark M., Oschkinat H., Sigurdsson S.T. // *Chemical Communications* – 2016. – T. 52 – № 43 – C.7020–7023.

89. Sauvée C. Tailoring of Polarizing Agents in the bTurea Series for Cross-Effect Dynamic Nuclear Polarization in Aqueous Media / Sauvée C., Casano G., Abel S., Rockenbauer A., Akhmetzyanov D., Karoui H., Siri D., Aussenac F., Maas W., Weber R.T., Prisner T., Rosay M., Tordo P., Ouari O. // *Chemistry - A European Journal* – 2016. – T. 22 – № 16 – C.5598–5606.

90. Ghosh R. Stability of the nitroxide biradical AMUPol in intact and lysed

mammalian cells / Ghosh R., Dumarieh R., Xiao Y., Frederick K.K. // *Journal of Magnetic Resonance* – 2022. – T. 336 – C.107150.

91. Michaelis V.K. Biradical Polarizing Agents at High Fields / Michaelis V.K., Keeler E.G., Bahri S., Ong T.-C., Daviso E., Colvin M.T., Griffin R.G. // *The Journal of Physical Chemistry B* – 2022. – T. 126 – № 40 – C.7847–7856.

92. Kieseewetter M.K. High field dynamic nuclear polarization NMR with surfactant sheltered biradicals / Kieseewetter M.K., Michaelis V.K., Walish J.J., Griffin R.G., Swager T.M. // *Journal of Physical Chemistry B* – 2014. – T. 118 – № 7 – C.1825–1830.

93. Zagdoun A. Large molecular weight nitroxide biradicals providing efficient dynamic nuclear polarization at temperatures up to 200 K / Zagdoun A., Casano G., Ouari O., Schwarzwälder M., Rossini A.J., Aussenac F., Yulikov M., Jeschke G., Copéret C., Lesage A., Tordo P., Emsley L. // *Journal of the American Chemical Society* – 2013. – T. 135 – № 34 – C.12790–12797.

94. Lund A. TinyPols: A family of water-soluble binitroxides tailored for dynamic nuclear polarization enhanced NMR spectroscopy at 18.8 and 21.1 T / Lund A., Casano G., Menzildjian G., Kaushik M., Stevanato G., Yulikov M., Jabbour R., Wisser D., Renom-Carrasco M., Thieuleux C., Bernada F., Karoui H., Siri D., Rosay M., Sergeyev I. V., Gajan D., Lelli M., Emsley L., Ouari O., Lesage A. // *Chemical Science* – 2020. – T. 11 – № 10 – C.2810–2818.

95. Harrabi R. Highly Efficient Polarizing Agents for MAS-DNP of Proton-Dense Molecular Solids / Harrabi R., Halbritter T., Aussenac F., Dakhlaoui O., Tol J. van, Damodaran K.K., Lee D., Paul S., Hediger S., Mentink-Vigier F., Sigurdsson S.T., Paëpe G. De // *Angewandte Chemie - International Edition* – 2022. – T. 61 – № 12 – C.1–9.

96. Mathies G. Efficient Dynamic Nuclear Polarization at 800 MHz/527 GHz with Trityl-Nitroxide Biradicals / Mathies G., Caporini M.A., Michaelis V.K., Liu Y., Hu K.N., Mance D., Zweier J.L., Rosay M., Baldus M., Griffin R.G. // *Angewandte Chemie - International Edition* – 2015. – T. 54 – № 40 – C.11770–11774.

97. Zhai W. Postmodification via Thiol-Click Chemistry Yields Hydrophilic

Triptyl-Nitroxide Biradicals for Biomolecular High-Field Dynamic Nuclear Polarization / Zhai W., Lucini Paioni A., Cai X., Narasimhan S., Medeiros-Silva J., Zhang W., Rockenbauer A., Weingarth M., Song Y., Baldus M., Liu Y. // *The Journal of Physical Chemistry B* – 2020. – T. 124 – № 41 – C.9047–9060.

98. Wisser D. BDPA-Nitroxide Biradicals Tailored for Efficient Dynamic Nuclear Polarization Enhanced Solid-State NMR at Magnetic Fields up to 21.1 T / Wisser D., Karthikeyan G., Lund A., Casano G., Karoui H., Yulikov M., Menzildjian G., Pinon A.C., Pura A., Engelke F., Chaudhari S.R., Kubicki D., Rossini A.J., Moroz I.B., Gajan D., Copéret C., Jeschke G., Lelli M., Emsley L., Lesage A., Ouari O. // *Journal of the American Chemical Society* – 2018. – T. 140 – № 41 – C.13340–13349.

99. Dane E.L. Synthesis of a BDPA-TEMPO biradical / Dane E.L., Maly T., Debelouchina G.T., Griffin R.G., Swager T.M. // *Organic Letters* – 2009. – T. 11 – № 9 – C.1871–1874.

100. Mandal S. On the Limited Stability of BDPA Radicals / Mandal S., Sigurdsson S.T. // *Chemistry - A European Journal* – 2020. – T. 26 – № 33 – C.7486–7491.

101. Mandal S. Water-soluble BDPA radicals with improved persistence / Mandal S., Sigurdsson S.T. // *Chemical Communications* – 2020. – T. 56 – № 86 – C.13121–13124.

102. Bothe S. Novel Biradicals for Direct Excitation Highfield Dynamic Nuclear Polarization / Bothe S., Nowag J., Klimavičius V., Hoffmann M., Troitskaya T.I., Amosov E. V., Tormyshev V.M., Kirilyuk I., Taratayko A., Kuzhelev A., Parkhomenko D., Bagryanskaya E., Gutmann T., Buntkowsky G. // *Journal of Physical Chemistry C* – 2018. – T. 122 – № 21 – C.11422–11432.

103. Cai X. Highly Efficient Triptyl-Nitroxide Biradicals for Biomolecular High-Field Dynamic Nuclear Polarization / Cai X., Paioni L., Adler A., Yao R., Zhang W.

104. Specker E. Neurotoxin II Bound to Acetylcholine Receptors in Native Membranes / Specker E., Rossum B. Van, Linden A.H., Lange S., Franks W.T. – 2011. – C.19266–19269.

105. McCoy K.M. Stability of nitroxide biradical TOTAPOL in biological samples

/ McCoy K.M., Rogawski R., Stovicek O., McDermott A.E. // *Journal of Magnetic Resonance* – 2019. – Т. 303 – С.115–120.

106. Ward R. Interspin Distance Determination by EPR BT - *Encyclopedia of Biophysics* / под ред. G.C.K. Roberts. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. – 1116–1123с.

107. Якимченко О.Е. Радикальные пары в исследовании элементарных химических реакций в твердых органических веществах / Якимченко О.Е., Лебедев Я.С. // *Успехи химии* – 1978. – Т. 47 – № 6 – С.1018–1047.

108. Milov A.D. Application of the double resonance method to electron spin echo in a study of the spatial distribution of paramagnetic centers in solids / Milov A.D., Salikhov K.M., Shirov M.D. // *Sov. Phys. Solid State* – 1981. – Т. 23 – С.565–569.

109. Shevelev G.Y. Triarylmethyl Labels: Toward Improving the Accuracy of EPR Nanoscale Distance Measurements in DNAs / Shevelev G.Y., Krumkacheva O.A., Lomzov A.A., Kuzhelev A.A., Trukhin D. V., Rogozhnikova O.Y., Tormyshev V.M., Pyshnyi D. V., Fedin M. V., Bagryanskaya E.G. // *Journal of Physical Chemistry B* – 2015. – Т. 119 – № 43 – С.13641–13648.

110. Davies E.R. A new pulse ENDOR technique / Davies E.R. // *Physics Letters A* – 1974. – Т. 47 – № 1 – С.1–2.

111. Mims W.B. Pulsed ENDOR experiments / Mims W.B. // *Proceedings of the Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences* – 1965. – Т. 283 – № 1395 – С.452–457.

112. Harmer J.R. Hyperfine spectroscopy-ENDOR / Harmer J.R. // *eMagRes* – 2016. – Т. 5 – № 4 – С.1493–1514.

113. Bowman M.K. The solution conformation of triarylmethyl radicals / Bowman M.K., Mailer C., Halpern H.J. // *Journal of Magnetic Resonance* – 2005. – Т. 172 – № 2 – С.254–267.

114. Trukhan S.N. Hyperfine interactions of narrow-line trityl radical with solvent molecules / Trukhan S.N., Yudanov V.F., Tormyshev V.M., Rogozhnikova O.Y., Trukhin D. V., Bowman M.K., Krzyaniak M.D., Chen H., Martyanov O.N. // *Journal of Magnetic Resonance* – 2013. – Т. 233 – С.29–36.

115. Bobko A.A. EPR and quantum chemical studies of the pH-sensitive imidazoline and imidazolidine nitroxides with bulky substituents / Bobko A.A., Kirilyuk I.A., Gritsan N.P., Polovyanenko D.N., Grigor'ev I.A., Khramtsov V. V, Bagryanskaya E.G. // *Applied magnetic resonance* – 2010. – T. 39 – C.437–451.

116. Reichardt C. *Solvent effects in organic chemistry* / Reichardt C. – 1979.

117. Zhurko I.F. 2-Butyl-2-tert-butyl-5,5-diethylpyrrolidine-1-oxyls: Synthesis and properties / Zhurko I.F., Dobrynin S., Gorodetskii A.A., Glazachev Y.I., Rybalova T. V., Chernyak E.I., Asanbaeva N., Bagryanskaya E.G., Kirilyuk I.A. // *Molecules* – 2020. – T. 25 – № 4 – C.1–17.

118. Dhimitruka I. Synthesis and characterization of amino derivatives of persistent trityl radicals as dual function pH and oxygen paramagnetic probes / Dhimitruka I., Bobko A.A., Hadad C.M., Zweier J.L., Khramtsov V. V // *Journal of the American Chemical Society* – 2008. – T. 130 – № 32 – C.10780–10787.

119. Driesschaert B. A phosphonated triarylmethyl radical as a probe for measurement of pH by EPR / Driesschaert B., Marchand V., Levêque P., Gallez B., Marchand-Brynaert J. // *Chemical Communications* – 2012. – T. 48 – № 34 – C.4049–4051.

120. Bobko A.A. Dual-function pH and oxygen phosphonated trityl probe / Bobko A.A., Dhimitruka I., Komarov D.A., Khramtsov V. V // *Analytical chemistry* – 2012. – T. 84 – № 14 – C.6054–6060.

121. Rogozhnikova O.Y. A Simple and Convenient Synthesis of a Multifunctional Spin Probe , Phosphonate Derivative of a Persistent Radical of the Triarylmethyl Series / Rogozhnikova O.Y., Trukhin D. V, Asanbaeva N.B., Tormyshev V.M. – 2021. – T. 57 – № 6 – C.905–913.

122. Asanbaeva N.B. An EPR Study on Highly Stable Nitroxyl-Nitroxyl Biradicals for Dynamic Nuclear Polarization Applications at High Magnetic Fields / Asanbaeva N.B., Dobrynin S.A., Morozov D.A., Haro-Mares N., Gutmann T., Buntkowsky G., Bagryanskaya E.G. // *Molecules* – 2023. – T. 28 – № 4 – C.1926.

123. Stevanato G. Open and Closed Radicals: Local Geometry Around Unpaired Electrons Governs MAS DNP Performance / Stevanato G., Casano G., Kubicki D., Rao

Y., Esteban Hofer L., Menzildjian G., Karoui H., Siri D., Cordova M., Yulikov M., Jeschke G., Lelli M., Lesage A., Ouari O., Emsley L. // *Journal of the American Chemical Society* – 2020. – № 2 – C.1–49.

124. Pracht P. Automated exploration of the low-energy chemical space with fast quantum chemical methods / Pracht P., Bohle F., Grimme S. // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2020. – T. 22 – № 14 – C.7169–7192.

125. Spicher S. Robust atomistic modeling of materials, organometallic, and biochemical systems / Spicher S., Grimme S. // *Angewandte Chemie International Edition* – 2020. – T. 59 – № 36 – C.15665–15673.

126. Decroos C. Oxidative and reductive metabolism of tris(*p*-carboxyltetrahydroarylmethyl)radicals by liver microsomes / Decroos C., Li Y., Bertho G., Frapart Y., Mansuy D., Boucher J.L. // *Chemical Research in Toxicology* – 2009. – T. 22 – № 7 – C.1342–1350.

127. Chen L. Synthesis and Redox Properties of Water-Soluble Asymmetric Trityl Radicals / Chen L., Wu L., Tan X., Rockenbauer A., Song Y., Liu Y. // *The Journal of Organic Chemistry* – 2021. – T. 86 – № 12 – C.8351–8364.

128. Asanbaeva N.B. Effects of Spiro-Cyclohexane Substitution of Nitroxyl Biradicals on Dynamic Nuclear Polarization / Asanbaeva N.B., Gurskaya L.Y., Polienko Y.F., Rybalova T. V, Kazantsev M.S., Dmitriev A.A., Gritsan N.P., Haromares N., Gutmann T., Buntkowsky G., Tretyakov E. V, Bagryanskaya E.G. – 2022.

129. Kathirvelu V. Relaxation rates for spirocyclohexyl nitroxyl radicals are suitable for interspin distance measurements at temperatures up to about 125 K / Kathirvelu V., Smith C., Parks C., Mannan M.A., Miura Y., Takeshita K., Eaton S.S., Eaton G.R. // *Chemical Communications* – 2009. – № 4 – C.454–456.

130. Kirilyuk I.A. Synthesis of 2,5-bis(spirocyclohexane)-substituted nitroxides of pyrroline and pyrrolidine series, including thiol-specific spin label: An analogue of MTSSL with long relaxation time / Kirilyuk I.A., Polienko Y.F., Krumkacheva O.A., Strizhakov R.K., Gatilov Y. V., Grigor'ev I.A., Bagryanskaya E.G. // *Journal of Organic Chemistry* – 2012. – T. 77 – № 18 – C.8016–8027.

131. Rajca A. A spirocyclohexyl nitroxide amino acid spin label for pulsed EPR

spectroscopy distance measurements / Rajca A., Kathirvelu V., Roy S.K., Pink M., Rajca S., Sarkar S., Eaton S.S., Eaton G.R. // *Chemistry - A European Journal* – 2010. – T. 16 – № 19 – C.5778–5782.

132. Molina P.I. Reactivity of 1,3-diaryl-2,4-bis(heteroarylimino)-1,3-diazetidines. Formation of N1,N2,N3,N4,N5-pentasubstituted biguanides / Molina P.I., Alajarin M., Lopez-Leonardo C., Foces-Foces M.C., Cano F.H., Claramunt R.M., Elguero J. // *Journal of Organic Chemistry* – 1989. – T. 54 – C.1264–1268.

133. Grytsai O. Synthetic accesses to biguanide compounds / Grytsai O., Ronco C., Benhida R. // *Beilstein Journal of Organic Chemistry* – 2021. – T. 17 – № i – C.1001–1040.

134. Asanbaeva N.B. Application of W-band ^{19}F electron nuclear double resonance (ENDOR) spectroscopy to distance measurement using a trityl spin probe and a fluorine label† / Asanbaeva N.B., Sukhanov A.A., Diveikina A.A., Rogozhnikova O.Y., Trukhin D. V., Tormyshev V.M., Chubarov A.S., Maryasov A.G., Genaev A.M., Shernyukov A. V., Salnikov G.E., Lomzov A.A., Pyshnyi D. V., Bagryanskaya E.G. // *Physical Chemistry Chemical Physics* – 2022. – T. 24 – № 10 – C.5982–6001.

135. Stoll S. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR / Stoll S., Schweiger A. // *Journal of Magnetic Resonance* – 2006. – T. 178 – № 1 – C.42–55.